

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Mariana de Oliveira Souza

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *Bacillus* sp. E
GÊNEROS RELACIONADOS PROVENIENTES DE ANÁLISES DE PRODUTOS
FARMACÊUTICOS**

Rio de Janeiro

2011

Mariana de Oliveira Souza

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *Bacillus* sp. E GÊNEROS
RELACIONADOS PROVENIENTES DE ANÁLISES DE PRODUTOS
FARMACÊUTICOS

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Vigilância
Sanitária do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz
como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadora: Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro

2011

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Souza, Mariana de Oliveira

Caracterização fenotípica e molecular de *Bacillus* sp. e gêneros relacionados provenientes de análises de produtos farmacêuticos / Mariana de Oliveira Souza – Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2011.

161 f.: il.

Orientadora: Verônica Viana Vieira.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2011.

1. Identificação. 2. *Bacillus* e gêneros relacionados. 3. 16S rRNA. 4. VITEK. 5. API.

Mariana de Oliveira Souza

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *Bacillus* sp. E GÊNEROS
RELACIONADOS PROVENIENTES DE ANÁLISES DE PRODUTOS
FARMACÊUTICOS

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Vigilância
Sanitária do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz
como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadora: Verônica Viana Vieira

Aprovado em ____/____/____

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Ana Luíza de Mattos Guaraldi (Doutor)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Fabio Faria da Mota (Doutor)
Fundação Oswaldo Cruz

Verônica Viana Vieira (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho a Deus por Seu imenso amor que foi expresso de diversas formas dentre elas a presença de pessoas tão maravilhosas, especiais e fundamentais em minha vida como minha família e meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação deve muito a algumas pessoas e instituições, por diferentes razões e eu gostaria de agradecer especialmente:

A CAPES pela bolsa durante os dois anos de estudo.

À Coordenação da Pós-Graduação pela prontidão com que me atendeu durante a realização desse trabalho.

À Verônica por compartilhar comigo seu tema de pesquisa, pela orientação e pela confiança durante a realização desse trabalho. Espero que você fique tão feliz com o resultado quanto eu fiquei!

Aos membros da banca examinadora: Maria Helena Simões Villas Bôas, Fabio Faria da Mota e Ana Luíza de Mattos Guaraldi pelas sugestões feitas.

Aos meus companheiros do IDBAC João, Carmen e Livia: aprendi e também me diverti muito com vocês! Foi ótimo o tempo que passamos juntos!

Ao pessoal dos Setores de Esterilidade, Biologia Molecular e Esterilização: vocês foram indispensáveis para a realização desse trabalho e a todos do Departamento de Microbiologia do INCQS que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

À minha mãe Helena, pelo amor incondicional, pelo companheirismo, pelo exemplo de vida, por todas as críticas construtivas e por ter SEMPRE estado ao meu lado me apoiando. Mais uma etapa cumprida, mãe, temos que pensar qual será a próxima.

Ao meu pai Wanderley, aos meus avós Jô e Mauri, à minha madrastra Ana Lisa, ao meu padrasto Sérgio, aos meus irmãos Thiago, Filipe, Fernanda, Pedro e André, às minhas tias Josetti e Cláudia, à minha afilhada Gabriela e a toda a minha família: cada um de vocês é um presente de Deus pra mim, vocês são meu alicerce e cada um tem um lugar especial no meu coração! A presença de vocês na minha vida foi fundamental para que eu conseguisse finalizar mais essa etapa e continuará sendo essencial para todas as vitórias que eu pretendo conquistar. Amo muito todos vocês!

Aos meus amigos, que são a família que eu escolhi, agradeço citando o poeta Vinícius de Moraes: "A amizade é um sentimento mais nobre do que o amor, eis que permite que o objeto dela se divida em outros afetos, enquanto o amor tem intrínseco o ciúme, que não admite a rivalidade. E eu poderia suportar, embora não

sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!”.

À equipe que me ajuda a manter a minha saúde: Andréa Caputi (a única nutricionista capaz de fazer uma dieta que eu pudesse seguir), José Marcos Cunha (meu clínico geral e pra quem eu corro nos momentos de crise), Renata Campos (a fisioterapeuta responsável por eu ter conseguido digitar essa dissertação), Ricardo Albuquerque (o profissional de educação física que conhece melhor que eu o limite da minha glicose e do meu ombro), Ronaldo Kneipp (o endocrinologista que diz que fica mais feliz do que eu com meus HbA1c, TSH, T4 e T3 controlados) e Zartur Menegassi (o ortopedista que me faz chorar fazendo meu ombro mexer). Vocês têm uma participação muito importante na finalização desse trabalho. Muito obrigada a todos!

RESUMO

Os produtos que requerem a característica de esterilidade devem ser submetidos ao Ensaio de Esterilidade Bacteriana e Fúngica assim como o ambiente de execução desse teste, a fim de evitar resultados falso-positivos. A legislação recomenda a identificação de microrganismos provenientes dos Ensaio e do ambiente onde estes foram realizados. A dificuldade da identificação de vários gêneros por metodologias fenotípicas e identificações equivocadas de bastonetes Gram positivos esporulados (BGPE) têm sido relatadas em vários estudos e mostram a necessidade da utilização de metodologias moleculares mais adequadas a essa identificação. Para tal, a análise da sequência do gene 16S rRNA tem sido promissora uma vez que este gene é universal para bactérias e está disponível em bancos de dados em uma grande quantidade de sequências permitindo, assim, a comparação das sequências de isolados bacterianos desconhecidos. O objetivo do presente estudo foi avaliar isolados bacterianos de BGPE provenientes de testes de esterilidade de produtos farmacêuticos e do controle ambiental das áreas onde são realizados estes testes. Para atingir esse objetivo foram avaliados 83 dos isolados bacterianos encaminhados para o Setor de Identificação Bacteriana do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz utilizando duas metodologias fenotípicas, os sistemas comerciais API 50CHB e VITEK 32 cartão BAC e uma genotípica, a análise da sequência do gene 16S rRNA. O API e o VITEK identificaram a espécie ou as prováveis espécies de 54% dos isolados bacterianos. Através da análise da sequência do gene 16S rRNA foram identificados os gêneros de todos os isolados bacterianos, que são: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Terribacillus*, *Lysinibacillus*, *Cohnella*, *Oceanobacillus* e *Paenisporosarcina*. Essa análise também mostrou que 18% dos isolados bacterianos avaliados podem fazer parte de espécies ainda não descritas.

Palavras-chave: Identificação, *Bacillus* e gêneros relacionados, 16S rRNA, VITEK, API.

ABSTRACT

Sterile products must be submitted to test for sterility as well as the environment where these tests are performed in order to avoid false-positive results. Brazilian law recommends the identification of microorganisms from sterility tests and the environment where these tests were performed. It has been reported in several papers difficulty in identifying various genera using phenotypic methods and also erroneous identification of *Bacillus* and related genera. It suggests the need of molecular methods which is more suitable for identifying these bacteria. Sequence analysis of 16S rRNA gene has contributed to bacterial identification, since this gene is universal for bacteria and a lot of sequences are available in databases, thus enabling the comparison of sequences of unknown bacterial samples. The aim of this study was to evaluate samples of *Bacillus* and related genera isolated from pharmaceutical products and environmental control of the areas where these tests are performed. To achieve this objective, we evaluated 83 samples of *Bacillus* and related genera sent to the Division of Bacterial Identification Department of Microbiology of National Institute of Quality Control in Health of Oswaldo Cruz Foundation using two phenotypic methodologies: commercial systems API 50CHB and VITEK 32 BAC card and a genotypic, analysis of 16S rRNA gene sequence. API and VITEK identified the species or group of species of 54% of the samples. It was identified the genera of all samples using sequence analysis of 16S rRNA gene, which were: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Terribacillus*, *Lysinibacillus*, *Cohnella*, *Oceanobacillus* and *Paenisporosarcina*. This analysis also showed that 18% of the samples might be from undescribed species.

Keywords: Identification, *Bacillus* and related genera, 16S rRNA, VITEK, API.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Avaliação da identificação de <i>Bacillus</i> spp. e gêneros relacionados utilizando o sistema API e usando-se o sequenciamento do gene 16S rRNA como referência	43
Figura 2 Avaliação da identificação de <i>Bacillus</i> spp. e gêneros relacionados utilizando o sistema VITEK e usando-se o sequenciamento do gene 16S rRNA como referência	44
Figura 3 Identificação de <i>Bacillus</i> spp. e gêneros relacionados utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA.....	44
Figura 4 Árvore filogenética baseada no método <i>neighbor-joining</i> usando sequências do gene 16S rRNA de isolados bacterianos do gênero <i>Bacillus</i> . As distâncias estimadas foram calculadas usando o modelo Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de <i>Bootstrap</i> após 1000 simulações é mostrada e a sequência do gene 16S rRNA de <i>Paenibacillus polymyxa</i> foi usada como grupo de fora.....	94
Figura 5 Árvore filogenética baseada no método <i>neighbor-joining</i> usando sequências do gene 16S rRNA de isolados bacterianos do gênero <i>Bacillus</i> . As distâncias estimadas foram calculadas usando o modelo Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de <i>Bootstrap</i> após 1000 simulações é mostrada e a sequência do gene 16S rRNA de <i>Paenibacillus polymyxa</i> foi usada como grupo de fora.....	95
Figura 6 Árvore filogenética baseada no método <i>neighbor-joining</i> usando sequências do gene 16S rRNA de isolados bacterianos do gênero <i>Bacillus</i> . As distâncias estimadas foram calculadas usando o modelo Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de <i>Bootstrap</i> após 1000 simulações é mostrada e a sequência do gene 16S rRNA de <i>Paenibacillus polymyxa</i> foi usada como grupo de fora.....	96
Figura 7 Árvore filogenética baseada no método <i>neighbor-joining</i> usando sequências do gene 16S rRNA de isolados bacterianos do gênero <i>Paenibacillus</i> . As distâncias estimadas foram calculadas usando o modelo Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de <i>Bootstrap</i> após 1000 simulações é mostrada e a sequência do gene 16S rRNA de <i>Bacillus subtilis</i> foi usada como grupo de fora.....	97
Figura 8 Árvore filogenética baseada no método <i>neighbor-joining</i> usando sequências do gene 16S rRNA de isolados bacterianos do gênero <i>Cohnella</i> . As distâncias estimadas foram calculadas usando o modelo Kimura 2 parâmetros. A porcentagem	

de *Bootstrap* após 1000 simulações é mostrada e a sequência do gene 16S rRNA de *Bacillus subtilis* foi usada como grupo de fora.....98

Figura 9 Árvore filogenética baseada no método *neighbor-joining* usando sequências do gene 16S rRNA de isolados bacterianos de gêneros relacionados ao gênero *Bacillus*. As distâncias estimadas foram calculadas usando o modelo Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de *Bootstrap* após 1000 simulações é mostrada e a sequência do gene 16S rRNA de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrue* foi usada como grupo de fora99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Lista de gêneros e número de espécies da família <i>Bacillaceae</i> segundo Logan e colaboradores (2009) e Euzéby (2010)	26
Tabela 2 Lista de famílias, gêneros e número de espécies de bactérias relacionadas ao gênero <i>Bacillus</i> segundo Logan e colaboradores (2009) e Euzéby (2010)	27
Tabela 3 Dados dos isolados bacterianos utilizados neste estudo	36
Tabela 4 Iniciadores utilizados nas reações de PCR e de sequenciamento	40
Tabela 5 Iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento.....	40
Tabela 6 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus megaterium</i>	46
Tabela 7 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus megaterium</i>	47
Tabela 8 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus megaterium</i>	48
Tabela 9 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus megaterium</i>	50
Tabela 10 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus pumilus</i>	53
Tabela 11 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus pumilus</i>	54
Tabela 12 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus pumilus</i>	55
Tabela 13 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus pumilus</i>	56
Tabela 14 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus cereus</i>	59
Tabela 15 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus cereus</i>	60
Tabela 16 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus cereus</i>	61

Tabela 17 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus cereus</i>	62
Tabela 18 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus subtilis</i>	64
Tabela 19 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus subtilis</i>	65
Tabela 20 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus subtilis</i>	66
Tabela 21 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus subtilis</i>	67
Tabela 22 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus licheniformis</i>	69
Tabela 23 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus licheniformis</i>	69
Tabela 24 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus licheniformis</i>	70
Tabela 25 Resultados da identificação utilizando análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos do grupo <i>Bacillus licheniformis</i>	70
Tabela 26 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. relacionados à espécie <i>Bacillus humi</i>	Erro!
Indicador não definido.	
Tabela 27 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. relacionados à espécie <i>Bacillus humi</i>	73
Tabela 28 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. relacionados à espécie <i>Bacillus humi</i>	74
Tabela 29 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. relacionados à espécie <i>Bacillus humi</i>	74
Tabela 30 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos de outras espécies do gênero <i>Bacillus</i>	76

Tabela 31 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos de outras espécies do gênero <i>Bacillus</i>	77
Tabela 32 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos de outras espécies do gênero <i>Bacillus</i>	78
Tabela 33 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos de outras espécies do gênero <i>Bacillus</i>	79
Tabela 34 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos de <i>Paenibacillus fonticola</i>	81
Tabela 35 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos de <i>Paenibacillus fonticola</i>	81
Tabela 36 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos de <i>Paenibacillus fonticola</i>	82
Tabela 37 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos de <i>Paenibacillus fonticola</i>	82
Tabela 38 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos de <i>Paenibacillus humicus</i>	84
Tabela 39 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos de <i>Paenibacillus humicus</i>	84
Tabela 40 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos de <i>Paenibacillus humicus</i>	85
Tabela 41 Resultado da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos de <i>Paenibacillus humicus</i>	85
Tabela 42 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos de outras espécies do gênero <i>Paenibacillus</i>	87
Tabela 43 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos de outras espécies do gênero <i>Paenibacillus</i>	87
Tabela 44 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos de outras espécies do gênero <i>Paenibacillus</i>	88
Tabela 45 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos de outras espécies do gênero <i>Paenibacillus</i>	89

Tabela 46 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos de outros gêneros relacionados ao gênero <i>Bacillus</i>	91
Tabela 47 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos de outros gêneros relacionados ao gênero <i>Bacillus</i>	91
Tabela 48 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos de outros gêneros relacionados ao gênero <i>Bacillus</i>	92
Tabela 49 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos de outros gêneros relacionados ao gênero <i>Bacillus</i>	92
Tabela 50 Testes bioquímicos contemplados nos sistemas API e VITEK	102
Tabela 51 Espécies Bacterianas de <i>Bacillus</i> e Gêneros Relacionados Identificadas pelos Sistemas VITEK e API.....	103
Tabela 52 Espécies identificadas pelos sistemas VITEK e API e espécies existentes na família <i>Bacillaceae</i>	104
Tabela 53 Espécies identificadas pelos sistemas VITEK e API e espécies existentes em famílias relacionadas ao gênero <i>Bacillus</i>	105
Tabela 54 Comparação das características fenotípicas de <i>Bacillus lehensis</i> , <i>Bacillus oshimensis</i> e o isolado bacteriano 3424 A	116
Tabela 55 Comparação das características fenotípicas de <i>Bacillus koreensis</i> e o isolado bacteriano 3441	118
Tabela 56 Comparação das características fenotípicas entre <i>Bacillus niabensis</i> e o isolado bacteriano 3537	119
Tabela 57 Comparação das características fenotípicas entre <i>Bacillus barbaricus</i> e o isolado bacteriano 3559	121
Tabela 58 Comparação das características fenotípicas entre <i>Paenibacillus fonticola</i> e os isolados bacterianos 3373 A, 3373 B, 3373 C e 3424 B	123
Tabela 59 Comparação das características fenotípica entre <i>Paenibacillus humicus</i> e os isolados bacterianos 3564, 3568 e 5002	124
Tabela 60 Comparação das características fenotípicas entre <i>Paenibacillus konsidensis</i> , <i>Paenibacillus barengoltzii</i> e o isolado bacteriano 3311	126
Tabela 61 Comparação das características fenotípicas entre <i>Paenibacillus kobensis</i> , <i>Paenibacillus cellulosityticus</i> e o isolado bacteriano 3439 B	128

Tabela 62 Comparação das características fenotípicas entre <i>Paenibacillus cineris</i> , <i>Paenibacillus favisporus</i> , <i>Paenibacillus rhizosphaerae</i> e o isolado bacteriano 3492	130
Tabela 63 Comparação das características fenotípicas entre <i>Paenibacillus dendritiformis</i> , <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> , <i>Paenibacillus popilliae</i> e o isolado bacteriano 3504.....	132
Tabela 64 Comparação das características fenotípicas entre <i>Paenibacillus lautus</i> e o isolado bacteriano 3566	134
Tabela 65 Comparação das características fenotípicas entre <i>Paenibacillus timonensis</i> e o isolado bacteriano 3584	136
Tabela 66 Comparação das características fenotípicas entre <i>Terribacillus goriensis</i> , <i>Terribacillus saccharophilus</i> , <i>Terribacillus halophilus</i> e o isolado bacteriano 3404.	139
Tabela 67 Comparação das características fenotípicas entre <i>Cohnella hongkongensis</i> , <i>Cohnella phaseoli</i> , <i>Cohnella thermotolerans</i> e o isolado bacteriano 3482	142

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

16S rRNA: ácido ribonucléico ribossomal 16 svedberg
BAC: Cartão de identificação de *Bacillus* (VITEK 1)
BCL: Cartão de identificação de *Bacillus* (VITEK 2)
°C: graus Celsius
DNA: ácido desoxirribonucléico
dNTP: deoxirribonucleotídeo
IDBAC: Setor de Identificação Bacteriana
INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz
µL: microlitro
mM: milimolar
NCBI: Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (EUA)
ng: nanograma
pb: pares de bases
PCR: Reação em cadeia da polimerase
pH: potencial hidrogeniônico
p/v: peso por volume
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
RDP II: Ribosomal Database Project II
RNA: ácido ribonucléico
Taq: DNA polimerase isolada inicialmente de *Thermus aquaticus*
Teste VP: Teste de Voges-Proskauer
TSA: Agar Triptona de Soja
TSB: Caldo Triptona de Soja
U: unidade
v/v: volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA.....	19
1.2 DESCRIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO GÊNERO <i>Bacillus</i> E GÊNEROS RELACIONADOS	22
1.3 IDENTIFICAÇÃO DE <i>Bacillus</i> E GÊNEROS RELACIONADOS	27
1.4 GENES <i>HOUSEKEEPING</i>	30
1.5 JUSTIFICATIVA.....	33
2 OBJETIVOS	34
2.1 GERAL.....	34
2.2 ESPECÍFICOS.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 ISOLADOS BACTERIANOS.....	35
3.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	35
3.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA.....	39
3.3.1 Extração de DNA pelo método de lise térmica.....	39
3.3.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	39
3.3.3 Determinação das Sequências Nucleotídicas	40
3.3.4 Análise das Sequências Nucleotídicas.....	40
4 RESULTADOS	42
4.1 DESCRIÇÃO GERAL DOS ISOLADOS BACTERIANOS.....	42
4.2 DESCRIÇÃO ESPECÍFICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS.....	45
4.2.1 Grupo <i>Bacillus megaterium</i>	45
4.2.2 Grupo <i>Bacillus pumilus</i>	51
4.2.3 Grupo <i>Bacillus cereus</i>	57
4.2.4 Grupo <i>Bacillus subtilis</i>	62
4.2.5 Grupo <i>Bacillus licheniformis</i>	67
4.2.6 <i>Bacillus</i> sp. Relacionado à espécie <i>Bacillus humi</i>	70
4.2.7 Outras Espécies de <i>Bacillus</i>	75
4.2.8 <i>Paenibacillus fonticola</i>	80
4.2.9 <i>Paenibacillus humicus</i>	82
4.2.10 Outras Espécies de <i>Paenibacillus</i>	85
4.2.11 Outros Gêneros Relacionados ao Gênero <i>Bacillus</i>	90

4.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA	93
5 DISCUSSÃO	100
5.1 GRUPO <i>Bacillus megaterium</i>	106
5.2 GRUPO <i>Bacillus pumilus</i>	108
5.3 GRUPO <i>Bacillus cereus</i>	110
5.4 GRUPO <i>Bacillus subtilis</i>	111
5.5 GRUPO <i>Bacillus licheniformis</i>	112
5.6 <i>Bacillus</i> sp. RELACIONADO À ESPÉCIE <i>Bacillus humi</i>	113
5.7 OUTRAS ESPÉCIES DE <i>Bacillus</i>	114
5.7.1 Isolado bacteriano 3399.....	114
5.7.2 Isolado bacteriano 3424 A.....	114
5.7.3 Isolado bacteriano 3428.....	116
5.7.4 Isolado bacteriano 3441	117
5.7.5 Isolado bacteriano 3537	118
5.7.6 Isolado bacteriano 3559	119
5.8 <i>Paenibacillus fonticola</i>	122
5.9 <i>Paenibacillus humicus</i>	123
5.10 OUTRAS ESPÉCIES DE <i>Paenibacillus</i>	125
5.10.1 Isolado bacteriano 3311	125
5.10.2 Isolado bacteriano 3439 B.....	127
5.10.3 Isolado bacteriano 3492	128
5.10.4 Isolado bacteriano 3504	131
5.10.5 Isolado bacteriano 3540	132
5.10.6 Isolado bacteriano 3566	133
5.10.7 Isolado bacteriano 3584	135
5.11 OUTROS GÊNEROS RELACIONADOS AO GÊNERO <i>Bacillus</i>	137
5.11.1 Isolado bacteriano 3404	137
5.11.2 Isolado bacteriano 3405	140
5.11.3 Isolado bacteriano 3482	140
5.11.4 Isolado bacteriano 3535	143
5.11.5 Isolado bacteriano 3552	143
5.12 SISTEMAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS.....	144
6 CONCLUSÕES	149
REFERÊNCIAS.....	150

1 INTRODUÇÃO

1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA

A Constituição Brasileira assumiu a saúde como um direito fundamental do ser humano e atribuiu ao Estado o papel de provedor dessas condições. A Vigilância Sanitária, segundo a Lei nº 8.080, artigo 6º, parágrafo 1º (BRASIL, 1990), é uma das principais estratégias utilizadas pelo Estado para prover essas condições.

"Entende-se por vigilância sanitária um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo:

I - o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo;

II - o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde."

Dentre os bens de consumo que se relacionam diretamente com a saúde estão os produtos estéreis, que não devem apresentar células viáveis ou endosporos de microrganismos em sua composição, cuja qualidade deve ser avaliada e garantida pelas ações da Vigilância Sanitária. Como exemplos de produtos estéreis estão medicamentos (produtos farmacêuticos, tecnicamente obtidos ou elaborados, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico), insumos farmacêuticos (drogas ou matérias-primas aditivas ou complementares de qualquer natureza, destinadas a emprego em medicamentos, quando for o caso, e seus recipientes) e correlatos (substâncias, produtos, aparelhos ou acessórios não enquadrados nos conceitos anteriores, cujo uso ou aplicação esteja ligado à defesa e proteção da saúde individual ou coletiva, à higiene pessoal ou de ambientes, ou a fins diagnósticos e analíticos, os cosméticos e perfumes, e, ainda, produtos dietéticos, óticos, de acústica médica, odontológicos e veterinários) (BRASIL, 1973). Sempre que um produto estéril não apresentar a característica de esterilidade, seja por falha na sua produção ou no processo de esterilização, seu consumo deverá ser suspenso. O consumo de produtos estéreis contaminados pode levar a alguns efeitos deletérios como: perda da eficácia terapêutica do produto, inflamação local, infecção local ou sistêmica, febre, afastamento do trabalho, recusa

na utilização de outros produtos da mesma categoria (dificuldade na imunização em massa, no caso de vacinas) e óbito.

Os produtos que requerem a característica de esterilidade tais como soros, vacinas e outros injetáveis devem ser submetidos a várias medidas de controle durante e após a produção, como análises das matérias primas, do ambiente onde são produzidos, do pessoal ligado à produção e do produto final. De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº17 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010), o Ensaio de Esterilidade Bacteriana e Fúngica aplicado ao produto final deve ser considerado a última das medidas de controle através do qual é garantida a esterilidade.

O Ensaio de Esterilidade aplicado aos produtos estéreis é adequado para revelar a presença de microrganismos nos mesmos, entretanto o resultado satisfatório indica somente que não foi encontrado microrganismo contaminante na amostra analisada. Para que esse resultado possa ser extrapolado para o restante do lote é necessário que todas as unidades do mesmo tenham sido preparadas de modo a garantir grande probabilidade de que todo o lote passaria pelo teste, o que depende de precauções tomadas durante a fabricação. Um lote é definido como uma coleção de frascos vedados cujo conteúdo e aspectos físicos são homogêneos em todas as características, por isso o risco de contaminação é considerado o mesmo para cada frasco do lote. Assim, se uma amostra do lote não está contaminada, o mesmo nível de pureza deve ser aplicado ao restante do lote (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988, INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA, 2006, JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2006, EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2009, UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2010).

O Ensaio deve ser efetuado em condições assépticas, evitando-se a contaminação acidental da amostra durante o teste. Os meios recomendados para a realização do ensaio são: meio tioglicolato fluido (para bactérias anaeróbicas) e meio de caseína-soja (para leveduras, fungos e bactérias aeróbicas) e ambos devem ser testados quanto à esterilidade e à capacidade de promoção de crescimento de microrganismos. Antes do início do Ensaio de Esterilidade também deve ser avaliada a atividade bacteriostática e/ou fungistática da amostra a ser testada. O número de amostras necessárias de um produto para realizar o Ensaio de Esterilidade varia de acordo com o tamanho do lote. O Ensaio pode ser realizado de duas maneiras: pelo método de inoculação do produto diretamente no meio ou pelo método de filtração

por membrana, que deve ser empregado sempre que a natureza do produto permitir. No segundo caso, o Ensaio consiste na dissolução da substância em análise em fluido estéril adequado e passagem dessa solução através de membrana estéril que irá reter qualquer contaminação em sua superfície, em seguida esta é lavada, seccionada e transferida assepticamente para o meio de cultura adequado. O meio deve ser incubado por no mínimo sete dias durante os quais deve ser observado em intervalos regulares para verificação de crescimento microbiano (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988, INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA, 2006, JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2006, EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2009, UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

Esse Ensaio somente pode ser interpretado em conjunto com os registros sobre as condições ambientais e sobre os dados relativos à fabricação do lote. Esta resolução contempla a necessidade do controle ambiental durante a produção e análise de um produto estéril devido ao fato de que um nível de pureza do ar minimiza os riscos de contaminação nos produtos ou materiais que estiverem sendo manipulados. Por isso tanto a produção quanto a análise desse tipo de produto devem ser realizadas em equipamento de fluxo unidirecional vertical ISO classe 5 (classe 100) mantido em áreas limpas ISO classe 7 (classe 10.000). Para que sejam consideradas áreas limpas, algumas características devem ser controladas como: filtração do ar, pressão diferencial, temperatura, umidade, velocidade e direção do fluxo do ar, concentração de partículas, contenção e extração de contaminantes gerados no ambiente entre outros (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988, BRASIL, 2010). Com isso evitam-se resultados falso-positivos e o Ensaio de Esterilidade é validado.

Após a realização do Ensaio de Esterilidade, a interpretação dos resultados obtidos varia, dependendo da farmacopéia seguida. É recomendado que a interpretação dos resultados seja da seguinte maneira: se não há evidência de crescimento microbiano, o produto testado é satisfatório no Ensaio de Esterilidade. Entretanto, se existe evidência de crescimento microbiano, o produto é insatisfatório no Ensaio de Esterilidade, a não ser que possa ser claramente demonstrado que o ensaio foi invalidado por causas não relacionadas ao produto avaliado. Se o Ensaio de Esterilidade for inadequado, ele deverá ser repetido. Se não existir evidência de crescimento microbiano no ensaio repetido, o produto é satisfatório no Ensaio de Esterilidade (INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA, 2006, JAPANESE

PHARMACOPOEIA, 2006, EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2009, UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

Entretanto, a Farmacopéia Brasileira (1988) recomenda que o Ensaio de Esterilidade seja composto por um teste e por até dois retestes de esterilidade. Se não houver crescimento microbiano após o teste de esterilidade, o produto é satisfatório no Ensaio de Esterilidade. Se houver crescimento microbiano, o microrganismo deve ser isolado e identificado e um primeiro reteste deve ser realizado. O primeiro reteste deve ser feito de maneira idêntica ao teste de esterilidade. Se não houver crescimento microbiano após o primeiro reteste de esterilidade, o produto é satisfatório no Ensaio de Esterilidade. Se houver crescimento microbiano também no primeiro reteste, o microrganismo deve ser isolado, identificado e comparado com o isolado no teste de esterilidade. Se for o mesmo microrganismo nos dois testes, o produto é insatisfatório no Ensaio de Esterilidade. Se forem microrganismos diferentes, um segundo reteste deve ser realizado com o dobro de amostras utilizadas no teste de esterilidade. Se não houver crescimento microbiano após o segundo reteste de esterilidade, o produto é satisfatório no Ensaio de Esterilidade. Se houver crescimento microbiano também no segundo reteste, o produto é insatisfatório no Ensaio de Esterilidade, independente da identificação do microrganismo. Como a legislação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010) recomenda que seja seguida a Farmacopéia Brasileira (1988), deve ser realizada a identificação dos isolados bacterianos e fúngicos provenientes dos Ensaio de Esterilidade e do ambiente onde estes foram realizados.

1.2 DESCRIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO GÊNERO *Bacillus* E GÊNEROS RELACIONADOS

Vários grupos bacterianos podem estar presentes como contaminantes de produtos farmacêuticos e em áreas limpas onde são realizados os Ensaio de Esterilidade. Os bastonetes aeróbicos Gram positivos esporulados (relacionados ao gênero *Bacillus*) são descritos como um dos principais grupos bacterianos encontrados nestes produtos e ambientes (JIMENEZ, 2007).

O grupo de bastonetes aeróbicos Gram positivos esporulados era classificado, até o ano 2000, dentro de uma mesma família: a *Bacillaceae*. Dentro dessa família havia três gêneros: *Thermoactinomyces*, *Sporolactobacillus* e *Bacillus*. As bactérias com hifas ramificadas que formavam endosporos verdadeiros pertenciam ao gênero *Thermoactinomyces* (PRIEST, 1993). As bactérias isoladas inicialmente de ração para frango e das rizosferas de plantas foram colocadas no gênero *Sporolactobacillus* (NORRIS, 1981). Todos os outros bastonetes aeróbicos esporulados excluídos dos gêneros *Thermoactinomyces* e *Sporolactobacillus* foram, por definição, denominados membros do gênero *Bacillus* (PRIEST, 1993). Com isso, o gênero *Bacillus* incluía, desde aquela época, uma ampla e heterogênea coleção de bastonetes amplamente distribuídos no ambiente (GOTO et al., 2000).

O gênero *Bacillus* ainda hoje inclui uma grande diversidade de microrganismos. As espécies desse gênero possuem parede de bactéria Gram positiva, apesar disso elas podem apresentar coloração Gram positiva (em culturas jovens), Gram lábil ou Gram negativa. Neste gênero são incluídas espécies que apresentam principalmente as seguintes características: são esporuladas, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, acidófilas, alcalófilas ou termofílicas (GOTO et al., 2000, LOGAN; POPOVIC; HOFFMASTER, 2007). Entretanto, o gênero *Bacillus* possui também espécies anaeróbicas estritas (*B. infernus* e *B. macyae*), espécies onde não foram observados endosporos (*B. infernus*, *B. foraminis*, *B. okhensis*, *B. qingdaonensis*, *B. saliphilus*, *B. subterraneus* e *B. thermoamylovorans*) e uma espécie onde foram observadas apenas células cocóides (*B. saliphilus*) (LOGAN et al., 2009). Comparado com muitos outros gêneros bacterianos, o gênero *Bacillus* é extenso e apresenta uma ampla diversidade genética (PRIEST, 1993).

Nos anos 90, a demanda de indústrias por produtos novos e aprimorados permitiu o isolamento de muitas bactérias esporuladas novas que precisavam ser classificadas. Essa necessidade de classificação, mesmo que apenas para requerimentos de patentes, estimulou uma apreciação das dificuldades da sistemática tanto do gênero *Bacillus* como dos gêneros a ele relacionados (PRIEST, 1993).

A taxonomia de procariotos é o aspecto da sistemática que engloba a caracterização, a classificação e a nomenclatura de procariotos. Sem uma taxonomia estabelecida não seria possível a identificação correta de microrganismos nem o reconhecimento de um microrganismo não classificado como um

microrganismo que pertence a uma espécie ainda não descrita (TINDALL; GARRITY, 2008). A identificação rápida e confiável de microrganismos permanece como a mais importante tarefa da taxonomia (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994).

Previamente à identificação, é necessário o estabelecimento do conceito de espécie. A definição zoológica de espécie como “grupos de populações que procriam ou com potencial de procriar reprodutivamente isolados de outros grupos” não pode ser aplicada a procariotos. A incapacidade de definir a espécie ou encontrar um conceito único de espécie reflete a variedade de sistemas reprodutivos e o estado dinâmico dos microrganismos. Se o termo espécie é usado para expressar os organismos de um mesmo nível taxonômico, os microbiologistas devem concordar com regras para fornecer estabilidade, reprodutibilidade e coerência na taxonomia (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994).

Visando facilitar e harmonizar as decisões taxonômicas num campo onde o conceito zoológico de espécie não se aplica, como nos casos dos procariotos, uma decisão arbitrária e artificial tem se desenvolvido e hoje a descrição de espécie bacteriana é mais controlada por recomendações do que qualquer outra unidade taxonômica (STACKEBRANDT; EBERS, 2006). Entre os vários métodos moleculares que possuem méritos na taxonomia, duas abordagens, ditas padrão ouro, desempenham papéis importantes: hibridização DNA-DNA para delimitação de espécies e similaridade da sequência do gene 16S rRNA para delimitação de relacionamento mais distante entre as cepas (WAYNE et al., 1987, STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994).

Uma espécie é definida como cepas que apresentam aproximadamente 70% ou mais de relação DNA-DNA com um δT_m de 5°C ou menos. As características fenotípicas devem confirmar essa definição (WAYNE et al., 1987). Stackebrandt e Ebers (2006) sugerem que, para se confirmar que um isolado corresponde a uma espécie ainda não descrita, seja realizada a hibridização DNA-DNA apenas entre cepas cuja similaridade das sequências do gene 16S rRNA esteja acima de 98,7-99%.

Com a inclusão de propriedades genômicas definidas nos padrões mínimos da descrição de unidades taxonômicas, dados moleculares se tornaram importantes em estudos de sistemática de procariotos. Dependendo do nível taxonômico, essas abordagens podem ser opcionais ou mandatórias. No caso de espécies, as propriedades moleculares servem tanto para verificar a coerência morfológica e

bioquímica de cepas de uma espécie através de suas similaridades (preferencialmente identidade) genômicas quanto para delinear esse taxon de espécies filogeneticamente vizinhas no gênero (WAYNE et al., 1987).

Foi recomendado que todas as descrições de espécies deveriam incluir uma sequência quase completa (maior que 1300 nucleotídeos) do gene 16S rRNA (STACKEBRANDT et al., 2002). Com isso, quase todas as descrições de espécie realizadas a partir dessa recomendação contêm uma análise filogenética da cepa tipo baseada na comparação da similaridade da sequência do gene 16S rRNA (STACKEBRANDT; EBERS, 2006). Sendo assim, a sequência do gene 16S rRNA forma a base filogenética para a taxonomia bacteriana moderna (LOGAN et al., 2009).

A aplicação de métodos moleculares no estudo da sistemática de *Bacillus* e gêneros relacionados trouxe grande impacto na classificação do gênero *Bacillus* (LOGAN; POPOVIC; HOFFMASTER, 2007). A edição de 1986 de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (SNEATH, 1986) listou quarenta espécies válidas de *Bacillus* e desde então mais de duzentas espécies do gênero *Bacillus* vêm sendo descritas ou revisadas. Através da utilização das técnicas moleculares foram identificados pelo menos dez grupos filogenéticos no gênero *Bacillus* (ASH et al., 1991, FARROW; WALLBANKS; COLLINS, 1992, NIELSEN et al., 1994, RAINEY; FRITZE; STACKEBRANDT, 1994, SUZUKI; YAMASATO, 1994, SHIDA et al., 1997). Os dados das sequências do gene 16S rRNA permitiram que o gênero *Bacillus* não só fosse dividido em grupos mais bem definidos como também permitiram que os seguintes gêneros novos contendo espécies originalmente alocadas no gênero *Bacillus* fossem descritos desde 1990: *Alicyclobacillus* (WISOTZKEY et al., 1992), *Paenibacillus* (ASH; PRIEST; COLLINS, 1993), *Brevibacillus* (SHIDA et al., 1996), *Aneurinibacillus* (SHIDA et al., 1996), *Halobacillus* (SPRING et al., 1996), *Virgibacillus* (HEYNDRICKX et al., 1998), *Gracilibacillus* (WAINO et al., 1999), *Geobacillus* (NAZINA et al., 2001), *Ureibacillus* (FORTINA et al., 2001), *Alkalibacillus* (JEON et al., 2005), *Pullulanibacillus* (HATAYAMA et al., 2006), *Sporolactobacillus* (HATAYAMA et al., 2006), *Lysinibacillus* (AHMED et al., 2007), *Viridibacillus* (ALBERT et al. 2007), *Salimicrobium* (YOON; KANG; OH, 2007), *Solibacillus* (KRISHNAMURTHI; CHAKRABARTI; STACKEBRANDT, 2009), *Rummeliibacillus* (VAISHAMPAYAN et al., 2009), *Falsibacillus* (ZHOU et al., 2009), *Anaerobacillus* (ZAVARZINA et al., 2009), *Jeotgalibacillus* (YOON et al., 2010) e *Aeribacillus*

(MIÑANA-GALBIS et al., 2010). Esses novos gêneros e outros gêneros relacionados ao gênero *Bacillus* são classificados em sete diferentes famílias da ordem *Bacillales* (LOGAN et al., 2009) representados nas Tabelas 1 e 2. Apesar da redução no número de espécies no gênero *Bacillus*, a sua heterogeneidade filogenética e fisiológica é ainda grande demais e a necessidade de mais separações é confirmada pela variabilidade do conteúdo G+C de 31 a 66% (HEYRMAN et al., 2005).

Tabela 1 Lista de gêneros e número de espécies da família *Bacillaceae* segundo Logan e colaboradores (2009) e Euzéby (2010)

FAMÍLIA	GÊNERO	ESPÉCIE
<i>Bacillaceae</i>	<i>Aeribacillus</i>	1 espécie*
	<i>Alkalibacillus</i>	6 espécies*
	<i>Amphibacillus</i>	4 espécies*
	<i>Anaerobacillus</i>	3 espécies*
	<i>Anoxybacillus</i>	11 espécies*
	<i>Aquisalibacillus</i>	1 espécie*
	<i>Bacillus</i>	164 espécies e 3 subespécies
	<i>Caldalkalibacillus</i>	2 espécies*
	<i>Cerasibacillus</i>	1 espécie*
	<i>Falsibacillus</i>	1 espécie*
	<i>Filobacillus</i>	1 espécie*
	<i>Geobacillus</i>	16 espécies*
	<i>Gracilibacillus</i>	9 espécies*
	<i>Halalkalibacillus</i>	1 espécie*
	<i>Halobacillus</i>	17 espécies*
	<i>Halolactibacillus</i>	3 espécies*
	<i>Lentibacillus</i>	11 espécies*
	<i>Lysinibacillus</i>	5 espécies*
	<i>Marinococcus</i>	3 espécies*
	<i>Microaerobacter</i>	1 espécie*
	<i>Natronobacillus</i>	1 espécie*
	<i>Oceanobacillus</i>	9 espécies e 2 subespécies
	<i>Ornithinibacillus</i>	2 espécies*
	<i>Paraliobacillus</i>	2 espécies*
	<i>Paucisalibacillus</i>	1 espécie*
	<i>Piscibacillus</i>	2 espécies*
	<i>Pontibacillus</i>	4 espécies*
	<i>Saccharococcus</i>	1 espécie*
	<i>Salimicrobium</i>	4 espécies*
	<i>Salinibacillus</i>	2 espécies*
	<i>Salirhabdus</i>	1 espécie*
	<i>Salsuginibacillus</i>	2 espécie*
	<i>Sediminibacillus</i>	2 espécies*
	<i>Tenuibacillus</i>	1 espécie*
	<i>Terribacillus</i>	3 espécies*
	<i>Thalassobacillus</i>	3 espécies*
<i>Tumebacillus</i>	1 espécie*	
<i>Virgibacillus</i>	19 espécies*	
<i>Viridibacillus</i>	3 espécies*	
<i>Vulcanibacillus</i>	1 espécie*	

*Não foram descritas subespécies nessas espécies

Tabela 2 Lista de famílias, gêneros e número de espécies de bactérias relacionadas ao gênero *Bacillus* segundo Logan e colaboradores (2009) e Euzéby (2010)

FAMÍLIA	GÊNERO	ESPÉCIE	
<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>Alicyclobacillus</i>	20 espécies e 2 subespécies	
<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Ammoniphilus</i>	2 espécies*	
	<i>Aneurinibacillus</i>	5 espécies*	
	<i>Brevibacillus</i>	16 espécies*	
	<i>Cohnella</i>	10 espécies*	
	<i>Fontibacillus</i>	1 espécie*	
	<i>Oxalophagus</i>	1 espécie*	
	<i>Paenibacillus</i>	115 espécies e 2 subespécies	
	<i>Saccharibacillus</i>	2 espécies*	
	<i>Thermobacillus</i>	2 espécies*	
	<i>Pasteuriaceae</i>	<i>Pasteuria</i>	4 espécies*
		<i>Bhargavaea</i>	1 espécie*
	<i>Planococcaceae</i>	<i>Caryophanon</i>	2 espécies*
		<i>Filibacter</i>	1 espécie*
		<i>Jeotgalibacillus</i>	4 espécies*
<i>Kurthia</i>		3 espécies*	
<i>Paenisporosarcina</i>		2 espécies*	
<i>Planococcus</i>		9 espécies*	
<i>Planomicrobium</i>		9 espécies*	
<i>Sporosarcina</i>		12 espécies*	
<i>Ureibacillus</i>		5 espécies*	
<i>Sporolactobacillaceae</i>		<i>Pullulanibacillus</i>	1 espécie*
		<i>Sinobaca</i>	1 espécie*
	<i>Sporolactobacillus</i>	8 espécies e 2 subespécies	
<i>Thermoactinomycetaceae</i>	<i>Tuberibacillus</i>	1 espécie*	
	<i>Desmospora</i>	1 espécie*	
	<i>Laceyella</i>	3 espécies*	
	<i>Mechercharimyces</i>	2 espécies*	
	<i>Planifilum</i>	3 espécies*	
	<i>Seinonella</i>	1 espécie*	
	<i>Shimazuella</i>	1 espécie*	
	<i>Thermoactinomyces</i>	2 espécies*	
	<i>Thermoflavimicrobium</i>	1 espécie*	
	Gêneros sem família definida	<i>Rummeliibacillus</i>	2 espécies*
<i>Solibacillus</i>		1 espécie*	

*Não foram descritas subespécies nessas espécies

1.3 IDENTIFICAÇÃO DE *Bacillus* E GÊNEROS RELACIONADOS

Existe uma demanda crescente da identificação confiável de bactérias aeróbicas esporuladas por várias razões que incluem desde o controle da qualidade de produtos farmacêuticos e de alimentos a manutenção da saúde e até preocupações militares (LOGAN et al., 2009).

Como os gêneros bacterianos em questão constituem mais de 500 espécies com características bem diversas, a identificação deles é difícil (GOTO et al., 2000, LOGAN et al., 2009, EUZÉBY, 2010). O progresso taxonômico não coincidiu com o progresso de ferramentas que pudessem ser utilizadas para identificação dos novos gêneros que apresentam uma grande diversidade no padrão de testes fenotípicos (LOGAN et al., 2009). Um exemplo da dificuldade de identificação do gênero *Bacillus* e de gêneros relacionados é o fato de três espécies anteriormente classificadas dentro do gênero *Bacillus*, *B. pasteurii*, *B. globisporus* e *B. psychrophilus* terem sido transferidas para o gênero de cocos esporulados aeróbicos, *Sporosarcina* (LOGAN; POPOVIC; HOFFMASTER, 2007).

A identificação de espécies de *Bacillus* relacionadas a infecções humanas tem sido realizada principalmente fenotipicamente através de critérios morfológicos e fisiológicos que são amplamente utilizados para vários grupos bacterianos (GOTO et al., 2000, MORGAN et al., 2009). Entretanto, o processo usado é complexo e demorado (BLACKWOOD; TURENNE; KABANI, 2004, MORGAN et al., 2009). Visando minimizar esses problemas, versões comerciais miniaturizadas de testes bioquímicos tradicionais vêm sendo amplamente utilizadas (Kits API, cartões VITEK, BBL Cristal entre outros) e oferecem provas padronizadas para diversas características bioquímicas (LOGAN et al., 2009). Esses testes têm como objetivo facilitar e agilizar a identificação, por exemplo, de *Bacillus* e gêneros relacionados (GOTO et al., 2000).

O API é um sistema semi-automatizado que identifica, dentre outros microrganismos, espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados através da utilização da galeria 50CHB. Durante a incubação, os carboidratos são fermentados a ácidos o que diminui o pH, detectado pela mudança de cor do meio. As leituras dos resultados do API que identifica *Bacillus* e gêneros relacionados devem ser feitas depois de vinte e quatro e quarenta e oito horas de incubação. Os resultados geram um perfil bioquímico que é usado pelo *software* de identificação APIWeb para identificar a cepa (BIOMÉRIEUX, 2002a, BIOMÉRIEUX, 2002b).

O VITEK é um sistema automatizado que identifica mais de quarenta gêneros de microrganismos. Esse sistema identifica espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados através da utilização do cartão BAC. Esse cartão se baseia na identificação através de métodos bioquímicos, sendo a maioria dos testes convencionais, como produção de ácido a partir de diferentes carboidratos. Para os

microrganismos que não crescem a 55°C, o período de incubação é de seis a quinze horas e a leitura dos resultados é feita com base na atenuação da luz medida pelo leitor óptico. Após a incubação do cartão contendo a suspensão padronizada da cultura bacteriana a ser identificada, o *software* analisa os perfis obtidos e proporciona uma identificação (BIOMÉRIEUX BRASIL, 2004).

Apesar da utilização de sistemas automatizados e semi-automatizados de identificação, as espécies ambientais e não patogênicas, por exibirem uma grande variedade de fisiologia e requerimento nutricional, permaneceram sendo um entrave para a identificação (GOTO et al., 2000). A dificuldade da identificação de vários gêneros bacterianos por metodologias fenotípicas e identificações equivocadas de bactérias pertencentes a vários grupos bacterianos tem sido relatada em vários estudos que mostram a necessidade de metodologias moleculares para a conclusão da identificação (BLACKWOOD; TURENNE; KABANI, 2004, DRANCOURT; BERGER; RAOULT, 2004, MOTA et al., 2004, PETTI, 2007, WANG et al., 2007). Nesse contexto, os procedimentos moleculares vêm tendo o seu uso aumentado para a identificação rápida de bactérias (BLACKWOOD; TURENNE; KABANI, 2004, PETTI, 2007).

Woese (1987) introduziu o uso de genes de rRNA para determinar as relações filogenéticas dos microrganismos. A noção que genes do rRNA poderiam identificar um organismo pela reconstrução da sua filogenia, com a possibilidade de armazenamento das sequências em bancos de dados, resultou na rápida adoção do gene 16S rRNA por microbiologistas (CASE et al., 2007). Várias características do gene 16S rRNA, como a sua função essencial, ubiquidade e propriedade evolutiva têm permitido que ele se torne o marcador molecular mais comumente usado na filogenia bacteriana e também em estudos de ecologia microbiana. Nestes estudos, este gene se estabeleceu como padrão ouro (CASE et al., 2007).

O sequenciamento do gene 16S rRNA foi primeiramente proposto para identificar microrganismos não cultiváveis (DRANCOURT; BERGER; RAOULT, 2004). Desde 1990, a análise da sequência do gene 16S rRNA também tem contribuído para a identificação bacteriana de um modo geral, uma vez que este gene é universal para bactérias e uma grande quantidade de sequências deste está disponível em bancos de dados permitindo, assim, a comparação das sequências de isolados bacterianos desconhecidos (BOSSHARD et al., 2003, CLARRIDGE, 2004). Para se realizar a identificação de um isolado bacteriano através do sequenciamento

do gene 16S rRNA, consideram-se cepas com uma identidade superior a 98,7% membros de uma mesma espécie (STACKEBRANDT; EBERS, 2006) e cepas com uma identidade acima de 97% pertencentes ao mesmo gênero (DRANCOURT; BERGER; RAOULT, 2004).

Como pequenas diferenças ou mesmo a identidade completa da sequência do gene 16S rRNA não são suficientes para garantir que diferentes isolados pertençam a uma mesma espécie (DRANCOURT; BERGER; RAOULT, 2004), o sequenciamento do gene 16S rRNA tem sido utilizado para identificar gêneros, em alguns casos espécies bacterianas (CHRISTENSEN et al., 2001, PETTI, 2007) e também na determinação da relação filogenética (GOTO et al., 2000). Com o aumento da utilização desta metodologia e com a diminuição dos custos dos reagentes utilizados para o sequenciamento de DNA após o investimento inicial do equipamento, mais laboratórios estão empregando esta análise para a identificação bacteriana (TURENNE et al., 2001).

A identificação bacteriana baseada na análise da sequência do gene 16S rRNA apresenta algumas limitações como, por exemplo, a presença de múltiplas cópias desse gene numa mesma cepa bacteriana que podem diferir na sequência, levando a identificação de múltiplos ribotipos de um único microrganismo. A extensão da heterogeneidade intragenômica do gene 16S rRNA entre bactérias varia de 0 a 11,6% de divergência na sequência para 1 a 15 cópias do gene 16S rRNA, o que parece afetar a escala fina da filogenia de organismos próximos (CASE et al., 2007). Outra limitação desta metodologia é o fato de espécies diferentes poderem compartilhar identidade completa da sequência do gene 16S rRNA (FOX; WISOTZKEY; JURTSUK, 1992, STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994, BLACKWOOD; TURENNE; KABANI, 2004, SATOMI; La DUC; VENKATESWARAN, 2006, LOGAN et al., 2009).

1.4 GENES *HOUSEKEEPING*

Devido a limitações da utilização da análise da sequência do gene 16S rRNA, é recomendada a análise da sequência de outros genes conservados do genoma bacteriano (genes *housekeeping*) para análises taxonômicas e identificação,

complementando a informação obtida com o sequenciamento do gene 16S rRNA (STACKEBRANDT et al., 2002, WANG et al., 2007, LOGAN et al., 2009). Dentre os genes conservados, os genes codificadores de proteína vêm sendo utilizados como critério molecular para delimitação de espécies, juntamente com o sequenciamento do gene 16S rRNA e com a hibridização DNA-DNA (STACKEBRANDT et al., 2002). Como exemplos de genes que oferecem possibilidades de serem utilizados para fins taxonômicos e de identificação de várias espécies bacterianas estão: *rpoB*, *gyrB*, *groEL*, *recA* entre outros (PETTI, 2007).

O uso de um gene cópia única para análise de comunidades é um marco importante na ecologia microbiana porque isso pode permitir uma medição acurada da diversidade e da relação filogenética, evitando perda na resolução filogenética e falhas na medição da diversidade devido à presença de heterogeneidade intragenômica. Um bom marcador filogenético não pode ser transferido horizontalmente e apresenta algumas regiões conservadas que decifram relações filogenéticas entre organismos distantes e também regiões mais variáveis, que são usadas para diferenciar relações entre organismos fortemente relacionados. Genes codificadores de proteína, como *rpoB* têm várias vantagens sobre genes codificadores de RNA como marcadores moleculares (CASE et al., 2007).

O gene *rpoB* codifica a subunidade β da RNA polimerase que executa papel essencial na transcrição do DNA para RNA, é encontrado como cópia única no genoma bacteriano e contém regiões conservadas e variáveis, por isso ele foi introduzido em estudos taxonômicos e análises de comunidades bacterianas como uma alternativa ao 16S rRNA (MOTA et al., 2004, MOTA et al., 2005). Ele fornece resolução filogenética comparável à do gene 16S rRNA em todos os níveis taxonômicos, exceto entre organismos intimamente relacionados (espécies e subespécies), para os quais ele fornece uma resolução melhor. Isso é particularmente relevante no contexto de um número crescente de estudos focando na diversidade de subespécies, nos quais um gene cópia única codificador de proteína como *rpoB* pode complementar a informação fornecida pelo gene 16S rRNA (CASE et al., 2007).

O sequenciamento do gene 16S rRNA apresenta limitações na diferenciação de determinadas espécies enquanto a análise da sequência do gene *rpoB* consegue diferenciar esse tipo de espécies devido às vantagens citadas anteriormente. Por isso esse último gene tem sido utilizado para a identificação de espécies de diversos

gêneros bacterianos para os quais as sequências do gene 16S rRNA não puderam discriminar, como espécies de *Mycobacterium* de crescimento rápido, de *Acinetobacter*, de *Streptococcus*, de *Streptomyces*, de *Bacillus*, de *Paenibacillus*, de *Corynebacterium* entre outros (MOLLET; DRANCOURT; RAOULT, 1997, RENESTO et al., 2001, DRANCOURT; RAOULT, 2002, MOTA et al., 2004, PETTI, 2007).

Outro gene utilizado para a identificação é o *gyrB*. Este gene codifica a subunidade β da DNA girase, uma topoisomerase tipo II, que desempenha um papel essencial na replicação do DNA e está distribuído universalmente entre as espécies bacterianas. Com a comparação da análise das sequências de *gyrB*, 16S rRNA e hibridização DNA-DNA foi verificado que o gene *gyrB* apresenta uma taxa de substituição de bases maior que o gene 16S rRNA, mostrando que o primeiro gene apresenta uma taxa de evolução mais rápida, sendo, por isso, um marcador filogenético mais discriminatório para a delimitação de níveis taxonômicos mais próximos, como espécies. As sequências do gene *gyrB* tem sido usadas em estudos filogenéticos de *Pseudomonas* (YAMAMOTO; HARAYAMA, 1998), *Acinetobacter* (YAMAMOTO; BOUVET; HARAYAMA, 1999), *Mycobacterium* (KASAI; EZAKI; HARAYAMA, 2000), *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* (FUKUSHIMA; KAKINUMA; KAWAGUCHI, 2002), *Aeromonas* (YÁNEZ et al., 2003) e *Bacillus* (La DUC et al., 2004, SATOMI; La DUC; VENKATESWARAN, 2006, WANG et al., 2007).

A análise da sequência desses genes *housekeeping* apresenta como limitação a ausência de sequências de referência em bancos de dados.

1.5 JUSTIFICATIVA

O Setor de Identificação Bacteriana (IDBAC) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) utiliza metodologia baseada na determinação de características fenotípicas para realizar as identificações. Um sistema comercial semi-automatizado, API (BioMérieux) e um automatizado, VITEK (BioMérieux) foram implantados e deram grande agilidade às identificações realizadas no Setor. Entretanto, estes sistemas foram criados para identificar bactérias de origem clínica e mesmo a versão industrial do sistema comercial automatizado VITEK 32 não conclui a identificação de vários isolados bacterianos que devem ser analisados. Esta questão nos levou a buscar metodologias moleculares, como o sequenciamento do gene 16S rRNA, para realizar a caracterização molecular dos isolados bacterianos que não puderam ser identificados pelos testes fenotípicos. A caracterização molecular é importante para concluir as identificações dos gêneros dos isolados bacterianos estudados. Os resultados rápidos e confiáveis conferidos pela identificação molecular são imprescindíveis para se garantir a qualidade dos produtos analisados pelo IDBAC que tem como objetivo principal evitar danos à saúde da população.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Identificar, utilizando metodologias fenotípicas e moleculares, os microrganismos pertencentes ao gênero *Bacillus* e a gêneros relacionados isolados de produtos farmacêuticos e do controle ambiental das áreas limpas onde são realizados os Ensaio de Esterilidade.

2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar a caracterização fenotípica dos microrganismos pertencentes ao gênero *Bacillus* e a gêneros relacionados utilizando o sistema comercial API 50 CHB (BioMérieux).
- ✓ Realizar a caracterização fenotípica dos microrganismos pertencentes ao gênero *Bacillus* e a gêneros relacionados utilizando o sistema comercial VITEK 32 (cartão BAC) (BioMérieux).
- ✓ Realizar a análise das sequências do gene 16S rRNA dos microrganismos pertencentes ao gênero *Bacillus* e a gêneros relacionados.
- ✓ Realizar a análise dos microrganismos pertencentes ao gênero *Bacillus* e a gêneros relacionados pela construção de árvores filogenéticas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Neste estudo foram analisados oitenta e três isolados bacterianos de *Bacillus* e gêneros relacionados. Desses isolados, cinquenta e três são provenientes de contaminações de Ensaio de Esterilidade de dois imunobiológicos e de quatro produtos farmacêuticos e trinta isolados bacterianos são de placas utilizadas para o controle ambiental da área limpa onde foram realizados os Ensaios de Esterilidade referentes aos anos de 2005 a 2008 (Tabela 3).

Todos os isolados bacterianos foram incubados a 30°C em meio Agar Triptona de Soja (TSA) durante a realização da caracterização fenotípica e da extração de DNA e foram preservados utilizando-se outras duas metodologias. A primeira metodologia de preservação foi o estoque em *skim milk* contendo 20% de glicerol (v/v) seguido de armazenagem a -20°C. A segunda metodologia de preservação foi a liofilização também seguida de armazenagem a -20°C.

3.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

A atividade da enzima catalase foi determinada pela produção de bolhas em solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) (SNEATH, 1986).

A capacidade de crescer em anaerobiose foi determinada pelo aparecimento de colônias em placas de TSA incubadas a 30°C em jarra de anaerobiose por um período mínimo de 48 horas (SNEATH, 1986).

Tabela 3 Dados dos isolados bacterianos utilizados neste estudo

NÚMERO DO ISOLADO BACTERIANO	ORIGEM DO ISOLADO BACTERIANO	ANO DE ISOLAMENTO
3301	Área Limpa	2005
3311	Imunobiológico A	2005
3325 B	Imunobiológico B	2005
3325 V	Imunobiológico B	2005
3338	Área Limpa	2005
3370	Imunobiológico B	2005
3373 A	Produto Farmacêutico A	2006
3373 B	Produto Farmacêutico A	2006
3373 C	Produto Farmacêutico A	2006
3374	Imunobiológico A	2006
3399	Imunobiológico B	2006
3401	Área Limpa	2006
3404	Imunobiológico B	2006
3405	Imunobiológico B	2006
3406 G	Imunobiológico B	2006
3406 O	Imunobiológico B	2006
3406 P	Imunobiológico B	2006
3408 A	Área Limpa	2006
3411	Área Limpa	2006
3417	Imunobiológico B	2006
3420	Imunobiológico B	2006
3423	Área Limpa	2006
3424 A	Área Limpa	2006
3424 B	Área Limpa	2006
3428	Imunobiológico B	2006
3429 A	Área Limpa	2006
3429 B	Área Limpa	2006
3429 C	Área Limpa	2006
3429 D	Área Limpa	2006
3434	Imunobiológico B	2006
3435	Área Limpa	2006
34382	Área Limpa	2006
34386 A	Área Limpa	2006
34386 B	Área Limpa	2006
34386 C	Área Limpa	2006
34386 D	Área Limpa	2006
3439 A	Área Limpa	2006
3439 B	Área Limpa	2006
3441	Área Limpa	2006
3452	Imunobiológico B	2006
3456	Imunobiológico B	2006
3457	Imunobiológico B	2006
3458	Imunobiológico B	2006
3461	Imunobiológico B	2006
3462 G	Imunobiológico B	2006
3462 P	Imunobiológico B	2006
3467	Imunobiológico B	2006
3468	Imunobiológico B	2006
3476	Imunobiológico B	2006
3477	Imunobiológico B	2006
3479	Área Limpa	2006
3480	Imunobiológico B	2006
3482	Imunobiológico B	2006
3492	Imunobiológico B	2006

Tabela 3 (cont.) Dados dos isolados bacterianos utilizados neste estudo

NÚMERO DO ISOLADO BACTERIANO	ORIGEM DO ISOLADO BACTERIANO	ANO DE ISOLAMENTO
3504	Imunobiológico B	2007
3528	Imunobiológico A	2007
3535	Imunobiológico B	2007
3537	Área Limpa	2007
3539	Área Limpa	2007
3540	Imunobiológico B	2007
3541	Imunobiológico B	2007
3544 B	Área Limpa	2007
3546	Área Limpa	2007
3547	Imunobiológico B	2007
3548	Área Limpa	2007
3549	Imunobiológico B	2007
3550	Imunobiológico B	2007
3551	Imunobiológico B	2007
3552	Imunobiológico B	2007
3559	Área Limpa	2007
3560	Imunobiológico B	2007
3564	Produto Farmacêutico B	2007
3566	Imunobiológico B	2007
3568	Imunobiológico B	2007
3571 B	Área limpa	2007
5000	Produto Farmacêutico C	2007
3584	Imunobiológico B	2008
3613 A	Área Limpa	2008
3614	Imunobiológico B	2008
3639 A	Imunobiológico B	2008
3639 B	Imunobiológico B	2008
5001	Produto Farmacêutico D	2008
5002	Produto Farmacêutico D	2008

Para se avaliar a capacidade de cada isolado bacteriano crescer a 55°C, foi feita uma suspensão 0,5 de McFarland em 2mL de salina estéril, sendo retirada uma alíquota de 50µL que foi transferida para um tubo contendo entre 2,5 e 3mL de Caldo Triptona de Soja (TSB). A capacidade de crescer a 55°C foi determinada pela turvação do caldo TSB incubado a 55°C por 48 horas. Se não fosse observada a turvação, os tubos eram reincubados a 30°C por 48 horas e só foram citados como incapazes de crescer a 55°C os microrganismos que não turvaram o meio a 55°C e turvaram a 30°C (SNEATH, 1986).

Foi realizada a hidrólise da esculina, da caseína e do amido e avaliada a produção de ácido a partir de frutose, glicose, lactose, maltose, manitol, rafinose, sacarose e xilose (SNEATH, 1986).

Todos os isolados bacterianos também foram submetidos a testes fenotípicos com os kits comerciais API galeria 50 CHB e VITEK 32 cartão BAC (BioMérieux) conforme instruções do fabricante. A leitura final do API foi realizada em 48 horas.

Os testes de ambos os kits foram repetidos sempre que o percentual de identificação ficou abaixo de 90%. Para realizar a leitura dos resultados dos testes do sistema API foram considerados positivos os testes que se tornaram amarelo, exceto o teste da hidrólise da Esculina, onde o meio se tornou preto, e negativos os testes que permaneceram vermelho. Para finalizar a identificação pelo API, foi utilizado o programa APIWeb com o objetivo de avaliar os resultados dos testes e fornecer um percentual de identificação para cada isolado bacteriano analisado. Para os isolados bacterianos que apresentaram testes com coloração laranja foram feitas três análises pelo programa APIWeb (BioMérieux). Na primeira análise os testes que ficaram laranja foram marcados com resultado duvidoso, na segunda análise esses testes foram marcados com resultado positivo e por último os testes duvidosos foram marcados como negativo. Essas três análises geraram três diferentes percentuais de identificação e foi considerado como resultado da identificação pelo sistema API a análise que apresentou o maior percentual. Nas tabelas que apresentam os resultados dos testes do sistema API, os testes que apresentaram a cor laranja foram considerados resultado duvidoso. Para o sistema VITEK, por ser um método automatizado, não é observado resultado duvidoso.

De acordo com as recomendações do fabricante, o percentual no qual o sistema API apresenta uma identificação aceitável é acima de 80% (BIOMÉRIEUX, 2003) sendo assim, os resultados em que o percentual foi abaixo desse valor ou o resultado da identificação foi perfil inaceitável, considerou-se que o sistema não identificou o isolado bacteriano (identificação inaceitável). De acordo com as recomendações do fabricante, o percentual no qual o sistema VITEK apresenta uma identificação aceitável é acima de 85% (BIOMÉRIEUX BRASIL, 2004), por isso os resultados em que o percentual foi abaixo desse valor ou o resultado da identificação foi organismo não identificado, considerou-se que o sistema não identificou o isolado bacteriano (identificação inaceitável).

3.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

3.3.1 Extração de DNA pelo método de lise térmica

Os isolados bacterianos foram incubados em placas de TSA por 18 a 24 horas a 30°C. O crescimento bacteriano de toda a placa de TSA foi suspenso em 500µL de água milli-Q estéril e submetido a banho-maria a 100°C por 15 minutos. Após essa etapa, a suspensão foi imediatamente congelada a -20°C. O sobrenadante foi posteriormente descongelado, centrifugado e utilizado na PCR.

3.3.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Para a amplificação de regiões específicas do genoma dos isolados bacterianos, a PCR foi realizada em um volume final de 50µL. As reações individuais foram compostas por água esterilizada, tampão 1X, entre 2 e 3mM de MgCl₂, entre 10 e 20mM de cada dNTP, entre 50 e 100ng de cada iniciador, 2,5U da enzima Taq polimerase e entre 3 e 4µL do DNA obtido pela extração por lise térmica. As reações foram realizadas nas seguintes condições: pré-desnaturação a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, entre 50 e 57°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos seguidos por uma extensão adicional a 72°C por 7 minutos. Os iniciadores utilizados para a amplificação do gene 16S rRNA foram os descritos por Watts e colaboradores (2001) (Tabela 4). O iniciador pA se liga da posição 8 a 27 e o iniciador pH da posição 1541 a 1522 do gene 16S rRNA de *Escherichia coli* (PASCUAL et al., 1995). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), corados com brometo de etídio e visualizados com o equipamento VDS (Pharmacia-Biotech).

3.3.3 Determinação das Sequências Nucleotídicas

Os fragmentos amplificados foram purificados com PureLink PCR Purification kit (Invitrogen) e posteriormente foram utilizados na reação de sequenciamento utilizando o Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems-Perkin Elmer Co.) segundo as instruções do fabricante. Para realizar o sequenciamento foi utilizado o Analisador de DNA (ABI 3730), modelo ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems) da Rede de Plataformas Tecnológicas do Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS / FIOCRUZ). Os iniciadores utilizados no sequenciamento estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 Iniciadores utilizados nas reações de PCR e de sequenciamento

NOME DO INICIADOR	POSIÇÃO CORRESPONDENTE NO GENE DE <i>E. coli</i>	SEQUÊNCIA DO INICIADOR	REFERÊNCIA DO INICIADOR
pA	8-27	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG>	Watts et al., 2001
pH	1492-1510	5'- AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA>	Watts et al., 2001

Tabela 5 Iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento

NOME DO INICIADOR	POSIÇÃO CORRESPONDENTE NO GENE DE <i>E. coli</i>	SEQUÊNCIA DO INICIADOR	REFERÊNCIA DO INICIADOR
1831	1831-1844	5'- GAG GAA CAC CGA TGG CGA AGG C>	Watts et al., 2001
1242f	1242-1259	5'- CAC ACG TGC TAC AAT GG>	Johnson, 1994
1832	1832-1820	5'- GCC CCC GTC AAT TCC TTT GAG TT>	Watts et al., 2001
519r	519-505	5'- G(AT)A TTA CCG CGG C(GT)G CTG>	Johnson, 1994

3.3.4 Análise das Sequências Nucleotídicas

As sequências nucleotídicas foram analisadas e editadas usando o programa SeqMan. Posteriormente as sequências foram comparadas às depositadas nos bancos de sequências GenBank e Ribosomal Database Project II (RDP-II). Esta comparação permitiu a identificação dos isolados bacterianos analisados pela determinação das espécies mais relacionadas a eles.

Para identificação bacteriana utilizando a análise da sequência do gene 16S rRNA foi utilizado o percentual de similaridade do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) e foram considerados os seguintes critérios: i) identificação da espécie bacteriana se o isolado bacteriano analisado apresentou um valor de similaridade da sequência do gene 16S rRNA acima de 98,7% com uma espécie descrita; ii) identificação das prováveis espécies bacterianas se o isolado bacteriano apresentou um valor de similaridade da sequência do gene 16S rRNA acima de 98,7% com mais de uma espécie descrita e iii) identificação do gênero bacteriano se o isolado bacteriano analisado não apresentou um valor de similaridade da sequência do gene 16S rRNA acima de 98,7% com pelo menos uma espécie descrita (STACKEBRANDT; EBERS, 2006).

Para a realização das análises filogenéticas foi utilizado o programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997) para alinhar as sequências do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos deste estudo e de cepas tipo das espécies relacionadas aos isolados bacterianos. As sequências alinhadas foram usadas para análise filogenética utilizando o programa MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007). As distâncias foram obtidas usando os modelos Kimura 2 parâmetros e Jukes-Cantor e o agrupamento foi pelo método de *Neighbour-Joining*. A estabilidade dos relacionamentos foi avaliada através da análise *Bootstrap* com um número mínimo de 1000 repetições.

4 RESULTADOS

Inicialmente será apresentada uma descrição geral dos isolados bacterianos avaliados e a seguir uma descrição específica de cada grupo de microrganismos nos quais os isolados bacterianos foram separados.

4.1 DESCRIÇÃO GERAL DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Todos os oitenta e três isolados bacterianos analisados apresentaram forma de bastonete Gram positivo ou Gram lábil, esporularam e produziram a enzima catalase. Apenas os isolados bacterianos identificados como o grupo *Bacillus licheniformis* (3452, 3479, 3547 e 3560) foram capazes de crescer a 55°C. O resultado do crescimento em anaerobiose foi variável.

Os isolados bacterianos incluídos neste estudo foram identificados utilizando os sistemas comerciais API e VITEK. Os resultados das identificações destes sistemas estão representados nas Figuras 1 e 2. A avaliação destes resultados foi realizada considerando como referência a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA.

A identificação realizada utilizando o sistema API mostrou que 1,20% dos isolados bacterianos analisados tiveram as espécies identificadas, 53,00% tiveram os grupos de prováveis espécies identificados e 18,10% tiveram apenas os gêneros identificados corretamente. Para 14,45% dos isolados bacterianos este sistema identificou os gêneros de maneira equivocada. Este sistema não identificou 4,80% dos isolados bacterianos ainda que as espécies ou as prováveis espécies desses isolados bacterianos estivessem presentes no banco de dados do API. Foram observados 8,45% de isolados bacterianos que não puderam ser identificados por este sistema uma vez que suas espécies ou prováveis espécies não estão presentes no banco de dados (Figura 1).

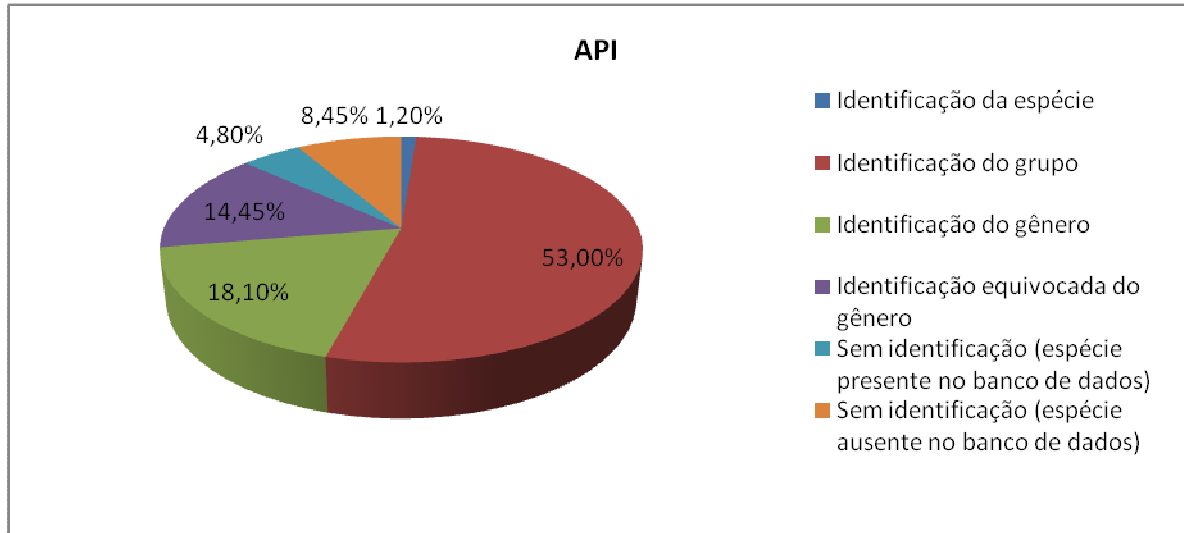


Figura 1 Avaliação da identificação de *Bacillus* spp. e gêneros relacionados utilizando o sistema API e usando-se o sequenciamento do gene 16S rRNA como referência.

A identificação realizada utilizando o sistema VITEK mostrou que 1,20% dos isolados bacterianos analisados tiveram as espécies identificadas, 53,00% tiveram os grupos de prováveis espécies identificados e 12,05% tiveram apenas os gêneros identificados corretamente. Para 20,50% dos isolados bacterianos este sistema identificou os gêneros de maneira equivocada. Este sistema não identificou 3,60% dos isolados bacterianos apesar de a espécie ou as prováveis espécies estarem presentes no banco de dados do VITEK. Ainda foi observado que 9,65% dos isolados bacterianos não puderam ser identificados por este sistema uma vez que as espécies ou as prováveis espécies desses isolados bacterianos não estão presentes no banco de dados (Figura 2).

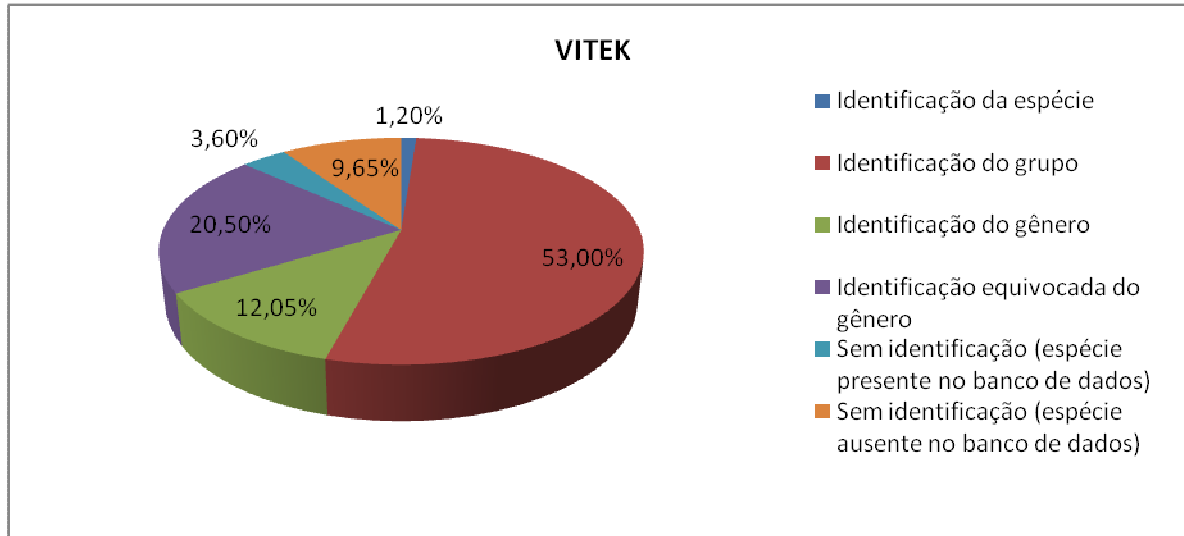


Figura 2 Avaliação da identificação de *Bacillus* spp. e gêneros relacionados utilizando o sistema VITEK e usando-se o sequenciamento do gene 16S rRNA como referência.

A identificação realizada pela análise da sequência do gene 16S rRNA está representada na Figura 3. Dos isolados bacterianos avaliados, 65% apresentaram similaridade da sequência desse gene acima de 98,7% com mais de uma espécie bacteriana descrita, 17% apresentaram similaridade da sequência do gene acima de 98,7% com uma espécie descrita e 18% apresentaram similaridade da sequência do gene 16S rRNA abaixo de 98,7% com quaisquer espécies descritas.

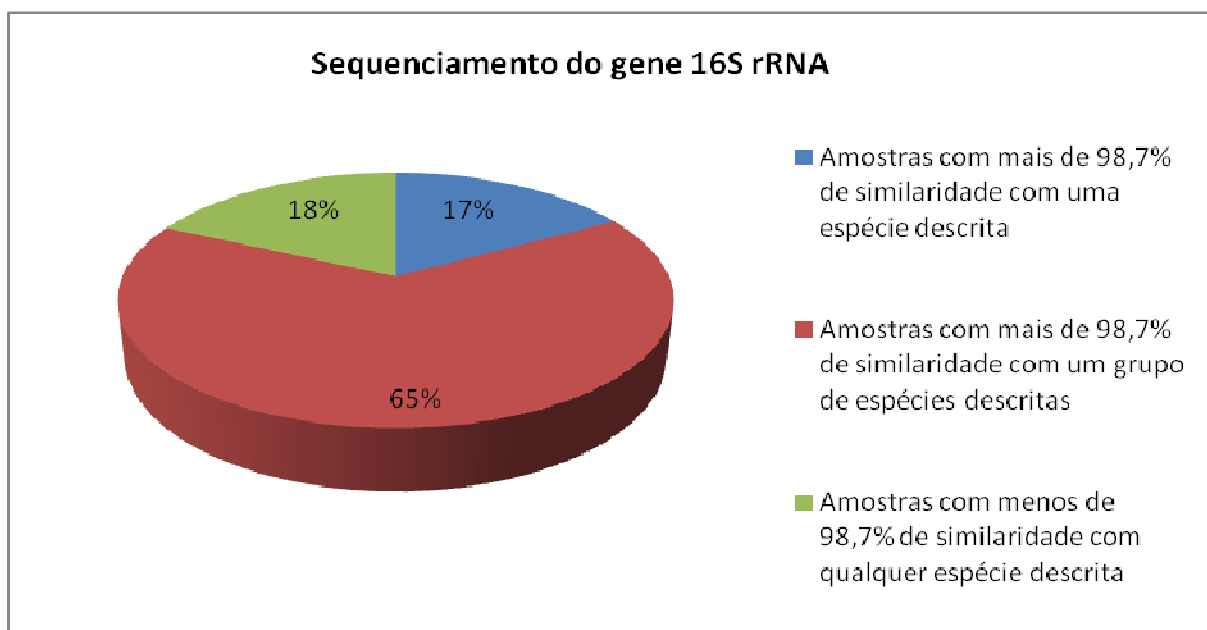


Figura 3 Identificação de *Bacillus* spp. e gêneros relacionados utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA.

Os isolados bacterianos foram agrupados de acordo com os resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA e foram divididos do seguinte modo: grupo *Bacillus megaterium*, grupo *Bacillus pumilus*, grupo *Bacillus cereus*, grupo *Bacillus subtilis*, grupo *B. licheniformis*, *Bacillus* sp. relacionado à espécie *Bacillus humi*, outras espécies de *Bacillus*, *Paenibacillus fonticola*, *Paenibacillus humicus*, outras espécies de *Paenibacillus* e outros gêneros relacionados ao gênero *Bacillus*.

4.2 DESCRIÇÃO ESPECÍFICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS

4.2.1 Grupo *Bacillus megaterium*

Dezoito isolados bacterianos fazem parte desse grupo. Conforme ilustrado pela Tabela 6, de todos os testes bioquímicos utilizados para identificação pelo sistema API, o resultado dos seguintes testes não apresentou variação, sendo todos os isolados bacterianos negativos para l-sorbose, d-tagatose e d-fucose e todos foram positivos para d-glicose, d-frutose, n-acetil-glicosamina, d-maltose, d-sacarose, d-trealose, d-rafinose, amido e glicogênio. Os demais testes apresentaram variação.

Segundo a Tabela 7 de todos os testes bioquímicos utilizados para identificação pelo sistema VITEK o resultado dos seguintes testes não apresentou variação, sendo todos os isolados bacterianos positivos para galactose, sacarose, arabinose, inulina, n-acetil-glicosamina, manitol, maltose, tiocianato de potássio, glicose, trealose, ácido mandélico e esculina e negativos para amidalina, oleandomicina, vermelho de tetrazólio, tagatose e ácido nalidíxico. Os demais testes apresentaram variação.

Tabela 6 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus megaterium*

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																																																					
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49				
3301	-	D	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	D	+	+	-	D	+	D	+	D	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	D	-	-	-	-	+	-	D	-	-				
3338	-	D	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	D	+	-	D	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-				
3370	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	D	-	-	-	D	+	-	-	D	+	+	+	+	+	D	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	-	-	-	-	D	-	D	D	-				
3401	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	D	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	D	-	-	-	-	-	-	-	-				
3406 G	-	+	-	-	+	+	+	D	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	D	D	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	D	-	D				
3406 O	-	+	-	D	+	+	+	-	-	-	+	+	+	D	-	-	D	D	+	-	-	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	D	+	+	D	-	-	D	-	-	D	-	-			
3406 P	-	+	-	D	+	+	+	D	-	D	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	D	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
3408 A	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	D	+	-	-	-	+	D	D	+	D	D	+	D	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	-	+	D	-	-	-	-	+	-	-	-		
3411	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
3420	-	+	-	-	+	+	+	-	D	D	+	+	+	D	-	D	-	D	+	+	-	D	+	D	D	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	-	-	-	+	-	D	-	-	
3423	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	-	-	-	-	-	-	D	D	D	D		
3435	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	D	-	D	+	-	D	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	D	-	-	-	-	-	-	-	D	D	-	
3439 A	-	D	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	D	+	-	-	-	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	D	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-
3544 B	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
3548	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	D	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
3549	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
3571 B	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
3613 A	-	D	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		

Legenda: 0: Controle negativo, 1: Glicerol, 2: Eritrol, 3: d-Arabinose, 4: l-Arabinose, 5: d-Ribose, 6: d-Xilose, 7: l-Xilose, 8: d-Adonitol, 9: Metil-β-d-Xilopiranosídeo, 10: d-Galactose, 11: d-Glicose, 12: d-Fructose, 13: d-Manose, 14: l-Sorbose, 15: l-Raminose, 16: Dulcitol, 17: Inositol, 18: d-Manitol, 19: d-Sorbitol, 20: Metil-α-d-Manopiranosídeo, 21: Metil-α-d-Glucopiranosídeo, 22: N-Acetil-Glicosamina, 23: Amidalina, 24: Arbutina, 25: Esculina, 26: Salicina, 27: d-Celobiose, 28: d-Maltose, 29: d-Lactose, 30: d-Melibiose, 31: d-Sacarose, 32: d-Trealose, 33: Inulina, 34: d-Melezitose, 35: d-Rafinose, 36: Amido, 37: Glicogênio, 38: Xilitol, 39: Gentiobiose, 40: d-Turanose, 41: d-Lixose, 42: d-Tagatose, 43: d-Fucose, 44: l-Fucose, 45: d-Arabitol, 46: l-Arabitol, 47: Gluconato de potássio, 48: 2 cetogluconato de potássio, 49: 5 cetogluconato de potássio. +: resultado positivo, -: resultado negativo, D: resultado duvidoso.

Tabela 7 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus*

megaterium

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																															
	NEG	GAL	AGA	SOR	OLD	THRM	SUC	ARA	INU	NAG	NAA	TZR	XYL	RIB	AMY	ARB	TAG	MAN	MLT	KCN	PAS	GLU	RAF	TRE	NCL	NAE	INO	SAL	PLA	MEN	ESC	
3301	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	
3338	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
3370	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
3401	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
3406 G	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
3406 O	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
3406 P	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
3408 A	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
3411	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
3420	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
3423	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
3435	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
3439 A	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
3544 B	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
3548	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
3549	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
3571 B	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
3613 A	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+

Legenda: NEG: Controle negativo, GAL: Galactose, AGA: Amidalina, SOR: Sorbitol, OLD: Oleandomicina, THRM: Termófilo, SUC: Sacarose, ARA: Arabinose, INU: Inulina, NAG: N-Acetil-Glicosamina, NAA: Acetato de sódio, TZR: Vermelho de Tetrázólio, XYL: Xilose, RIB: Ribose, AMY: Amilopectina, ARB: Arabitol, TAG: Tagatose, MAN: Manitol, MLT: Maltose, KCN: Tiocianato de Potássio, PAS: Poliamido-higroestrepina, GLU: Glicose, RAF: Rafinose, TRE: Trealose, NCL: Cloreto de sódio, NAE: Ácido nalidíxico, INO: Inositol, SAL: Salicina, PLA: Platinose, MEN: Ácido mandélico, ESC: Esculina. +: resultado positivo, -: resultado negativo.

De acordo com a Tabela 8, o tamanho das sequências do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos variou entre 1508 e 1544 pares de bases. Os isolados bacterianos apresentaram maior similaridade respectivamente com *Bacillus aryabhatai*, *B. megaterium* e *Bacillus flexus*, exceto o isolado bacteriano 3406 O que apresentou maior similaridade com *B. megaterium*, *B. aryabhatai* e *B. flexus*, respectivamente. Os isolados bacterianos apresentaram entre 99,93% e 99,66% de similaridade do gene 16S rRNA com *B. aryabhatai*, entre 99,74% e 99,39% com *B. megaterium* e entre 98,95% e 98,62% com *B. flexus*.

Na Tabela 9 pode-se observar que apenas o isolado bacteriano 3401 não apresentou crescimento em anaerobiose. Segundo a mesma tabela, os sistemas API e VITEK apresentaram resultados de identificação diferentes para os isolados bacterianos 3435 e 3613 A. Quando comparado com o resultado da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, o VITEK não identificou corretamente uma das prováveis espécies do isolado bacteriano 3435 e apresentou como resultado para o isolado bacteriano 3406 P identificação inaceitável. Todos os outros isolados bacterianos tiveram uma das prováveis espécies identificadas corretamente pelo VITEK com um percentual entre 95% e 99%. Por outro lado, o API apresentou como resultado para o isolado bacteriano 3301 identificação inaceitável e o API também não identificou corretamente uma das prováveis espécies do isolado bacteriano 3613 A, enquanto os demais isolados bacterianos tiveram uma das suas prováveis espécies identificadas corretamente pelo API com um percentual de probabilidade entre 81,9% e 99,9%.

Tabela 8 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus megaterium*

ISOLADOS BACTERIANOS	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (NÚMERO DE ACESSO)	TAMANHO DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (PB)	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUÊNCIA
3301	99,80% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 99,66% <i>B. megaterium</i> (D16273) 98,88% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1522	FJ215782
3338	99,80% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 99,66% <i>B. megaterium</i> (D16273) 98,88% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1522	FJ215784
3370	99,73% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 99,39% <i>B. megaterium</i> (D16273) 98,62% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1527	JF309231
3401	99,86% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 99,59% <i>B. megaterium</i> (D16273) 98,82% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1544	FJ215786
3406 G	99,86% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 99,73% <i>B. megaterium</i> (D16273) 98,95% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1523	JF309232
3406 O	99,74% <i>B. megaterium</i> (D16273) 99,66% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 98,92% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1513	JF309233
3406 P	99,66% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 99,52% <i>B. megaterium</i> (D16273) 98,74% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1508	JF309234
3408 A	99,80% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 99,52% <i>B. megaterium</i> (D16273) 98,75% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1522	JF309235
3411	99,73% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 99,59% <i>B. megaterium</i> (D16273) 98,82% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1535	FJ215788
3420	99,67% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 99,66% <i>B. megaterium</i> (D16273) 98,82% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1533	JF309236
3423	99,80% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 99,39% <i>B. megaterium</i> (D16273) 98,62% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1523	FJ215790
3435	99,86% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 99,52% <i>B. megaterium</i> (D16273) 98,75% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1522	FJ215793
3439 A	99,80% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 99,66% <i>B. megaterium</i> (D16273) 98,88% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1525	FJ215794

Tabela 8 (Cont.) Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus megaterium*

ISOLADOS BACTERIANOS	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (NÚMERO DE ACESSO)	TAMANHO DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (PB)	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUÊNCIA
3544B	99,80% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 99,66% <i>B. megaterium</i> (D16273) 98,87% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1507	JF309237
3548	99,93% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 99,52% <i>B. megaterium</i> (D16273) 98,75% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1534	JF309239
3549	99,86% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 99,66% <i>B. megaterium</i> (D16273) 98,88% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1521	JF309240
3571 B	99,86% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 99,52% <i>B. megaterium</i> (D16273) 98,74% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1509	JF309241
3613 A	99,80% <i>B. aryabhatai</i> (EF114313) 99,59% <i>B. megaterium</i> (D16273) 98,80% <i>B. flexus</i> (AB021185)	1508	JF309242

Tabela 9 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus megaterium*

ISOLADO BACTERIANO	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA	VITEK	API	CRESCIMENTO EM ANAEROBIOSE
3301	Grupo <i>B. megaterium</i>	95% <i>B. megaterium</i>	Identificação inaceitável	+
3338	Grupo <i>B. megaterium</i>	99% <i>B. megaterium</i>	99,9% <i>B. megaterium</i>	+
3370	Grupo <i>B. megaterium</i>	99% <i>B. megaterium</i>	99,8% <i>B. megaterium</i>	+
3401	Grupo <i>B. megaterium</i>	99% <i>B. megaterium</i>	99,9% <i>B. megaterium</i>	-
3406 G	Grupo <i>B. megaterium</i>	97% <i>B. megaterium</i>	98,9% <i>B. megaterium</i>	+
3406 O	Grupo <i>B. megaterium</i>	99% <i>B. megaterium</i>	90,1% <i>B. megaterium</i>	+
3406 P	Grupo <i>B. megaterium</i>	Identificação inaceitável	99,9% <i>B. megaterium</i>	+
3408 A	Grupo <i>B. megaterium</i>	99% <i>B. megaterium</i>	99,9% <i>B. megaterium</i>	+
3411	Grupo <i>B. megaterium</i>	97% <i>B. megaterium</i>	81,9% <i>B. megaterium</i>	+
3420	Grupo <i>B. megaterium</i>	99% <i>B. megaterium</i>	99,9% <i>B. megaterium</i>	+
3423	Grupo <i>B. megaterium</i>	99% <i>B. megaterium</i>	96,8% <i>B. megaterium</i>	+
3435	Grupo <i>B. megaterium</i>	98% <i>B. subtilis</i>	99,4% <i>B. megaterium</i>	+
3439 A	Grupo <i>B. megaterium</i>	99% <i>B. megaterium</i>	98,9% <i>B. megaterium</i>	+
3544 B	Grupo <i>B. megaterium</i>	97% <i>B. megaterium</i>	99,6% <i>B. megaterium</i>	+
3548	Grupo <i>B. megaterium</i>	99% <i>B. megaterium</i>	99,7% <i>B. megaterium</i>	+
3549	Grupo <i>B. megaterium</i>	98% <i>B. megaterium</i>	98% <i>B. megaterium</i>	+
3571 B	Grupo <i>B. megaterium</i>	99% <i>B. megaterium</i>	91,8% <i>B. megaterium</i>	+
3613 A	Grupo <i>B. megaterium</i>	99% <i>B. megaterium</i>	98,9% <i>B. cereus</i> 1	+

4.2.2 Grupo *Bacillus pumilus*

Foram incluídos nesse grupo doze isolados bacterianos. Conforme ilustrado na Tabela 10, de todos os testes bioquímicos utilizados para identificação pelo sistema API, o resultado dos seguintes testes não apresentou variação, sendo todos os isolados bacterianos negativos para d-adonitol, amido, glicogênio, d-lixose, l-fucose, d-arabitol e 2 ceto-gluconato de potássio e todos foram positivos para l-arabinose, d-ribose, d-glicose, d-frutose, d-manose, esculina e d-celobiose. Os demais testes apresentaram variação.

Segundo a Tabela 11 de todos os testes bioquímicos utilizados para identificação pelo sistema VITEK, o resultado dos seguintes testes não apresentou variação, sendo todos os isolados bacterianos negativos para galactose, sorbitol, oleandomicina, inulina, xilose, amilopectina, arabitol, maltose, rafinose, inositol e platinose e todos foram positivos para sacarose, acetato de sódio, tagatose, manitol, tiocianato de potássio, poliamido-higroestrepina, glicose, salicina, ácido mandélico e esculina. Os demais testes apresentaram variação.

De acordo com a Tabela 12, o tamanho das sequências do gene 16S rRNA variou entre 1420 e 1518 pares de bases. Os isolados bacterianos foram divididos em quatro grupos. No primeiro grupo os isolados bacterianos 3429 A, 3429 B, 3429 C, 3429 D, 34386 A, 34386 B e 34386 D apresentam maior similaridade com *Bacillus altitudinis*, *Bacillus stratosphericus*, *Bacillus aerophilus*, *Bacillus safensis* e *B. pumilus*, respectivamente. No segundo grupo os isolados bacterianos 3325 B, 3325 V e 34382 apresentam maior similaridade com *B. safensis*, *B. pumilus*, *B. altitudinis*, *B. stratosphericus* e *B. aerophilus*, respectivamente. No terceiro grupo o isolado bacteriano 34386 C apresentou maior similaridade com *B. stratosphericus*, *B. aerophilus*, *B. altitudinis*, *B. safensis* e *B. pumilus*, respectivamente. No quarto grupo o isolado bacteriano 3528 apresentou maior similaridade respectivamente com *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. altitudinis*, *B. stratosphericus* e *B. aerophilus*.

Os isolados bacterianos do primeiro grupo apresentaram entre 100% e 99,93% de similaridade da sequência do gene 16S rRNA com *B. altitudinis*, entre 99,93% e 99,86% de similaridade com *B. stratosphericus* e com *B. aerophilus* e entre 99,51% e 99,44% de similaridade com *B. safensis* e com *B. pumilus*. Os isolados bacterianos do segundo grupo apresentaram 99,93% de similaridade com

B. safensis, 99,79% de similaridade com *B. pumilus*, entre 99,59% e 99,52% de similaridade com *B. altitudinis* e entre 99,53% e 99,46% de similaridade com *B. stratosphericus* e com *B. aerophilus*. O isolado bacteriano do terceiro grupo apresentou 100% de similaridade com *B. stratosphericus* e com *B. aerophilus*, 99,93% de similaridade com *B. altitudinis* e 99,44% de similaridade com *B. safensis* e com *B. pumilus*. O isolado bacteriano do quarto grupo apresentou 99,85% de similaridade com *B. pumilus*, 99,70% de similaridade com *B. safensis*, 99,42% de similaridade com *B. altitudinis* e 99,36% de similaridade com *B. stratosphericus* e com *B. aerophilus*.

Na Tabela 13 pode-se observar que apenas os isolados bacterianos 3325 B, 3325 V, 34382 e 3528 apresentaram crescimento em anaerobiose. Segundo os resultados apresentados na mesma tabela, os sistemas API e VITEK apresentaram a mesma identificação para todos os isolados bacterianos e esses resultados identificaram uma das prováveis espécies corretamente quando comparados com o resultado do sequenciamento do gene 16S rRNA. Os isolados bacterianos foram identificados pelo sistema VITEK com um percentual de 99% e pelo sistema API com um percentual de 99,9%.

Tabela 10 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus pumilus*

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																																																															
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49														
3325 B	-	D	D	-	+	+	+	-	-	-	D	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	D	-	D	D	D	+	D	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
3325 V	-	+	-	D	+	+	+	D	-	D	+	+	+	+	+	D	D	D	D	D	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	D	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
3429 A	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	D	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	D	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+								
3429 B	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+								
3429 C	-	-	-	-	+	+	D	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	D	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+								
3429 D	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
34382	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	D	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
34386 A	-	D	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
34386 B	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
34386 C	-	D	D	D	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
34386 D	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
3528	-	D	-	-	+	+	+	D	-	-	D	+	+	+	-	-	D	-	+	D	D	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: 0: Controle negativo, 1: Glicerol, 2: Eritrol, 3: d-Arabinose, 4: l-Arabinose, 5: d-Ribose, 6: d-Xilose, 7: l-Xilose, 8: d-Adonitol, 9: Metil-β-d-Xilopiranosídeo, 10: d-Galactose, 11: d-Glicose, 12: d-Fructose, 13: d-Manose, 14: l-Sorbose, 15: l-Raminose, 16: Dulcitol, 17: Inositol, 18: d-Manitol, 19: d-Sorbitol, 20: Metil-α-d-Manopiranosídeo, 21: Metil-α-d-Glucopiranosídeo, 22: N-Acetil-Glicosamina, 23: Amidalina, 24: Arbutina, 25: Esculina, 26: Salicina, 27: d-Celobiose, 28: d-Maltose, 29: d-Lactose, 30: d-Melibiose, 31: d-Sacarose, 32: d-Trealose, 33: Inulina, 34: d-Melezitose, 35: d-Rafinose, 36: Amido, 37: Glicogênio, 38: Xilitol, 39: Gentiobiose, 40: d-Turanose, 41: d-Lixose, 42: d-Tagatose, 43: d-Fucose, 44: l-Fucose, 45: d-Arabitól, 46: l-Arabitól, 47: Gluconato de potássio, 48: 2 ceto-gluconato de potássio, 49: 5 ceto-gluconato de potássio. +: resultado positivo, -: resultado negativo, D: resultado duvidoso.

Tabela 11 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus pumilus*

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																															
	NEG	GAL	AGA	SOR	OLD	THRM	SUC	ARA	INU	NAG	NAA	TZR	XYL	RIB	AMY	ARB	TAG	MAN	MLT	KCN	PAS	GLU	RAF	TRE	NCL	NAE	INO	SAL	PLA	MEN	ESC	
3325 B	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	
3325 V	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	
3429 A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
3429 B	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	
3429 C	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
3429 D	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	
34382	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	
34386 A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	
34386 B	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	
34386 C	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	
34386 D	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	
3528	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	

Legenda: NEG: Controle negativo, GAL: Galactose, AGA: Amidalina, SOR: Sorbitol, OLD: Oleandomicina, THRM: Termófilo, SUC: Sacarose, ARA: Arabinose, INU: Inulina, NAG: N-Acetil-Glicosamina, NAA: Acetato de sódio, TZR: Vermelho de Tetrazólio, XYL: Xilose, RIB: Ribose, AMY: Amilopectina, ARB: Arabitol, TAG: Tagatose, MAN: Manitol, MLT: Maltose, KCN: Tiocianato de Potássio, PAS: Poliamido-higroestrepina, GLU: Glicose, RAF: Rafinose, TRE: Trealose, NCL: Cloreto de sódio, NAE: Ácido nalidixico, INO: Inositol, SAL: Salicina, PLA: Platinose, MEN: Ácido mandélico, ESC: Esculina. +: resultado positivo, -: resultado negativo.

Tabela 12 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus pumilus*

ISOLADO BACTERIANO	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (NÚMERO DE ACESSO)	TAMANHO DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (PB)	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUÊNCIA
3325 B	99,93% <i>B. safensis</i> (AF234854)	1505	JF309243
	99,79% <i>B. pumilus</i> (AY876289)		
	99,52% <i>B. altitudinis</i> (AJ831842)		
	99,46% <i>B. stratosphaericus</i> (AJ831841)*		
	99,46% <i>B. aerophilus</i> (AJ831844)*		
3325 V	99,93% <i>B. safensis</i> (AF234854)	1500	JF309244
	99,79% <i>B. pumilus</i> (AY876289)		
	99,59% <i>B. altitudinis</i> (AJ831842)		
	99,53% <i>B. stratosphaericus</i> (AJ831841)*		
	99,53% <i>B. aerophilus</i> (AJ831844)*		
3429 A	99,93 % <i>B. altitudinis</i> (AJ831842)	1516	JF309245
	99,86% <i>B. stratosphericus</i> (AJ831841)*		
	99,86% <i>B. aerophilus</i> (AJ831844)*		
	99,51% <i>B. safensis</i> (AF234854)		
	99,51% <i>B. pumilus</i> (AY876289)		
3429 B	100 % <i>B. altitudinis</i> (AJ831842)	1505	JF309246
	99,93% <i>B. stratosphericus</i> (AJ831841)*		
	99,93% <i>B. aerophilus</i> (AJ831844)*		
	99,51% <i>B. safensis</i> (AF234854)		
	99,51% <i>B. pumilus</i> (AY876289)		
3429 C	99,93% <i>B. altitudinis</i> (AJ831842)	1503	JF309247
	99,86% <i>B. stratosphericus</i> (AJ831841)*		
	99,86% <i>B. aerophilus</i> (AJ831844)*		
	99,44% <i>B. safensis</i> (AF234854)		
	99,44% <i>B. pumilus</i> (AY876289)		
3429 D	100% <i>B. altitudinis</i> (AJ831842)	1497	JF309248
	99,93% <i>B. stratosphericus</i> (AJ831841)*		
	99,93% <i>B. aerophilus</i> (AJ831844)*		
	99,51% <i>B. safensis</i> (AF234854)		
	99,51% <i>B. pumilus</i> (AY876289)		
34382	99,93% <i>B. safensis</i> (AF234854)	1501	JF309250
	99,79% <i>B. pumilus</i> (AY876289)		
	99,59% <i>B. altitudinis</i> (AJ831842)		
	99,53% <i>B. stratosphericus</i> (AJ831841)*		
	99,53% <i>B. aerophilus</i> (AJ831844)*		
34386 A	100% <i>B. altitudinis</i> (AJ831842)	1518	JF309251
	99,93% <i>B. stratosphericus</i> (AJ831841)*		
	99,93% <i>B. aerophilus</i> (AJ831844)*		
	99,51% <i>B. safensis</i> (AF234854)		
	99,51% <i>B. pumilus</i> (AY876289)		
34386 B	100% <i>B. altitudinis</i> (AJ831842)	1513	JF309252
	99,93% <i>B. stratosphericus</i> (AJ831841)*		
	99,93% <i>B. aerophilus</i> (AJ831844)*		
	99,51% <i>B. safensis</i> (AF234854)		
	99,51% <i>B. pumilus</i> (AY876289)		

*cepa tipo não está disponível em coleções de culturas

Tabela 12 (Cont.) Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus pumilus*

ISOLADO BACTERIANO	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (NÚMERO DE ACESSO)	TAMANHO DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (PB)	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUÊNCIA
34386 C	100% <i>B. stratosphericus</i> (AJ831841)* 100% <i>B. aerophilus</i> (AJ831844)* 99,93% <i>B. altitudinis</i> (AJ831842) 99,44% <i>B. safensis</i> (AF234854) 99,44% <i>B. pumilus</i> (AY876289)	1513	JF309253
34386 D	100% <i>B. altitudinis</i> (AJ831842) 99,93% <i>B. stratosphericus</i> (AJ831841)* 99,93% <i>B. aerophilus</i> (AJ831844)* 99,51% <i>B. safensis</i> (AF234854) 99,51% <i>B. pumilus</i> (AY876289)	1502	JF309254
3528	99,85% <i>B. pumilus</i> (AY876289) 99,70% <i>B. safensis</i> (AF234854) 99,42% <i>B. altitudinis</i> (AJ831842) 99,36% <i>B. stratosphericus</i> (AJ831841)* 99,36% <i>B. aerophilus</i> (AJ831844)*	1420	JF309249

*cepa tipo não está disponível em coleções de culturas

Tabela 13 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para isolados bacterianos do grupo *Bacillus pumilus*

ISOLADO BACTERIANO	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA	VITEK	API	CRESCIMENTO EM ANAEROBIOSE
3325 B	Grupo <i>B. pumilus</i>	99% <i>B. pumilus</i>	99,9% <i>B. pumilus</i>	+
3325 V	Grupo <i>B. pumilus</i>	99% <i>B. pumilus</i>	99,9% <i>B. pumilus</i>	+
3429 A	Grupo <i>B. pumilus</i>	99% <i>B. pumilus</i>	99,9% <i>B. pumilus</i>	-
3429 B	Grupo <i>B. pumilus</i>	99% <i>B. pumilus</i>	99,9% <i>B. pumilus</i>	-
3429 C	Grupo <i>B. pumilus</i>	99% <i>B. pumilus</i>	99,9% <i>B. pumilus</i>	-
3429 D	Grupo <i>B. pumilus</i>	99% <i>B. pumilus</i>	99,9% <i>B. pumilus</i>	-
34382	Grupo <i>B. pumilus</i>	99% <i>B. pumilus</i>	99,9% <i>B. pumilus</i>	+
34386 A	Grupo <i>B. pumilus</i>	99% <i>B. pumilus</i>	99,9% <i>B. pumilus</i>	-
34386 B	Grupo <i>B. pumilus</i>	99% <i>B. pumilus</i>	99,9% <i>B. pumilus</i>	-
34386 C	Grupo <i>B. pumilus</i>	99% <i>B. pumilus</i>	99,9% <i>B. pumilus</i>	-
34386 D	Grupo <i>B. pumilus</i>	99% <i>B. pumilus</i>	99,9% <i>B. pumilus</i>	-
3528	Grupo <i>B. pumilus</i>	99% <i>B. pumilus</i>	99,9% <i>B. pumilus</i>	+

4.2.3 Grupo *Bacillus cereus*

Este grupo é composto por oito isolados bacterianos. Conforme ilustrado pela Tabela 14, de todos os testes bioquímicos utilizados para identificação pelo sistema API, o resultado dos seguintes testes não apresentou variação, sendo todos os isolados bacterianos negativos para eritrol, d-arabinose, l-arabinose, d-xilose, l-xilose, d-adonitol, metil- β -d-xilopiranosídeo, l-sorbose, l-raminose, dulcitol, inositol, d-manitol, metil- α -d-manopiranosídeo, metil- α -d-glucopiranosídeo, d-lactose, d-melibiose, inulina, d-rafinose, xilitol, d-lixose, d-tagatose, d-fucose, l-fucose, d-arabitol, l-arabitol e 2 ceto-gluconato de potássio. Também não houve variação nos seguintes testes, onde todos os isolados bacterianos foram positivos para d-glicose, esculina, d-maltose e glicogênio. Os demais testes apresentaram variação.

Segundo a Tabela 15 de todos os testes bioquímicos utilizados para identificação pelo sistema VITEK, o resultado dos seguintes testes não apresentou variação, sendo todos os isolados bacterianos negativos para amidalina, sorbitol, oleandomicina, arabinose, inulina, vermelho de tetrazólio, xilose, ribose, arabitol, tagatose, manitol, rafinose, cloreto de sódio, inositol e platinose e positivos para n-acetil-glicosamina, maltose, glicose e esculina. Os demais testes apresentaram variação.

De acordo com a Tabela 16, o tamanho das sequências do gene 16S rRNA variou entre 1404 e 1521 pares de bases. Para avaliar a similaridade do gene 16S rRNA de cada isolado bacteriano com *B. cereus* as sequências dos isolados bacterianos foram comparadas com as sequências dos treze operons da cepa tipo de *B. cereus* e na Tabela 16 estão representados os resultados do operon com maior similaridade e do operon com menor similaridade para cada isolado bacteriano. Os isolados bacterianos apresentaram maior similaridade com o operon A de *B. cereus*, exceto o isolado bacteriano 3541, que apresentou maior similaridade com o operon C. O isolado bacteriano 3539 apresentou menor similaridade com o operon K e os isolados bacterianos 3374 e 3541 apresentaram menor similaridade com o operon B. Os demais isolados bacterianos s apresentaram menor similaridade com o operon C.

O isolado bacteriano 3434 apresentou maior similaridade respectivamente com *B. cereus* (operon A), *Bacillus anthracis*, *B. cereus* (operon C), *Bacillus*

thuringiensis, *Bacillus weihenstephanensis* e *Bacillus mycoides*. O isolado bacteriano 3541 apresentou maior similaridade respectivamente com *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis* e *B. mycoides*. Os isolados bacterianos 3374 e 3539 apresentaram maior similaridade respectivamente com *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* e *B. mycoides*. Os demais isolados bacterianos apresentaram maior similaridade com *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* e *B. mycoides*, respectivamente.

Os isolados bacterianos apresentaram entre 99,93% e 98,39% de similaridade com *B. cereus*, entre 99,92% e 98,54% de similaridade com *B. anthracis*, entre 99,79% e 98,38% de similaridade com *B. thuringiensis* e entre 99,53% e 98,18% de similaridade com *B. weihenstephanensis* e *B. mycoides*.

Na Tabela 17 pode-se observar que todos os isolados bacterianos apresentaram crescimento em anaerobiose. Segundo a mesma tabela, os resultados obtidos utilizando os sistemas API e VITEK apresentaram identificação diferente para o isolado bacteriano 3546. Quando comparado com o resultado da análise da sequência do gene 16S rRNA, o sistema VITEK não identificou corretamente as prováveis espécies do isolado bacteriano 3546. Para os demais isolados bacterianos, o sistema VITEK identificou corretamente as prováveis espécies com um percentual entre 96% e 99%. Os isolados bacterianos tiveram as prováveis espécies identificadas corretamente pelo sistema API com um percentual entre 83,2% e 99,9%.

Tabela 14 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus cereus*

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																																																				
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49			
3374	-	D	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	+	D	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3434	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	D	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	
3539	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	D	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	D	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-
3541	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	D	+	+	+	+	+	-	-	-	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	
3546	-	D	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	D	-	-	-	-	-	-	+	+	-	D	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	
3550	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
3551	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
5000	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	

Legenda: 0: Controle negativo, 1: Glicerol, 2: Eritrol, 3: d-Arabinose, 4: l-Arabinose, 5: d-Ribose, 6: d-Xilose, 7: l-Xilose, 8: d-Adonitol, 9: Metil-β-d-Xilopiranosídeo, 10: d-Galactose, 11: d-Glicose, 12: d-Fructose, 13: d-Manose, 14: l-Sorbose, 15: l-Raminose, 16: Dulcitol, 17: Inositol, 18: d-Manitol, 19: d-Sorbitol, 20: Metil-α-d-Manopiranosídeo, 21: Metil-α-d-Glucopiranosídeo, 22: N-Acetil-Glicosamina, 23: Amidalina, 24: Arbutina, 25: Esculina, 26: Salicina, 27: d-Celobiose, 28: d-Maltose, 29: d-Lactose, 30: d-Melibiose, 31: d-Sacarose, 32: d-Trelose, 33: Inulina, 34: d-Melezitose, 35: d-Rafinose, 36: Amido, 37: Glicogênio, 38: Xilitol, 39: Gentiobiose, 40: d-Turanose, 41: d-Lixose, 42: d-Tagatose, 43: d-Fucose, 44: l-Fucose, 45: d-Arabitol, 46: l-Arabitol, 47: Gluconato de potássio, 48: 2 ceto-gluconato de potássio, 49: 5 ceto-gluconato de potássio. +: resultado positivo, -: resultado negativo, D: resultado duvidoso.

Tabela 15 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus cereus*

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																															
	NEG	GAL	AGA	SOR	OLD	THRM	SUC	ARA	INU	NAG	NAA	TZR	XYL	RIB	AMY	ARB	TAG	MAN	MLT	KCN	PAS	GLU	RAF	TRE	NCL	NAE	INO	SAL	PLA	MEN	ESC	
3374	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	
3434	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	
3539	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	
3541	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	
3546	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	
3550	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	
3551	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	
5000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+

Legenda: NEG: Controle negativo, GAL: Galactose, AGA: Amidalina, SOR: Sorbitol, OLD: Oleandomicina, THRM: Termófilo, SUC: Sacarose, ARA: Arabinose, INU: Inulina, NAG: N-Acetil-Glicosamina, NAA: Acetato de sódio, TZR: Vermelho de Tetrazólio, XYL: Xilose, RIB: Ribose, AMY: Amilopectina, ARB: Arabitol, TAG: Tagatose, MAN: Manitol, MLT: Maltose, KCN: Tiocianato de Potássio, PAS: Poliamido-higroestrepina, GLU: Glicose, RAF: Rafinose, TRE: Trealose, NCL: Cloreto de sódio, NAE: Ácido nalidixico, INO: Inositol, SAL: Salicina, PLA: Platinose, MEN: Ácido mandélico, ESC: Esculina. +: resultado positivo, -: resultado negativo.

Tabela 16 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus cereus*

ISOLADO BACTERIANO	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (NÚMERO DE ACESSO)	TAMANHO DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (PB)	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUÊNCIA
3374	99,93% <i>B. cereus</i> (AE016877) operon A 99,86% <i>B. cereus</i> (AE016877) operon B 99,77% <i>B. anthracis</i> (AB190217) 99,73% <i>B. thuringiensis</i> (D16281) 99,47% <i>B. weihenstephanensis</i> (AB021199) 99,46% <i>B. mycoides</i> (AB021192)	1515	JF309221
3434	99,93% <i>B. cereus</i> (AE016877) operon A 99,84% <i>B. anthracis</i> (AB190217) 99,79% <i>B. cereus</i> (AE016877) operon C 99,66% <i>B. thuringiensis</i> (D16281) 99,40% <i>B. weihenstephanensis</i> (AB021199) 99,40% <i>B. mycoides</i> (AB021192)	1521	FJ215792
3539	99,79% <i>B. cereus</i> (AE016877) operon A 99,73% <i>B. cereus</i> (AE016877) operon K 99,69% <i>B. anthracis</i> (AB190217) 99,66% <i>B. thuringiensis</i> (D16281) 99,46% <i>B. weihenstephanensis</i> (AB021199) 99,46% <i>B. mycoides</i> (AB021192)	1505	JF309222
3541	99,93% <i>B. cereus</i> (AE016877) operon C 99,86% <i>B. cereus</i> (AE016877) operon B 99,79% <i>B. thuringiensis</i> (D16281) 99,77% <i>B. anthracis</i> (AB190217) 99,53% <i>B. weihenstephanensis</i> (AB021199) 99,53% <i>B. mycoides</i> (AB021192)	1519	JF309223
3546	98,54% <i>B. anthracis</i> (AB190217) 98,52% <i>B. cereus</i> (AE016877) operon A 98,39% <i>B. cereus</i> (AE016877) operon C 98,38% <i>B. thuringiensis</i> (D16281) 98,18% <i>B. weihenstephanensis</i> (AB021199) 98,18% <i>B. mycoides</i> (AB021192)	1497	JF309224
3550	99,69% <i>B. anthracis</i> (AB190217) 99,65% <i>B. cereus</i> (AE016877) operon A 99,51% <i>B. cereus</i> (AE016877) operon C 99,37% <i>B. thuringiensis</i> (D16281) 99,16% <i>B. weihenstephanensis</i> (AB021199) 99,16% <i>B. mycoides</i> (AB021192)	1447	JF309225
3551	99,92% <i>B. anthracis</i> (AB190217) 99,86% <i>B. cereus</i> (AE016877) operon A 99,72% <i>B. cereus</i> (AE016877) operon C 99,58% <i>B. thuringiensis</i> (D16281) 99,37% <i>B. weihenstephanensis</i> (AB021199) 99,37% <i>B. mycoides</i> (AB021192)	1444	JF309226
5000	99,92% <i>B. anthracis</i> (AB190217) 99,78% <i>B. cereus</i> (AE016877) operon A 99,64% <i>B. cereus</i> (AE016877) operon C 99,49% <i>B. thuringiensis</i> (D16281) 99,28% <i>B. weihenstephanensis</i> (AB021199) 99,27% <i>B. mycoides</i> (AB021192)	1404	JF309227

Tabela 17 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus cereus*

ISOLADO BACTERIANO	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA	VITEK	API	CRESCIMENTO EM ANAEROBIOSE
3374	Grupo <i>B. cereus</i>	99% grupo <i>B. cereus</i>	83,2% <i>B. cereus</i> 1	+
3434	Grupo <i>B. cereus</i>	96% grupo <i>B. cereus</i>	96,3% <i>B. cereus</i> 1	+
3539	Grupo <i>B. cereus</i>	99% grupo <i>B. cereus</i>	99,9% <i>B. cereus</i> 1	+
3541	Grupo <i>B. cereus</i>	99% grupo <i>B. cereus</i>	99,9% <i>B. cereus</i> 1	+
3546	Grupo <i>B. cereus</i>	94% <i>B. coagulans</i>	94,4% <i>B. cereus</i> 1	+
3550	Grupo <i>B. cereus</i>	98% grupo <i>B. cereus</i>	99,9% <i>B. cereus</i> 1	+
3551	Grupo <i>B. cereus</i>	99% grupo <i>B. cereus</i>	94,4% <i>B. cereus</i> 1	+
5000	Grupo <i>B. cereus</i>	99% grupo <i>B. cereus</i>	99,9% <i>B. cereus</i> 1	+

4.2.4 Grupo *Bacillus subtilis*

Estão nesse grupo seis isolados bacterianos. Conforme ilustrado pela Tabela 18, de todos os testes bioquímicos utilizados para identificação pelo sistema API, o resultado dos seguintes testes não apresentou variação, sendo todos os isolados bacterianos negativos para eritrol, l-xilose, d-adonitol, metil- β -d-xilopiranosídeo, l-raminose, dulcitol, metil- α -d-manopiranosídeo, d-lixose, l-arabitol e 2 ceto-gluconato de potássio e todos foram positivos para d-glicose, d-frutose, d-manitol, esculina e d-sacarose. Os demais testes apresentaram variação.

Segundo a Tabela 19 de todos os testes bioquímicos utilizados para identificação pelo sistema VITEK, o resultado dos seguintes testes não apresentou variação, sendo todos os isolados bacterianos positivos para sacarose, manitol, tiocianato de potássio, poliamido-higroestrepina, glicose, ácido mandélico e esculina e todos foram negativos para galactose, amidalina, oleandomicina, n-acetil-glicosamina, vermelho de tetrazólio, xilose, arabitol, tagatose, rafinose e ácido nalidíxico. Os demais testes apresentaram variação.

De acordo com a Tabela 20, o tamanho das sequências do gene 16S rRNA variou entre 1502 e 1531 pares de bases. Os isolados bacterianos apresentaram maior similaridade respectivamente com *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus mojavensis* e *Bacillus atrophaeus*, exceto o isolado bacteriano 3417 que apresentou

maior similaridade com *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. atrophaeus*, respectivamente.

Os isolados bacterianos apresentaram entre 99,80% e 99,20% de similaridade com *B. subtilis* subsp. *subtilis*, entre 99,79% e 99,25% de similaridade com *B. amyloliquefaciens*, entre 99,67% e 99,21% de similaridade com *B. vallismortis*, entre 99,64% e 99,00% de similaridade com *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, entre 99,47% e 98,87% de similaridade com *B. mojavensis* e entre 99,47% e 98,86% de similaridade com *B. atrophaeus*.

Na Tabela 21 podemos observar que apenas os isolados bacterianos 3639 A e 3639 B não apresentaram crescimento em anaerobiose e não puderam ser identificados pelo sistema API. Quando comparado com o resultado da análise da sequência do gene 16S rRNA, o sistema VITEK identificou corretamente as prováveis espécies de todos os isolados bacterianos com um percentual de 99%. Por outro lado, o sistema API identificou corretamente as prováveis espécies dos isolados bacterianos com um percentual entre 99% e 96,7%, exceto os isolados bacterianos 3639 A e 3639 B.

Tabela 18 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus subtilis*

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																																																				
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49			
3417	-	D	-	D	+	+	D	-	-	-	D	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	D	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	D	-	D	D	D	D	-	D	-	-		
3480	-	D	-	-	+	+	D	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	D	+	+	+	+	+	D	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3614	-	D	-	-	D	+	D	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	D	+	+	-	D	D	D	+	+	+	+	D	D	D	+	+	D	-	D	+	+	+	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3639 A	-	D	-	-	D	D	D	-	-	-	D	+	+	+	D	-	-	D	+	+	-	D	D	D	+	D	D	D	D	D	D	+	D	-	-	D	D	D	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	
3639 B	-	D	-	-	D	D	D	-	-	-	D	+	+	+	-	-	-	D	+	+	-	+	+	D	+	+	+	D	+	D	D	+	D	-	-	D	D	D	D	D	D	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5001	-	+	-	-	+	+	D	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	D	+	D	-	D	D	D	D	+	+	+	+	D	D	+	D	+	-	D	D	+	-	D	D	+	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	

Legenda: 0: Controle negativo, 1: Glicerol, 2: Eritrol, 3: d-Arabinose, 4: l-Arabinose, 5: d-Ribose, 6: d-Xilose, 7: l-Xilose, 8: d-Adonitol, 9: Metil-β-d-Xilopiranosídeo, 10: d-Galactose, 11: d-Glicose, 12: d-Frutose, 13: d-Manose, 14: l-Sorbose, 15: l-Raminose, 16: Dulcitol, 17: Inositol, 18: d-Manitol, 19: d-Sorbitol, 20: Metil-α-d-Manopiranosídeo, 21: Metil-α-d-Glucopiranosídeo, 22: N-Acetil-Glicosamina, 23: Amidalina, 24: Arbutina, 25: Esculina, 26: Salicina, 27: d-Celobiose, 28: d-Maltose, 29: d-Lactose, 30: d-Melibiose, 31: d-Sacarose, 32: d-Trealose, 33: Inulina, 34: d-Melezitose, 35: d-Rafinose, 36: Amido, 37: Glicogênio, 38: Xilitol, 39: Gentiobiose, 40: d-Turanose, 41: d-Lixose, 42: d-Tagatose, 43: d-Fucose, 44: l-Fucose, 45: d-Arabitol, 46: l-Arabitol, 47: Gluconato de potássio, 48: 2 ceto-gluconato de potássio, 49: 5 ceto-gluconato de potássio. +: resultado positivo, -: resultado negativo, D: resultado duvidoso.

Tabela 19 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus subtilis*

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																														
	NEG	GAL	AGA	SOR	OLD	THRM	SUC	ARA	INU	NAG	NAA	TZR	XYL	RIB	AMY	ARB	TAG	MAN	MLT	KCN	PAS	GLU	RAF	TRE	NCL	NAE	INO	SAL	PLA	MEN	ESC
3417	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
3480	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
3614	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
3639 A	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
3639 B	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
5001	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+

Legenda: NEG: Controle negativo, GAL: Galactose, AGA: Amidalina, SOR: Sorbitol, OLD: Oleandomicina, THRM: Termófilo, SUC: Sacarose, ARA: Arabinose, INU: Inulina, NAG: N-Acetil-Glicosamina, NAA: Acetato de sódio, TZR: Vermelho de Tetrazólio, XYL: Xilose, RIB: Ribose, AMY: Amilopectina, ARB: Arabitol, TAG: Tagatose, MAN: Manitol, MLT: Maltose, KCN: Tiocianato de Potássio, PAS: Poliamido-higroestrepina, GLU: Glicose, RAF: Rafinose, TRE: Trealose, NCL: Cloreto de sódio, NAE: Ácido nalidíxico, INO: Inositol, SAL: Salicina, PLA: Platinose, MEN: Ácido mandélico, ESC: Esculina. +: resultado positivo, -: resultado negativo.

Tabela 20 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus subtilis*

ISOLADO BACTERIANO	RESULTADO DA ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (NÚMERO DE ACESSO)	TAMANHO DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (PB)	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUÊNCIA
3417	99,80% <i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (AJ276351) 99,64% <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (AF074970) 99,47% <i>B. mojavensis</i> (AB021191) 99,47% <i>B. vallismortis</i> (AB021198) 99,25% <i>B. amyloliquefaciens</i> (AB255669) 99,07% <i>B. atrophaeus</i> (AB021181)	1519	FJ215789
3480	99,72% <i>B. amyloliquefaciens</i> (AB255669) 99,60% <i>B. vallismortis</i> (AB021198) 99,53% <i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (AJ276351) 99,36% <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (AF074970) 99,21% <i>B. mojavensis</i> (AB021191) 99,20% <i>B. atrophaeus</i> (AB021181)	1519	JF309255
3614	99,72% <i>B. amyloliquefaciens</i> (AB255669) 99,67% <i>B. vallismortis</i> (AB021198) 99,60% <i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (AJ276351) 99,43% <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (AF074970) 99,27% <i>B. mojavensis</i> (AB021191) 99,27% <i>B. atrophaeus</i> (AB021181)	1517	JF309256
3639 A	99,79% <i>B. amyloliquefaciens</i> (AB255669) 99,60% <i>B. vallismortis</i> (AB021198) 99,53% <i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (AJ276351) 99,50% <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (AF074970) 99,47% <i>B. mojavensis</i> (AB021191) 99,47% <i>B. atrophaeus</i> (AB021181)	1529	JF309257
3639 B	99,66% <i>B. amyloliquefaciens</i> (AB255669) 99,47% <i>B. vallismortis</i> (AB021198) 99,40% <i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (AJ276351) 99,36% <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (AF074970) 99,34% <i>B. mojavensis</i> (AB021191) 99,33% <i>B. atrophaeus</i> (AB021181)	1531	JF309258
5001	99,32% <i>B. amyloliquefaciens</i> (AB255669) 99,26% <i>B. vallismortis</i> (AB021198) 99,20% <i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (AJ276351) 99,00% <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (AF074970) 98,87 % <i>B. mojavensis</i> (AB021191) 98,86 % <i>B. atrophaeus</i> (AB021181)	1502	JF309259

Tabela 21 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus subtilis*

ISOLADO BACTERIANO	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA	VITEK	API	CRESCIMENTO EM ANAEROBIOSE
3417	Grupo <i>B. subtilis</i>	99% <i>B. subtilis</i>	98,2% <i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i>	+
3480	Grupo <i>B. subtilis</i>	98% <i>B. amyloliquefaciens</i>	98,3% <i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i>	+
3614	Grupo <i>B. subtilis</i>	99% <i>B. amyloliquefaciens</i>	99,0% <i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i>	+
3639 A	Grupo <i>B. subtilis</i>	99% <i>B. amyloliquefaciens</i>	Identificação inaceitável	-
3639 B	Grupo <i>B. subtilis</i>	99% <i>B. amyloliquefaciens</i>	Identificação inaceitável	-
5001	Grupo <i>B. subtilis</i>	99% <i>B. amyloliquefaciens</i>	96,7% <i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i>	+

4.2.5 Grupo *Bacillus licheniformis*

Um total de quatro isolados bacterianos faz parte deste grupo e todos são capazes de crescer a 55°C. Conforme ilustrado na Tabela 22, de todos os testes bioquímicos utilizados para identificação pelo sistema API, o resultado dos seguintes testes não apresentou variação, sendo todos os isolados bacterianos negativos para eritrol, d-arabinose, l-xilose, d-adonitol, l-sorbose, dulcitol, metil- α -d-manopiranosídeo, xilitol, d-lixose, d-fucose, l-fucose, d-arabitol, l-arabitol, 2 ceto-gluconato de potássio e 5 ceto-gluconato de potássio. Também não houve variação nos seguintes testes, onde todos os isolados bacterianos foram positivos para d-xilose, d-glicose, d-frutose, d-manose, d-manitol, metil- α -d-glucopiranosídeo, n-acetil-glicosamina, amidalina, arbutina, esculina, salicina, d-celobiose, d-maltose, d-sacarose, d-trealose, amido, glicogênio e gentiobiose. Os demais testes apresentaram variação.

Segundo a Tabela 23, de todos os testes bioquímicos utilizados para identificação pelo sistema VITEK, o resultado dos seguintes testes não apresentou variação, sendo todos os isolados bacterianos negativos para galactose, vermelho

de tetrazólio, xilose, arabitol e rafinose e todos foram positivos para poliamidohigroestrepina e esculina. Os demais testes apresentaram variação.

De acordo com a Tabela 24, o tamanho das sequências do gene 16S rRNA variou entre 1386 e 1519 pares de bases. Para avaliar a similaridade da sequência do gene 16S rRNA de cada isolado bacteriano com *B. licheniformis*, cada sequência foi comparada com as sequências dos sete operons da cepa tipo de *B. licheniformis* e na Tabela 24 estão representados os resultados do operon com maior similaridade e do operon com menor similaridade para cada isolado bacteriano. Os isolados bacterianos apresentaram maior similaridade com o operon rRNA 0001, exceto o isolado bacteriano 3479 que apresentou maior similaridade com o operon rRNA 0004. Os isolados bacterianos 3452 e 3479 apresentaram menor similaridade com o operon rRNA 0013 enquanto os isolados bacterianos 3547 e 3560 apresentaram menor similaridade com o operon rRNA 0004.

Os isolados bacterianos apresentaram maior similaridade com *B. licheniformis*, *Bacillus sonorensis* e *Bacillus aerius*, respectivamente. Os isolados bacterianos apresentaram entre 99,92% e 99,66% de similaridade com *B. licheniformis*, entre 99,68% e 99,42% de similaridade com *B. sonorensis* e entre 99,48% e 99,24% de similaridade com *B. aerius*.

Na Tabela 25 podemos observar que todos os isolados bacterianos deste grupo apresentaram crescimento em anaerobiose. Segundo a mesma tabela, os sistemas API e VITEK não apresentaram a mesma identificação para nenhum isolado bacteriano. Quando comparado com o resultado da análise da sequência do gene 16S rRNA, o sistema VITEK não apresentou uma identificação aceitável para o isolado bacteriano 3560, se equivocou na identificação do gênero do isolado bacteriano 3479, na identificação de uma das prováveis espécies de 3452 e identificou corretamente uma das prováveis espécies apenas do isolado bacteriano 3547. Por outro lado, o sistema API não identificou corretamente a espécie e o gênero do isolado bacteriano 3547. Os demais isolados bacterianos tiveram suas prováveis espécies identificadas corretamente pelo sistema API com um percentual de 99,9%.

Tabela 22 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus licheniformis*

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																																																			
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49		
3452	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	D	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	D	+	+	+	-	D	+	+	-	+	D	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
3479	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
3547	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
3560	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-

Legenda: 0: Controle negativo, 1: Glicerol, 2: Eritrol, 3: d-Arabinose, 4: l-Arabinose, 5: d-Ribose, 6: d-Xilose, 7: l-Xilose, 8: d-Adonitol, 9: Metil-βd-Xilopiranosídeo, 10: d-Galactose, 11: d-Glicose, 12: d-Frutose, 13: d-Manose, 14: l-Sorbose, 15: l-Raminose, 16: Dulcitol, 17: Inositol, 18: d-Manitol, 19: d-Sorbitol, 20: Metil-α-d-Manopiranosídeo, 21: Metil-α-d-Glucopiranosídeo, 22: N-Acetil-Glicosamina, 23: Amidalina, 24: Arbutina, 25: Esculina, 26: Salicina, 27: d-Celobiose, 28: d-Maltose, 29: d-Lactose, 30: d-Melibiose, 31: d-Sacarose, 32: d-Trealose, 33: Inulina, 34: d-Melezitose, 35: d-Rafinose, 36: Amido, 37: Glicogênio, 38: Xilitol, 39: Gentiobiose, 40: d-Turanose, 41: d-Lixose, 42: d-Tagatose, 43: d-Fucose, 44: l-Fucose, 45: d-Arabitol, 46: l-Arabitol, 47: Gluconato de potássio, 48: 2 ceto-gluconato de potássio, 49: 5 ceto-gluconato de potássio. +: resultado positivo, -: resultado negativo, D: resultado duvidoso.

Tabela 23 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus licheniformis*

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																																																	
	NEG	GAL	AGA	SOR	OLD	THRM	SUC	ARA	INU	NAG	NAA	TZR	XYL	RIB	AMY	ARB	TAG	MAN	MLT	KCN	PAS	GLU	RAF	TRE	NCL	NAE	INO	SAL	PLA	MEN	ESC																			
3452	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
3479	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
3547	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3560	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: NEG: Controle negativo, GAL: Galactose, AGA: Amidalina, SOR: Sorbitol, OLD: Oleandomicina, THRM: Termófilo, SUC: Sacarose, ARA: Arabinose, INU: Inulina, NAG: N-Acetil-Glicosamina, NAA: Acetato de sódio, TZR: Vermelho de Tetrázólio, XYL: Xilose, RIB: Ribose, AMY: Amilopectina, ARB: Arabitol, TAG: Tagatose, MAN: Manitol, MLT: Maltose, KCN: Tiocianato de Potássio, PAS: Poliamido-higroestrepina, GLU: Glicose, RAF: Rafinose, TRE: Trealose, NCL: Cloreto de sódio, NAE: Ácido nalidíxico, INO: Inositol, SAL: Salicina, PLA: Platinoase, MEN: Ácido mandélico, ESC: Esculina. +: resultado positivo, -: resultado negativo.

Tabela 24 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus licheniformis*

ISOLADO BACTERIANO	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (NÚMERO DE ACESSO)	TAMANHO DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (PB)	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUÊNCIA
3452	99,86% <i>B. licheniformis</i> (CP000002) BL_rrna_0001 99,72% <i>B. licheniformis</i> (CP000002) BL_rrna_0013 99,56% <i>B. sonorensis</i> (AF302118) 99,37% <i>B. aerius</i> (AJ831843)*	1465	JF309228
3479	99,92% <i>B. licheniformis</i> (CP000002) BL_rrna_0004 99,78% <i>B. licheniformis</i> (CP000002) BL_rrna_0013 99,68% <i>B. sonorensis</i> (AF302118) 99,48% <i>B. aerius</i> (AJ831843)*	1387	FJ2157801
3547	99,80% <i>B. licheniformis</i> (CP000002) BL_rrna_0001 99,67% <i>B. licheniformis</i> (CP000002) BL_rrna_0004 99,43% <i>B. sonorensis</i> (AF302118) 99,26% <i>B. aerius</i> (AJ831843)*	1519	JF309229
3560	99,79% <i>B. licheniformis</i> (CP000002) BL_rrna_0001 99,66% <i>B. licheniformis</i> (CP000002) BL_rrna_0004 99,42% <i>B. sonorensis</i> (AF302118) 99,24% <i>B. aerius</i> (AJ831843)*	1482	JF309230

*cepa tipo não está disponível em coleções de culturas

Tabela 25 Resultados da identificação utilizando análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos do grupo *Bacillus licheniformis*

ISOLADO BACTERIANO	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA	VITEK	API	CRESCIMENTO EM ANAEROBIOSE
3452	Grupo <i>B. licheniformis</i>	97% <i>B. subtilis</i>	99,9% <i>B. licheniformis</i>	+
3479	Grupo <i>B. licheniformis</i>	99% <i>Brevibacillus borstelensis</i> / <i>Brevibacillus parabrevis</i> / <i>Brevibacillus brevis</i>	99,9% <i>B. licheniformis</i>	+
3547	Grupo <i>B. licheniformis</i>	99,9% <i>B. licheniformis</i>	99,5% <i>P. amylolyticus</i>	+
3560	Grupo <i>B. licheniformis</i>	Identificação inaceitável	99,9% <i>B. licheniformis</i>	+

4.2.6 *Bacillus* sp. Relacionado à espécie *Bacillus humi*

Um total de dez isolados bacterianos compõe este grupo. Conforme ilustrado pela Tabela 26, de todos os testes bioquímicos utilizados para identificação pelo

sistema API, o resultado dos seguintes testes não apresentou variação, sendo todos os isolados bacterianos negativos para eritrol, l-xilose, d-adonitol, d-manose, l-sorbose, l-raminose, dulcitol, d-manitol, d-sorbitol, metil- α -d-manopiranosídeo, amidalina, salicina, d-melibiose, inulina, d-melezitose, xilitol, d-turanose, d-lixose, d-tagatose, d-fucose e gluconato de potássio. Também não houve variação nos seguintes testes, onde todos os isolados bacterianos foram positivos para d-maltose, d-sacarose e d-trealose. Os demais testes apresentaram variação.

Segundo a Tabela 27, de todas as provas bioquímicas utilizadas para identificação pelo sistema VITEK o resultado das seguintes não apresentou variação, sendo todos os isolados bacterianos negativos para galactose, amidalina, sorbitol, oleandomicina, sacarose, arabinose, inulina, vermelho de tetrazólio, xilose, ribose, arabitol, tagatose, manitol, tiocianato de potássio, rafinose, cloreto de sódio, inositol, salicina e platinose e todos foram positivos para acetato de sódio. Os demais testes apresentaram variação.

De acordo com a Tabela 28, o tamanho das sequências do gene 16S rRNA variou entre 1509 e 1533 pares de bases. Todos os isolados bacterianos apresentaram maior similaridade com *B. humi*, com um percentual de similaridade entre 98,20% e 97,88%.

Na Tabela 29 podemos observar que apenas os isolados bacterianos 3468 e 3476 apresentaram crescimento em anaerobiose. Segundo a mesma tabela, os sistemas API e VITEK não apresentaram o mesmo resultado para nenhum dos isolados bacterianos e apresentaram como resultado para o isolado bacteriano 3456 identificação inaceitável. O sistema VITEK também apresentou identificação inaceitável para os isolados bacterianos 3457 e 3462 G. Quando os resultados do sistema VITEK foram comparados aos da análise da sequência do gene 16S rRNA, foi observado que o sistema identificou de maneira equivocada a espécie e o gênero dos demais isolados bacterianos. O sistema API também identificou de modo equivocado a provável espécie de todos os isolados bacterianos, porém acertou o gênero de todos os isolados bacterianos, exceto do isolado bacteriano 3456.

Tabela 27 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos de *Bacillus* sp. relacionados à espécie *Bacillus humi*

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																															
	NEG	GAL	AGA	SOR	OLD	THRM	SUC	ARA	INU	NAG	NAA	TZR	XYL	RIB	AMY	ARB	TAG	MAN	MLT	KCN	PAS	GLU	RAF	TRE	NCL	NAE	INO	ASL	PLA	MEN	ESC	
3456	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	
3457	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	
3458	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3461	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3462 G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
3462 P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
3467	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3468	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
3476	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3477	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: NEG: Controle negativo, GAL: Galactose, AGA: Amidalina, SOR: Sorbitol, OLD: Oleandomicina, THRM: Termófilo, SUC: Sacarose, ARA: Arabinose, INU: Inulina, NAG: N-Acetil-Glicosamina, NAA: Acetato de sódio, TZR: Vermelho de Tetrazólio, XYL: Xilose, RIB: Ribose, AMY: Amilopectina, ARB: Arabitol, TAG: Tagatose, MAN: Manitol, MLT: Maltose, KCN: Tiocianato de Potássio, PAS: Poliamido-higroestrepina, GLU: Glicose, RAF: Rafinose, TRE: Trealose, NCL: Cloreto de sódio, NAE: Ácido nalidíxico, INO: Inositol, SAL: Salicina, PLA: Platinose, MEN: Ácido mandélico, ESC: Esculina. +: resultado positivo, -: resultado negativo.

Tabela 28 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos de *Bacillus* sp. relacionados à espécie *Bacillus humi*

ISOLADO BACTERIANO	RESULTADO DA ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (NÚMERO DE ACESSO)	TAMANHO DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (PB)	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUÊNCIA
3456	98,20% <i>B. humi</i> (AJ627210)	1524	FJ215795
3457	98,20% <i>B. humi</i> (AJ627210)	1520	JF327777
3458	98,07% <i>B. humi</i> (AJ627210)	1519	FJ215796
3461	98,07% <i>B. humi</i> (AJ627210)	1522	FJ215797
3462 G	97,88% <i>B. humi</i> (AJ627210)	1524	JF327778
3462 P	97,93% <i>B. humi</i> (AJ627210)	1509	JF327779
3467	98,14% <i>B. humi</i> (AJ627210)	1519	JF327780
3468	98,07% <i>B. humi</i> (AJ627210)	1521	FJ215798
3476	98,14% <i>B. humi</i> (AJ627210)	1533	FJ215799
3477	98,14% <i>B. humi</i> (AJ627210)	1521	FJ215800

Tabela 29 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos de *Bacillus* sp. relacionados à espécie *Bacillus humi*

ISOLADO BACTERIANO	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA	VITEK	API	CRESCIMENTO EM ANAEROBIOSE
3456	<i>Bacillus</i> sp.*	Identificação inaceitável	Identificação inaceitável	-
3457	<i>Bacillus</i> sp.*	Identificação inaceitável	94,5% <i>B. cereus</i> 2	-
3458	<i>Bacillus</i> sp.*	95% <i>L. sphaericus</i> / <i>L. fusiformis</i>	90,9% <i>B. firmus</i>	-
3461	<i>Bacillus</i> sp.*	95% <i>Brevibacillus borstelensis</i> / <i>Brevibacillus parabrevis</i> / <i>Brevibacillus brevis</i>	98,9% <i>B. cereus</i> 2	-
3462 G	<i>Bacillus</i> sp.*	Identificação inaceitável	98,9% <i>B. cereus</i> 2	-
3462 P	<i>Bacillus</i> sp.*	98% <i>Brevibacillus borstelensis</i> / <i>Brevibacillus parabrevis</i> / <i>Brevibacillus brevis</i>	98,8% <i>B. cereus</i> 2	-
3467	<i>Bacillus</i> sp.*	95% <i>L. sphaericus</i> / <i>L. fusiformis</i>	98,2% <i>B. cereus</i> 2	-
3468	<i>Bacillus</i> sp.*	96% <i>Brevibacillus borstelensis</i> / <i>Brevibacillus parabrevis</i> / <i>Brevibacillus brevis</i>	91,6% <i>B. cereus</i> 2	+
3476	<i>Bacillus</i> sp.*	95% <i>L. sphaericus</i> / <i>L. fusiformis</i>	89,9% <i>B. cereus</i> 1	+
3477	<i>Bacillus</i> sp.*	87% <i>L. sphaericus</i> / <i>L. fusiformis</i>	85,5% <i>B. cereus</i> 2	-

*menos de 98,7% de similaridade com todas as sequências depositadas nos bancos de dados.

4.2.7 Outras Espécies de *Bacillus*

Nesse grupo estão alocados seis isolados bacterianos: 3399, 3424 A, 3428, 3441, 3537 e 3559. Os isolados bacterianos 3399 e 3537 foram os únicos desse grupo capazes de crescer em anaerobiose. Os dados referentes a estes isolados bacterianos estão apresentados nas Tabelas 30, 31, 32 e 33.

O isolado bacteriano 3399 teve um fragmento de 1519 pares de bases do gene 16S rRNA sequenciado e, por essa análise, o isolado bacteriano foi identificado como *Bacillus circulans*. Quando comparado com o resultado da análise da sequência do gene 16S rRNA, o sistema VITEK identificou corretamente a espécie do isolado bacteriano e o sistema API apresentou como resultado para o isolado bacteriano identificação inaceitável.

O isolado bacteriano 3424 A teve um fragmento de 1501 pares de bases do gene 16S rRNA sequenciado. Como o isolado bacteriano apresentou similaridade do gene 16S rRNA acima de 98,7% com *Bacillus lehensis* e *Bacillus oshimensis*, foram determinadas as prováveis espécies deste isolado bacteriano. Comparando com os resultados da identificação pela análise da sequência do gene 16S rRNA, o sistema VITEK identificou de maneira equivocada a espécie e o gênero do isolado bacteriano, enquanto o sistema API identificou de maneira equivocada a espécie, porém acertou o gênero.

O isolado bacteriano 3428 teve um fragmento de 1518 pares de bases do gene 16S rRNA sequenciado. As prováveis espécies desse isolado bacteriano são *Bacillus jeotgali*, *Bacillus thioparans*, *Bacillus boroniphilus* e *Bacillus selenatarsenatis*. Quando comparado o resultado da análise da sequência do gene 16S rRNA, o sistema API acertou apenas o gênero do isolado bacteriano, enquanto o VITEK identificou de maneira equivocada tanto a espécie quanto o gênero.

O isolado bacteriano 3441 teve um fragmento de 1524 pares de bases do gene 16S rRNA sequenciado, o que permitiu a identificação da sua espécie como *Bacillus koreensis*. Quando comparado o resultado da análise da sequência do gene 16S rRNA com os resultados dos sistemas comerciais ambos os sistemas não foram capazes de identificar o isolado bacteriano. O sistema API identificou de maneira equivocada a espécie e o gênero do isolado bacteriano e o sistema VITEK

apresentou como resultado identificação inaceitável. Os testes bioquímicos convencionais realizados com este isolado bacteriano tiveram os seguintes resultados: o isolado bacteriano hidrolisa esculina, caseína e amido e produz ácido a partir de frutose, glicose, lactose, maltose, rafinose e sacarose, mas não a partir de manitol e xilose.

O isolado bacteriano 3537 teve um fragmento de 1394 pares de bases do gene 16S rRNA sequenciado. Como o percentual de similaridade da sequência do gene 16S rRNA do isolado bacteriano com *Bacillus niabensis*, a espécie mais próxima, foi abaixo de 98,7%, a espécie do isolado bacteriano não pôde ser identificada por esta análise. Quando os resultados fenotípicos foram comparados com o resultado da análise da sequência do gene 16S rRNA, foi observado que o sistema VITEK identificou de maneira equivocada tanto a espécie quanto o gênero deste isolado bacteriano, enquanto o sistema API identificou de maneira equivocada a espécie, porém acertou o gênero.

O isolado bacteriano 3559 teve um fragmento de 1521 pares de bases do gene 16S rRNA sequenciado, sendo identificado como *Bacillus barbaricus*. Os sistemas API e VITEK identificaram de modo equivocado o gênero deste isolado bacteriano.

Tabela 30 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos de outras espécies do gênero *Bacillus*

ISOLADO BACTERIANO	RESULTADO DA ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (NÚMERO DE ACESSO)	TAMANHO DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (PB)	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUÊNCIA
3399	99,12% <i>B. circulans</i> (AY724690)	1519	FJ215785
3424 A	99,80% <i>B. lehensis</i> (AY793550) 98,82% <i>B. oshimensis</i> (AB188090)	1501	JF309260
3428	99,53% <i>B. jeotgali</i> (AF221061) 99,45% <i>B. thioparans</i> (DQ371431) 99,39% <i>B. boroniphilus</i> (AB198719) 99,36% <i>B. selenatarsenatis</i> (AB262082)	1518	FJ215791
3441	99,85% <i>B. koreensis</i> (AY667496)	1524	FJ215781
3537	98,11% <i>B. niabensis</i> (AY998119)	1394	JF327782
3559	98,81% <i>B. barbaricus</i> (AJ422145)	1521	JF327783

Tabela 31 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA e os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos de outras espécies do gênero *Bacillus*

ISOLADO BACTERIANO	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA	VITEK	API	CRESCIMENTO EM ANAEROBIOSE
3399	<i>B. circulans</i>	90% <i>B. circulans</i>	Identificação inaceitável	+
3424 A	<i>Bacillus</i> sp.	95% <i>Brevibacillus borstelensis</i> / <i>Brevibacillus parabrevis</i> / <i>Brevibacillus brevis</i>	82,9% <i>B. circulans</i>	-
3428	<i>Bacillus</i> sp.	97% <i>L. sphaericus</i> / <i>L. fusiformis</i>	85,9% <i>B. firmus</i>	-
3441	<i>B. koreensis</i>	Identificação inaceitável	92,5% <i>P. thiaminolyticus</i>	-
3537	<i>Bacillus</i> sp.*	99% <i>L. sphaericus</i> / <i>L. fusiformis</i>	95,4% <i>B. circulans</i>	+
3559	<i>B. barbaricus</i>	98% <i>Brevibacillus borstelensis</i> / <i>Brevibacillus parabrevis</i> / <i>Brevibacillus brevis</i>	99,9% <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	-

*menos de 98,7% de similaridade com todas as sequências depositadas nos bancos de dados

Tabela 33 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos de outras espécies do gênero

Bacillus

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																																
	NEG	GAL	AGA	SOR	OLD	THRM	SUC	ARA	INU	NAG	NAA	TZR	XYL	RIB	AMY	ARB	TAG	MAN	MLT	KCN	PAS	GLU	RAF	TRE	NCL	NAE	INO	SAL	PLA	MEN	ESC		
3399	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+		
3424 A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3428	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
3441	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
3537	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
3559	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Legenda: NEG: Controle negativo, GAL: Galactose, AGA: Amidalina, SOR: Sorbitol, OLD: Oleandomicina, THRM: Termófilo, SUC: Sacarose, ARA: Arabinose, INU: Inulina, NAG: N-Acetil-Glicosamina, NAA: Acetato de sódio, TZR: Vermelho de Tetrazólio, XYL: Xilose, RIB: Ribose, AMY: Amilopectina, ARB: Arabitol, TAG: Tagatose, MAN: Manitol, MLT: Maltose, KCN: Tiocianato de Potássio, PAS: Poliamido-higroestrepina, GLU: Glicose, RAF: Rafinose, TRE: Trealose, NCL: Cloreto de sódio, NAE: Ácido nalidixico, INO: Inositol, SAL: Salicina, PLA: Platinose, MEN: Ácido mandélico, ESC: Esculina. +: resultado positivo, -: resultado negativo.

4.2.8 *Paenibacillus fonticola*

Neste estudo foram identificados quatro isolados bacterianos da espécie *Paenibacillus fonticola*. Conforme ilustrado pela Tabela 34, de todos os testes bioquímicos utilizados para identificação pelo sistema API, o resultado dos seguintes testes não apresentou variação, sendo todos os isolados bacterianos negativos para glicerol, eritrol, l-xilose, dulcitol, metil- α -d-manopiranosídeo, metil- α -d-glucopiranosídeo, d-melezitose, d-fucose, d-arabitol, l-arabitol e 2 ceto-gluconato de potássio. Também não houve variação nas seguintes provas, onde todos os isolados bacterianos foram positivos para l-arabinose, d-ribose, d-xilose, d-galactose, d-glicose, d-frutose, d-manose, l-raminose, n-acetil-glicosamina, amidalina, arbutina, esculina, salicina, d-celobiose, d-maltose, d-lactose, d-melibiose, d-sacarose, d-trealose, inulina, d-rafinose, amido, glicogênio, gentiobiose, d-turanose, d-lixose e l-fucose. Os demais testes apresentaram variação.

Segundo a Tabela 35 de todos os testes bioquímicos utilizados para identificação pelo sistema VITEK, o resultado dos seguintes testes não apresentou variação, sendo todos os isolados bacterianos negativos para sorbitol, n-acetil-glicosamina, amilopectina, arabitol, tagatose, tiocianato de potássio, poliamidohigroestrepina, cloreto de sódio e inositol. Também não houve variação nos seguintes testes, onde todos os isolados bacterianos foram positivos para sacarose, arabinose, inulina, acetato de sódio, vermelho de tetrazólio, xilose, manitol, maltose, glicose, rafinose, trealose, salicina, platinose, ácido mandélico e esculina. Os demais testes apresentaram variação.

De acordo com a Tabela 36, o tamanho das sequências do gene 16S rRNA variou entre 1522 e 1533 pares de bases. Os isolados bacterianos apresentaram maior similaridade do gene com a espécie *P. fonticola* com percentual variando entre 99,52% e 99,45%.

Tabela 34 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos de *Paenibacillus fonticola*

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																																																				
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49			
3373 A	-	-	-	D	+	+	+	-	-	D	+	+	+	+	-	+	-	D	-	D	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	D	+	+	+	+	-	-	+	-	-	D	-	D	
3373 B	-	-	-	+	+	+	+	-	D	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	D	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	D	+	+	+	+	D	-	-	+	-	-	+	-	D
3373 C	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	D	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	D	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-		
3424 B	-	-	-	D	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	D	+	-	D	+	D	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	D	+	+	+	+	D	-	-	+	-	-	+	-	D

Legenda: 0: Controle negativo, 1: Glicerol, 2: Eritrol, 3: d-Arabinose, 4: l-Arabinose, 5: d-Ribose, 6: d-Xilose, 7: l-Xilose, 8: d-Adonitol, 9: Metil-β-D-Xilopiranosídeo, 10: d-Galactose, 11: d-Glicose, 12: d-Frutose, 13: d-Manose, 14: l-Sorbose, 15: l-Raminose, 16: Dulcitol, 17: Inositol, 18: d-Manitol, 19: d-Sorbitol, 20: Metil-α-D-Manopiranosídeo, 21: Metil-α-D-Glucopiranosídeo, 22: N-Acetil-Glicosamina, 23: Amidalina, 24: Arbutina, 25: Esculina, 26: Salicina, 27: d-Celobiose, 28: d-Maltose, 29: d-Lactose, 30: d-Melibiose, 31: d-Sacarose, 32: d-Trealose, 33: Inulina, 34: d-Melezitose, 35: d-Rafinose, 36: Amido, 37: Glicogênio, 38: Xilitol, 39: Gentiobiose, 40: d-Turanose, 41: d-Lixose, 42: d-Tagatose, 43: d-Fucose, 44: l-Fucose, 45: d-Arabitol, 46: l-Arabitol, 47: Gluconato de potássio, 48: 2 ceto-gluconato de potássio, 49: 5 ceto-gluconato de potássio. +: resultado positivo, -: resultado negativo, D: resultado duvidoso.

Tabela 35 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos de *Paenibacillus fonticola*

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																																																				
	NEG	GAL	AGA	SOR	OLD	THRM	SUC	ARA	INU	NAG	NAA	TZR	XYL	RIB	AMY	ARB	TAG	MAN	MLT	KCN	PAS	GLU	RAF	TRE	NCL	NAE	INO	SAL	PLA	MEN	ESC																						
3373 A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
3373 B	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
3373 C	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3424 B	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: NEG: Controle negativo, GAL: Galactose, AGA: Amidalina, SOR: Sorbitol, OLD: Oleandomicina, THRM: Termófilo, SUC: Sacarose, ARA: Arabinose, INU: Inulina, NAG: N-Acetil-Glicosamina, NAA: Acetato de sódio, TZR: Vermelho de Tetrázólio, XYL: Xilose, RIB: Ribose, AMY: Amilopectina, ARB: Arabitol, TAG: Tagatose, MAN: Manitol, MLT: Maltose, KCN: Tiocianato de Potássio, PAS: Poliamido-higroestrepina, GLU: Glicose, RAF: Rafinose, TRE: Trealose, NCL: Cloreto de sódio, NAE: Ácido nalidíxico, INO: Inositol, SAL: Salicina, PLA: Platinose, MEN: Ácido mandélico, ESC: Esculina. +: resultado positivo, -: resultado negativo.

Tabela 36 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos de *Paenibacillus fonticola*

ISOLADO BACTERIANO	RESULTADO DA ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (NÚMERO DE ACESSO)	TAMANHO DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (PB)	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUÊNCIA
3373 A	99,45% <i>P. fonticola</i> (DQ453131)	1533	JF309266
3373 B	99,52% <i>P. fonticola</i> (DQ453131)	1522	JF309267
3373 C	99,52% <i>P. fonticola</i> (DQ453131)	1523	JF309268
3424 B	99,52% <i>P. fonticola</i> (DQ453131)	1524	JF309269

Na Tabela 37 pode-se observar que todos os isolados bacterianos apresentaram crescimento em anaerobiose. Segundo a mesma tabela, os sistemas API e VITEK não apresentaram a mesma identificação para nenhum dos isolados bacterianos. Quando os resultados de identificação obtidos pelos sistemas foram comparados com os do sequenciamento do gene 16S rRNA, foi verificado que o sistema VITEK identificou de modo equivocado a espécie de todos os isolados bacterianos, mas acertou o gênero, exceto do isolado bacteriano 3424 B, para o qual o VITEK apresentou uma identificação inaceitável. Por outro lado, o sistema API identificou de modo equivocado a espécie e o gênero de dois isolados bacterianos e apresentou identificação inaceitável para os isolados bacterianos 3373 C e 3424 B.

Tabela 37 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos de *Paenibacillus fonticola*

ISOLADO BACTERIANO	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA	VITEK	API	CRESCIMENTO EM ANAEROBIOSE
3373 A	<i>P. fonticola</i>	87% <i>P. macerans</i>	85,2% <i>B. circulans</i>	+
3373 B	<i>P. fonticola</i>	98% <i>P. macerans</i>	88,6% <i>B. circulans</i>	+
3373 C	<i>P. fonticola</i>	93% <i>P. macerans</i>	Identificação inaceitável	+
3424 B	<i>P. fonticola</i>	Identificação inaceitável	Identificação inaceitável	+

4.2.9 *Paenibacillus humicus*

Estão nesse grupo três isolados bacterianos. Conforme ilustrado pela Tabela 38, de todos os testes bioquímicos utilizados para identificação pelo sistema API, o resultado dos seguintes testes não apresentou variação, sendo todos os isolados bacterianos negativos para glicerol, eritol, d-arabinose, l-xilose, d-adonitol, l-

sorbose, l-raminose, dulcitol, inositol, d-sorbitol, inulina, xilitol, d-lixose, d-tagatose, d-fucose, l-fucose, d-arabitol, l-arabitol e 2 ceto-gluconato de potássio. Também não houve variação nos seguintes testes, onde todos os isolados bacterianos foram positivos para d-manitol, arbutina, esculina, salicina, d-celobiose, d-maltose, d-lactose, d-sacarose, d-trealose, d-rafinose, amido, glicogênio e gentiobiose. Os demais testes apresentaram variação.

Segundo a Tabela 39 de todos os testes bioquímicos utilizados para identificação pelo sistema VITEK, o resultado dos seguintes testes não apresentou variação, sendo todos os isolados bacterianos negativos para amidalina, sorbitol, oleandomicina, arabinose, inulina, vermelho de tetrazólio, ribose, arabitol, tagatose, tiocianato de potássio, poliamido-higroestrepina, cloreto de sódio, ácido nalidíxico e inositol. Também não houve variação nos seguintes testes, onde todos os isolados bacterianos foram positivos para galactose, sacarose, manitol, maltose, glicose, rafinose, trealose, salicina, platinose, ácido mandélico e esculina. Os demais testes apresentaram variação.

De acordo com a Tabela 40, o tamanho das sequências do gene 16S rRNA variou entre 1516 e 1518 pares de bases. Os isolados bacterianos apresentaram maior similaridade com *Paenibacillus humicus* com percentual variando entre 99,66% e 99,59%.

Na Tabela 41 podemos observar que nenhum dos isolados bacterianos deste grupo apresentou crescimento em anaerobiose. Segundo a mesma tabela, os resultados fornecidos pelos sistemas API e VITEK apresentaram a mesma identificação somente para o isolado bacteriano 3568. Na comparação com o resultado do sequenciamento do gene 16S rRNA, o sistema VITEK identificou de maneira equivocada a espécie de todos os isolados bacterianos, mas acertou o gênero e o sistema API não identificou corretamente a espécie dos isolados bacterianos acertando apenas o gênero do isolado bacteriano 3568.

Tabela 40 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos de *Paenibacillus humicus*

ISOLADO BACTERIANO	RESULTADO DA ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (NÚMERO DE ACESSO)	TAMANHO DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (PB)	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUÊNCIA
3564	99,59% <i>P. humicus</i> (AM411528)	1518	JF309270
3568	99,59% <i>P. humicus</i> (AM411528)	1517	JF309271
5002	99,66% <i>P. humicus</i> (AM411528)	1516	JF309272

Tabela 41 Resultado da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos de *Paenibacillus humicus*

ISOLADO BACTERIANO	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA	VITEK	API	CRESCIMENTO EM ANAEROBIOSE
3564	<i>P. humicus</i>	99% <i>P. amylolyticus</i>	99,6% <i>B. lentus</i>	-
3568	<i>P. humicus</i>	96% <i>P. amylolyticus</i>	99,8% <i>P. amylolyticus</i>	-
5002	<i>P. humicus</i>	96% <i>P. amylolyticus</i>	97,7% <i>B. lentus</i>	-

4.2.10 Outras Espécies de *Paenibacillus*

Esse grupo é constituído pelos isolados bacterianos: 3311, 3439 B, 3492, 3504, 3540, 3566 e 3584. Os dados referentes a esses isolados bacterianos são apresentados nas Tabelas 42, 43, 44 e 45. Os sete isolados bacterianos deste grupo apresentaram capacidade de crescer em anaerobiose (Tabela 43).

O isolado bacteriano 3311 teve um fragmento de 1524 pares de bases do gene 16S rRNA sequenciado. A análise da sequência do gene 16S rRNA deste isolado bacteriano possibilitou a determinação apenas do gênero bacteriano uma vez que não há similaridade com valores acima de 98,7% desta sequência com nenhuma espécie descrita e as espécies mais próximas são *Paenibacillus barengoltzii* e *Paenibacillus konsidensis*. O API e o VITEK se equivocaram na identificação do gênero desse isolado bacteriano.

O isolado bacteriano 3439 B teve um fragmento de 1456 pares de bases do gene 16S rRNA sequenciado. A sequência desse isolado bacteriano apresentou maior similaridade com as espécies *Paenibacillus cellulosilyticus* e *Paenibacillus kobensis*, porém o percentual de similaridade está abaixo do limite de identificação de espécies. Por isso foi possível a determinação apenas do gênero desse isolado

bacteriano. O sistema VITEK identificou de modo equivocado o gênero deste isolado bacteriano e o sistema API apresentou como resultado para o isolado bacteriano 3439 B identificação inaceitável.

O isolado bacteriano 3492 teve um fragmento de 1524 pares de bases do gene 16S rRNA sequenciado. A sequência desse isolado bacteriano indicou *Paenibacillus favisporus*, *Paenibacillus cineris* e *Paenibacillus rhizosphaerae* como as prováveis espécies desse isolado bacteriano. O sistema API identificou o gênero do isolado bacteriano de modo equivocado, enquanto o VITEK apresentou como resultado identificação inaceitável.

O isolado bacteriano 3504 teve um fragmento de 1457 pares de bases do gene 16S rRNA sequenciado. A sequência desse isolado bacteriano apresentou valores de similaridade acima de 98,7% com as espécies *Paenibacillus dendritiformis*, *Paenibacillus thiaminolyticus* e *Paenibacillus popilliae* indicando as prováveis espécies que o isolado bacteriano analisado pode pertencer. Ambos os sistemas de identificação apresentaram o mesmo resultado, identificando uma das prováveis espécies do isolado bacteriano analisado.

O isolado bacteriano 3540 teve um fragmento de 1493 pares de bases do gene 16S rRNA sequenciado. A sequência desse isolado bacteriano mostrou que as prováveis espécies do isolado bacteriano são *Paenibacillus tundrae*, *Paenibacillus amylolyticus* e *Paenibacillus xylanexedens*. O sistema API identificou corretamente o gênero deste isolado bacteriano e o sistema VITEK apresentou como resultado identificação inaceitável.

O isolado bacteriano 3566 foi identificado como *Paenibacillus lautus* pelo sequenciamento de 1525 pares de bases do gene 16S rRNA e também pelo API. O sistema VITEK identificou de modo equivocado a espécie do isolado bacteriano.

O isolado bacteriano 3584 teve um fragmento de 1523 pares de bases do gene 16S rRNA sequenciado que apresentou similaridade acima de 98,7% apenas com *Paenibacillus timonensis*. O sistema VITEK apresentou como resultado identificação inaceitável e o sistema API identificou de modo equivocado tanto a espécie quanto o gênero do isolado bacteriano.

Tabela 42 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos de outras espécies do gênero *Paenibacillus*

ISOLADO BACTERIANO	RESULTADO DA ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (NÚMERO DE ACESSO)	TAMANHO DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (PB)	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUÊNCIA
3311	96,72% <i>P. barengoltzii</i> (AY167814) 96,63% <i>P. konsidensis</i> (EU081509)	1524	JF327783
3439 B	98,55% <i>P. cellulosityticus</i> (DQ407282) 98,18% <i>P. kobensis</i> (AB073363)	1456	JF327784
3492	99,86% <i>P. favisporus</i> (AY208751) 99,80% <i>P. cineris</i> (AJ575658) 99,60% <i>P. rhizosphaerae</i> (AY751754)	1524	JF309261
3504	99,78% <i>P. dendritiformis</i> (AY359885) 99,65% <i>P. thiaminolyticus</i> (AB073197) 99,58% <i>P. popilliae</i> (AB073198)	1457	JF309262
3540	99,38% <i>P. tundrae</i> (EU558284) 99,17% <i>P. amylolyticus</i> (D85396) 98,83% <i>P. xylanexedens</i> (EU558281)	1493	JF309263
3566	99,20% <i>P. lautus</i> (AB073188)	1525	JF309264
3584	99,72% <i>P. timonensis</i> (AY323612)	1523	JF309265

Tabela 43 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose para os isolados bacterianos de outras espécies do gênero *Paenibacillus*

ISOLADO BACTERIANO	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA	VITEK	API	CRESCIMENTO EM ANAEROBIOSE
3311	<i>Paenibacillus</i> sp.*	90,7% <i>B. circulans</i>	82% <i>B. circulans</i>	+
3439 B	<i>Paenibacillus</i> sp.*	97% <i>L. sphaericus</i> / <i>L. fusiformis</i>	Identificação inaceitável	+
3492	<i>Paenibacillus</i> sp.	Identificação inaceitável	90,1% <i>B. megaterium</i>	+
3504	<i>Paenibacillus</i> sp.	97% <i>P. thiaminolyticus</i>	99,9% <i>P. thiaminolyticus</i>	+
3540	<i>Paenibacillus</i> sp.	Identificação inaceitável	89,4% <i>P. macerans</i>	+
3566	<i>P. lautus</i>	99% <i>P. amylolyticus</i>	94,7% <i>P. lautus</i>	+
3584	<i>P. timonensis</i>	Identificação inaceitável	90,3% <i>B. circulans</i>	+

*menos de 98,7% de similaridade com todas as sequências depositadas nos bancos de dados

Tabela 44 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para os isolados bacterianos de outras espécies do gênero

Paenibacillus

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																																																			
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49		
3311	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
3439 B	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3492	-	-	-	D	+	+	+	-	-	D	+	+	+	D	-	-	-	-	+	-	D	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	D	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
3504	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	
3540	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
3566	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3584	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: 0: Controle negativo, 1: Glicerol, 2: Eritrol, 3: d-Arabinose, 4: l-Arabinose, 5: d-Ribose, 6: d-Xilose, 7: l-Xilose, 8: d-Adonitol, 9: Metil-β-d-Xilopiranosídeo, 10: d-Galactose, 11: d-Glicose, 12: d-Frutose, 13: d-Manose, 14: l-Sorbose, 15: l-Raminose, 16: Dulcitol, 17: Inositol, 18: d-Manitol, 19: d-Sorbitol, 20: Metil-α-d-Manopiranosídeo, 21: Metil-α-d-Glucopiranosídeo, 22: N-Acetil-Glicosamina, 23: Amidalina, 24: Arbutina, 25: Esculina, 26: Salicina, 27: d-Celobiose, 28: d-Maltose, 29: d-Lactose, 30: d-Melibiose, 31: d-Sacarose, 32: d-Trealose, 33: Inulina, 34: d-Melezitose, 35: d-Rafinose, 36: Amido, 37: Glicogênio, 38: Xilitol, 39: Gentiobiose, 40: d-Turanose, 41: d-Lixose, 42: d-Tagatose, 43: d-Fucose, 44: l-Fucose, 45: d-Arabitol, 46: l-Arabitol, 47: Gluconato de potássio, 48: 2 ceto-gluconato de potássio, 49: 5 ceto-gluconato de potássio. +: resultado positivo, -: resultado negativo, D: resultado duvidoso.

Tabela 45 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para os isolados bacterianos de outras espécies do gênero *Paenibacillus*

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																														
	NEG	GAL	AGA	SOR	OLD	THRM	SUC	ARA	INU	NAG	NAA	TZR	XYL	RIB	AMY	ARB	TAG	MAN	MLT	KCN	PAS	GLU	RAF	TRE	NCL	NAE	INO	SAL	PLA	MEN	ESC
3311	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
3439 B	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3492	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
3504	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
3540	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
3566	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
3584	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+

Legenda: NEG: Controle negativo, GAL: Galactose, AGA: Amidalina, SOR: Sorbitol, OLD: Oleandomicina, THRM: Termófilo, SUC: Sacarose, ARA: Arabinose, INU: Inulina, NAG: N-Acetil-Glicosamina, NAA: Acetato de sódio, TZR: Vermelho de Tetrazólio, XYL: Xilose, RIB: Ribose, AMY: Amilopectina, ARB: Arabitol, TAG: Tagatose, MAN: Manitol, MLT: Maltose, KCN: Tiocianato de Potássio, PAS: Poliamido-higroestrepina, GLU: Glicose, RAF: Rafinose, TRE: Trealose, NCL: Cloreto de sódio, NAE: Ácido nalidíxico, INO: Inositol, SAL: Salicina, PLA: Platinose, MEN: Ácido mandélico, ESC: Esculina. +: resultado positivo, -: resultado negativo.

4.2.11 Outros Gêneros Relacionados ao Gênero *Bacillus*

Este grupo compreende os isolados bacterianos: 3404, 3405, 3482, 3535 e 3552. Os dados referentes a esses isolados bacterianos são apresentados nas Tabelas 46, 47, 48 e 49. O isolado bacteriano 3405 foi o único dentre os cinco isolados bacterianos desse grupo capaz de crescer em anaerobiose (Tabela 47).

O isolado bacteriano 3404 teve um fragmento de 1524 pares de bases do gene 16S rRNA sequenciado, o que identificou as prováveis espécies que o isolado bacteriano analisado pode pertencer: *Terribacillus saccharophilus*, *Terribacillus goriensis* e *Terribacillus halophilus*. Ambos os sistemas identificaram de maneira equivocada este isolado bacteriano como *B. pumilus*.

O isolado bacteriano 3405 teve um fragmento de 1521 pares de bases do gene 16S rRNA sequenciado. A sequência desse isolado bacteriano apresentou valores de similaridade ligeiramente acima de 98,7% com as espécies *Lysinibacillus boronitolerans* e *Lysinibacillus fusiformis*. O sistema VITEK identificou corretamente o grupo de prováveis espécies à qual o isolado bacteriano pertence, enquanto o sistema API identificou de modo equivocado a espécie e o gênero do isolado bacteriano.

O isolado bacteriano 3482 teve um fragmento de 1533 pares de bases do seu gene 16S rRNA sequenciado através do qual foi possível determinar o seu gênero. As espécies mais próximas, *Cohnella phaseoli*, *Cohnella hongkongensis* e *Cohnella thermotolerans*, apresentaram similaridade do gene abaixo de 98,7%. O sistema VITEK identificou de modo equivocado a espécie e o gênero deste isolado bacteriano e o sistema API apresentou como resultado identificação inaceitável.

O isolado bacteriano 3535 teve um fragmento de 1533 pares de bases do gene 16S rRNA sequenciado, identificando a espécie do isolado bacteriano como *Oceanobacillus sojiae*. Os sistemas VITEK e API apresentaram como resultado identificação inaceitável para este isolado bacteriano.

O isolado bacteriano 3552 teve um fragmento de 1506 pares de bases do gene 16S rRNA sequenciado e foi identificado como *Paenisporosarcina quisquiliarum*. O sistema VITEK não identificou a espécie nem o gênero deste isolado bacteriano e o sistema API apresentou como resultado identificação inaceitável.

Tabela 46 Resultados da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA de isolados bacterianos de outros gêneros relacionados ao gênero *Bacillus*

ISOLADO BACTERIANO	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (NÚMERO DE ACESSO)	TAMANHO DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA (PB)	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUÊNCIA
3404	99,86% <i>Terribacillus saccharophilus</i> (AB243845) 99,86% <i>Terribacillus goriensis</i> (DQ519571) 98,93% <i>Terribacillus halophilus</i> (AB243849)	1524	JF309273
3405	98,90% <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> (AB199591) 98,74% <i>Lysinibacillus fusiformis</i> (AF169537)	1521	JF309274
3482	96,49% <i>Cohnella phaseoli</i> (EU014872) 95,47% <i>Cohnella hongkongensis</i> (AF433165) 94,60% <i>Cohnella thermotolerans</i> (AJ971483)	1533	JF327785
3535	99,47% <i>Oceanobacillus sojiae</i> (AB477361)	1533	JF309275
3552	99,51% <i>Paenisporosarcina quisquiliarum</i> (DQ333897)	1506	JF309238

Tabela 47 Resultados da identificação utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA, os sistemas VITEK e API e crescimento em anaerobiose de isolados bacterianos de outros gêneros relacionados ao gênero *Bacillus*

ISOLADO BACTERIANO	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA	VITEK	API	CRESCIMENTO EM ANAEROBIOSE
3404	<i>Terribacillus</i> sp.	99% <i>B. pumilus</i>	96,6% <i>B. pumilus</i>	-
3405	<i>Lysinibacillus</i> sp.	95% <i>L. sphaericus</i> / <i>L. fusiformis</i>	89,6% <i>Bacillus</i> não reativo	+
3482	<i>Cohnella</i> sp.*	99% <i>L. sphaericus</i> / <i>L. fusiformis</i>	Identificação inaceitável	-
3535	<i>Oceanobacillus sojiae</i>	Identificação inaceitável	Identificação inaceitável	-
3552	<i>Paenisporosarcina quisquiliarum</i>	95% <i>L. sphaericus</i> / <i>L. fusiformis</i>	Identificação inaceitável	-

*menos de 98,7% de similaridade com todas as sequências depositadas nos bancos de dados

Tabela 48 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema API para isolados bacterianos de outros gêneros relacionados ao gênero *Bacillus*

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																																																				
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49			
3404	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3405	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3482	-	+	-	+	+	+	+	+	D	+	D	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	D	-	D	+	-	+	+	+	D	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	D	+	+	-	-	-	-	-	-	D
3535	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3552	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Legenda: 0: Controle negativo, 1: Glicerol, 2: Eritrol, 3: d-Arabinose, 4: l-Arabinose, 5: d-Ribose, 6: d-Xilose, 7: l-Xilose, 8: d-Adonitol, 9: Metil-β-d-Xilopiranosídeo, 10: d-Galactose, 11: d-Glicose, 12: d-Frutose, 13: d-Manose, 14: l-Sorbose, 15: l-Raminose, 16: Dulcitol, 17: Inositol, 18: d-Manitol, 19: d-Sorbitol, 20: Metil-α-d-Manopiranosídeo, 21: Metil-α-d-Glucopiranosídeo, 22: N-Acetil-Glicosamina, 23: Amidalina, 24: Arbutina, 25: Esculina, 26: Salicina, 27: d-Celobiose, 28: d-Maltose, 29: d-Lactose, 30: d-Melibiose, 31: d-Sacarose, 32: d-Trealose, 33: Inulina, 34: d-Melezitose, 35: d-Rafinose, 36: Amido, 37: Glicogênio, 38: Xilitol, 39: Gentiobiose, 40: d-Turanose, 41: d-Lixose, 42: d-Tagatose, 43: d-Fucose, 44: l-Fucose, 45: d-Arabitol, 46: l-Arabitol, 47: Gluconato de potássio, 48: 2 ceto-gluconato de potássio, 49: 5 ceto-gluconato de potássio. +: resultado positivo, -: resultado negativo, D: resultado duvidoso.

Tabela 49 Resultados dos testes bioquímicos utilizando o sistema VITEK para isolados bacterianos de outros gêneros relacionados ao gênero *Bacillus*

ISOLADO BACTERIANO	TESTES BIOQUÍMICOS																																																				
	NEG	GAL	AGA	SOR	OLD	THRM	SUC	ARA	INU	NAG	NAA	TZR	XYL	RIB	AMY	ARB	TAG	MAN	MLT	KCN	PAS	GLU	RAF	TRE	NCL	NAE	INO	SAL	PLA	MEN	ESC																						
3404	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
3405	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3482	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
3535	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3552	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: NEG: Controle negativo, GAL: Galactose, AGA: Amidalina, SOR: Sorbitol, OLD: Oleandomicina, THRM: Termófilo, SUC: Sacarose, ARA: Arabinose, INU: Inulina, NAG: N-Acetil-Glicosamina, NAA: Acetato de sódio, TZR: Vermelho de Tetrazólio, XYL: Xilose, RIB: Ribose, AMY: Amilopectina, ARB: Arabitol, TAG: Tagatose, MAN: Manitol, MLT: Maltose, KCN: Tiocianato de Potássio, PAS: Poliamido-higroestrepina, GLU: Glicose, RAF: Rafinose, TRE: Trealose, NCL: Cloreto de sódio, NAE: Ácido nalidíxico, INO: Inositol, SAL: Salicina, PLA: Platinose, MEN: Ácido mandélico, ESC: Esculina. +: resultado positivo, -: resultado negativo.

4.3 Análise Filogenética

A análise filogenética foi realizada para avaliar a proximidade dos isolados bacterianos deste estudo com as espécies descritas. Para a realização dessa análise foram utilizadas as sequências do gene 16S rRNA das cepas tipo de todas as espécies que possuíam maior similaridade desse gene com os isolados bacterianos analisados.

Devido ao grande número de isolados bacterianos contemplados neste trabalho, foram construídas seis árvores filogenéticas. Os isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Bacillus* foram alocados em três diferentes árvores. Uma das árvores contemplou os isolados bacterianos dos grupos *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* e o isolado bacteriano de *Bacillus* semelhante a *B. niabensis*, além das sequências do gene 16S rRNA de cepas tipo das espécies mais similares (Figura 4). Outra árvore filogenética foi construída utilizando as sequências do gene em questão dos isolados bacterianos do grupo *B. megaterium* e das outras espécies de *Bacillus* restantes, além das sequências do gene 16S rRNA de cepas tipo das espécies mais similares (Figura 5). Uma terceira árvore filogenética foi construída para o gênero *Bacillus* para avaliar um conjunto de isolados bacterianos que possuem semelhanças com *B. humi* e que não apresentam similaridade do gene 16S rRNA acima de 98,7% com nenhuma espécie descrita (Figura 6).

Além das árvores filogenéticas citadas, foram construídas outras três para incluir os gêneros relacionados ao gênero *Bacillus*. Uma das árvores foi para avaliar os isolados bacterianos do gênero *Paenibacillus* (Figura 7), outra para avaliar o isolado bacteriano do gênero *Cohnella* (Figura 8) e a última para mostrar o relacionamento dos outros gêneros relacionados ao gênero *Bacillus* identificados neste estudo: *Oceanobacillus*, *Terribacillus*, *Paenisporosarcina* e *Lysinibacillus* (Figura 9).

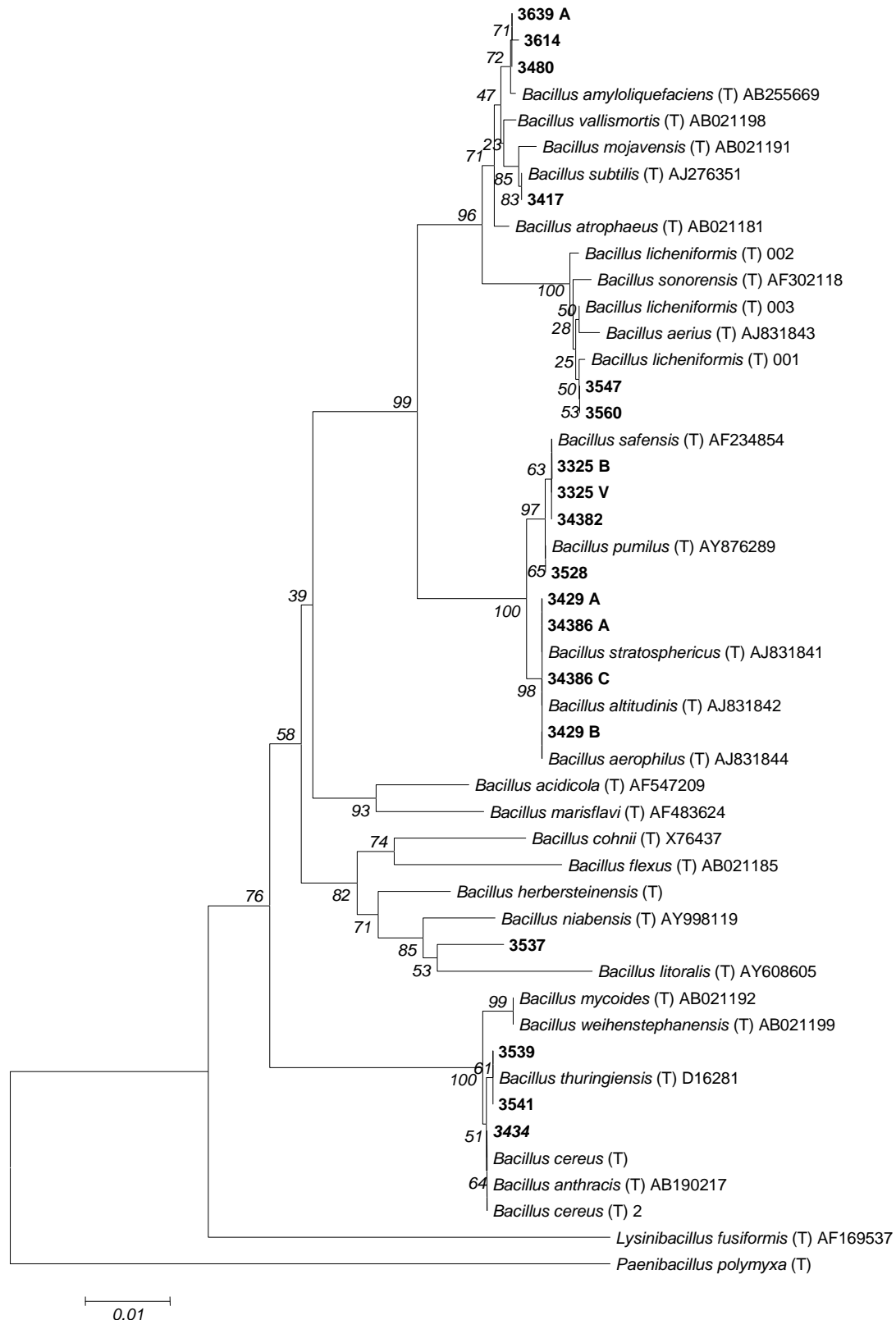


Figura 4 Árvore filogenética baseada no método *neighbor-joining* usando sequências do gene 16S rRNA de isolados bacterianos do gênero *Bacillus*. As distâncias estimadas foram calculadas usando o modelo Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de *Bootstrap* após 1000 simulações é mostrada e a sequência do gene 16S rRNA de *Paenibacillus polymyxa* foi usada como grupo de fora.

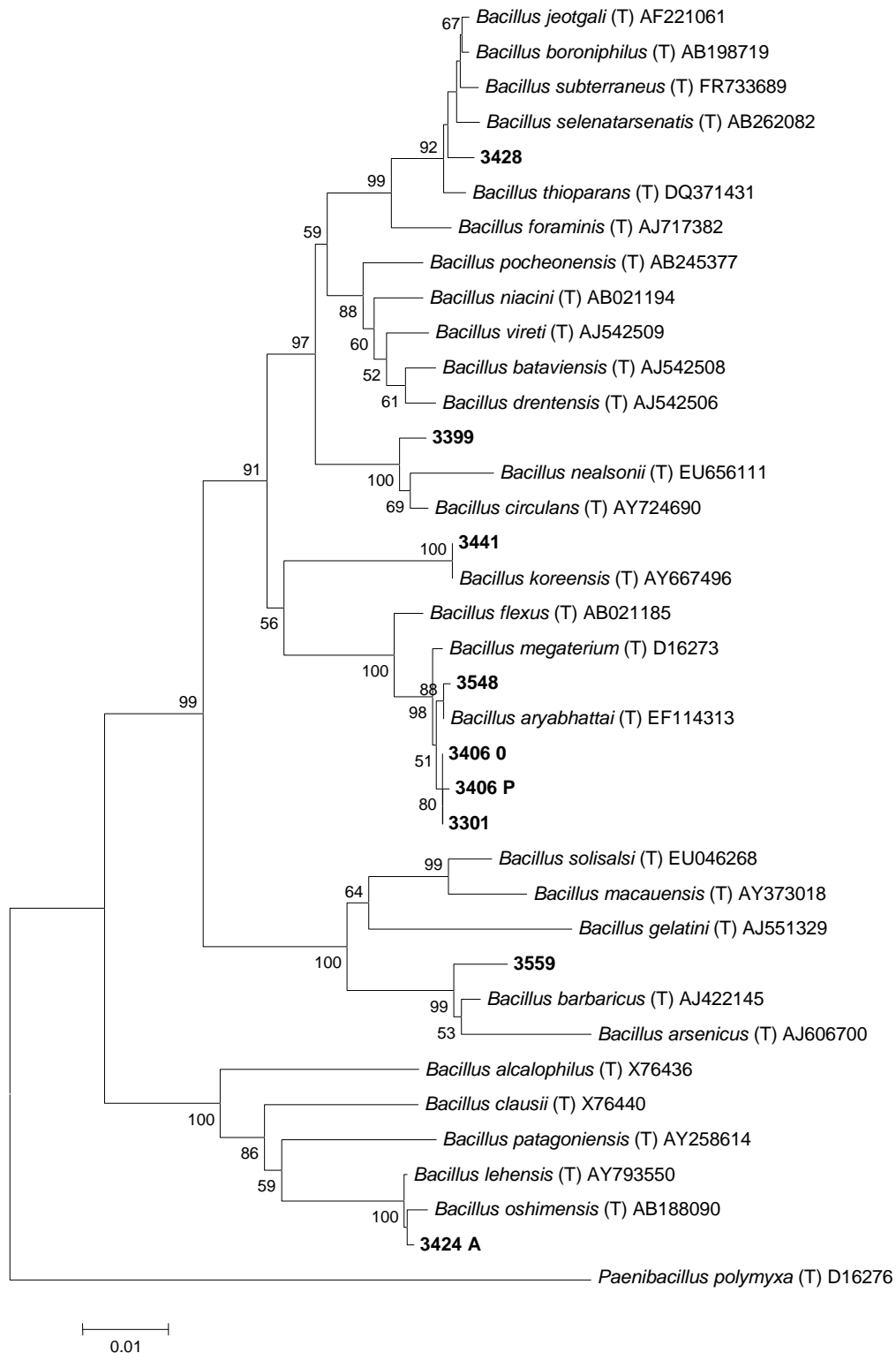


Figura 5 Árvore filogenética baseada no método *neighbor-joining* usando sequências do gene 16S rRNA de isolados bacterianos do gênero *Bacillus*. As distâncias estimadas foram calculadas usando o modelo Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de *Bootstrap* após 1000 simulações é mostrada e a sequência do gene 16S rRNA de *Paenibacillus polymyxa* foi usada como grupo de fora.

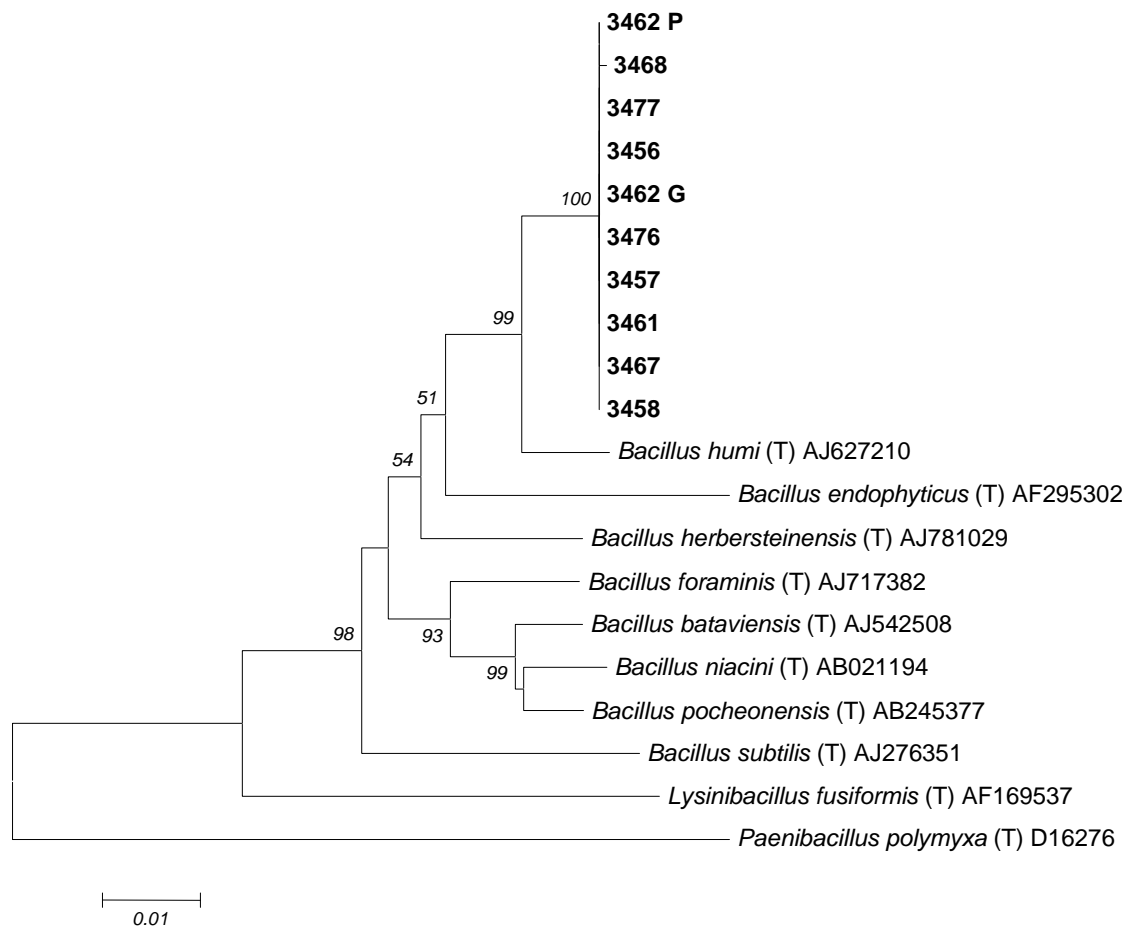


Figura 6 Árvore filogenética baseada no método *neighbor-joining* usando sequências do gene 16S rRNA de isolados bacterianos do gênero *Bacillus*. As distâncias estimadas foram calculadas usando o modelo Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de *Bootstrap* após 1000 simulações é mostrada e a sequência do gene 16S rRNA de *Paenibacillus polymyxa* foi usada como grupo de fora.

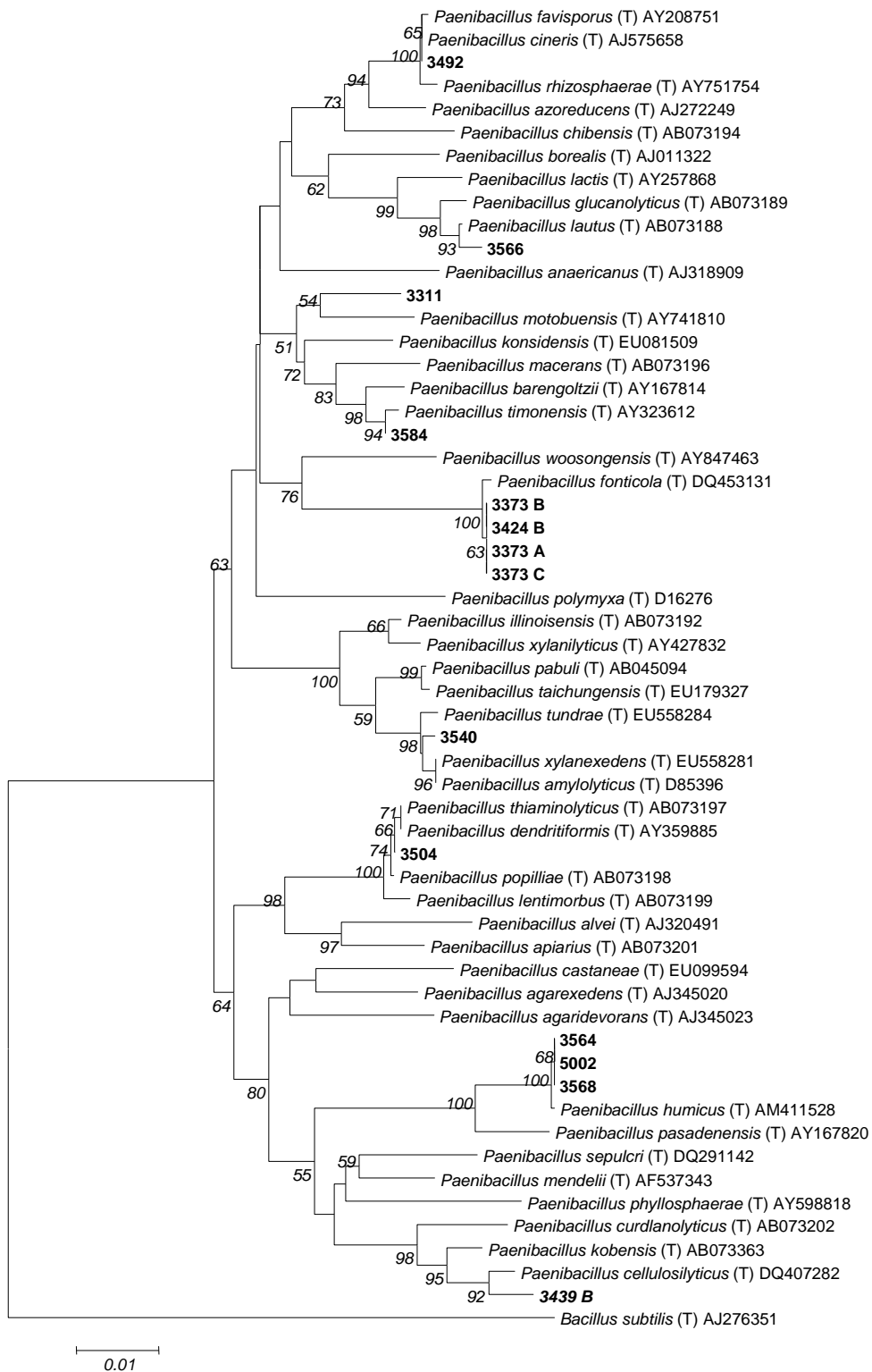


Figura 7 Árvore filogenética baseada no método *neighbor-joining* usando seqüências do gene 16S rRNA de isolados bacterianos do gênero *Paenibacillus*. As distâncias estimadas foram calculadas usando o modelo Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de *Bootstrap* após 1000 simulações é mostrada e a seqüência do gene 16S rRNA de *Bacillus subtilis* foi usada como grupo de fora.

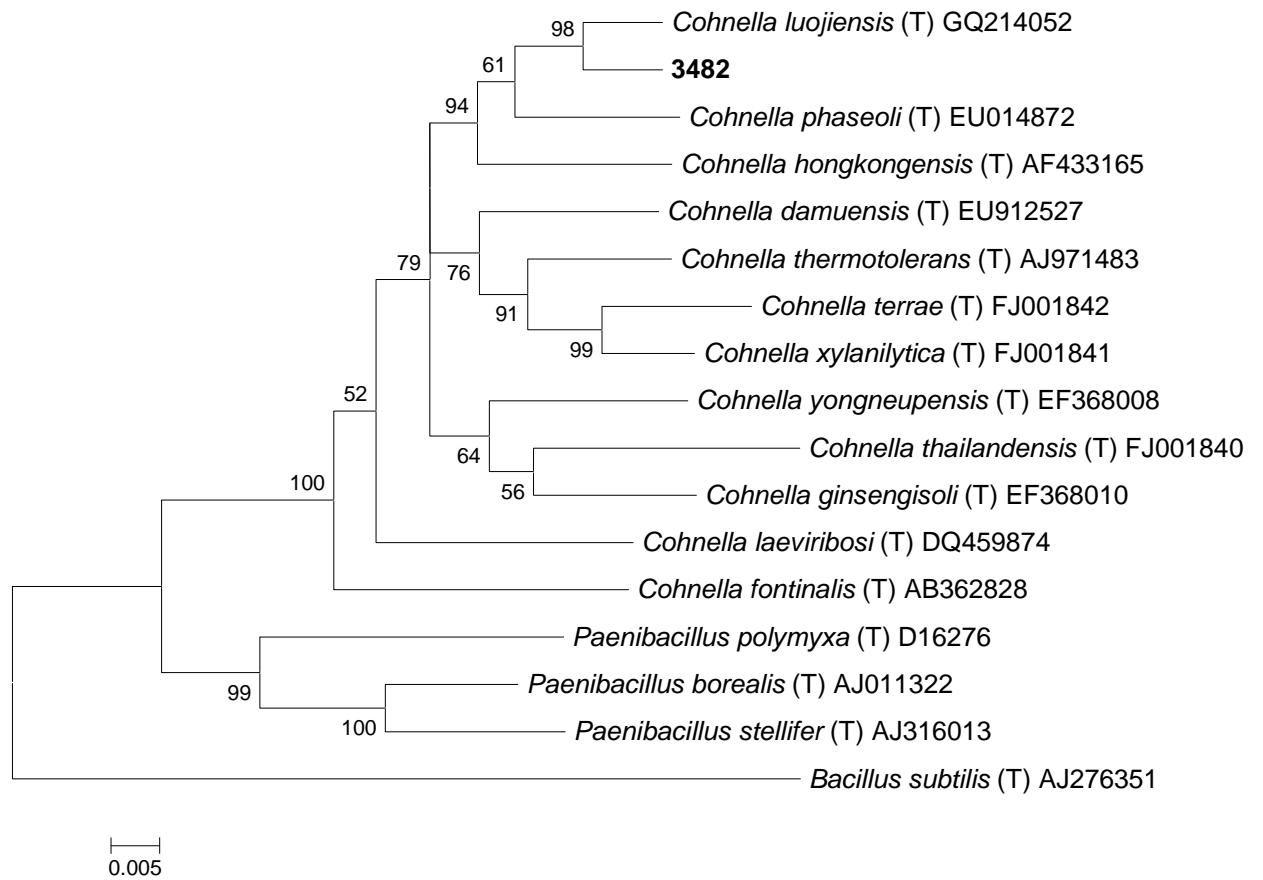


Figura 8 Árvore filogenética baseada no método *neighbor-joining* usando sequências do gene 16S rRNA de isolados bacterianos do gênero *Cohnella*. As distâncias estimadas foram calculadas usando o modelo Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de *Bootstrap* após 1000 simulações é mostrada e a sequência do gene 16S rRNA de *Bacillus subtilis* foi usada como grupo de fora.

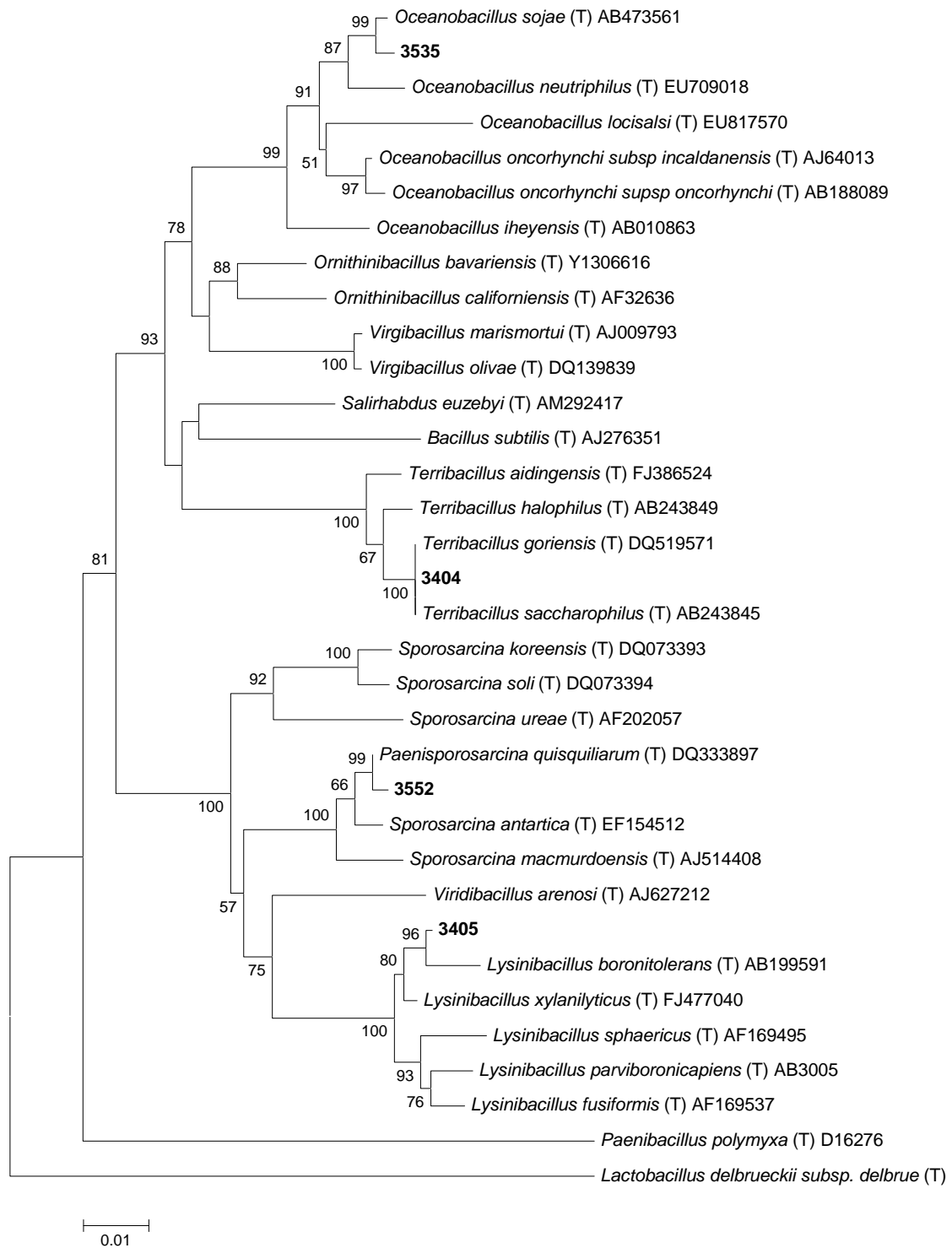


Figura 9 Árvore filogenética baseada no método *neighbor-joining* usando sequências do gene 16S rRNA de isolados bacterianos de gêneros relacionados ao gênero *Bacillus*. As distâncias estimadas foram calculadas usando o modelo Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de *Bootstrap* após 1000 simulações é mostrada e a sequência do gene 16S rRNA de *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrue* foi usada como grupo de fora.

5 DISCUSSÃO

A identificação dos contaminantes de Ensaio de Esterilidade e do ambiente onde esses Ensaio são realizados é um ponto importante para a avaliação da qualidade dos produtos estéreis (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010). Esse trabalho teve como objetivo avaliar duas metodologias fenotípicas e uma molecular utilizadas para a identificação de um dos grupos bacterianos mais identificados no IDBAC / INCQS, o gênero *Bacillus* e gêneros relacionados. O grupo bacteriano em questão foi caracterizado utilizando a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA e os sistemas comerciais API e VITEK, que são baseados em testes fenotípicos.

Os sistemas API e VITEK são baseados em testes bioquímicos convencionais e têm sido amplamente utilizados para identificação de isolados bacterianos de origem clínica. Entretanto, muitas vezes os resultados obtidos com os dois sistemas não podem ser comparados, isto é, para um mesmo isolado bacteriano resultados diferentes podem ser observados. No caso da identificação de *Bacillus* e gêneros relacionados, essas diferenças nos resultados podem ser porque os testes bioquímicos que compõem estes sistemas utilizam substratos diferentes ou isômeros diferentes do mesmo substrato (Tabela 50) e o tempo de leitura final dos resultados também varia entre eles. O sistema VITEK finaliza a identificação do cartão BAC em até quinze horas e a leitura final da galeria 50 CH do sistema API deve ser feita em quarenta e oito horas (BIOMÉRIEUX, 2002b, BIOMÉRIEUX BRASIL, 2004). Mesmo quando se trata de um teste com o mesmo substrato, os resultados obtidos por estes sistemas podem não ser os mesmos por diferenças na concentração do substrato e no corante utilizado. Além disso, o sistema VITEK detecta o aumento da turbidez para determinar o resultado do teste e o resultado do sistema API é detectado pela mudança de cor do meio, que acontece devido à mudança do pH. Essas razões podem justificar a observação de isolados bacterianos neste estudo cujos testes apresentaram resultados diferentes nos sistemas API e VITEK ainda que as espécies dos isolados estivessem nos bancos de dados dos sistemas (Tabelas 9, 17, 21, 25, 31, 43 e 47).

Uma das limitações da identificação através de métodos automatizados / semi-automatizados são os bancos de dados que os sistemas de identificação utilizam (ODUMERU et al., 1999). O sistema API identifica trinta e seis diferentes espécies ou grupos de prováveis espécies enquanto o sistema VITEK identifica vinte e sete diferentes espécies ou grupos de prováveis espécies (Tabela 51). Quando comparado com o universo de espécies das famílias nas quais estão alocadas os bastonetes Gram positivos esporulados relacionados ao gênero *Bacillus*, ambos os sistemas possuem bancos de dados muito limitados (Tabelas 52 e 53).

Tabela 50 Testes bioquímicos contemplados nos sistemas API e VITEK

PROVA	API ¹	VITEK ²
Amidalina	Amidalina	Amidalina
Arabinose	d-Arabinose l-Arabinose	Arabinose
Arabitol	d-Arabitol l-Arabitol	Arabitol
Esculina	Esculina	Esculina
Galactose	d-Galactose	Galactose
Glicose	d-Glicose	Glicose
Inositol	Inositol	Inositol
Inulina	Inulina	Inulina
Maltose	d-Maltose	Maltose
Manitol	d-Manitol	Manitol
N-Acetil-Glicosamina	N-Acetil-Glicosamina	N-Acetil-Glicosamina
Rafinose	d-Rafinose	Rafinose
Ribose	d-Ribose	Ribose
Sacarose	d-Sacarose	Sacarose
Salicina	Salicina	Salicina
Sorbitol	d-Sorbitol	Sorbitol
Tagatose	d-Tagatose	Tagatose
Trealose	d-Trealose	Trealose
Xilose	d-Xilose l-Xilose	Xilose
2 ceto Gluconato de potássio	2 ceto Gluconato de potássio	NR
5 ceto Gluconato de potássio	5 ceto Gluconato de potássio	NR
Adonitol	d-Adonitol	NR
Amido	Amido	NR
Arbutina	Arbutina	NR
Celobiose	d-Celobiose	NR
Dulcitol	Dulcitol	NR
Eritrol	Eritrol	NR
Frutose	d-Frutose	NR
Fucose	d-Fucose l-Fucose	NR
Gentiobiose	Gentiobiose	NR
Glicerol	Glicerol	NR
Glicogênio	Glicogênio	NR
Gluconato de potássio	Gluconato de potássio	NR
Lactose	d-Lactose (origem bovina)	NR
Lixose	d-Lixose	NR
Manose	d-Manose	NR
Melezitose	d-Melezitose	NR
Melibiose	d-Melibiose	NR
Metil- α -d-Manopiranosideo	Metil- α -d-Manopiranosideo	NR
Metil- α -d-Glucopiranosideo	Metil- α -d-Glucopiranosideo	NR
Metil- β -d-Xilanopiranosideo	Metil- β -d-Xilanopiranosideo	NR
Raminose	l-Raminose	NR
Sorbose	l-Sorbose	NR
Turanose	d-Turanose	NR
Xilitol	Xilitol	NR
Acetato de sódio	NR	Acetato de sódio
Ácido mandélico	NR	Ácido mandélico
Ácido nalidíxico	NR	Ácido nalidíxico
Amilopectina	NR	Amilopectina
Cloreto de sódio 7%	NR	Cloreto de sódio 7%
Oleandomicina	NR	Oleandomicina
Palatinose	NR	Palatinose
Poliâmido-higroestrepina	NR	Poliâmido-higroestrepina
Tiocianato de potássio	NR	Tiocianato de potássio
Vermelho de tetrazólio	NR	Vermelho de tetrazólio

¹ Dados de BIOMÉRIEUX (2002a). ² Dados de BIOMÉRIEUX BRASIL (2006). NR: não realizado

Tabela 51 Espécies Bacterianas de *Bacillus* e Gêneros Relacionados Identificadas pelos Sistemas VITEK e API

ESPÉCIE	VITEK ¹	API ²
<i>Aneurinibacillus aneuriniliticus</i>	Não identifica	Identifica
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Identifica	Identifica
<i>Bacillus anthracis</i>	Não identifica	Identifica
<i>Bacillus badius</i>	Não identifica	Identifica
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. mycooides</i> e <i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus cereus</i> 1 e <i>B. cereus</i> 2
<i>Bacillus circulans</i>	Identifica	<i>Bacillus circulans</i> 1 e <i>B. circulans</i> 2
<i>Bacillus coagulans</i>	Identifica	Identifica
<i>Bacillus firmus</i>	Identifica	Identifica
<i>Bacillus lentus</i>	Identifica	Identifica
<i>Bacillus licheniformis</i>	Identifica	Identifica
<i>Bacillus megaterium</i>	Identifica	<i>Bacillus megaterium</i> 1 e <i>B. megaterium</i> 2
<i>Bacillus mycooides</i>	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. mycooides</i> e <i>B. thuringiensis</i>	Identifica
<i>Bacillus pumilus</i>	Identifica	Identifica
<i>Bacillus smithii</i>	Não identifica	Identifica
<i>Bacillus subtilis</i>	Identifica	Identifica
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. mycooides</i> e <i>B. thuringiensis</i>	Identifica
<i>Brevibacillus agri</i>	Não identifica	Identifica
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	<i>Brevibacillus borstelensis</i> , <i>Brevibacillus parabrevis</i> e <i>Brevibacillus brevis</i>	Identifica
<i>Brevibacillus brevis</i>	<i>Brevibacillus borstelensis</i> , <i>Brevibacillus parabrevis</i> e <i>Brevibacillus brevis</i>	Identifica
<i>Brevibacillus centrosporus</i>	Não identifica	Identifica
<i>Brevibacillus choshinensis</i>	Não identifica	Identifica
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Identifica	Identifica
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	<i>Brevibacillus borstelensis</i> , <i>Brevibacillus parabrevis</i> e <i>Brevibacillus brevis</i>	Não identifica
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Identifica	Identifica
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	Identifica	Não identifica
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	Identifica	Identifica
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> e <i>L. fusiformis</i>	Identifica
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> e <i>L. fusiformis</i>	Identifica
<i>Paenibacillus alvei</i>	Identifica	Identifica
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	Identifica	Identifica
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	Não identifica	Identifica
<i>Paenibacillus lautus</i>	Não identifica	Identifica
<i>Paenibacillus macerans</i>	Identifica	Identifica
<i>Paenibacillus pabuli</i>	Não identifica	Identifica
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Identifica	Identifica
<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	Identifica	Identifica
<i>Paenibacillus validus</i>	Não identifica	Identifica
<i>Virgibacillus pontothenticus</i>	Identifica	Identifica

¹Dados de BIOMÉRIEUX BRASIL (2004) ²Dados de BIOMÉRIEUX (2005)

Tabela 52 Espécies identificadas pelos sistemas VITEK e API e espécies existentes na família *Bacillaceae*

FAMÍLIA	GÊNEROS EXISTENTES ¹	ESPÉCIES EXISTENTES ¹	Nº DE ESPÉCIES IDENTIFICADAS PELO VITEK ²	Nº DE ESPÉCIES IDENTIFICADAS PELO API ³
<i>Bacillaceae</i>	<i>Aeribacillus</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Alkalibacillus</i>	6 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Amphibacillus</i>	4 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Anaerobacillus</i>	3 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Anoxybacillus</i>	11 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Aquisalibacillus</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Bacillus</i>	164 espécies e 3 subespécies	12	15
	<i>Caldalkalibacillus</i>	2 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Cerasibacillus</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Falsibacillus</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Filobacillus</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Geobacillus</i>	16 espécies*	3	2
	<i>Gracilibacillus</i>	9 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Halalkalibacillus</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Halobacillus</i>	17 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Halolactibacillus</i>	3 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Lentibacillus</i>	11 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Lysinibacillus</i>	5 espécies*	2	2
	<i>Marinococcus</i>	3 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Microaerobacter</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Natronobacillus</i>	1 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Oceanobacillus</i>	9 espécies e 2 subespécies	Não identifica	Não identifica
	<i>Ornithinibacillus</i>	2 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Paraliobacillus</i>	2 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Paucisalibacillus</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Piscibacillus</i>	2 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Pontibacillus</i>	4 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Saccharococcus</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Salimicrobium</i>	4 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Salinibacillus</i>	2 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Salirhabdus</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Salsuginibacillus</i>	2 espécies*	Não identifica	Não identifica
<i>Sediminibacillus</i>	2 espécies*	Não identifica	Não identifica	
<i>Tenuibacillus</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica	
<i>Terribacillus</i>	3 espécies*	Não identifica	Não identifica	
<i>Thalassobacillus</i>	3 espécies*	Não identifica	Não identifica	
<i>Tumebacillus</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica	
<i>Virgibacillus</i>	19 espécies*	1	1	
<i>Viridibacillus</i>	3 espécies*	Não identifica	Não identifica	
<i>Vulcanibacillus</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica	

*Não foram descritas subespécies nessas espécies ¹ Dados de EUZÉBY, 2010 ² Dados de BIOMÉRIEUX BRASIL (2004) ³ Dados de BIOMÉRIEUX (2005)

Tabela 53 Espécies identificadas pelos sistemas VITEK e API e espécies existentes em famílias relacionadas ao gênero *Bacillus*

FAMÍLIA	GÊNEROS EXISTENTES ¹	ESPÉCIES EXISTENTES ¹	Nº DE ESPÉCIES IDENTIFICADAS PELO VITEK ²	Nº DE ESPÉCIES IDENTIFICADAS PELO API ³
<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>Alicyclobacillus</i>	20 espécies e 2 subespécies	Não identifica	Não identifica
	<i>Ammoniphilus</i>	2 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Aneurinibacillus</i>	5 espécies*	Não identifica	1
	<i>Brevibacillus</i>	16 espécies*	4	6
	<i>Cohnella</i>	10 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Fontibacillus</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Oxalophagus</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus</i>	115 espécies e 2 subespécies	5	9
	<i>Saccharibacillus</i>	2 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Thermobacillus</i>	2 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Pasteuriaceae</i>	<i>Pasteuria</i>	4 espécies*	Não identifica
<i>Pasteuriaceae</i>	<i>Bhargavaea</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Caryophanon</i>	2 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Filibacter</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Jeotgalibacillus</i>	4 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Kurthia</i>	3 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Paenisporosarcina</i>	2 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Planococcaceae</i>	<i>Planococcus</i>	9 espécies*	Não identifica
<i>Planococcaceae</i>	<i>Planomicrobium</i>	9 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Sporosarcina</i>	12 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Ureibacillus</i>	5 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Pullulanibacillus</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Sinobaca</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Sporolactobacillaceae</i>	<i>Sporolactobacillus</i>	8 espécies e 2 subespécies	Não identifica
<i>Thermoactinomycetaceae</i>	<i>Tuberibacillus</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Desmospora</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Laceyella</i>	3 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Mechercharimyces</i>	2 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Planifilum</i>	3 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Seinonella</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Shimazuella</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica
	<i>Thermoactinomyces</i>	2 espécies*	Não identifica	Não identifica
	<i>Thermoflavimicrobium</i>	1 espécie*	Não identifica	Não identifica

*Não foram descritas subespécies nessas espécies¹ Dados de EUZÉBY, 2010² Dados de BIOMÉRIEUX BRASIL (2004)³ Dados de BIOMÉRIEUX (2005)

5.1 GRUPO *Bacillus megaterium*

Diferente do descrito para as espécies *B. megaterium* (SNEATH, 1986, LOGAN; POPOVIC; HOFFMASTER, 2007) e *B. flexus* (PRIEST; GOODFELLOW; TODD, 1988), os isolados bacterianos desse grupo cresceram em anaerobiose, exceto o isolado bacteriano 3401. Não foi descrito se a espécie *B. aryabhatai* cresce em anaerobiose (SHIVAJI et al., 2009). Conforme descrito para *B. megaterium* (SNEATH, 1986, LOGAN; POPOVIC; HOFFMASTER, 2007), *B. flexus* (PRIEST; GOODFELLOW; TODD, 1988) e *B. aryabhatai* (SHIVAJI et al., 2009), os isolados bacterianos desse grupo não crescem a 55°C.

Na comparação dos resultados obtidos pelos sistemas VITEK e API e da análise da sequência do gene 16S rRNA (Tabela 9) observam-se algumas divergências. Cada sistema identificou com equívoco um isolado bacteriano deste grupo (3435 e 3613 A) e não conseguiu identificar outro isolado bacteriano (3406 P e 3301). Além disso, na análise da sequência do gene 16S rRNA para os isolados bacterianos desse grupo foi obtido como resultado espécies pertencentes ao grupo *B. megaterium*, enquanto os sistemas VITEK e o API identificam os isolados bacterianos como pertencentes a espécie *B. megaterium*. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de não estarem incluídas as espécies *B. aryabhatai* e *B. flexus* nos bancos de dados destes sistemas (Tabela 51). Se essas espécies estivessem nos bancos de dados, elas provavelmente seriam indicadas como possível resultado da identificação, uma vez que as três espécies são fenotipicamente semelhantes.

A espécie *B. aryabhatai* foi descrita em 2009 (SHIVAJI et al., 2009) com uma única cepa e até a presente data não há estudos fenotípicos com outras cepas. Sendo assim, os resultados fenotípicos apresentados na descrição podem não representar a variação fenotípica da espécie em questão. O resultado das provas fenotípicas de *B. megaterium* (SNEATH, 1986, LOGAN; POPOVIC; HOFFMASTER, 2007, SHIVAJI et al., 2009), *B. aryabhatai* (SHIVAJI et al., 2009), *B. flexus* (PRIEST; GOODFELLOW; TODD, 1988) e dos isolados bacterianos identificados como membros do grupo *B. megaterium* foi comparado. Os isolados bacterianos avaliados nesse estudo apresentaram características fenotípicas semelhantes às três espécies para produção de ácido a partir de frutose, glicose, manitol, lactose, glicerol,

galactose e glicogênio. Quando considerada a espécie *B. flexus*, os isolados bacterianos apresentaram resultados semelhantes na produção de ácido a partir de sorbitol, adonitol, eritrol, trealose, maltose e manose e diferentes na produção de ácido a partir de celobiose. Os isolados bacterianos apresentaram o mesmo resultado que *B. megaterium* para produção de ácido a partir de melibiose, l-arabinose, adonitol, eritrol, manose, celobiose e diferente quando considerados os carboidratos trealose, maltose, sorbitol e inositol. Na comparação com *B. aryabhatai* foi observado que o resultado dos isolados bacterianos coincidiu com o dessa espécie para a produção de ácido a partir de melibiose, l-arabinose, trealose, maltose e celobiose e não coincidiu para produção de ácido a partir de sorbitol, inositol, adonitol, eritrol e manose. De acordo com esses resultados não é possível a identificação das espécies dos isolados bacterianos desse grupo.

Todos os isolados bacterianos deste grupo apresentaram alta similaridade da sequência do gene 16S rRNA com *B. aryabhatai*, *B. megaterium* e *B. flexus* (Tabela 8). Quatro isolados bacterianos deste grupo foram incluídos na análise filogenética. Estes isolados bacterianos formaram um grupo com a cepa tipo de *B. aryabhatai* que está estreitamente relacionada com *B. megaterium* (Figura 5). Mesmo o isolado bacteriano que apresentou maior similaridade com *B. megaterium* se agrupou com *B. aryabhatai*, talvez devido a cepa tipo de *B. megaterium* possuir apenas 1486 pares de bases e as demais cepas analisadas deste grupo possuírem mais de 1500 pares de bases.

Existem espécies que apresentam identidade completa ou similaridade acima de 98,7% do gene 16S rRNA (FOX; WISOTZKEY; JURTSUK, 1992, STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994, BLACKWOOD; TURENNE; KABANI, 2004, SATOMI; La DUC; VENKATESWARAN, 2006, LOGAN et al., 2009). Nesses casos não é possível a determinação da espécie do isolado bacteriano apenas com o sequenciamento desse gene, sendo recomendado que seja analisada a sequência de outro gene conservado para distinguir as espécies em questão ou realizar experimentos de reassociação de DNA (STACKEBRANDT et al., 2002, WANG et al., 2007, LOGAN et al., 2009).

5.2 GRUPO *Bacillus pumilus*

Em 2006 foram descritas quatro espécies relacionadas a *B. pumilus*: *B. safensis* (SATOMI; LA DUC; VENKATESWARAN, 2006), *B. altitudinis*, *B. stratosphericus* e *B. aerophilus* (SHIVAJI et al., 2006). Como estas espécies bacterianas foram descritas simultaneamente, não foi feita uma comparação entre *B. safensis* e as outras três espécies (SATOMI; LA DUC; VENKATESWARAN, 2006, SHIVAJI et al., 2006). Na descrição da espécie *B. safensis* os autores sugeriram quatro testes fenotípicos para diferenciar *B. pumilus* de *B. safensis*: produção de ácido a partir de inositol, metil α -d-glicopiranosídeo, maltose e d-turanose (SATOMI; LA DUC; VENKATESWARAN, 2006). Porém, desses quatro testes, apenas a produção de ácido a partir de inositol apresentou resultado positivo para as treze cepas de *B. safensis* e negativo para as seis cepas de *B. pumilus* testadas por estes autores (SATOMI; LA DUC; VENKATESWARAN, 2006). Os demais testes tiveram resultados variados, impossibilitando a sua utilização para a diferenciação dessas espécies (SATOMI; LA DUC; VENKATESWARAN, 2006). Dos isolados bacterianos identificados como membros do grupo *B. pumilus* no presente estudo, a maioria foi negativa para produção de ácido a partir de inositol e, portanto, seriam considerados como *B. pumilus*, com exceção do isolado bacteriano 3325 V, que teve resultado duvidoso quando considerado o API (Tabela 10). Entretanto, as espécies *B. pumilus* e *B. safensis* não crescem em anaerobiose (SNEATH, 1986, SATOMI; LA DUC; VENKATESWARAN, 2006, LOGAN; POPOVIC; HOFFMASTER, 2007), e os isolados bacterianos 3325 B, 3325 V, 34382 e 3528 apresentaram crescimento nestas condições (Tabela 13). O que se conclui que não é possível diferenciar estas espécies utilizando estes testes.

Shivaji e colaboradores (2006) descreveram espécies (*B. altitudinis*, *B. stratosphericus* e *B. aerophilus*) que apresentam alta similaridade da sequência do gene 16S rRNA com *B. pumilus*. Naquele estudo, não foram realizados experimentos de reassociação de DNA-DNA entre *B. stratosphericus* e *B. aerophilus* com *B. pumilus*. Além disso, apesar da alta similaridade da sequência do gene 16S rRNA das três espécies com *B. safensis*, também não foi feita a hibridização DNA-DNA de nenhuma dessas três espécies com *B. safensis* já que elas foram descritas

juntas. Pelo resultado da reassociação de DNA-DNA, é possível afirmar que *B. stratosphericus* e *B. aerophilus* pertencem a espécies diferentes (SHIVAJI et al., 2006). Como não foi feita a hibridização DNA-DNA dessas espécies com *B. altitudinis* nem com *B. pumilus* a posição taxonômica das duas espécies é duvidosa.

No estudo de Shivaji e colaboradores (2006), além da ausência de experimentos de hibridização de DNA-DNA fundamentais, existe um questionamento a respeito das cepas utilizadas. Nos experimentos de reassociação de DNA-DNA não foi utilizada a cepa tipo de *B. pumilus* (EUZÉBY, 2010). Ao se avaliar a árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA foi observado que não foram utilizadas as cepas tipo de *B. pumilus* e *B. licheniformis* (EUZÉBY, 2010). Uma das cepas que os autores citam como cepa tipo de *B. licheniformis* é a cepa tipo da espécie *Bacillus luciferensis* (EUZÉBY, 2010).

Outra questão relacionada às espécies *B. stratosphericus* e *B. aerophilus* é o fato de as cepas tipo dessas espécies não estarem disponíveis em coleções de culturas (EUZÉBY, 2010). Quando a cepa tipo não está disponível para a comunidade científica, é recomendado que seja proposta uma nova cepa tipo (FELIS; TORRIANI; DELLAGLIO, 2004), como essas espécies foram descritas apenas com uma cepa (SHIVAJI et al., 2006) e não foram descritas novas cepas dessas espécies, não é possível a determinação de uma nova cepa tipo. O acesso à cepa tipo pela comunidade científica é um ponto crítico para que o nome da espécie seja considerado válido e, quando isso não ocorre, é recomendado que o nome da espécie em questão seja rejeitado (FELIS; TORRIANI; DELLAGLIO, 2004, TINDALL et al., 2006, TINDALL; GARRITY, 2008). Deste modo, ainda não foi definida a posição taxonômica das cepas referidas como *B. stratosphericus* e *B. aerophilus* (EUZÉBY, 2010).

Na comparação dos resultados obtidos pelos sistemas VITEK e API e da análise da sequência do gene 16S rRNA (Tabela 9) observamos que ambos identificaram os isolados bacterianos deste grupo como pertencentes a espécie *B. pumilus* (Tabela 13). Entretanto, nos bancos de dados dos sistemas VITEK e API não estão incluídas as espécies *B. altitudinis*, *B. stratosphericus*, *B. aerophilus* e *B. safensis* (Tabela 51). Se essas espécies estivessem nos bancos de dados, elas provavelmente também estariam como o resultado da identificação dos isolados

bacterianos, uma vez que as cinco espécies parecem ser fenotipicamente semelhantes.

Todos os isolados bacterianos do grupo *B. pumilus* apresentaram alta similaridade da sequência do gene 16S rRNA com *B. altitudinis*, *B. stratosphericus*, *B. aerophilus*, *B. safensis* e *B. pumilus* (Tabela 12). Oito dos doze isolados bacterianos deste grupo foram incluídos na análise filogenética realizada e se agruparam de acordo com os valores de similaridade (Tabela 12, Figura 4). As espécies *B. safensis* e *B. pumilus* são relacionadas, separando-se discretamente e se agrupam com os isolados bacterianos que apresentaram maior similaridade com cada uma delas (Figura 4). Já os isolados bacterianos que apresentaram maior similaridade com as espécies *B. altitudinis*, *B. stratosphericus* e *B. aerophilus* formaram outro grupo com as sequências das cepas tipo destas espécies, sugerindo que estas sejam altamente relacionadas. Nesta análise as cinco espécies em questão são estreitamente relacionadas, diferente do que foi observado pelos autores que descreveram as espécies *B. altitudinis*, *B. stratosphericus* e *B. aerophilus* (SHIVAJI et al., 2006).

Assim como ocorreu com os isolados bacterianos do grupo *B. megaterium*, os isolados bacterianos pertencentes ao grupo *B. pumilus* também precisam ter outro gene conservado sequenciado para distinguir estas espécies. Na descrição do *B. safensis* foi realizada a análise da sequência do gene *gyrB* que se mostrou eficiente para diferenciação das espécies *B. pumilus* e *B. safensis* (SATOMI; La DUC; VENKATESWARAN, 2006). Estes isolados bacterianos serão submetidos a análise da sequência do gene *gyrB* posteriormente.

5.3 GRUPO *Bacillus cereus*

Os sistemas API e VITEK identificaram os isolados bacterianos deste grupo como pertencentes ao grupo *B. cereus*, exceto o isolado bacteriano 3546 que teve a identificação equivocada pelo sistema VITEK (Tabela 17). Estes sistemas sugerem a realização de provas adicionais para a diferenciação de algumas das espécies que compõem este grupo, entretanto a identificação destas espécies é difícil de ser

realizada utilizando tanto a caracterização fenotípica quanto a genotípica (HELGASON et al., 2000, HELGASON et al., 2004). Conforme descrito para as espécies do grupo *B. cereus* (SNEATH, 1986, LOGAN; POPOVIC; HOFFMASTER, 2007), os isolados bacterianos desse grupo não crescem a 55°C e crescem em anaerobiose (Tabela 17).

Os isolados bacterianos deste grupo apresentaram alta similaridade da sequência do gene 16S rRNA com *B. cereus* (treze diferentes operons), *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* e *B. mycoides* (Tabela 16). Três isolados bacterianos deste grupo foram incluídos nas análises filogenéticas e estes se agruparam com as sequências do gene 16S rRNA das espécies com maior similaridade (Figura 4). Estudos mostram que a utilização da análise de outros genes conservados tais como *rpoB* e *gyrB* distinguem as espécies deste grupo (KO et al., 2003, BLACKWOOD; TURENNE; KABANI, 2004, BAVYKIN et al., 2004, La DUC et al., 2004).

5.4 GRUPO *Bacillus subtilis*

Utilizando o sistema VITEK os isolados bacterianos deste grupo foram identificados como espécie *B. subtilis* ou *B. amyloliquefaciens*. O sistema API não identificou dois isolados bacterianos e os demais foram identificados como pertencentes ao grupo *B. subtilis* (Tabela 21). Nos bancos de dados destes sistemas não estão incluídas as espécies *B. vallismortis*, *B. mojavensis* e *B. atrophaeus*, que apresentam características fenotípicas muito semelhantes às outras espécies deste grupo. As espécies que compõem este grupo são dificilmente diferenciadas por características fenotípicas assim como pela análise da sequência do gene 16S rRNA (SNEATH, 1986, NAKAMURA, 1989, ROBERTS; NAKAMURA; COHAN, 1994, ROBERTS; NAKAMURA; COHAN, 1996, PALMISANO et al., 2001, LOGAN; POPOVIC; HOFFMASTER, 2007, WANG et al., 2007).

Todos os isolados bacterianos desse grupo apresentaram alta similaridade da sequência do gene 16S rRNA com *B. amyloliquefaciens*, *B. vallismortis*, *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *B. mojavensis* e *B. atrophaeus* (Tabela

20). Quatro isolados bacterianos deste grupo foram incluídos nas análises filogenéticas e estes se agruparam conforme com as espécies que apresentaram os maiores valores de similaridade da sequência do gene 16S rRNA (Tabela 20, Figura 4). É recomendado que a diferenciação dessas espécies seja realizada utilizando a análise de outros genes conservados. Wang e colaboradores (2007) utilizaram a análise da sequência do gene *gyrB* para identificação destas espécies.

5.5 GRUPO *Bacillus licheniformis*

Para os isolados bacterianos deste grupo os sistemas comerciais, quando acertaram, apresentaram como identificação apenas a espécie *B. licheniformis*, uma vez que as outras espécies que compõem este grupo, *B. sonorensis* e *B. aerius*, não estão incluídas nos bancos de dados (Tabela 51). Se essas espécies estivessem nos bancos de dados, elas provavelmente também estariam como o resultado da identificação dos isolados bacterianos ao invés de apenas *B. licheniformis*, uma vez que essas espécies são fenotipicamente semelhantes (PALMISANO et al., 2001, SHIVAJI et al., 2006) e já foi mostrado que testes metabólicos como o API não são capazes de diferenciar *B. licheniformis* de *B. sonorensis* (PALMISANO et al., 2001).

A espécie *B. aerius* está na mesma situação que as espécies *B. stratosphericus* e *B. aerophilus* (SHIVAJI et al., 2006). Essa espécie foi descrita com apenas uma cepa, ainda não foram descritas outras cepas dessa espécie e a cepa tipo não está disponível em coleções de culturas (EUZÉBY, 2010). Este fato torna indefinida a sua posição taxonômica da espécie (FELIS; TORRIANI; DELLAGLIO, 2004, TINDALL et al., 2006, TINDALL; GARRITY, 2008).

O sistema VITEK falhou na identificação de três dos quatro isolados bacterianos enquanto o sistema API falhou em um (Tabela 25). Conforme descrito para as espécies do grupo *B. licheniformis* (SNEATH, 1986, PALMISANO et al., 2001, LOGAN; POPOVIC; HOFFMASTER, 2007), os isolados bacterianos desse grupo crescem a 55°C e em anaerobiose (Tabela 25).

Todos os isolados bacterianos apresentaram alta similaridade da sequência do gene 16S rRNA com *B. licheniformis* (sete diferentes operons), *B. sonorensis* e *B.*

aerius (Tabela 24). Na análise filogenética realizada os isolados bacterianos deste grupo se agrupam com a cepa tipo da espécie com maior similaridade da sequência do gene 16S rRNA (Figura 4). A análise da sequência de outro gene conservado, como o *rpoB*, é recomendada para a diferenciação das espécies integrantes deste grupo (PALMISANO et al., 2001).

5.6 *Bacillus* sp. RELACIONADO À ESPÉCIE *Bacillus humi*

Uma vez que estes isolados bacterianos pertencem a uma espécie não incluída nos bancos de dados dos sistemas comerciais utilizados neste estudo, o esperado seria que estes sistemas não identificassem estes isolados bacterianos. Contudo, o sistema VITEK identificou sete dos dez isolados bacterianos, proporcionando resultados equivocados, onde apresentou falha inclusive na determinação do gênero (Tabela 29). Já o sistema API não identificou um dos isolados bacterianos e identificou corretamente o gênero dos demais isolados bacterianos (Tabela 29).

Na descrição da espécie *B. humi*, os autores utilizaram o sistema API para realizar a caracterização fenotípica dos isolados bacterianos. Eles observaram que as cepas da espécie *B. humi* possuem capacidade variável de produzir ácido a partir de arbutina, lactose e salicina e são incapaz de produzir ácido a partir dos demais carboidratos do API (HEYRMAN et al., 2005). Os isolados bacterianos do estudo podem ser diferenciadas da espécie *B. humi* pois todos os isolados bacterianos produziram ácido a partir de d-maltose, d-sacarose e d-trealose quando considerados os resultados obtidos pelo mesmo sistema (Tabela 26).

Os dez isolados bacterianos apresentaram um valor de similaridade da sequência do gene 16S rRNA com *B. humi* abaixo de 98,70% (Tabela 28), indicando que esse grupo de isolados bacterianos pode corresponder a uma espécie ainda não descrita. A análise filogenética realizada confirma que estes isolados bacterianos não se agrupam com a espécie *B. humi* (Figura 6). Segundo Stackebrandt e Ebers (2006), há necessidade da realização de experimentos de

reassociação de DNA-DNA para determinação da posição taxonômica destes isolados bacterianos.

5.7 OUTRAS ESPÉCIES DE *Bacillus*

Seis isolados bacterianos foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*.

5.7.1 Isolado bacteriano 3399

O isolado bacteriano 3399 foi identificado pela análise do sequência do gene 16S rRNA e pelo sistema VITEK como *B. circulans*. Entretanto, apesar de essa espécie estar presente no banco de dados, o sistema API apresentou como resultado para o isolado bacteriano uma identificação inaceitável. Conforme descrito para *B. circulans* (SNEATH, 1986, LOGAN; POPOVIC; HOFFMASTER, 2007), o isolado bacteriano 3399 produz a enzima catalase, cresce em anaerobiose, não cresce a 55°C, hidrolisa amido, produz ácido a partir de d-glicose, l-arabinose, d-xilose, d-manitol, d-trealose e salicina e não produz ácido a partir de d-arabinose (Tabelas 31, 32 e 33).

5.7.2 Isolado bacteriano 3424 A

O isolado bacteriano 3424 A apresentou similaridade do gene 16S rRNA acima de 98,7% com *B. lehensis* e *B. oshimensis*, o que possibilita determinar as prováveis espécies do isolado bacteriano. Como estas espécies não fazem parte dos bancos de dados dos sistemas API e VITEK (Tabela 51), a identificação fenotípica foi equivocada. Apenas o sistema API identificou corretamente o gênero

do isolado bacteriano (Tabela 31). Conforme descrito para *B. lehensis* e *B. oshimensis* (YUMOTO et al., 2005, GHOSH et al., 2007), o isolado bacteriano 3424 A não cresce a 55°C nem em anaerobiose (Tabela 31).

Na Tabela 54 foi feita uma comparação fenotípica entre *B. lehensis*, *B. oshimensis* e o isolado bacteriano 3424 A. Os resultados negativos do VITEK podem ser justificados pelo tempo de incubação insuficiente para o isolado bacteriano metabolizar os substratos dos testes bioquímicos. Quando considerado o resultado do sistema API, o isolado bacteriano apresentou o mesmo resultado que as espécies *B. lehensis* e *B. oshimensis* para produção de ácido a partir de d-arabinose, trealose e d-xilose, porém apresentou um resultado diferente das espécies para produção de ácido a partir de amidalina e d-manitol. O isolado bacteriano apresentou o mesmo resultado que *B. lehensis* para produção de ácido a partir de glicogênio, d-lactose e d-frutose e o mesmo resultado que *B. oshimensis* para produção de ácido a partir de d-manose, melibiose e d-ribose. Tanto *B. lehensis* quanto *B. oshimensis* foram descritas com uma cepa e até o momento, apesar de terem sido depositadas sequências de genes de outras cepas dessas espécies, não foi feita uma análise fenotípica dessas novas cepas para a determinação do perfil bioquímico das espécies. A comparação de resultados apenas da cepa tipo das espécies pode não considerar variações fenotípicas dentro das mesmas, o que pode justificar as diferenças nos resultados obtidos para o isolado bacteriano 3424 A.

Tabela 54 Comparação das características fenotípicas de *Bacillus lehensis*, *Bacillus oshimensis* e o isolado bacteriano 3424 A

TESTE	<i>B. lehensis</i> ^{1,3}	<i>B. oshimensis</i> ^{1,2,3}	3424 A	
			API ⁴	VITEK ⁵
d-Arabinose	-	-	-	-
Glicogênio	+	-	+	NR
d-Lactose	+	-	+	NR
d-Manose	-	+	+	NR
Amidalina	-	-	+	NR
d-Frutose	+	-	+	NR
d-Manitol	-	-	+	-
Melibiose	-	+	+	NR
d-Ribose	-	+	+	-
Trealose	+	+	+	-
d-Xilose	+	+	+	-

¹ Resultados de bioquímica convencional e BIOLOG GP2 (GHOSH et al., 2007)

² Resultados de bioquímica convencional (YUMOTO et al., 2005) ³ Resultados de bioquímica convencional (CHEN et al., 2011) ⁴ Resultados apresentados na Tabela 32

⁵ Resultados apresentados na Tabela 33. NR: não realizado.

5.7.3 Isolado bacteriano 3428

O isolado bacteriano 3428 apresentou similaridade do gene 16S rRNA acima de 98,7% com *B. jeotgali*, *B. thioparans*, *B. boroniphilus* e *B. selenatarsenatis*. Como as prováveis espécies desse isolado bacteriano não fazem parte dos bancos de dados dos sistemas API e VITEK (Tabela 51), o resultado da identificação foi equivocado. Apenas o sistema API identificou corretamente o gênero do isolado bacteriano (Tabela 31). Conforme descrito para *B. jeotgali*, *B. thioparans*, *B. boroniphilus* e *B. selenatarsenatis* (YOON et al., 2001, AHMED et al., 2007, PÉREZ-IBARRA; FLORES; GARCÍA-VARELA, 2007, YAMAMURA et al., 2007), o isolado bacteriano 3428 não cresce a 55°C e produz a enzima catalase (Tabela 31). Como na descrição dessas espécies não foi avaliada a capacidade de cada uma produzir ácido a partir de diferentes carboidratos, não foi possível realizar a comparação fenotípica entre o isolado bacteriano 3428 e as espécies *B. jeotgali*, *B. thioparans*, *B. boroniphilus* e *B. selenatarsenatis* (YOON et al., 2001, AHMED et al., 2007, PÉREZ-IBARRA; FLORES; GARCÍA-VARELA, 2007, YAMAMURA et al., 2007).

A espécie *B. jeotgali* foi descrita em 2001 (YOON et al., 2001) e em 2007 foram descritas as espécies *B. thioparans*, *B. boroniphilus* e *B. selenatarsenatis*

(AHMED et al., 2007, PÉREZ-IBARRA; FLORES; GARCÍA-VARELA, 2007, YAMAMURA et al., 2007). Nos estudos realizados em 2007 foram feitos experimentos de reassociação de DNA-DNA entre *B. jeotgali* e *B. boroniphilus*, *B. jeotgali* e *B. selenatarsenatis* e *B. jeotgali* e *B. thioparans*. Os resultados confirmaram que *B. jeotgali* pertence a uma espécie diferente das demais (AHMED et al., 2007, YAMAMURA et al., 2007, PÉREZ-IBARRA; FLORES; GARCÍA-VARELA, 2007). Entretanto, não há estudos de reassociação de DNA-DNA entre as espécies *B. selenatarsenatis*, *B. thioparans* e *B. boroniphilus* por isso a posição taxonômica destas espécies pode ser questionada. Essas espécies foram descritas com poucas cepas (três, uma e uma, respectivamente) e ainda não foram descritas novas cepas dessas espécies, o que dificulta a análise das variações fenotípicas que podem ocorrer dentro de cada uma delas.

5.7.4 Isolado bacteriano 3441

De acordo com a análise da sequência do gene 16S rRNA, o isolado bacteriano 3441 foi identificado como *B. koreensis*. Como essa espécie não faz parte dos bancos de dados dos sistemas comerciais utilizados (Tabela 51), o VITEK apresentou como resultado identificação inaceitável enquanto o API identificou de modo equivocado a espécie e o gênero do isolado bacteriano (Tabela 31).

Na Tabela 55 foi feita a comparação fenotípica entre *B. koreensis* e o isolado bacteriano 3441. O isolado bacteriano 3441 apresentou os mesmos resultados que *B. koreensis* para as hidrólises da esculina, da caseína e do amido assim como para a produção de ácido a partir de frutose, glicose, glicerol, manitol, trealose e xilose. A produção de ácido a partir de rafinose e sacarose foi negativa apenas no resultado do VITEK do isolado bacteriano 3441. A produção de ácido a partir de lactose e maltose foi negativa apenas para *B. koreensis*. Outras semelhanças entre *B. koreensis* e o isolado bacteriano 3441 são ambos serem bastonetes Gram positivos esporulados, produtores da enzima catalase, sem capacidade de crescer em anaerobiose e terem sido isolados de ambiente numa temperatura de incubação de 30°C (LIM et al., 2006).

As diferenças entre *B. koreensis* e o isolado bacteriano 3441 observadas na Tabela 55 podem ser justificadas pelo fato de a descrição da espécie ter sido feita com apenas uma cepa (LIM et al., 2006), o que pode subestimar a variação fenotípica dentro da espécie.

Tabela 55 Comparação das características fenotípicas de *Bacillus koreensis* e o isolado bacteriano 3441

TESTE	<i>B. koreensis</i> ¹	3441		
		API ²	VITEK ³	BIOQUÍMICA CONVENCIONAL ⁴
Esculina	+	+	+	+
Caseína	+	NR	NR	+
Amido	+	+	NR	+
Frutose	+	+	NR	+
Glicose	+	+	+	+
Glicerol	+	+	NR	NR
Lactose	-	+	NR	+
Maltose	-	+	+	+
Manitol	-	-	-	-
Rafinose	+	+	-	+
Sacarose	+	+	-	+
Trealose	-	-	-	NR
Xilose	-	-	-	-

¹ Resultados de bioquímica convencional (LIM et al., 2006) ² Resultados apresentados na Tabela 32

³ Resultados apresentados na Tabela 33 ⁴ Resultados descritos no corpo do trabalho. NR: não realizado.

5.7.5 Isolado bacteriano 3537

O isolado bacteriano 3537 não apresentou similaridade do gene 16S rRNA acima de 98,7% com nenhuma espécie descrita, não sendo possível a determinação da sua espécie. A espécie que apresentou maior similaridade do gene 16S rRNA foi *B. niabensis*. Como foi obtida para o isolado bacteriano uma sequência do gene 16S rRNA de 1394 pares de bases, é provável que esse percentual de similaridade seja modificado se o tamanho dessa sequência for aumentado. Se o percentual de similaridade do gene 16S rRNA do isolado bacteriano continuar abaixo de 98,7% com quaisquer espécies descritas, esse isolado bacteriano pode fazer parte de uma espécie ainda não descrita (STACKEBRANDT; EBERS, 2006). Novos experimentos

serão realizados para esclarecer o relacionamento desse isolado bacteriano com as espécies descritas.

Como *B. niabensis* não faz parte dos bancos de dados dos sistemas VITEK e API (Tabela 51), a identificação realizada pelo VITEK foi equivocada e o sistema API identificou corretamente o gênero do isolado bacteriano (Tabela 31).

Na Tabela 56 foi feita a comparação fenotípica entre *B. niabensis*, descrita com cinco cepas e o isolado bacteriano 3537. Os resultados de *B. niabensis* coincidiram com os do API do isolado bacteriano 3537 para os cinco testes analisados. Entretanto o VITEK de 3537 apresentou o mesmo resultado que *B. niabensis* apenas para hidrólise da esculina. As diferenças observadas na Tabela 56 podem ser justificadas pelo lento crescimento apresentado tanto pelas cepas de *B. niabensis* (KWON et al., 2007) quanto para o isolado bacteriano 3537 (Tabela 50), assim como pela utilização de diferentes isômeros dos carboidratos testados no VITEK. Além das semelhanças fenotípicas apresentadas na Tabela 56 entre *B. niabensis* (KWON et al., 2007) e o isolado bacteriano 3537 (Tabela 31), outras características em comum são presença da enzima catalase, habilidade de crescer em anaerobiose e inabilidade de crescer a 55°C.

Tabela 56 Comparação das características fenotípicas entre *Bacillus niabensis* e o isolado bacteriano 3537

TESTE	<i>B. niabensis</i> ¹	3537	
		API ²	VITEK ³
Arabinose	+	+	-
Glicose	+	+	-
Manitol	+	+	-
Xilose	+	+	-
Esculina	+	+	+

¹ Resultados de bioquímica convencional (KWON et al., 2007)

² Resultados apresentados na Tabela 32 ³ Resultados apresentados na Tabela 33

5.7.6 Isolado bacteriano 3559

A análise da sequência do gene 16S rRNA identificou o isolado bacteriano 3559 como *B. barbaricus*. Como essa espécie não faz parte dos bancos de dados

dos sistemas VITEK e API (Tabela 51), estes se equivocaram no resultado da identificação e identificaram de maneira equivocada a espécie e o gênero do isolado bacteriano (Tabela 31).

Na Tabela 57 foi feita a comparação fenotípica entre *B. barbaricus* e o isolado bacteriano 3559. Num total de quarenta e um testes, os resultados obtidos utilizando o sistema API para o isolado bacteriano 3559 não coincidiram com os da espécie *B. barbaricus* para n-acetil-glicosamina, trealose, amido, glicogênio e d-manose. Essas diferenças podem ser explicadas pela descrição da espécie *B. barbaricus* ter sido feita com quatro cepas isoladas de um mesmo local, enquanto é recomendado que a descrição de novas espécies seja feita com um mínimo de cinco ou dez cepas isoladas independentemente de diferentes locais (CHRISTENSEN et al., 2001). Para o sistema VITEK, num total de dezenove testes, não foi observado o mesmo resultado para d-glicose, n-acetil-glicosamina, esculina, maltose e trealose. A espécie *B. barbaricus* apresenta crescimento lento (TÄUBEL et al., 2003), com isso o VITEK, que finaliza as leituras das provas em até quinze horas, não detecta os testes que são positivos no sistema API, cuja leitura é realizada em quarenta e oito horas. Além das semelhanças entre o isolado bacteriano 3559 (Tabela 31) e *B. barbaricus* (TÄUBEL et al., 2003) apresentadas na Tabela 57, outras características em comum são inabilidade de crescer a 55°C, ambas são produtoras da enzima catalase e crescem em anaerobiose.

Tabela 57 Comparação das características fenotípicas entre *Bacillus barbaricus* e o isolado bacteriano 3559

TESTE	<i>B. barbaricus</i> ¹	3559	
		API ²	VITEK ²
Glicose	+	+	-
N-Acetil-Glicosamina	+	-	-
Esculina	+	+	-
Maltose	+	+	-
Trealose	+	-	-
Amido	+	-	NR
Glicogênio	+	-	NR
Glicerol	-	-	NR
Eritrol	-	-	NR
Arabinose	-	-	-
Ribose	-	-	-
d-Xilose	-	-	-
l-Xilose	-	-	-
Adonitol	-	-	NR
Metil-β-Xilosideo	-	-	NR
d-Manose	-	+	NR
l-Sorbose	-	-	NR
Raminose	-	-	NR
Dulcitol	-	-	NR
Inositol	-	-	-
Manitol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Amidalina	-	-	-
Arbutina	-	-	NR
Salicina	-	-	-
Celobiose	-	-	NR
Melibiose	-	-	NR
Inulina	-	-	-
Melezitose	-	-	NR
Rafinose	-	-	-
Xilitol	-	-	NR
β-Gentiobiose	-	-	NR
d-Lixose	-	-	NR
Tagatose	-	-	-
d-Fucose	-	-	NR
l-Fucose	-	-	NR
d-Arabitól	-	-	-
l-Arabitól	-	-	-
Gluconato de potássio	-	-	NR
2-Ceto gluconato de potássio	-	-	NR
5-Ceto gluconato de potássio	-	-	NR

¹ Resultados de API 50 CHB (TÄUBEL et al., 2003) ² Resultados apresentados na Tabela 32

³ Resultados apresentados na Tabela 33. NR: não realizado.

Os seis isolados bacterianos que compõem este grupo foram incluídos nas análises filogenéticas (Figuras 4 e 5). Estes isolados bacterianos se agruparam com as espécies que apresentaram maior similaridade da sequência do gene 16S rRNA.

Algumas discrepâncias foram observadas provavelmente devido ao tamanho das sequências do gene das cepas tipo nem sempre possuírem mais de 1500 pares de bases. O isolado bacteriano 3399, identificado como *B. circulans*, se agrupou próximo às cepas mais similares, *B. nealsonii* e *B. circulans*, mas era esperado que se agrupasse com a cepa tipo de *B. circulans*. Esse fato pode ser explicado pela a cepa tipo de *B. nealsonii* possuir 1509 pares de bases e a de *B. circulans* possuir 1480 pares de bases. Outras análises serão realizadas com estes isolados bacterianos posteriormente.

5.8 *Paenibacillus fonticola*

Os isolados bacterianos deste grupo foram identificados pela análise da sequência do gene 16S rRNA como *P. fonticola* (Tabela 36). Como esta espécie não faz parte dos bancos de dados dos sistemas VITEK e API (Tabela 51), a identificação foi equivocada quando estes foram utilizados. Apenas o sistema VITEK identificou o gênero de três dos quatro isolados bacterianos analisados (Tabela 37).

Na Tabela 58 foi feita a comparação fenotípica entre *P. fonticola* e os isolados bacterianos 3373 A, 3373 B, 3373 C e 3424 B. Os isolados bacterianos apresentaram o mesmo resultado que *P. fonticola* nos seguintes testes: l-arabinose (API), arabinose (VITEK), inositol (VITEK) e sorbitol (VITEK). Para glicose, melibiose, raminose e sacarose todos os isolados bacterianos apresentaram resultado diferente de *P. fonticola*. Para os demais testes houve variação nos resultados, nos quais, para um mesmo teste, pelo menos um isolado bacteriano apresentou o mesmo resultado que *P. fonticola* e outro apresentou um resultado diferente de *P. fonticola*.

Tanto *P. fonticola* (CHOU et al., 2007) quanto 3373 A, 3373 B, 3373 C e 3424 B (Tabela 37) são produtores da enzima catalase, crescem em anaerobiose e não crescem a 55°C. As diferenças entre *P. fonticola* e os isolados bacterianos apresentadas na Tabela 58 podem ser justificadas pela descrição de *P. fonticola* ter sido feita com uma cepa e por terem sido utilizadas metodologias diferentes (CHOU et al., 2007).

Todos os isolados bacterianos apresentaram alta similaridade da sequência do gene 16S rRNA (acima de 99,45%) apenas com *P. fonticola* (Tabela 36). Como esse percentual foi acima de 98,7% para todos os isolados bacterianos, a espécie desses isolados bacterianos pode ser definida (STACKEBRANDT; EBERS, 2006). Os isolados bacterianos se agrupam com a espécie *P. fonticola* na análise filogenética confirmando os dados descritos neste estudo (Figura 7).

Tabela 58 Comparação das características fenotípicas entre *Paenibacillus fonticola* e os isolados bacterianos 3373 A, 3373 B, 3373 C e 3424 B

TESTE	<i>P. fonticola</i> ¹	3373 A		3373 B		3373 C		3424 B	
		API ²	VITEK ³	API ²	VITEK ³	API ²	VITEK ³	API ²	VITEK ³
Amidalina	-	+	-	+	+	+	-	+	-
Arabinose ⁴	+	D	+	+	+	+	+	D	+
Glicose	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	D	-	+	-	D	-	D	-
Manitol	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR
Raminose	-	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR
Sacarose	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	D	-	D	-	-	-	D	-

D: duvidoso ¹ *P. fonticola* ZL¹. Resultados de API 20E, API 20NE e Microlog GN2 (CHOU et al., 2007)
² Resultados apresentados na Tabela 34 ³ Resultados apresentados na Tabela 35 ⁴ Estão representados resultados de d-arabinose (linha superior) e l-arabinose (linha inferior) para API. NR: não realizado.

5.9 *Paenibacillus humicus*

Os isolados bacterianos deste grupo foram identificados pela análise da sequência do gene 16S rRNA como *P. humicus* (Tabela 40). Como esta espécie não faz parte dos bancos de dados dos sistemas VITEK e API (Tabela 51), os resultados obtidos com esses sistemas foram equivocados. A identificação do gênero destes isolados bacterianos foi correta pelo sistema VITEK, entretanto, o sistema API identificou o gênero de apenas um dos isolados bacterianos analisados (Tabela 41).

Na Tabela 59 foi feita a comparação fenotípica entre *P. humicus* e os isolados bacterianos 3564, 3568 e 5002. Os isolados bacterianos apresentaram o mesmo resultado que *P. humicus* nos seguintes testes: d-celobiose, maltose, sacarose e

trealose. Para glicogênio, d-manitol, d-rafinose e amido todos os isolados bacterianos apresentaram resultado diferente de *P. humicus*. Para os demais testes houve variação nos resultados, nos quais, para um mesmo teste pelo menos um isolado bacteriano apresentou o mesmo resultado que *P. humicus* e outro apresentou um resultado diferente de *P. humicus*.

Tanto *P. humicus* (VAZ-MOREIRA et al., 2007) quanto 3564, 3568 e 5002 (Tabela 41) são produtores da enzima catalase, não crescem em anaerobiose nem a 55°C. As diferenças entre *P. humicus* e os isolados bacterianos apresentadas na Tabela 59 podem ser justificadas pela descrição de *P. humicus* ter sido feita com apenas duas cepas (VAZ-MOREIRA et al., 2007).

Todos os isolados bacterianos apresentaram alta similaridade da sequência do gene 16S rRNA (acima de 99,59%) apenas com *P. humicus* (Tabela 40), como esse percentual foi acima de 98,7% para todos os isolados bacterianos, a espécie desses isolados bacterianos pode ser identificada (STACKEBRANDT; EBERS, 2006). Estes isolados bacterianos foram incluídos na análise filogenética que confirma os dados descritos (Figura 7).

Tabela 59 Comparação das características fenotípica entre *Paenibacillus humicus* e os isolados bacterianos 3564, 3568 e 5002

TESTE	<i>P. humicus</i> ¹	3564		3568		5002	
		API ²	VITEK ³	API ²	VITEK ³	API ²	VITEK ³
Arabinose	-	D	-	-	-	D	-
d-Frutose	-	-	NR	+	NR	D	NR
Galactose	-	D	+	+	+	D	+
Glicose	-	D	+	+	+	D	+
Glicogênio	-	+	NR	+	NR	+	NR
d-Manose	-	-	NR	D	NR	D	NR
Manitol	-	+	+	+	+	+	+
d-Melezitose	-	D	NR	+	NR	+	NR
Rafinose	-	+	+	+	+	+	+
Amido	-	+	NR	+	NR	+	NR
Xilose	-	D	-	+	-	D	+
Amidalina	+	D	-	D	-	D	-
d-Celobiose	+	+	NR	+	NR	+	NR
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+

D: duvidoso ¹ Resultados de API 50CHB (VAZ-MOREIRA et al., 2007) ² Resultados apresentados na Tabela 38 ³ Resultados apresentados na Tabela 39. NR: não realizado.

5.10 OUTRAS ESPÉCIES DE *Paenibacillus*

Nesse grupo estão sete isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Paenibacillus*.

5.10.1 Isolado bacteriano 3311

O isolado bacteriano 3311 não apresentou similaridade do gene 16S rRNA acima de 98,7% com nenhuma espécie descrita, não sendo possível a identificação de sua espécie. As espécies que apresentaram maior similaridade do gene 16S rRNA foram respectivamente *P. barengoltzii* e *P. konsidensis*. Como essas espécies não fazem parte dos bancos de dados dos sistemas VITEK e API (Tabelas 43 e 51), os dois sistemas erraram no resultado da identificação, apesar de terem identificado o isolado bacteriano como a mesma espécie, *B. circulans* (Tabela 43).

Na Tabela 60 foi feita a comparação fenotípica entre *P. konsidensis*, *P. barengoltzii* e o isolado bacteriano 3311. O isolado bacteriano 3311 apresentou resultados diferentes de *P. konsidensis* para produção de ácido a partir de raminose, rafinose e d-xilose e apresentou os mesmos resultados que *P. barengoltzii* para produção de ácido a partir de d-arabinose, l-raminose, manitol, d-manitol, inulina, melezitose, d-turanose, d-arabitol, d-frutose, l-sorbose e xilitol.

O isolado bacteriano 3311 é produtor da enzima catalase, produz ácido a partir de d-xilose e não produz a partir de raminose e de rafinose. Essas características diferenciam o isolado bacteriano 3311 (Tabela 60) da espécie *P. konsidensis* (KO et al., 2008). A capacidade do isolado bacteriano 3311 de produzir ácido a partir de diversos carboidratos assim como sua capacidade de crescer em anaerobiose (Tabelas 43 e 60) são características que o diferenciam da espécie *P. barengoltzii* (OSMAN; SATOMI; VENKATESWARAN, 2006). Além disso, o percentual de similaridade do gene 16S rRNA do isolado bacteriano está abaixo de 98,7% com quaisquer espécies descritas, sugerindo que esse isolado bacteriano

pode fazer parte de uma espécie ainda não descrita (STACKEBRANDT; EBERS, 2006).

Tabela 60 Comparação das características fenotípicas entre *Paenibacillus konsidensis*, *Paenibacillus barengoltzii* e o isolado bacteriano 3311

TESTE	<i>P. konsidensis</i> ¹	<i>P. barengoltzii</i> ²	3311	
			API ³	VITEK ⁴
Glicerol	-	NR	-	NR
Arabinose	NR	-	NR	+
d-Arabinose	-	-	-	NR
l-Arabinose	+	-	+	NR
Ribose	+	NR	NR	+
D-Ribose	NR	-	+	NR
Glicose	+	NR	NR	+
d-Glicose	NR	-	+	NR
Manose	+	NR	NR	NR
d-Manose	NR	-	+	NR
Raminose	+	-	NR	NR
l-Raminose	NR	-	-	NR
Manitol	-	-	NR	-
d-Manitol	NR	-	-	NR
Metil α-d-Manopiranosídeo	-	NR	-	NR
N-Acetil-Glicosamina	+	-	+	+
Sacarose	+	-	NR	+
d-Sacarose	NR	-	+	NR
Inulina	-	-	-	-
Melezitose	-	NR	NR	NR
d-Melezitose	NR	-	-	NR
Rafinose	+	NR	NR	-
d-Rafinose	NR	-	+	NR
Amido	+	-	+	NR
Glicogênio	+	-	+	NR
Gentiobiose	+	-	+	NR
Turanose	+	NR	NR	NR
d-Turanose	NR	-	-	NR
Xilose	NR	NR	NR	+
d-Xilose	-	-	+	NR
l-Fucose	-	NR	-	NR
Arabitol	NR	NR	NR	-
d-Arabitol	-	-	-	NR
Galactose	NR	NR	NR	+
d-Galactose	NR	-	+	NR
d-Frutose	NR	-	-	NR
Amidalina	NR	-	+	+
Salicina	NR	-	+	+
d-Lactose	NR	-	+	NR
Trealose	NR	NR	NR	+
d-Trealose	NR	-	+	NR
l-Sorbose	NR	-	-	NR
Xilitol	NR	-	-	NR
Metil β-d-Xilopiranosídeo	NR	-	NR	NR
Metil α-d-Glucopiranosídeo	NR	-	+	NR
d-Celobiose	NR	-	+	NR
Maltose	NR	NR	NR	+
d-Maltose	NR	-	+	NR
Gluconato de potássio	+	-	+	NR
d-Melibiose	NR	-	+	NR

¹ Resultados de API 50CHB (KO et al., 2008) ² Resultados de API 20E, API 20NE, API 50CHB e Biolog (OSMAN; SATOMI; VENKATESWARAN, 2006; BENARDINI et al., 2010) ³ Resultados apresentados na Tabela 44 ⁴ Resultados apresentados na Tabela 45. NR: não realizado.

5.10.2 Isolado bacteriano 3439 B

O isolado bacteriano 3439 B não apresentou similaridade do gene 16S rRNA acima de 98,7% com nenhuma espécie descrita, sendo possível apenas a determinação de seu gênero. As espécies que apresentaram maior similaridade do gene 16S rRNA foram *P. cellulosityticus* e *P. kobensis*. Como a sequência obtida do gene 16S rRNA para o isolado bacteriano 3439 B possui 1456 pares de bases, é provável que esse percentual de similaridade seja modificado se o tamanho da sequência desse gene for aumentado. Se o percentual de similaridade do gene 16S rRNA do isolado bacteriano continuar abaixo de 98,7% com quaisquer espécies descritas, esse isolado bacteriano pode fazer parte de uma espécie ainda não descrita (STACKEBRANDT; EBERS, 2006).

Como as espécies mais similares a esse isolado bacteriano não fazem parte do banco de dados do sistema VITEK (Tabela 51), este forneceu um resultado equivocado da identificação (Tabela 43). O API apresentou como resultado identificação inaceitável (Tabela 43).

Na Tabela 61 foi feita a comparação fenotípica entre *P. kobensis*, *P. cellulosityticus* e o isolado bacteriano 3439 B. O isolado bacteriano 3439 B apresentou resultados diferentes de *P. kobensis* para produção de ácido a partir de arabinose, melibiose e sacarose (VITEK). O API do isolado bacteriano 3439 B apresentou os mesmos resultados que *P. cellulosityticus* e o VITEK apresentou resultados diferentes de *P. cellulosityticus* para todos os testes.

O isolado bacteriano 3439 B cresce em anaerobiose, produz ácido a partir de melibiose e não produz ácido a partir de arabinose, essas características diferenciam 3439 B (Tabelas 43 e 61) da espécie *P. kobensis* (RIVAS et al., 2005, OSMAN; SATOMI; VENKATESWARAN, 2006). A falta da capacidade do isolado bacteriano 3439 B de produzir ácido a partir de l-xilose e xilose (Tabela 61) o diferencia da espécie *P. cellulosityticus* (RIVAS et al., 2006). Entretanto, as diferenças observadas devem ser cuidadosamente avaliadas uma vez que diferentes metodologias foram utilizadas nos estudos destas espécies e foram avaliados poucos testes.

Tabela 61 Comparação das características fenotípicas entre *Paenibacillus kobensis*, *Paenibacillus cellulosilyticus* e o isolado bacteriano 3439 B

TESTE	<i>P. kobensis</i> ¹	<i>P. cellulosilyticus</i> ²	3439 B	
			API ³	VITEK ⁴
Arabinose	+	NR	NR	-
d-Arabinose	NR	NR	-	NR
l-Arabinose	NR	+	+	NR
Manitol	-	NR	NR	-
d-Manitol	NR	NR	-	NR
Melibiose	-	NR	NR	NR
d-Melibiose	NR	NR	+	NR
Raminose	-	NR	NR	NR
l-raminose	NR	NR	-	NR
Sacarose	+	NR	NR	-
d-Sacarose	NR	NR	+	NR
Glicose	NR	+	NR	-
d-Glicose	NR	NR	+	NR
Xilose	NR	+	NR	-
d-Xilose	NR	NR	+	NR
l-Xilose	NR	NR	-	NR
Rafinose	-	+	NR	-
d- Rafinose	NR	NR	+	NR

¹ Resultados de API 20E, API 20NE e Biolog (OSMAN; SATOMI; VENKATESWARAN, 2006)

² Resultados de bioquímica convencional e API 20NE (RIVAS et al., 2006) ³ Resultados apresentados na Tabela 44 ⁴ Resultados apresentados na Tabela 45. NR: não realizado.

5.10.3 Isolado bacteriano 3492

O isolado bacteriano 3492 apresentou similaridade do gene 16S rRNA acima de 98,7% respectivamente com *P. favisporus*, *P. cineris* e *P. rhizosphaerae*, sendo possível a determinação de suas prováveis espécies. Como essas espécies não fazem parte do banco de dados do sistema API (Tabela 51), ele se equivocou no resultado da identificação. O sistema VITEK apresentou identificação inaceitável.

Na Tabela 62 foi feita a comparação fenotípica entre *P. cineris*, *P. favisporus*, *P. rhizosphaerae* e o isolado bacteriano 3492. O isolado bacteriano 3492 apresentou resultado diferente de *P. cineris* apenas para produção de ácido a partir de inositol e apresentou resultado diferente de *P. favisporus* e de *P. rhizosphaerae* apenas para produção de ácido a partir de raminose.

O isolado bacteriano 3492, *P. cineris*, *P. favisporus* e *P. rhizosphaerae* (LOGAN et al., 2004, VELÁZQUEZ et al., 2004, RIVAS et al., 2005) são produtores

da enzima catalase. Tanto o isolado bacteriano 3492 (Tabelas 43 e 62) quanto *P. favisporus* (LOGAN et al., 2004) crescem em anaerobiose e não crescem a 55°C e o único teste para o qual houve um resultado diferente entre eles foi a capacidade de produzir ácido a partir de inositol. Tanto o isolado bacteriano 3492 (Tabelas 43 e 62) quanto *P. favisporus* (VELÁZQUEZ et al., 2004) crescem em anaerobiose e o único teste para o qual houve um resultado diferente entre eles foi a capacidade de produzir ácido a partir de raminose. Tanto o isolado bacteriano 3492 (Tabelas 43 e 62) quanto *P. rhizosphaerae* não possuem a capacidade de crescer a 55°C e, além do resultado diferente de produção ácido a partir de raminose, outra diferença entre eles é a incapacidade de *P. rhizosphaerae* crescer em anaerobiose (RIVAS et al., 2005). Esses resultados impossibilitam a definição da espécie do isolado bacteriano 3492.

Tabela 62 Comparação das características fenotípicas entre *Paenibacillus cineris*, *Paenibacillus favisporus*, *Paenibacillus rhizosphaerae* e o isolado bacteriano 3492

TESTE	<i>P. cineris</i> ¹	<i>P. favisporus</i> ²	<i>P. rhizosphaerae</i> ³	3492	
				API ⁴	VITEK ⁵
N-Acetil-Glicosamina	+	NR	NR	+	+
Amidalina	+	NR	+	+	+
I-Arabinose	+	NR	+	+	+
Arbutina	+	NR	NR	+	NR
d-Celobiose	+	NR	NR	+	NR
d-Frutose	+	NR	NR	+	NR
Galactose	+	NR	NR	+	+
Gentiobiose	+	NR	NR	+	NR
d-Glicose	+	+	+	+	+
Meso-Inositol	+	NR	NR	-	-
Lactose	+	+	NR	+	NR
Maltose	+	+	NR	+	+
Manitol	+	+	+	+	+
d-Melibiose	+	+	+	+	NR
d-Rafinose	+	+	NR	+	+
Ribose	+	NR	NR	+	+
Salicina	+	NR	NR	+	+
Amido	+	NR	NR	+	NR
Sacarose	+	+	+	+	+
d-Trealose	+	NR	NR	+	+
d-Turanose	+	NR	NR	+	NR
d-Xilose	+	+	+	+	+
Adonitol	-	NR	NR	-	NR
d-Arabitól	-	NR	NR	-	-
I-Arabitól	-	NR	NR	-	-
Dulcitol	-	NR	NR	-	NR
Eritrol	-	NR	NR	-	NR
d-Fucose	-	NR	NR	-	NR
I-Fucose	-	NR	NR	-	NR
Glicerol	-	NR	NR	-	NR
Gluconato de potássio	-	NR	NR	-	NR
2 ceto Gluconato de potássio	-	NR	NR	-	NR
5 ceto Gluconato de potássio	-	NR	NR	-	NR
d-Lixose	-	NR	NR	-	NR
Raminose	-	+	+	-	NR
I-Sorbose	-	NR	NR	-	NR
d-Tagatose	-	NR	NR	-	-
I-Xilose	-	NR	NR	-	+
Xilitol	-	NR	NR	-	NR

¹ Resultados de API 50CHB (LOGAN et al., 2004) ² Resultados de API 20E e bioquímica convencional (VELÁZQUEZ et al., 2004) ³ Resultados de API 20E e bioquímica convencional (RIVAS et al., 2005) ⁴ Resultados apresentados na Tabela 44 ⁵ Resultados apresentados na Tabela 45. NR: não realizado.

5.10.4 Isolado bacteriano 3504

O isolado bacteriano 3504 apresentou similaridade do gene 16S rRNA acima de 98,7% respectivamente com *P. dendritiformis*, *P. thiaminolyticus* e *P. popilliae*, sendo possível a identificação de suas prováveis espécies. Como das prováveis espécies desse isolado bacteriano somente *P. thiaminolyticus* faz parte dos bancos de dados dos sistemas API e VITEK (Tabelas 43 e 51), ambos apresentaram esse resultado. Entretanto isso não é garantia de que o isolado bacteriano realmente pertença a essa espécie.

O isolado bacteriano 3504 (Tabelas 43 e 63), *P. dendritiformis*, *P. thiaminolyticus* e *P. popilliae* crescem em anaerobiose e apresentam outras características fenotípicas em comum (PETTERSSON et al., 1999, TCHERPAKOV; BEN-JACOB; GUTNICK, 1999, OUYANG et al., 2008). Na Tabela 63 foi feita a comparação fenotípica entre *P. dendritiformis*, *P. thiaminolyticus*, *P. popilliae* e o isolado bacteriano 3504. O isolado bacteriano 3504 apresentou resultado diferente de *P. dendritiformis* para produção de ácido a partir de lactose, apresentou resultado diferente de *P. thiaminolyticus* para produção de ácido a partir de d-celobiose, d-frutose e d-lactose e não apresentou resultado diferente de *P. popilliae*. Esses resultados impossibilitam a identificação da espécie do isolado bacteriano 3504.

Tabela 63 Comparação das características fenotípicas entre *Paenibacillus dendritiformis*, *Paenibacillus thiaminolyticus*, *Paenibacillus popilliae* e o isolado bacteriano 3504

TESTE	<i>P. dendritiformis</i> ¹	<i>P. thiaminolyticus</i> ²	<i>P. popilliae</i> ³	3504	
				API ⁴	VITEK ⁵
Arabinose	-	NR	-	NR	-
d-Arabinose	NR	-	NR	-	NR
l-Arabinose	NR	-	NR	-	NR
Glicose	+	NR	+	NR	+
d-Glicose	NR	+	NR	+	NR
Manitol	-	NR	-	NR	-
d-Manitol	NR	-	NR	-	NR
Xilose	-	NR	-	NR	-
d-Xilose	NR	-	NR	-	NR
l-Xilose	NR	-	NR	-	NR
Trealose	+	NR	+	NR	+
d-Trealose	NR	+	NR	+	NR
Celobiose	+	NR	NR	NR	NR
d-Celobiose	NR	-	NR	+	NR
Manose	+	NR	NR	NR	NR
d-Manose	NR	+	NR	+	NR
Sacarose	+	NR	NR	NR	+
d-Sacarose	NR	+	NR	+	NR
Frutose	-	NR	NR	NR	NR
d-Frutose	NR	+	NR	-	NR
Lactose	-	NR	NR	NR	NR
d-Lactose	NR	-	NR	+	NR

¹ Resultados de bioquímica convencional (TCHERPAKOV; BEN-JACOB; GUTNICK, 1999) ² Resultados de API 50CHB (OUYANG et al., 2008) ³ Resultados de bioquímica convencional (PETTERSSON et al., 1999) ⁴ Resultados apresentados na Tabela 44 ⁵ Resultados apresentados na Tabela 45. NR: não realizado.

5.10.5 Isolado bacteriano 3540

O isolado bacteriano 3540 apresentou similaridade do gene 16S rRNA acima de 98,7% respectivamente com *P. tundrae*, *P. amylolyticus* e *P. xylanexedens*, não sendo possível a determinação de sua espécie. Como uma das prováveis espécies desse isolado bacteriano faz parte do banco de dados do VITEK (Tabelas 43 e 51), ele se equivocou no resultado da identificação. O API identificou corretamente o gênero do isolado bacteriano.

Assim como descrito para as três espécies (NELSON et al., 2009), o isolado bacteriano 3540 (Tabela 43) é produtor da enzima catalase, cresce em anaerobiose e não cresce a 55°C. Não foi realizada a comparação fenotípica entre o isolado bacteriano 3540, *P. amylolyticus*, *P. tundrae* e *P. xylanexedens* porque as duas

últimas espécies foram descritas com uma cepa cada, são citadas somente no trabalho que as descreve e não foi descrita a capacidade de cada uma dessas espécies produzirem ácido a partir de diferentes carboidratos (NELSON et al., 2009), não sendo possível a comparação com os resultados obtidos pelos sistemas API e VITEK para o isolado bacteriano 3540.

5.10.6 Isolado bacteriano 3566

O isolado bacteriano 3566 foi identificado pela análise da sequência do gene 16S rRNA e pelo sistema API como *P. lautus*. Como essa espécie não faz parte do banco de dados do sistema VITEK (Tabela 51), este identificou de modo equivocado a espécie, porém acertou o gênero do isolado bacteriano (Tabela 43).

Na Tabela 64 foi feita a comparação fenotípica entre *P. lautus* e 3566. O sistema API do isolado bacteriano 3566 apresentou resultado diferente de *P. lautus* apenas para produção de ácido a partir de d-turanose, d-tagatose e xilitol enquanto o sistema VITEK apresentou resultado diferente de *P. lautus* para produção de ácido a partir de amidalina e ribose. Dos quarenta e cinco testes fenotípicos apresentados na Tabela 64, o isolado bacteriano 3566 (Tabelas 43 e 64) e *P. lautus* (HEYNDRICKX et al., 1996) tiveram o mesmo resultado em quarenta e dois e ambos crescem em anaerobiose, são produtores da enzima catalase e não crescem a 55°C. Esses resultados confirmam que o isolado bacteriano 3566 pertence a espécie *P. lautus*.

Tabela 64 Comparação das características fenotípicas entre *Paenibacillus lautus* e o isolado bacteriano 3566

TESTE	<i>P. lautus</i> ¹	3566	
		API ²	VITEK ³
Hidrólise de esculina	+	+	+
Amidalina	+	+	-
Arbutina	+	+	NR
d-Arabinose	+	+	NR
l-Arabinose	+	+	NR
d-Celobiose	+	+	NR
d-Frutose	+	+	NR
Galactose	+	+	+
Gentiobiose	+	+	NR
d-Glicose	+	+	NR
Glicerol	+	+	NR
Glicogênio	+	+	NR
Lactose	+	+	NR
Maltose	+	+	+
d-Manose	+	+	NR
Manitol	+	+	+
d-Melibiose	+	+	NR
Metil- α -d-Glucopiranosídeo	+	+	NR
Metil- β -d-Xilopiranosídeo	+	+	NR
N-Acetil-Glicosamina	+	+	+
d-Rafinose	+	+	NR
Ribose	+	+	-
Salicina	+	+	+
Amido	+	+	NR
Sacarose	+	+	+
d-Trealose	+	+	NR
d-Turanose	+	-	NR
d-Xilose	+	+	NR
d-Adonitol	-	-	NR
d-Arabitol	-	-	NR
l-Arabitol	-	-	NR
Dulcitol	-	-	NR
Eritrol	-	-	NR
d-Fucose	-	-	NR
2-ceto-Gluconato	-	-	NR
5-ceto-Gluconato	-	-	NR
d-Lixose	-	-	NR
Inositol	-	-	-
Metil- α -d-Manopiranosídeo	-	-	NR
l-Raminose	-	-	NR
Sorbitol	-	-	-
l-Sorbose	-	-	NR
d-Tagatose	-	+	NR
Xilitol	-	+	NR
l-Xilose	-	-	NR

¹ Resultados de API 50CHB (HEYNDRICKX et al., 1996) ² Resultados apresentados na Tabela 44 ³ Resultados apresentados na Tabela 45. NR: não realizado.

5.10.7 Isolado bacteriano 3584

O isolado bacteriano 3584 foi identificado pela análise da sequência do gene 16S rRNA como *P. timonensis*. Como essa espécie não faz parte dos bancos de dados dos sistemas VITEK e API (Tabela 51), o VITEK apresentou como resultado identificação inaceitável e o API se equivocou na identificação (Tabela 43).

Na Tabela 65 foi feita a comparação fenotípica entre *P. timonensis* e 3584. Os resultados do sistema API para o isolado bacteriano 3584 foram diferente de *P. timonensis* para produção de ácido a partir de d-arabinose, raminose, metil- α -D-manopiranosídeo, sacarose, rafinose, d-turanose, l-fucose e 5-ceto-gluconato enquanto o sistema VITEK apresentou resultado diferente de *P. timonensis* para produção de ácido a partir de amidalina.

A diferença entre os resultados obtidos pelo sistema VITEK para o isolado bacteriano 3584 (Tabela 65) e *P. timonensis* (ROUX; RAOULT, 2004) pode ser explicada por terem sido utilizadas metodologias diferentes e pela identificação do sistema VITEK ser finalizada em até quinze horas, o que pode ser um tempo insuficiente para avaliar o real comportamento do isolado bacteriano perante os substratos. Dos quarenta e seis testes fenotípicos apresentados na Tabela 65, os resultados do sistema API para o isolado bacteriano 3584 (Tabelas 43 e 65) e *P. timonensis* (ROUX; RAOULT, 2004) tiveram o mesmo resultado em trinta e oito, ambos crescem em anaerobiose e são produtores da enzima catalase. As diferenças entre *P. timonensis* e os resultados obtidos pelo sistema API do isolado bacteriano 3584 podem ser justificadas pela descrição da espécie ter sido realizada com uma cepa, o que impossibilita a avaliação da variação fenotípica dentro da espécie. Esses resultados sugerem que o isolado bacteriano 3584 pode pertencer a espécie *P. timonensis*.

Tabela 65 Comparação das características fenotípicas entre *Paenibacillus timonensis* e o isolado bacteriano 3584

TESTE	<i>P. timonensis</i> ¹	3584	
		API ²	VITEK ³
I-Arabinose	+	+	NR
Galactose	+	+	+
Glicose	+	+	+
Frutose	+	+	NR
Metil- α -d-Glucopiranosídeo	+	+	NR
N-Acetil-Glicosamina	+	+	+
Amidalina	+	+	-
Arbutina	+	+	NR
Esculina	+	+	+
Salicina	+	+	+
Celobiose	+	+	NR
Maltose	+	+	+
Lactose	+	+	NR
Melibiose	+	+	NR
Trealose	+	+	+
Amido	+	+	NR
Glicogênio	+	+	NR
Gentiobiose	+	+	NR
Glicerol	-	-	NR
Eritrol	-	-	NR
d-Arabinose	-	+	NR
Ribose	-	-	-
I-Xilose	-	-	NR
Adonitol	-	-	NR
Sorbose	-	-	NR
Raminose	-	+	NR
Dulcitol	-	-	NR
Inositol	-	-	-
Manitol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Metil- α -d-Manopiranosídeo	-	+	NR
Sacarose	-	+	-
Inulina	-	-	-
Melezitose	-	-	NR
Rafinose	-	+	-
Xilitol	-	-	NR
d-Turanose	-	+	NR
d-Lixose	-	-	NR
d-Tagatose	-	-	NR
d-Fucose	-	-	NR
I-Fucose	-	+	NR
d-Arabitol	-	-	NR
I-Arabitol	-	-	NR
2-ceto-Gluconato	-	-	NR
5-ceto-Gluconato	-	+	NR

¹ Resultados de API 50CHB (ROUX; RAOULT, 2004) ² Resultados apresentados na Tabela 44 ³ Resultados apresentados na Tabela 45. NR: não realizado.

Os isolados bacterianos deste grupo foram avaliados utilizando análise filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA. A maioria dos isolados bacterianos se agrupou de acordo com os resultados de similaridade da sequência do gene 16S rRNA apresentados. O isolado bacteriano 3311 não se agrupou com as espécies que apresentaram maior similaridade da sequência do gene 16S rRNA. O relacionamento deste isolado bacteriano com as sequências das cepas tipo das espécies mais similares, *P. barengoltzii* e *P. konsidensis* pode ter sido comprometido uma vez que estas possuem 1339 pares de bases e 1450 pares de bases, respectivamente.

5.11 OUTROS GÊNEROS RELACIONADOS AO GÊNERO *Bacillus*

Nesse grupo estão cinco isolados bacterianos pertencentes a cinco diferentes gêneros relacionados ao gênero *Bacillus*.

5.11.1 Isolado bacteriano 3404

O gênero *Terribacillus* foi determinado para o isolado bacteriano 3404 utilizando a análise da sequência do gene 16S rRNA. Essa sequência apresentou similaridade acima de 98,7% com *T. saccharophilus*, *T. goriensis* e *T. halophilus*, respectivamente, sendo possível a determinação das prováveis espécies do isolado bacteriano. Como este gênero não faz parte dos bancos de dados dos sistemas API e VITEK (Tabela 51), ambos apresentaram resultados de identificação equivocados (Tabela 47).

O isolado bacteriano 3404 (Tabela 47), *T. goriensis*, *T. saccharophilus* e *T. halophilus* (AN et al., 2007, KIM et al., 2007) são produtores da enzima catalase, não crescem em anaerobiose nem a 55°C. Na Tabela 66 foi feita a comparação fenotípica entre *T. goriensis*, *T. saccharophilus*, *T. halophilus* e o isolado bacteriano 3404. Dos quarenta e cinco testes fenotípicos apresentados na Tabela 66, o isolado

bacteriano 3404 e *T. goriensis* tiveram o mesmo resultado em quarenta e dois, apresentando resultado diferente apenas para produção de ácido a partir de n-acetilglicosamina (VITEK), amidalina e l-arabinose. O isolado bacteriano 3404 e *T. saccharophilus* tiveram o mesmo resultado em oito dos nove testes realizados, apresentando resultado diferente para produção de ácido a partir de melibiose. Na comparação com *T. halophilus*, 3404 teve o mesmo resultado em seis dos nove testes realizados, sendo diferente para produção de ácido a partir de glicose, melibiose e sacarose (Tabela 66).

As diferenças fenotípicas encontradas entre o isolado bacteriano 3404 e as três espécies podem ser explicadas pelo número de cepas utilizado para a descrição de cada espécie, *T. goriensis* foi descrita com uma cepa, *T. saccharophilus* foi descrita com duas e *T. halophilus* foi descrita com uma cepa (AN et al., 2007, KIM et al., 2007). Esse pequeno número de cepas analisado pode ter impossibilitado a avaliação da variação fenotípica existente dentro de cada uma das espécies. Esses resultados impossibilitam a identificação do isolado bacteriano 3404.

Tabela 66 Comparação das características fenotípicas entre *Terribacillus goriensis*, *Terribacillus saccharophilus*, *Terribacillus halophilus* e o isolado bacteriano 3404

TESTE	<i>T. goriensis</i> ¹	<i>T. saccharophilus</i> ²	<i>T. halophilus</i> ²	API ³	3404 VITEK ⁴
Glicose	+	+	-	+	+
d-Frutose	+	NR	NR	+	NR
d-Manose	+	NR	NR	+	NR
Melibiose	+	-	-	+	NR
Raminose	NR	-	-	-	NR
d-Trealose	+	NR	NR	+	NR
Manitol	+	+	+	+	+
Esculina	+	NR	NR	+	+
d-Celobiose	+	NR	NR	+	NR
d-Lactose	+	NR	NR	+	NR
d-Rafinose	+	NR	NR	+	NR
Glicerol	+	NR	NR	+	NR
N-Acetil-Glicosamina	+	NR	NR	+	-
Amidalina	+	-	-	-	-
Salicina	+	NR	NR	+	+
Arbutina	+	NR	NR	+	NR
Gentiobiose	+	NR	NR	+	NR
d-Tagatose	+	NR	NR	+	NR
Sacarose	+	+	-	+	+
Eritrol	-	NR	NR	-	NR
Adonitol	-	NR	NR	-	NR
Metil-β-d-Xilopiranosídeo	-	NR	NR	-	NR
l-Sorbose	-	NR	NR	-	NR
Dulcitol	-	NR	NR	-	NR
Metil-α-d-Manopiranosídeo	-	NR	NR	-	NR
Metil-α-d-Glucopiranosídeo	-	NR	NR	-	NR
Melezitose	-	NR	NR	-	NR
Amido	-	NR	NR	-	NR
Glicogênio	-	NR	NR	-	NR
Xilitol	-	NR	NR	-	NR
d-Turanose	-	NR	NR	-	NR
d-Lixose	-	NR	NR	-	NR
d-Fucose	-	NR	NR	-	NR
l-Fucose	-	NR	NR	-	NR
Gluconato de potássio	-	NR	NR	-	NR
2-ceto-Gluconato de potássio	-	NR	NR	-	NR
5-ceto-Gluconato de potássio	-	NR	NR	-	NR
Arabinose	NR	-	-	-	-
d-Arabinose	-	NR	NR	-	NR
l-Arabinose	-	NR	NR	+	NR
d-Ribose	-	NR	NR	-	NR
d-Xilose	-	NR	NR	-	NR
l-Xilose	-	NR	NR	-	NR
Inositol	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
d-Maltose	-	NR	NR	-	NR
Inulina	-	NR	NR	-	-

¹ Resultados de API 50CHB (KIM et al., 2007) ² Resultados de API 50CHB e API 20NE (AN et al., 2007)

³ Resultados apresentados na Tabela 48 ⁴ Resultados apresentados na Tabela 49. NR: não realizado.

5.11.2 Isolado bacteriano 3405

O isolado bacteriano 3405 apresentou similaridade do gene 16S rRNA acima de 98,7% respectivamente com *L. boronitolerans* e *L. fusiformis*, com isso foi possível a determinação das suas prováveis espécies. Como das prováveis espécies desse isolado bacteriano somente *L. fusiformis* faz parte do banco de dados do sistema VITEK (Tabela 51), esse foi o resultado obtido. Entretanto isso não é garantia de que o isolado bacteriano realmente pertença a essa espécie. O sistema API se equivocou no resultado da identificação.

Não é possível diferenciar *L. boronitolerans* de *L. fusiformis* pela produção de ácido a partir de carboidratos, uma vez que ambas as espécies são fracamente reativas (AHMED et al., 2007). Testes como teste VP e hidrólise de gelatina poderiam diferenciar *L. boronitolerans* de *L. fusiformis*, porém, como esses resultados foram obtidos com poucas cepas das espécies (três e uma, respectivamente) (AHMED et al., 2007), eles podem não representar a variação de cada espécie. Esses resultados impossibilitam a definição da espécie do isolado bacteriano 3405.

5.11.3 Isolado bacteriano 3482

O isolado bacteriano 3482 não apresentou similaridade do gene 16S rRNA acima de 98,7% com nenhuma espécie descrita, sendo possível a determinação do seu gênero. As espécies que apresentaram maior similaridade da sequência do gene 16S rRNA foram *C. phaseoli*, *C. hongkongensis* e *C. thermotolerans*, respectivamente. Como o percentual de similaridade do gene 16S rRNA do isolado bacteriano está abaixo de 97% com quaisquer espécies descritas, esse isolado bacteriano pode fazer parte de uma espécie ainda não descrita (STACKEBRANDT; EBERS, 2006).

Como este gênero bacteriano não faz parte dos bancos de dados dos sistemas VITEK e API (Tabela 51), o sistema API apresentou como resultado um

identificação inaceitável e o sistema VITEK um resultado equivocado da identificação.

Na Tabela 67 foi feita a comparação fenotípica entre *C. hongkongensis*, *C. phaseoli*, *C. thermotolerans* e o isolado bacteriano 3482. O sistema API para o isolado bacteriano 3482 apresentou resultado semelhante ao de *C. hongkongensis* para produção de ácido a partir de quinze carboidratos e a única diferença entre os resultados do sistema VITEK para o isolado bacteriano 3482 e o de *C. hongkongensis* foi a produção de ácido a partir de amilopectina. O isolado bacteriano 3482 apresentou resultado diferente de *C. phaseoli* para produção de ácido a partir de d-arabinose (VITEK), ribose (VITEK), d-xilose (VITEK), d-glicose (VITEK), amidalina, salicina, maltose (VITEK), sacarose (VITEK), trealose (VITEK), d-rafinose (VITEK), amido e glicogênio. O isolado bacteriano 3482 apresentou resultado diferente de *C. thermotolerans* para produção de ácido a partir de l-arabinose, d-xilose (API), d-glicose (API), d-manose, raminose, inositol (API), metil- α -d-glucosídeo, celobiose, maltose (API), lactose, sacarose (API), trealose (API) e d-rafinose (API).

O isolado bacteriano 3482 pode ser diferenciado fenotipicamente das espécies *C. hongkongensis*, *C. phaseoli* e *C. thermotolerans* por vários testes fenotípicos (TENG et al., 2003, KÄMPFER et al., 2006, GARCÍA-FRAILE et al., 2008). Dos quarenta e um testes do sistema API apenas quinze apresentaram o mesmo resultado para o isolado bacteriano 3482 e para *C. hongkongensis* (Tabela 67). O isolado bacteriano 3482 pode ser diferenciado de *C. hongkongensis* também pelo sistema VITEK, além disso *C. hongkongensis* (TENG et al., 2003) é Gram negativa e a enzima catalase é fracamente produzida enquanto 3482 (Tabela 67) é Gram positivo e produtor da enzima catalase. Dos vinte e dois testes realizados, 3482 (Tabela 67) apresentou resultado diferente de *C. phaseoli* em doze (GARCÍA-FRAILE et al., 2008) e dos dezenove testes, o isolado bacteriano 3482 apresentou resultado diferente de *C. thermotolerans* em treze (KÄMPFER et al., 2006). Outra diferença entre 3482 e *C. thermotolerans* é o fato de o isolado bacteriano não ter capacidade de crescer a 55°C enquanto cepas da espécie *C. thermotolerans* crescem bem na mesma temperatura (KÄMPFER et al., 2006). Esses resultados sugerem que o isolado bacteriano 3482 pode pertencer a uma espécie ainda não descrita.

Tabela 67 Comparação das características fenotípicas entre *Cohnella hongkongensis*, *Cohnella phaseoli*, *Cohnella thermotolerans* e 3482

TESTE	<i>C. hongkongensis</i>		<i>C. phaseoli</i> ²	<i>C. thermotolerans</i> ³	3482	
	API ¹	VITEK ¹			API ⁴	VITEK ⁵
Glicerol	-	NR	NR	NR	+	NR
Eritrol	-	NR	NR	-	-	NR
D-Arabinose	-	-	+	NR	+	-
L-Arabinose	-	NR	+	-	+	NR
Ribose	-	-	+	NR	+	-
D-Xilose	-	-	+	-	+	-
L-Xilose	-	NR	NR	NR	+	NR
β Metil xilosídeo	-	NR	+	NR	+	NR
D-Glicose	-	-	+	-	+	-
D-Frutose	-	NR	+	NR	+	NR
D-Manose	-	NR	+	-	+	NR
L-Sorbose	-	NR	NR	NR	-	NR
Raminose	-	NR	NR	-	+	NR
Dulcitol	-	NR	NR	-	-	NR
Inositol	-	-	NR	-	+	-
Manitol	-	-	NR	-	-	-
Sorbitol	-	-	NR	-	-	-
Metil- α-d-manosídeo	-	NR	NR	NR	+	NR
Metil- α-d-glucosídeo	-	NR	+	-	+	NR
Amidalina	-	-	+	NR	-	-
Salicina	-	-	+	-	-	-
Celobiose	-	NR	+	-	+	NR
Maltose	-	-	+	-	+	-
Lactose	-	NR	+	-	+	NR
Sacarose	-	-	+	-	+	-
Trealose	-	-	+	-	+	-
Inulina	-	-	NR	NR	-	-
Melezitose	-	NR	NR	NR	+	NR
D-Rafinose	-	-	+	-	+	-
Amido	-	NR	+	NR	-	NR
Glicogênio	-	NR	+	NR	-	NR
Xilitol	-	NR	NR	NR	-	NR
Gentiobiose	-	NR	+	NR	+	NR
D-Turanose	-	NR	+	NR	+	NR
D-Lixose	-	NR	NR	NR	+	NR
D-Fucose	-	NR	NR	NR	+	NR
L-Fucose	-	NR	+	NR	+	NR
D-Arabitól	-	-	NR	-	-	-
L-Arabitól	-	NR	NR	NR	-	NR
Gluconato	-	NR	NR	NR	-	NR
2-ceto Gluconato	-	NR	NR	NR	-	NR
Platinose	NR	-	NR	NR	NR	-
Amilopectina	NR	-	NR	NR	NR	+
Tiocianato de Potássio	NR	-	NR	NR	NR	-
7% NaCl	NR	-	NR	NR	NR	-
Ácido Mandélico	NR	-	NR	NR	NR	-
Oleandomicina	NR	-	NR	NR	NR	-
Acetato de Sódio	NR	+	NR	NR	NR	+
Poliâmido	NR	-	NR	NR	NR	-
Higro estreptina	NR	-	NR	NR	NR	-
Ácido Nalidixico	NR	-	NR	NR	NR	-
Vermelho de tetrazólio	NR	-	NR	NR	NR	-

¹ Resultados de TENG et al., 2003 ² Resultados de API 50CHB, API 20NE e API 20E (GARCÍA-FRAILE et al., 2008) ³ Resultados de API 50CHB (KÄMPFER et al., 2006) ⁴ Resultados apresentados na Tabela 48 ⁵ Resultados apresentados na Tabela 49. NR: não realizado.

5.11.4 Isolado bacteriano 3535

O isolado bacteriano 3535 foi identificado pela análise da sequência do gene 16S rRNA como pertencente à espécie *O. sojae*. Como esta espécie não faz parte dos bancos de dados dos sistemas VITEK e API (Tabela 51), estes sistemas apresentaram como resultado identificação inaceitável (Tabela 47).

Assim como a espécie *O. sojae* (TOMINAGA et al., 2009), o isolado bacteriano 3535 produz a enzima catalase, não cresce a 55°C nem em anaerobiose (Tabela 47). Para as quarenta e nove provas do API, 3535 (Tabela 48) apresentou resultado diferente de *O. sojae* (TOMINAGA et al., 2009) nos seguintes testes: d-arabinose, inositol, amido e d-turanose. Essas diferenças podem ser explicadas pelo fato de a espécie ter sido descrita com apenas uma cepa (TOMINAGA et al., 2009), não sendo determinadas as variações fenotípicas dentro da espécie.

5.11.5 Isolado bacteriano 3552

O isolado bacteriano 3552 foi identificado pela análise da sequência do gene 16S rRNA como pertencente à espécie *Paenisporsarcina quisquiliarum*. Como esta espécie não faz parte dos bancos de dados dos sistemas VITEK e API (Tabela 51), o VITEK se equivocou no resultado da identificação e o API apresentou uma identificação inaceitável (Tabela 47).

O isolado bacteriano 3552 (Tabela 47) e a espécie *Paenisporsarcina quisquiliarum* (KRISHNAMURTHI et al., 2009) são produtores da enzima catalase, aeróbicos estritos e não crescem a 55°C. Dos quarenta e nove testes do API, o isolado bacteriano 3552 foi positivo apenas para 5-ceto-gluconato de potássio (Tabela 48) e dos vinte e nove testes do VITEK o isolado bacteriano 3552 foi positivo apenas para acetato de sódio (Tabela 49). Como não foi descrito o comportamento da espécie *Paenisporsarcina quisquiliarum* para esses testes, não é possível a comparação pela produção de ácido a partir de diferentes carboidratos do isolado bacteriano com a espécie citada.

Os cinco isolados bacterianos pertencentes aos gêneros relacionados ao gênero *Bacillus* tiveram as sequências do gene 16S rRNA submetidas à análise filogenética (Figuras 8 e 9). Os isolados bacterianos 3404, 3535 e 3552 se agruparam com as espécies que apresentaram maior similaridade da sequência do gene 16S rRNA (Figura 9).

O isolado bacteriano 3405 pertence ao gênero *Lysinibacillus*. As sequências do gene analisado das cinco espécies deste gênero foram incluídas na análise filogenética, entretanto a sequência de uma das espécies com a qual o isolado bacteriano em questão apresentou similaridade acima de 98,70%, *L. fusiformis*, possui apenas 1412 pares de bases e por este motivo pode não ter se agrupado com o isolado bacteriano 3405 (Figura 9).

A sequência do gene 16S rRNA do isolado bacteriano 3482 que pertence ao gênero *Cohnella* foi submetida à análise filogenética com as sequências das doze espécies deste gênero. Esta análise mostrou que este isolado bacteriano parece pertencer a uma espécie não descrita, entretanto é necessária a realização de experimentos de reassociação de DNA-DNA para confirmação (Figura 8).

5.12 SISTEMAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Os sistemas de identificação automatizada são utilizados em laboratórios de microbiologia clínica e de alimentos. Esses sistemas apresentam vantagens sobre os métodos convencionais, como redução do trabalho e do erro humano, aumento do número de isolados bacterianos analisados e resultados rápidos. É essencial determinar a sensibilidade, a especificidade e a repetibilidade desses sistemas para a identificação de microrganismos (ODUMERU et al., 1999). Stager e Davis (1992) avaliaram os sistemas automatizados VITEK, Sensititre, Walkaway-96, Walkaway-40, Autoscan-4, Aladin e Autoreader, Biolog, Midi Microbial Identification System e Autosceptor para identificação de microrganismos e concluíram que a maioria desses sistemas foi capaz de identificar microrganismos de origem clínica. Eles também concluíram que, apesar disso, ainda existe espaço para melhoria da

capacidade de identificação, pois foram constatadas limitações na identificação realizada por esses sistemas (STAGER; DAVIS, 1992).

O esperado é que microrganismos ausentes nos bancos de dados dos sistemas de identificação não sejam identificados. Uma das limitações apresentadas pelos sistemas comerciais foi o fato de, mesmo quando testados microrganismos não presentes nos bancos de dados, eles terem sido frequentemente identificados (STAGER; DAVIS, 1992). Dos isolados bacterianos avaliados nesse estudo, 35% não estavam presentes nos bancos de dados dos respectivos sistemas. Destes, 77,5% foram identificados pelo API e 75% foram identificados pelo VITEK (Tabelas 29, 31, 37, 41, 43 e 47).

Esses sistemas também apresentaram dificuldade na identificação de microrganismos de crescimento lento. Esse tipo de microrganismo pode ser identificado de maneira equivocada porque a leitura dos testes, normalmente finalizada entre 4 e 24 horas, é feita antes do tempo necessário para o microrganismo reagir à prova (STAGER; DAVIS, 1992). Nesse estudo esta questão foi observada para os isolados bacterianos de crescimento lento avaliados pelo sistema VITEK. Esse sistema identificou de modo equivocado microrganismos de crescimento lento em cinco dos onze grupos nos quais os isolados bacterianos foram separados (Tabelas 25, 29, 31, 43 e 47). Uma das dificuldades para a realização do API 50CHB para isolados bacterianos de crescimento lento foi a obtenção da quantidade de células necessárias para que a escala 2 de McFarland fosse alcançada após vinte e quatro horas de incubação. No caso dos isolados bacterianos avaliados nesse estudo, os que foram identificados pelo sistema API e pelo VITEK como *Lysinibacillus* sp., *Brevibacillus* sp. e como *Bacillus* não reativo se enquadram na categoria de microrganismos de crescimento lento (Tabelas 25, 29, 31, 43 e 47).

Foi também sugerido que os sistemas automatizados avaliados não sejam altamente reprodutíveis na geração de perfis idênticos (STAGER; DAVIS, 1992). Em outras palavras, um mesmo isolado bacteriano pode apresentar variações no perfil metabólico quando realizado um novo teste, fazendo com que esse tipo de sistema de identificação não seja preciso (STAGER; DAVIS, 1992).

Morgan e colaboradores (2009) avaliaram a identificação de quinze cepas de *Bacillus* que não puderam ser identificadas por testes bioquímicos convencionais. As

cepas foram identificadas pela análise da sequência do gene 16S rRNA e pelo sistema Biolog Omnilog e os resultados foram comparados, tendo a análise da sequência do gene 16S rRNA como método de referência. Das quinze cepas, seis foram identificadas corretamente, três tiveram o gênero identificado corretamente, duas tiveram o gênero identificado de maneira equivocada e quatro não foram identificadas por Biolog Omnilog (MORGAN et al., 2009).

Logan e Berkeley (1984) avaliaram a capacidade do sistema API em identificar espécies de *Bacillus*. Nesse trabalho foram utilizadas mais de mil isolados bacterianos que representavam todas as espécies do gênero descritas na época, exceto as espécies fastidiosas patogênicas para insetos e as que necessitavam de pH muito alto ou muito baixo para seu crescimento. Foi concluído que o sistema API permitiu a identificação de trinta e oito taxa e que a disponibilidade de um grande número de testes permite a identificação de cepas atípicas e intermediárias. Porém, o API não conseguiu diferenciar espécies incapazes de produzir ácidos a partir dos carboidratos testados assim como as espécies com capacidade de produzir ácidos a partir de poucos dos carboidratos testados (LOGAN; BERKELEY, 1984).

Houve dificuldade na identificação pelo sistema API quando a cor do meio no momento da leitura dos testes era laranja, um resultado duvidoso entre vermelho (negativo) e amarelo (positivo). Esse problema foi apresentado nas Tabelas 6, 10, 14, 18, 22, 26, 32, 34, 38, 44 e 48. Os resultados apresentados na Figura 1 mostram que o API foi capaz de identificar corretamente a espécie ou as prováveis espécies de 54% dos isolados bacterianos analisados. As limitações deste sistema citadas anteriormente podem justificar este valor.

O sistema VITEK 2 foi avaliado por Halket, Dinsdale e Logan (2010) quanto a sua capacidade de identificar *Bacillus* e gêneros relacionados. Nesse trabalho foi apresentado um percentual de acerto de 93% para o VITEK2 BCL e de 70% para o VITEK BAC. Porém o objetivo era avaliar a acurácia do cartão BCL do VITEK2 para a identificação das espécies mais comuns. Não foram definidos os critérios para definição de espécies comuns (HALKET; DINSDALE; LOGAN, 2010).

No estudo de Halket, Dinsdale e Logan (2010), quando um isolado bacteriano apresentou uma identificação diferente da esperada, ele foi retestado para ver se daria o resultado esperado. Entretanto, isso não acontece num laboratório de identificação de microrganismos uma vez que não se sabe a identificação que o

isolado bacteriano deve apresentar. Esse fato pode ter superestimado o acerto do VITEK2. Outro ponto interessante é que dos seis isolados bacterianos isolados de área limpa, cinco foram identificados de maneira equivocada pelo VITEK2. Isso sugere que o percentual de acerto do sistema VITEK2 pode ser reduzido quando a origem dos isolados bacterianos é considerada e quando é utilizada uma origem de isolados bacterianos semelhante aos isolados bacterianos encaminhados para o IDBAC.

Pode ser feita uma crítica ao trabalho de Halket, Dinsdale e Logan (2010) que é ter identificado *B. licheniformis* pelo sequenciamento do gene 16S rRNA (HALKET; DINSDALE; LOGAN, 2010) apesar de não ser possível diferenciar *B. licheniformis* de *B. sonorensis* pelo sequenciamento desse gene (PALMISANO et al., 2001).

Algumas críticas feitas aos sistemas de identificação de microrganismos por Stager e Davis (1992) podem ser também aplicadas ao trabalho de Halket, Dinsdale e Logan (2010). Uma delas é não estar citado qual foi o método de referência utilizado na comparação dos resultados de identificação (HALKET; DINSDALE; LOGAN, 2010). Outra crítica é o universo amostral do trabalho e o banco de dados do VITEK2 (STAGER; DAVIS, 1992). No banco de dados BCL estão quarenta e seis espécies dos seguintes gêneros: *Aneurinibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus* e *Virgibacillus*. Dessas espécies, foram avaliadas vinte e quatro (LOGAN; BERKELEY, 1984), um número bem menor que o número de espécies descritas nesses gêneros (Tabelas 1 e 2).

Uma limitação importante dos sistemas comerciais de identificação de *Bacillus* e gêneros relacionados são os bancos de dados. As Tabelas 52 e 53 ilustram a limitação dos bancos de dados dos sistemas API e do VITEK frente ao universo de espécies descritas dos microrganismos em questão. Como esses organismos são, em sua maioria, considerados clinicamente irrelevantes, eles frequentemente não estão incluídos nos bancos de dados de sistemas de identificação de microrganismos de origem clínica (CLARRIDGE, 2004). Os cartões BAC e BCL do sistema VITEK foram propostos para utilização na indústria de alimentos e fármacos. Entretanto existem raros estudos mostrando a diversidade destes organismos no âmbito da produção de produtos farmacêuticos. No banco de dados BCL (VITEK 2) estão quarenta e seis espécies dos seguintes gêneros: *Aneurinibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus* e *Virgibacillus*. Se

somadas as espécies existentes nos seis gêneros, são mais de trezentas (Tabelas 1 e 2). Isto ilustra a dificuldade da utilização destes sistemas para identificação dos organismos de origem ambiental pertencentes aos gêneros em questão. As metodologias moleculares agilizaram os estudos taxonômicos das bactérias de origem ambiental e a cada dia mais espécies têm sido descritas, o que pode dificultar a atualização dos bancos de dados destes sistemas para incluir as novas espécies. Além disto, algumas espécies são incompatíveis com os sistemas comerciais. Considerando-se apenas o gênero *Bacillus*, um terço das suas espécies apresenta uma ou mais das seguintes características: acidófilo, alcalófilo, termofílico, psicrófilo, halófilo, nutricionalmente fastidioso ou anaeróbico estrito (HALKET; DINSDALE; LOGAN, 2010).

A análise da sequência do gene 16S rRNA utilizada com o objetivo de identificar bactérias apresenta algumas limitações, entretanto este estudo mostrou ter mais vantagens do que a identificação obtida pelos sistemas comerciais API e VITEK para o grupo bacteriano avaliado. Neste estudo a metodologia molecular identificou o gênero de todos os isolados bacterianos, a espécie de 17% dos isolados bacterianos, as prováveis espécies de 65% dos isolados bacterianos e indicou que 18% dos isolados bacterianos podem pertencer a espécies ainda não descritas. Essas informações não são obtidas quando é feita a identificação fenotípica. A rapidez dos resultados é outro ponto favorável à identificação pela análise do sequenciamento do gene 16S rRNA.

Laboratórios de referência que frequentemente recebem para identificação isolados bacterianos atípicos, como os raramente relacionados com infecção humana ou os considerados contaminantes ambientais, precisam utilizar métodos adicionais além dos testes convencionais de identificação, como a análise da sequência do gene 16S rRNA (MORGAN et al., 2009). Os isolados bacterianos enviados ao Setor de Identificação Bacteriana do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde apresentam essas características, por isso a necessidade da implantação de metodologias moleculares para a identificação.

6 CONCLUSÕES

- ✓ O API e o VITEK foram capazes de identificar a espécie ou as prováveis espécies de 54% dos isolados bacterianos avaliados.
- ✓ API e VITEK sistemas apresentaram limitações na identificação dos microrganismos avaliados.
- ✓ O API identificou 77,5% dos isolados bacterianos avaliados que não estavam presentes no seu banco de dados e o VITEK identificou 75%.
- ✓ VITEK e API identificaram de modo equivocado microrganismos de crescimento lento em cinco dos onze grupos nos quais os isolados bacterianos foram separados.
- ✓ O sequenciamento do gene 16S rRNA foi capaz de identificar a espécie de quatorze amostras e as prováveis espécies de cinquenta amostras, correspondendo a 82% dos isolados bacterianos testados.
- ✓ O sequenciamento do gene 16S rRNA sugere que os 18% restantes correspondem a quinze isolados bacterianos que podem pertencer a seis espécies bacterianas ainda não descritas.
- ✓ A análise da sequência do gene 16S rRNA possibilitou a identificação do gênero de todos os isolados bacterianos, a indicação de espécies ainda não descritas e a demonstração do alto percentual de identificações equivocadas pelo API e pelo VITEK.
- ✓ A utilização de metodologias moleculares é fundamental para que sejam obtidas identificações confiáveis de BGPE pelo INCQS.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Diretoria Colegiada. RDC nº17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. [Brasília], 2010. Disponível em: <www.gehaka.com.br/docs_produtos/rdc_17.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2011.

AHMED, I. et al. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p.1117-1125, 2007.

ALBERT, R. A. et al. Proposal of *Viridibacillus* gen. nov. and reclassification of *Bacillus arvi*, *Bacillus arenosi* and *Bacillus neidei* as *Viridibacillus arvi* gen. nov., comb. nov., *Viridibacillus arenosi* comb. nov. and *Viridibacillus neidei* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 2729-2737, 2007.

AN, S. Y. et al. *Terribacillus saccharophilus* gen. nov., sp. nov. and *Terribacillus halophilus* sp. nov., spore-forming bacteria isolated from field soil in Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 51-55, 2007.

ASH, C. et al. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequence. **Letters in Applied Microbiology**. v. 13, p. 202-206, 1991.

ASH, C.; PRIEST, F. G.; COLLINS, M. D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 64, p. 253-260, 1993.

BAVYKIN, S. G. et al. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 8, p. 3711-3730, 2004.

BENARDINI, J. N. et al. *Paenibacillus phoenicis* sp. nov., a spore-forming bacterium isolated from the Phoenix Lander assembly facility. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2010 Jun 28. No prelo

BIOMÉRIEUX. **Brochura técnica**: informações biológicas para programas de identificação. Ref. 41207, versão C 04/25. Lyon, 2005.

BIOMÉRIEUX. **APIWEB**: expressão do resultado. [Lyon], [2003]. Disponível em: <https://apiweb.biomerieux.com/jsp/help_ident/index.jsp>. Acesso em: 27 nov. 2010.

BIOMÉRIEUX BRASIL. **Manual de referência de microbiologia VITEK**: 008179-2PT-1 (REV 12/2004). [Rio de Janeiro], 2004. (Folhetos BAC, 4).

BIOMÉRIEUX BRASIL. **Cartão VITEK de identificação de bacilos (BAC V 1304):** (REV 05/2006). Rio de Janeiro, 2006.

BIOMÉRIEUX. **API 50 CH:** Carbohydrates: REF 50 300. [Paris], 2002a.

BIOMÉRIEUX. **API 50 CHB/E Médium:** *Bacillus* et apparentés/ Enterobacteriaceae et Vibrionaceae: REF 50 430. [Paris], 2002b.

BLACKWOOD, K. S.; TURENNE, C. Y.; KABANI, A. M. Reassessment of sequence-based targets for identification of *Bacillus* species. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 42, n. 4, p. 1626-1630, 2004.

BOSSHARD, P. P. et al. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic Gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). **Journal of Clinical Microbiology.** v. 41, p. 4134-4140, 2003.

BRASIL. Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990. Seção 1, p. 18055. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L8080.htm>. Acesso em: 27 nov. 2010.

BRASIL. Lei 5991, de 17 de dezembro de 1973. Dispõe sobre o Controle Sanitário do Comércio de Drogas, Medicamentos, Insumos Farmacêuticos e Correlatos, e dá outras Providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 dez. 1973, p. 13049. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L5991.htm>. Acesso em: 27 jan. 2011.

CASE, R. J. et al. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Applied Environmental Microbiology.** v. 73, n. 1, p. 278-288, 2007.

CHEN, Y. G. et al. *Bacillus hunanensis* sp. nov., a slightly halophilic bacterium isolated from non-saline forest soil. **Antonie Van Leeuwenhoek.** v. 99, n. 3, p. 481-488, 2011.

CHOU, J.-H. et al. *Paenibacillus fonticola* sp. nov., isolated from a warm spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 57, p. 1346-1350, 2007.

CHRISTENSEN, H. et al. Is characterization of a single isolate sufficient to valid publication of a new genus or species? Proposal to modify Recommendation 30b of the Bacteriological Code (1990 Revision). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 51, p. 2221-2225, 2001.

CLARRIDGE III, J. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 17: 840-862, 2004.

DRANCOURT, M.; RAOULT, D. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, p. 1333-1338, 2002.

DRANCOURT, M.; BERGER, P.; RAOULT, D. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, p. 2197-2202, 2004

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 2.6.1. Sterility. In: _____. **European Pharmacopoeia**. 6. ed. Suppl. 6.8. Strasbourg: Council of Europe, 2009. p. 5795-5798.

EUZÉBY, J. P., List of bacterial names with standing in nomenclature (LBSN). Disponível em <<http://www.bacterio.net>>. Acesso em: 30 out. 2010.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. V.5. Métodos Biológicos: V.5.1. testes de segurança biológica: V.5.1.1. esterilidade. In: _____. **Farmacopéia brasileira**. 4. ed. Parte I. São Paulo: Atheneu, 1988. 6 p.

FARROW, J. A. E.; WALLBANKS, S.; COLLINS, M. D. Phylogenetic analysis of the genera *Planococcus*, *Marinococcus* and *Sporosarcina* and their relationship to members of the genus *Bacillus*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 93, p. 167-172, 1992.

FELIS, G. E.; TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F. The status of the species *Lactobacillus rogosae* Holdeman and Moore 1974. Request for an Opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 1903-1904, 2004.

FORTINA, M. G. et al. *Ureibacillus* gen. nov., a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, p. 447-455, 2001.

FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK, P. Jr. How close is close: 16S rRNA sequence may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 42, p. 166-170, 1992.

FUKUSHIMA, M.; KAKINUMA, K.; KAWAGUCHI, R. Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella* and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, p. 2779-2785, 2002.

GARCÍA-FRAILE, P. et al. *Cohnella phaseoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus coccineus* in Spain, and emended description of the genus *Cohnella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 58, p. 1855-1859, 2008.

GHOSH, A. et al. *Bacillus lehensis* sp. nov., an alkalitolerant bacterium isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 238-242, 2007.

GOTO, K. et al. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. **The Journal of General and Applied Microbiology**. v. 46, p. 1-8, 2000.

HALKET, G.; DINSDALE, A. E.; LOGAN, N. A. Evaluation of the VITEK2 BCL card for identification of *Bacillus* species and other aerobic endosporeformers. **Letters in Applied Microbiology**. v. 50, n. 1, p. 120-126, 2010.

HATAYAMA, K. et al. *Tuberibacillus calidus* gen. nov., sp. nov., isolated from a compost pile and reclassification of *Bacillus naganoensis* Tomimura et al. 1990 as *Pullulanibacillus naganoensis* gen. nov., comb. nov. and *Bacillus laevolacticus* Andersch et al. 1994 as *Sporolactobacillus laevolacticus* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 2545-2551, 2006.

HELGASON, E. et al. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 1, p. 191-201, 2004.

HELGASON, E. et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n. 6, p. 2627-2630, 2000.

HEYNDRICKX, M. et al. A polyphasic reassessment of the genus *Paenibacillus*, reclassification of *Bacillus lautus* (Nakamura 1984) as *Paenibacillus lautus* comb. nov. and of *Bacillus peoriae* (Montefusco et al. 1993) as *Paenibacillus peoriae* comb. nov., and emended descriptions of *P. lautus* and of *P. peoriae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 46, n. 4, p. 988-1003, 1996.

HEYNDRICKX, M. et al. *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 48, p. 99-106, 1998.

HEYRMAN, J. et al. *Bacillus arenosi* sp. nov., *Bacillus arvi* sp. nov. and *Bacillus humi* sp. nov., isolated from soil. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 55, p. 111-117, 2005.

INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA. 3.2 Test for sterility. In: ____ . **The International Pharmacopoeia**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 2006. v. 2. p. 1236-1241.

JAPANESE PHARMACOPOEIA. 4.06 Sterility Test. In: ____ . **The Japanese pharmacopoeia**. 15. ed. Tokyo: Society of Japanese Pharmacopoeia, 2006. p. 93-97.

JEON, C. O. et al. Reclassification of *Bacillus haloalkaliphilus* Fritze 1996 as *Alkalibacillus haloalkaliphilus* gen. nov., comb. nov. and the description of *Alkalibacillus salilacus* sp. nov., a novel halophilic bacterium isolated from a salt lake in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 55: 1891-1896, 2005.

JIMENEZ, L. Microbial diversity in pharmaceutical product recalls and environments. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**. v. 61, n. 5, p. 383-99, 2007.

JOHNSON, J. L. Similarity analysis of rRNAs. In: Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994. Página 691.

KÄMPFER, P. et al. *Cohnella thermotolerans* gen. nov., sp. nov., and classification of '*Paenibacillus hongkongensis*' as *Cohnella hongkongensis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 781-786, 2006.

KASAI, H.; EZAKI, T.; HARAYAMA, S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 30, p. 301-308, 2000.

KIM, Y. G. et al. *Pelagibacillus goriensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halotolerant bacterium isolated from coastal water off the east coast of Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 1554-1560, 2007.

KO, K. S. et al. Identification of *Bacillus anthracis* by *rpoB* sequence analysis and multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 7, p. 2908-2914, 2003.

KO, K. S. et al. *Paenibacillus konsidensis* sp. nov., isolated from a patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 58, p. 2164-2168, 2008.

KRISHNAMURTHI, S.; CHAKRABARTI, T.; STACKEBRANDT, E. Re-examination of the taxonomic position of *Bacillus silvestris* Rheims et al. 1999 and proposal to transfer it to *Solibacillus* gen. nov. as *Solibacillus silvestris* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 59, p. 1054-1058, 2009.

KRISHNAMURTHI, S. et al. Description of *Paenisporosarcina quisquiliarum* gen. nov., sp. nov., and reclassification of *Sporosarcina macmurdoensis* Reddy et al. 2003 as *Paenisporosarcina macmurdoensis* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 59, p. 1364-1370, 2009.

KWON, S.-W. et al. *Bacillus niabensis* sp. nov., isolated from cotton-waste composts for mushroom cultivation. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 1909-1913, 2007.

La DUC, M. T. et al. *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group. **Journal of Microbiological Methods**. v. 56, n. 3, p. 383-394, 2004.

LIM, J. M. et al. *Bacillus koreensis* sp. nov., a spore-forming bacterium, isolated from the rhizosphere of willow roots in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 59-63, 2006.

LOGAN, N. A.; BERKELEY, R. C. Identification of *Bacillus* strains using the API system. **Journal of General Microbiology**. v. 130, n. 7, p. 1871-1882, 1984.

LOGAN, N. A. et al. *Paenibacillus cineris* sp. nov. and *Paenibacillus cookii* sp. nov., from Antarctic volcanic soils and a gelatin-processing plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 1071-1076, 2004.

LOGAN, N. A.; POPOVIC, T.; HOFFMASTER, A. *Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria. In: MURRAY, P. R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A (eds.). **Manual of Clinical Microbiology**. 9 ed. Washington, D.C. ASM Press, 2007, p. 455-473.

LOGAN, N. A. et al. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 59, p. 2114-2121, 2009.

MIÑANA-GALBIS, D. et al. Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz *et al.* 1988) Banat *et al.* 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 60, p. 1600-1604, 2010.

MOLLET, C.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. **Molecular Microbiology**. v. 26, p. 1005-1011, 1997.

MORGAN, M. C. et al. Comparison of the Biolog OmniLog Identification System and 16S ribosomal RNA gene sequencing for accuracy in identification of atypical bacteria of clinical origin. **Journal of Microbiological Methods**. v. 79, n. 3, p. 336-343, 2009.

MOTA, F. F. et al. Use of *rpoB* gene analysis for identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species as an alternative to the 16S rRNA gene. **Letters in Applied Microbiology**. v. 39, p. 34-40, 2004.

MOTA, F. F. et al. Assessment of the diversity of *Paenibacillus* species in environmental samples by a novel *rpoB*-based PCR-DGGE method. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 53, n. 2, p. 317-328, 2005.

NAKAMURA, L. K. Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 39, p. 295-300, 1989.

NAZINA, T. N. et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Geobacillus thermodenitrificans*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, p. 433-446, 2001.

NELSON, D. M. et al. *Paenibacillus tundrae* sp. nov. and *Paenibacillus xylanexedens* sp. nov., psychrotolerant, xylan-degrading bacteria from Alaskan tundra. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 59, p. 1708-1714, 2009.

NIELSEN, P. et al. Comparative 16S rDNA sequence analysis of some alkaliphilic bacilli and the establishment of a sixth rRNA group within the genus *Bacillus*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 117, p. 61-66, 1994.

NORRIS, J. R. *Sporosarcina* and *Sporolactobacillus*, p. 322-357. In R. C. W. Berkeley and M. Goodfellow (ed.), **The aerobic endospore-forming bacteria: classification and identification**. Academic Press, London, 1981.

ODUMERU, J. A. et al. Evaluation of accuracy and repeatability of identification of food-borne pathogens by automated bacterial identification systems. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, n. 4, p. 944-949, 1999.

OSMAN, S.; SATOMI, M.; VENKATESWARAN, K. *Paenibacillus pasadenensis* sp. nov. and *Paenibacillus barengoltzii* sp. nov., isolated from a spacecraft assembly facility. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 1509-1514, 2006.

OUYANG, J. et al. Case report: *Paenibacillus thiaminolyticus*: a new cause of human infection, inducing bacteremia in a patient on hemodialysis. **Annals of Clinical and Laboratory Science**. v. 38, p. 393-400, 2008.

PALMISANO, M. M. et al. *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, p. 1671-1679, 2001.

PASCUAL, C. et al. Phylogenetic Analysis of the Genus *Corynebacterium* Based on 16s rRNA Gene Sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 45, n. 4, p. 724-728, 1995.

PÉREZ-IBARRA, B. M.; FLORES, M. E.; GARCÍA-VARELA, M. Isolation and characterization of *Bacillus thioparus* sp. nov., chemolithoautotrophic, thiosulfate-oxidizing bacterium. **FEMS Microbiology Letters**. v. 271, n. 2, p. 289-96, 2007.

PETTERSSON, B. et al. Transfer of *Bacillus lentimorbus* and *Bacillus popilliae* to the genus *Paenibacillus* with emended descriptions of *Paenibacillus lentimorbus* comb. nov. and *Paenibacillus popilliae* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 49, p. 531-540, 1999.

PETTI C. A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. **Clinical Infectious Disease**. v. 44, n. 8, p. 1108-14, 2007.

PRIEST, F. G. Systematics and ecology of *Bacillus*. In: SONENSHEIN, A. L., HOCH, J. A., LOSICK, R. eds. ***Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics**. Washington, D.C.: American Society Microbiology, 1993. pg 3- 16.

PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M.; TODD, C. A numerical classification of the genus *Bacillus*. **Journal of General Microbiology**. v. 134, p. 1847-1882, 1988.

RAINEY, F. A.; FRITZE, D.; STACKEBRANDT, E. The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis. **FEMS Microbiology Letters**. v. 115, p. 205-212, 1994.

RENESTO, P. et al. Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of Bartonella species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, p. 430-437, 2001.

RIVAS, R. et al. *Paenibacillus rhizosphaerae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Cicer arietinum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 55, p. 1305-1309, 2005.

RIVAS, R. et al. *Paenibacillus cellulolyticus* sp. nov., a cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from the bract phyllosphere of Phoenix dactylifera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 2777-2781, 2006.

ROBERTS, M. S.; NAKAMURA, L. K.; COHAN, F. M. *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 46, p. 470-475, 1996.

ROBERTS, M. S.; NAKAMURA, L. K.; COHAN, F. M. *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and difference in fatty acid composition. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 44, p. 256-264, 1994.

ROUX, V.; RAOULT, D. *Paenibacillus massiliensis* sp. nov., *Paenibacillus sanguinis* sp. nov. and *Paenibacillus timonensis* sp. nov., isolated from blood cultures. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 1049-1054, 2004.

SATOMI, M.; La DUC, M. T.; VENKATESWARAN, K. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 55, p. 1735-1740, 2006.

- SHIDA, O. et al. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 46, p. 939-946, 1996.
- SHIDA, O. et al. Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis* and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 47, n. 2, p. 289-298, 1997.
- SHIVAJI, S. et al. *Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhatai* sp. nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 59, p. 2977-2986, 2009.
- SHIVAJI, S. et al. *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphaericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov. isolated from cryotubes used for collecting air samples from high altitudes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 1465-1473, 2006.
- SNEATH, P. H. A. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In: SNEATH, P. H. A. (ed.); MAIR, N. S. (ed.); SHARPE, M. E. (ed.); HOLT, J. G. (ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986, p. 1104-1138.
- SPRING, S. et al. *Halobacillus* gen. nov., with description of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus truperi* sp. nov., and transfer of *Sporosarcina halophilia* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 46, p. 492-496, 1996.
- STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 44, p. 846-849, 1994.
- STACKEBRANDT, E. et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 52, p. 1043-1047, 2002.
- STACKEBRANDT, E.; EBERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiology Today**. v. 33, p. 152-155, 2006.
- STAGER, C. E.; DAVIS, J. R. Automated systems for identification of microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 5, n. 3, p. 302-327, 1992.
- SUZUKI, T.; YAMASATO, K. Phylogeny of spore-forming lactic acid bacteria based on 16S rRNA gene sequences. **FEMS Microbiology Letters**. v. 115, p. 13-18, 1994.

- TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 24, p. 1596–1599, 2007.
- TÄUBEL, M. et al. *Bacillus barbaricus* sp. nov., isolated from an experimental wall painting. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 53, p. 725-30, 2003.
- TCHERPAKOV, M.; BEN-JACOB, E.; GUTNICK, D. L. *Paenibacillus dendritiformis* sp. nov., proposal for a new pattern-forming species and its localization within a phylogenetic cluster. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 49, p. 239-246, 1999.
- TENG, J. L. et al. Pseudobacteraemia in a patient with neutropenic fever caused by a novel *paenibacillus* species: *Paenibacillus hongkongensis* sp. nov. **Molecular Pathology**. v. 56, p. 29-35, 2003.
- THOMPSON, J. D. et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**. v. 25, p. 4876–4882, 1997.
- TINDALL, B. J.; GARRITY, G. M. Proposals to clarify how type strains are deposited and made available to the scientific community for the purpose of systematic research. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 58, p. 1987-1990, 2008.
- TINDALL, B. J. et al. Valid publication of names of prokaryotes according to the rules of nomenclature: past history and current practice. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 2715-2720, 2006.
- TOMINAGA, T. et al. *Oceanobacillus soja* sp. nov. isolated from soy sauce production equipment in Japan. **The Journal of General and Applied Microbiology**. v. 55, n. 3, p. 225-232, 2009.
- TURENNE, C. Y. et al. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, p. 3637-3648, 2001. (Erratum, 40, p. 2316, 2002).
- UNITED STATES PHARMACOPEIA. Sterility Tests. In:_____ . **USP 33 / NF 28**: reissue. Rockville, 2010. (General Chapters, 71). CD-ROM.
- VAISHAMPAYAN, P. et al. Description of *Rummeliibacillus stabekisii* gen. nov., sp. nov. and reclassification of *Bacillus pycnus* Nakamura et al. 2002 as *Rummeliibacillus pycnus* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 59, p. 1094-1099, 2009.
- VAZ-MOREIRA, I. et al. *Paenibacillus humicus* sp. nov., isolated from poultry litter compost. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 2267-2271, 2007.

- VELÁZQUEZ, E. et al. *Paenibacillus favisporus* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from cow faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 59-64, 2004.
- WAINO, M. et al. *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov.: transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* to the genus *Salibacillus* gen. nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 49, p. 821-831, 1999.
- WANG, L.-T. et al. Comparasion of *gyrB* gene sequence, 16S rRNA gene sequence and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 1846-1850, 2007.
- WATTS, J. L. et al. Phylogenetic studies on *Corinebacterium bovis* isolated from bovine mammary glands. **Journal of Dairy Science**. v. 84 , n. 11, p. 2419-2423, 2001.
- WAYNE, L. G. et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 37, p. 463-464, 1987.
- WISOTZKEY, J. D. et al. Comparative sequence analysis on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 42, p. 263-269, 1992
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**. v. 51, p. 221-271, 1987.
- YAMAMOTO, S.; HARAYAMA, S. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 48, p. 813-819, 1998.
- YAMAMOTO, S.; BOUVET, P. J.; HARAYAMA, S. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 49, p. 87-95, 1999.
- YAMAMURA, S. et al. *Bacillus selenatarsenatis* sp. nov., a selenate- and arsenate-reducing bacterium isolated from the effluent drain of a glass-manufacturing plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 1060-1064, 2007.
- YÁNEZ, M. A. et al. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 53, p. 875-883, 2003.

YOON, J.-H. et al. *Jeotgalibacillus alimentarius* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from jeotgal with L-lysine in the cell-wall, and reclassification of *Bacillus marinus* Ruger 1983 as *Marinibacillus marinus* gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, p. 2087-2093, 2001.

YOON, J.-H.; KANG, S. J.; OH, T. K. Reclassification of *Marinococcus albus* Hao et al. 1985 as *Salimicrobium album* gen. nov., comb. nov. and *Bacillus halophilus* Ventosa et al. 1990 as *Salimicrobium halophilum* comb. nov., and description of *Salimicrobium luteum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 2406-2411, 2007.

YOON J.-H. et al. *Jeotgalibacillus salarius* sp. nov., isolated from a marine saltern, and reclassification of *Marinibacillus marinus* and *Marinibacillus campisalis* as *Jeotgalibacillus marinus* comb. nov. and *Jeotgalibacillus campisalis* comb. nov., respectively. . **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 60, p. 15-20, 2010.

YUMOTO, I. et al. *Bacillus oshimensis* sp. nov., a moderately halophilic, non-motile alkaliphile. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 55, p. 907-911, 2005.

ZAVARZINA, D. G. et al. Description of *Anaerobacillus alkalilacustre* gen. nov., sp. nov. — Strictly anaerobic diazotrophic bacillus isolated from soda lake and transfer of *Bacillus arseniciselenatis*, *Bacillus macyae*, and *Bacillus alkalidiazotrophicus* to *Anaerobacillus* as the new combinations *A. arseniciselenatis* comb. nov., *A. macyae* comb. nov., and *A. alkalidiazotrophicus* comb. nov. **Microbiology**. v. 78, p. 723-731, 2009.

ZHOU, Y. et al. *Falsibacillus pallidus* to replace the homonym *Bacillus pallidus* Zhou et al. 2008. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 59, p. 3176-3180, 2009.