

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

LÍVIA CAROLINE ALEXANDRE DE ARAÚJO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS DE
***Zymomonas mobilis* DA COLEÇÃO DE**
MICRO-ORGANISMOS UFPEDA

RECIFE
2014

LÍVIA CAROLINE ALEXANDRE DE ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS DE
Zymomonas mobilis DA COLEÇÃO DE
MICRO-ORGANISMOS UFPEDA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Prof^a. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Araújo, Livia Caroline Alexandre de

Caracterização molecular das linhagens de *Zymomonas mobilis* da coleção de micro-organismos UFPEDA/ Livia Caroline Alexandre de Araújo– Recife: O Autor, 2014.

54 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Márcia Vanusa da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biotecnologia Industrial, 2014.

Inclui bibliografia

- 1. *Zymomonas mobilis* 2. Fermentação I. Silva, Márcia Vanusa da (orientadora) II. Título**

579.33

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-138

LÍVIA CAROLINE ALEXANDRE DE ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS DE
Zymomonas mobilis DA COLEÇÃO DE
MICRO-ORGANISMOS UFPEDA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de mestre em Biotecnologia Industrial.

APROVADA EM 20/02/2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Gláucia Manoella de Souza Lima
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
Dept. de Antibióticos -CCB

Prof^a. Dr^a. Maria Betânia Melo de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
Dept. de Bioquímica - CCB

RECIFE, 20 DE FEVEREIRO DE 2014.

Dedico à minha família:
Meus pais Kátia e Haroldo,
Meus irmãos Tatiane e Hugo,
E em especial, à minha filha Júlia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente à Deus que ao longo de toda minha jornada esteve comigo guiando meus caminhos e me concedendo forças em todos os obstáculos, permitindo a realização de mais um sonho.

Aos meus pais, por todo incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida. Por abrir mão dos momentos de descanso e lazer para cuidar da minha filha.

Aos meus irmãos, por toda a torcida e apoio sempre.

À minha filha Júlia, por ser minha alegria, minha inspiração, meu amor. Por causa dela tudo isso faz sentido.

À minha orientadora, Profa. Márcia Vanusa, pela orientação, oportunidade, confiança, sugestões e paciência em todos os momentos.

À Profa. Gláucia Manoella, por todo o apoio, orientação, paciência e por toda ajuda em todos os momentos em que precisei.

À Profa. Maria Betânia, por ter acreditado desde o início no nosso trabalho, por toda a disponibilidade e sugestões.

À minha querida turma do mestrado: Mariana, Márcia, Milca, Gracielly, Bruno, Raquel, Temístocles, Ednaldo, Rafaela, Priscilla. Pela amizade, por ter dividido todos os momentos de angústia e de alegria.

À Tayane, minha iniciação científica e amiga, por toda a ajuda, as palavras de apoio e por sempre acreditar que tudo daria certo.

À todos os amigos que fiz no Laboratório de Biologia Molecular: Carol, Túlio, Aninha, Clóvis, Clébia, Daniel, Luís, Jan e todos os outros. Por terem me recebido tão bem, sempre dispostos a me ajudar e tirar minha dúvida.

E à todos os outros amigos que sempre torceram para que eu conseguisse concluir mais essa etapa na minha vida.

*"Sem sonhos, a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais."*

Augusto Cury

RESUMO

Zymomonas mobilis vem despertando um grande interesse no meio científico, industrial e biotecnológico devido ao seu alto potencial fermentativo. Do ponto de vista taxonômico, *Z. mobilis* é a única espécie do gênero *Zymomonas*, e é subdivida em três subespécies: *Z. mobilis* subsp. *mobilis*, *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* e *Z. mobilis* subsp. *francensis*. A diferenciação destas subespécies é baseada em testes fisiológicos. Estes testes consomem tempo e são frequentemente duvidosos. Por isso, técnicas moleculares são propostas como uma alternativa rápida e confiável para diferenciação destas bactérias. O presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização molecular das 32 linhagens de *Zymomonas mobilis* depositadas na Coleção de Microrganismos UFPEDA, através da análise das sequências do gene 16S rDNA e ARDRA. As linhagens foram cultivadas em meio SSDL por 24 horas à 30°, seguida de centrifugação e extração de DNA cromossômico. As reações de PCR foram realizadas com iniciadores e condições específicas para a amplificação do gene 16S rDNA. Os produtos do gene 16S rDNA amplificados foram purificados, sequenciados e clivados com as enzimas de restrição *Hae III*, *NdeII* e *StuI*. Os dados obtidos pelo sequenciamento do gene 16S rDNA foram analisados, comparados e alinhados, pelo programas BLASTn e MultiAlin, com sequências de linhagens de *Z. mobilis* previamente depositadas no banco de dados GenBank. Um dendograma foi construído através do programa ClustalW pelo método de neighbor-joining. Os perfis de restrição teórica das enzimas de restrição *Hae III*, *NdeII* e *StuI* foram gerados a partir do WebCutter 2.0. Dendogramas foram construídos a partir da matriz de similaridade genética de Jaccard, calculada pela análise dos perfis de restrição teóricos de cada enzima. A análise das sequências obtidas no presente estudo revelou o elevado grau de conservação no gene 16SrDNA, confirmando a relação de proximidade das linhagens de *Zymomonas mobilis* depositadas na Coleção de Micro-organismos UFPEDA e a proximidade com a *Z. mobilis* subsp. *mobilis* LMG445, sugerindo que as linhagens desta coleção pertencem a esta subespécie. Além disso, conclui-se que a análise do perfil restrição teórica do gene 16S rDNA possibilita a diferenciação de *Z. mobilis*, a nível de subespécie, mas não é eficaz para analisar a variabilidade genética entre as linhagens de *Z. mobilis* UFPEDA. Baseados nestes resultados, outros marcadores filogenéticos devem ser empregados para analisar a variabilidade genética destas linhagens, possibilitando um melhor conhecimento da diversidade desta bactéria.

Palavras-chave: Gene 16S rDNA; ARDRA; Subespécies; *Zymomonas mobilis*

ABSTRACT

Zymomonas mobilis has attracted great interest in the scientific, industrial and biotechnological medium due to its high fermentation potential. The taxonomic viewpoint, *Z. mobilis* is the only species of the genus *Zymomonas*, and is subdivided into three subspecies: *Z. mobilis* subsp. *mobilis*, *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* and *Z. mobilis* subsp. *francensis*. The differentiation of these subspecies is based on physiological tests. These tests are time consuming and often unreliable. Therefore, molecular techniques are proposed as a fast and reliable alternative to differentiation of these bacteria. This study aims to perform molecular characterization of 32 strains of *Zymomonas mobilis* deposited in the Collection of Microorganisms UFPEDA by sequence analysis of 16S rDNA gene and the theoretical restriction profile of this gene. The strains were grown in SSDL for 24 hours at 30 °, followed by centrifugation and extraction of chromosomal DNA. PCR reactions were performed with primers and specific conditions for amplification of the 16S rDNA gene. The amplified products of 16S rDNA were purified, sequenced, and cleaved with restriction enzymes *Hae III*, *NdeII* and *StuI*. The data obtained by 16S rDNA gene were analyzed, compared and aligned by BLASTn and MultiAlin programs with sequences of strains of *Z. mobilis* previously deposited in the GenBank databases. A dendrogram was constructed using the program ClustalW method by neighbor-joining. Profiles theoretical restriction of restriction enzyme *Hae III*, *NdeII* and *StuI* were generated from WebCutter 2.0. Dendrograms were constructed from the genetic Jaccard similarity matrix, calculated by analyzing the theoretical restriction profiles of each enzyme. The analysis of the sequences obtained in this study revealed the high degree of conservation in 16SrDNA gene, confirming the close relationship of strains of *Zymomonas mobilis* deposited in the Collection of Micro-organisms UFPEDA and closeness with *Z. mobilis* subsp. *mobilis* LMG445, suggesting that the strains in this collection belong to this subspecies. In addition, it is concluded that the theoretical restriction profile analysis of the 16S rDNA gene allows differentiation of *Z. mobilis*, the level of subspecies, but it is not effective to analyze the genetic variability between strains of *Z. mobilis* UFPEDA. Based on these results, other phylogenetic markers should be employed to analyze the genetic variability of these strains, allowing a better understanding of the diversity of this bacteria.

Keywords: 16S rDNA gene; ARDRA; Subspecies; *Zymomonas mobilis*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Geral.....	14
2.2 Específicos.....	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 <i>Zymomonas mobilis</i>	
3.1.1 Histórico: Isolamento, Ocorrência e Identificação.....	15
3.1.2 Aspectos morfológicos e bioquímicos.....	16
3.1.3 Aspectos genotípicos.....	18
3.1.4 Importância Biotecnológica: Aplicação na indústria.....	19
3.1.5 Uso terapêutico.....	20
3.2 Técnicas moleculares para a identificação e caracterização bacteriana.....	21
3.2.1 Genes ribossomais como marcadores filogenéticos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Micro-organismos.....	26
4.2 Extração de DNA cromossômico.....	26
4.3 Amplificação do gene 16S rDNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	28
4.4 Determinação dos perfis de restrição teóricos.....	29
4.5 Análise de restrição do gene 16S rDNA (ARDRA).....	29
4.5 Análise dos dados.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32

5.1 Extração de DNA cromossômico.....	32
5.2 Amplificação do gene 16S rDNA por PCR.....	33
5.3 Análise das sequências do gene 16S rDNA por PCR.....	33
5.4 Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA).....	37
5.5 Análises filogenéticas.....	42
6. CONCLUSÃO	47
7. REFERÊNCIAS.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Resolução taxonômica das técnicas utilizadas na caracterização de micro-organismos.....	22
Figura 2	Organização do operon do RNA ribossômico.....	23
Figura 3	Extração de DNA de algumas linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> UFPEDA.....	32
Figura 4	Produtos de amplificação do gene 16S rDNA de algumas linhagens de <i>Z. mobilis</i> UFPEDA.....	33
Figura 5	Alinhamento múltiplo das sequências de 16S rDNA das linhagens <i>Z. mobilis</i> UFPEDA gerado pelo programa Multialin.....	37
Figura 6	Perfil de restrição do gene 16S rDNA de algumas linhagens de <i>Z. mobilis</i> UFPEDA após digestão com a enzima <i>HaeIII</i>	41
Figura 7	Perfil de restrição do gene 16S rDNA de algumas linhagens de <i>Z. mobilis</i> UFPEDA após digestão com a enzima <i>NdeII</i>	41
Figura 8	Perfil de restrição do gene 16S rDNA de algumas linhagens de <i>Z. mobilis</i> UFPEDA após digestão com a enzima <i>StuI</i>	42
Figura 9	Dendograma gerado pelo programa Clustalw a partir das sequências de 16S rDNA de linhagens de <i>Z. mobilis</i> UFPEDA e outras <i>Z. mobilis</i> depositadas no GenBank.....	43
Figura 10	Dendograma gerado a partir do perfil de restrição teórico da enzima <i>HaeIII</i>	44
Figura 11	Dendograma gerado a partir do perfil de restrição teórico da enzima <i>NdeII</i>	45
Figura 12	Dendograma gerado a partir do perfil de restrição teórico da enzima <i>StuI</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> UFPEDA.....	27
Tabela 2	Componentes das reações de amplificação do gene 16S rDNA.....	28
Tabela 3	Primers e condições de amplificação do gene 16S rDNA daslinhagens de <i>Z.mobilis</i> UFPEDA.....	29
Tabela 4	Sítios de clivagem das enzimas de restrição <i>HaeIII</i> , <i>StuI</i> e <i>NdeII</i>	30
Tabela 5	Componentes das reações de restrição do gene rDNA das linhagens de <i>Z.mobilis</i> UFPEDA.....	30
Tabela 6	Similaridade entre as linhagens de <i>Z. mobilis</i> UFPEDA e linhagens depositadas no banco de dados GenBank.....	35
Tabela 7	Perfis de restrição teóricos das enzimas <i>HaeIII</i> , <i>StuI</i> e <i>NdeII</i>	39

1. INTRODUÇÃO

Zymomonas mobilis é uma bactéria Gram-negativa, que utiliza sacarose, glicose e frutose como fonte de carbono e energia, produzindo quantidades equimolares de etanol e CO₂ (SWINGS & DELEY, 1977). O metabolismo desses carboidratos é realizado a partir da via Entner-Duodoroff, característica marcante do gênero *Zymomonas*, sendo a única bactéria anaeróbica a utilizar esta rota metabólica (GIBBS & DE MOSS, 1954; VIIKARI, 1984).

Essa bactéria tem sido alvo de inúmeras pesquisas devido ao seu alto potencial fermentativo, visto que, quando comparado às leveduras, apresenta alta tolerância a etanol, maiores velocidades específicas de consumo de substrato, de produção de etanol e consequentemente, maior rendimento. Além de etanol, a *Z. mobilis* é capaz de produzir subprodutos de interesse biotecnológico, entre os mais importantes estão a levana (KANG *et al.*, 2006) e o sorbitol (CAZETTA *et al.*, 2005; VIGNOLI *et al.*, 2006).

Do ponto de vista taxonômico, *Z. mobilis* é a única espécie do gênero *Zymomonas*, sendo subdividida em duas subespécies: *Z. mobilis* subsp. *mobilis* e *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* (SWINGS & DELEY, 1977). A diferenciação dessa bactéria, ao nível de subespécies, é baseada em testes fisiológicos que inclui o cultivo a 36°C e a avaliação do crescimento na presença de 0,5% NaCl, 0,0075% KCN ou 0,2% sais biliares. Segundo Coton *et al.* (2006), estes testes consomem tempo e são duvidosos. Por esta razão, técnicas moleculares são propostas como uma alternativa rápida e confiável para a caracterização genética dessas bactérias.

Diferentes técnicas de biologia molecular têm sido descritas e aprimoradas para identificação e comparação de isolados bacterianos, dentre as mais utilizadas estão: a) RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism); b) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); c) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism); d) seqüências de subunidades do rDNA; e) ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis); f) RISA (ribosomal intergenic spacer analysis) ; g) DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (VAN ELSAS *et al.*, 1998; MCDONALD, 1997; AMICUCCI *et al.*, 2001; PENNANEN *et al.*, 2001; TAYLOR *et al.*, 2001; OLIVEIRA; COSTA, 2002; MARSHALL *et al.*, 2003; FAGBOLA; ABANG, 2004).

A técnica conhecida como ARDRA (Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado), utiliza-se das características do RNA ribossômico. Essa técnica é baseada em padrões de restrição enzimática usando enzimas selecionadas com base na sua habilidade de revelar polimorfismos nos fragmentos de DNA analisados e no grau de conservação dos sítios de restrição do RNAr que reflete padrões filogenéticos. A ARDRA é bastante útil para uma rápida análise de diversidade genética (GRIFONI *et al.*, 1995).

Coton *et al.* (2006), utilizaram a análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) para identificar, ao nível de subespécies, linhagens de *Z. mobilis* subsp. *mobilis*, *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* de diferentes coleções e alguns novos isolados franceses de *Z. mobilis*. As enzimas de restrição utilizadas foram: a *StuI*, que identificou as linhagens a nível de subespécies; a *NdeII*, que foi capaz de diferenciar os isolados franceses das linhagens das demais coleções; e a *HaeII*, que gerou três perfis de restrição: um correspondendo a *Z. mobilis* subsp. *mobilis*, um segundo para *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* e um outro perfil para os novos isolados franceses. A partir deste estudo, concluíram que esta é uma técnica rápida e confiável para a identificação das linhagens de *Z. mobilis*, ao nível de subespécies.

A Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos (UFPEDA) possui um acervo de 32 linhagens de *Z. mobilis* isoladas de diferentes locais e fontes, bem como variantes obtidas através da fusão de esferoplastos por vários pesquisadores do Departamento de Antibióticos (CALAZANS *et al.*, 1989). Algumas dessas linhagens já foram caracterizadas pelo Perfil Plasmidial (DALLY *et al.*, 1982; YABLONSKY *et al.*, 1988), pela Análise de Proteínas Totais (SDS-PAGE) e por técnicas moleculares como RAPD e rep-PCR. (SILVA, 2000; LIMA, 2002). Entretanto, uma análise molecular mais detalhada, incluindo todas as linhagens, ainda não foi efetuada.

A caracterização molecular dessas linhagens poderá informar se entre essas linhagens de *Z. mobilis* isoladas de diferentes locais, fontes e anos, existem diferenças que possam sugerir a ocorrências de uma nova subespécie ou se todas as linhagens pertencem a *Z. mobilis* subsp. *mobilis* ou a subespécie *Z. mobilis* subsp. *pomaceae*.

Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo realizar a caracterização molecular das 32 linhagens de *Z. mobilis* depositadas na Coleção de Micro-organismo UFPEDA, por meio do sequenciamento do gene 16SrDNA e da análise de restrição do gene ribossomal 16S (16S *rDNA*).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar 32 linhagens de *Zymomonas mobilis* depositadas na Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos (UFPEDA), através do estudo do gene ribossomal 16S (16S rDNA).

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar as sequências obtidas pela amplificação do gene 16S rDNA por PCR;
- Analisar o perfil de restrição do gene 16S rDNA amplificado por PCR (ARDRA);
- Incorporar os dados obtidos ao Banco de Dados da Coleção de Micro-organismos UFPEDA.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Zymomonas mobilis*

3.1.1 Histórico: Isolamento, ocorrência e identificação

Os estudos sobre *Zymomonas mobilis* foram iniciados por Barker e Hillier, em 1911, sendo eles os primeiros a isolar e descrever essa bactéria como causadora da “doença da sidra”, correlacionando a mesma com as alterações do sabor e aroma típicos da sidra. Contudo, esses pesquisadores não designaram um binômio latino para classificação taxonômica desse gênero.

A descoberta de *Z. mobilis* foi atribuída a Lindner, em 1924, por ocasião do seu isolamento no México, a partir da seiva fermentada de *Agave atrovirens*, o qual constitui uma bebida regional popularmente chamada “pulque”. (GONÇALVES DE LIMA *et. al.*, 1970). Em seus estudos, Lindner descobriu uma bactéria semelhante à de Berker e Hillier, a qual denominou *Thermobacterium mobili*. (SWINGS; DE LEY, 1977).

Em 1931, Kluyver e Hoppenbrouwers estudaram a fermentação alcoólica por *Thermobacterium mobili* e trocaram o nome dessa espécie para *Pseudomonas lindneri*. Posteriormente em 1936, Kluyver e Van Niel denominaram a bactéria descoberta por Lindner de *Zymomonas mobilis* (SWINGS; DE LEY, 1977).

A ocorrência da *Z. mobilis* foi verificada em várias partes do mundo e em diversos meios açucarados. Na Europa, a bactéria foi isolada de vinhos de maçã e pêra e também como contaminantes na indústria de cerveja (MILLIS, 1956; DADDS; MARTINS, 1973). Na África, Américas e Ásia através do fermentado de vinhos de seiva de palmas diversas (DADDS, MARTIN, 1973). E no México, foi isolada a partir da fermentação da seiva do agave (CARR, 1974).

No Brasil, especificamente em Pernambuco, Gonçalves de Lima e outros pesquisadores isolaram diversas linhagens de *Zymomonas* a partir de caldo de cana-de-açúcar fermentado, popularmente conhecido como “caldo de cana picado”. Através de estudos taxonômicos essas linhagens foram denominadas de *Zymomonas mobilis* variedade *recifensis* (GONÇALVES DE LIMA *et. al.*, FALCÃO DE MORAIS, 1983; FALCÃO DE MORAIS *et. al.*, 1993).

Swings e De Ley (1977), baseados em características fenotípicas e genéticas, concluíram que *Z. mobilis* é a única espécie do gênero com duas subespécies: *Z. mobilis* subsp. *mobilis* e *Z. mobilis* subsp. *pomaceae*.

Em 2005, Coton et. al. utilizaram a técnica de Análise de Restrição do rDNA Amplificado (ARDRA) para identificar, ao nível de subespécie, cepas de *Z. mobilis* isoladas de cidras 'frambiosé' de diferentes regiões da França. Diferenças consistentes foram observadas nas sequências 16S rDNA e no padrão de restrição dos isolados franceses comparadas com as duas subespécies previamente descritas, *Z. mobilis* subsp. *mobilis* e *Z. mobilis* subsp. *pomaceae*. A partir dos resultados obtidos, os autores sugeriram que os isolados franceses pertenciam a um novo genótipo dentro da *Z. mobilis* subsp. *pomaceae*.

Coton et al. (2006) compararam, por recursos polifásicos, linhagens de *Z. mobilis* com subespécies definidas, pertencentes às coleções de culturas DSMZ (German Resource Centre for Biological Material) e BCCM (Belgian Coordinated Cultures of Microorganisms), com os isolados franceses pertencentes à coleção Adria Normandie (COTON; COTON, 2003). Tanto os testes fisiológicos quanto os perfis de proteínas totais obtidos por SDS-PAGE revelaram significantes diferenças entre as subespécies conhecidas e os isolados franceses. Com esses resultados, reforçados pelas técnicas moleculares RAPD e REP, ficou clara a diferença com as subespécies definidas. As linhagens francesas exibiram aproximadamente 94% de similaridade com a Região Espaçadora Intergênica 16S-23S (ISR), 90% para HSP60 (proteína de “choque-térmico”) e 86% para gyrB (girase B) de *Z. mobilis* subsp. *mobilis*. Para *Z. mobilis* subsp. *pomaceae*, as similaridades foram de 87, 84 e 80%, respectivamente. Baseados em todos esses resultados foi proposto que os isolados franceses constituíam uma nova subespécie designada como *Zymomonas mobilis* subsp. *francensis* subsp. *nov.*

3.1.2 Aspectos morfológicos e bioquímicos

Zymomonas mobilis é uma bactéria Gram-negativa, não esporulante e anaeróbica facultativa, pertencente ao subgrupo α proteobactérias. Morfologicamente, apresentam-se na forma de bastonete curto e grosso, medindo de 2,0 a 6,0 μm de comprimento e 1,0 a 1,4 μm de largura, geralmente agrupadas aos pares. Quando apresenta mobilidade, possui de um a quatro flagelos polares. Apresentam colônias de

coloração branca ou creme, lenticulares, de bordas regulares. Seu crescimento em meio líquido é caracterizado pela alta densidade celular dispersa, como também pelo sedimento flocoso. Em meio sólido, as colônias crescem de forma lenta (acima de 48 horas) e convexa, com coloração esbranquiçada medindo de 1 a 2 mm de diâmetro (SWINGS; DE LEY, 1977; CONWAY, 1992; KANG, 1998).

Com relação às condições de cultivo, são capazes de crescer em pH, variando entre 3,5 e 7,5 (SWINGS; DE LEY, 1977; YANG *et al.*, 2009). Alguns autores encontraram uma temperatura ótima de crescimento para este micro-organismo de 25 a 31 °C (MILLIS, 1951). De acordo com Gonçalves de Lima *et al.*, (1970) as cepas CP1, CP2 e CP3 var. *recifenses* crescem bem entre 25 e 42°C. Entretanto, Swings e De Ley (1977) constatarem crescimento das CP3 e CP4 var. *recifenses* a 38°C, mas não a 40°C.

Do ponto de vista nutricional, a *Z. mobilis* é obrigatoriamente fermentativa e utiliza como fonte de carbono a glicose, a frutose e a sacarose. O metabolismo desses carboidratos é realizado a partir da via Entner-Doudoroff, característica marcante do gênero *Zymomonas*, sendo a única bactéria anaeróbica a utilizar esta rota metabólica (GIBBS & DE MOSS, 1954; VIKARI, 1984).

Em decorrência do uso dessa via, o rendimento energético obtido por *Z. mobilis* representa a metade do obtido por *Saccharomyces cerevisiae* pela via de Embden-Meyerhof (FALCÃO DE MORAIS, 1993; MCGILL; DAWES, 1971; SWINGS e DELEY, 1977). Estas rotas metabólicas são comparativamente simples em relação a outros micro-organismos. *Z. mobilis* cataboliza substratos com altas taxas específicas de carbono, uma vez que a parcela maior deste substrato é incorporado no catabolismo do produto final (TOMA *et al.*, 2003).

Quando utiliza glicose como fonte de carbono, a produção de etanol por *Z. mobilis* representa cerca de 95% do valor máximo teórico, havendo a formação de outros produtos como acetoína, acetaldeído, glicerol, entre outros (VIKARI, 1988). Rendimentos inferiores são atingidos com a utilização de frutose como substrato, atingindo cerca de 90% do valor máximo teórico. Com a sacarose, é observada uma redução mais acentuada na produção de etanol, cerca de 75-80% do valor máximo teórico.

No metabolismo dos carboidratos coexiste a fermentação etanólica e a produção de alguns subprodutos (SWINGS; DE LEY, 1977; SPRENGER *et al.*, 1996). Quando utiliza sacarose como fonte energética, *Z. mobilis* é capaz de produzir um

polissacarídeo, a princípio de alto peso molecular, denominado levana (JEREZ, 1993; ERNADES, 2006).

Além da levana, outro subproduto é formado pelo metabolismo da *Z. mobilis*, o sorbitol, que é produzido a partir não só da sacarose mas também a partir de uma mistura de glicose mais frutose em detrimento da produção de etanol (KANNAN *et al.*, 1998).

3.1.3 Aspectos genéticos da *Z. mobilis*

Segundo Doelle *et al.* (1993), *Z. mobilis* é uma bactéria única dentro do mundo microbiano, com crescimento, produção de energia e resposta às condições de cultura peculiares, causando um grande interesse no meio científico, industrial e biotecnológico.

Devido a estas características apresentadas pela *Z. mobilis*, estudos genéticos passaram a ser intensamente realizados na pesquisa desta bactéria. Estudos envolvendo o melhoramento genético de linhagens (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001) bem como a aplicação da análise do fluxo metabólico, mutagênese dirigida, inserção e/ou deleção de genes específico, vêm sendo desenvolvidos com o intuito de aprofundar o conhecimento sobre o metabolismo da *Z. mobilis* (HATZIMANIKATS *et al.*, 1998; CORNISH-BOWDEN; CARDENAS, 2000).

Segundo Swings e De Ley (1977), essa bactéria apresenta conteúdo de guanina e citosina (G+C) em torno de 48%. Entretanto, estudos posteriores realizados por Dadds e Carr (1973), mostraram que o conteúdo de G+C foi de aproximadamente 46,4% para a *Z. mobilis* NCIMB 10565 e 45,1% para *Zymomonas* B70. Kang e Kang (1998), através de análise de PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis), determinaram que o genoma de *Z. mobilis* apresentava um tamanho de aproximadamente 2085,5 Kb. O sequenciamento completo do genoma das linhagens de *Z. mobilis* subsp. *mobilis* e *Z. mobilis* subsp. *pomacea*, demonstrou que o conteúdo de C+G foi de 46,33% e 46,83%, respectivamente. E que o tamanho do genoma era em torno de 2,056,363pb e 1,989,865pb, respectivamente (CHONG, *et al.*, 2005;. KOUVELIS, *et al.*, 2009; PAPAS *et al.*, 2011; KOUVELIS, *et al.*, 2011)

A realização de um mapa físico do genoma de *Z. mobilis* ZM4 e sua unidade transcricional ribossomal (KANG; KANG, 1998; LEE; JIN; KANG, 2001)

contribuíram para a descoberta do primeiro genoma completo deste micro-organismo. Além da *Z. mobilis* ZM4, outras linhagens como ATCC 10988, NCIMB 11163 e ATCC 29192, já tiveram o seu genoma sequenciado (KOUVELIS, et. al., 2009; PAPAS et. al., 2011; KOUVELIS, et al., 2011). Recentemente, a *Z. mobilis* CP4, isolada de caldo de cana fermentado e depositada na Coleção de Micro-organismo do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA), teve o genoma completo sequenciado (KOUVELLIS et. al., 2014).

A ocorrência de plasmídios foi relatada pela primeira vez por Tonomura et al., (1992), possibilitando a comparação e a caracterização destes elementos extracromossômicos em diferentes linhagens de *Z. mobilis*. Esses autores demonstraram que todas apresentaram plasmídios variando de 1,76 a 50 Kb.

O sequenciamento das linhagens de *Z. mobilis* CP4, ATCC 10988, ATCC 29192, demonstrou que as mesmas possuíam 5, 6 e 2 plasmídios, respectivamente, variando o tamanho entre 2Kb e 37Kb (KOUVELIS, et. al., 2009, KOUVELIS, et al., 2011, KOUVELLIS et. al., 2014).

Vários genes e operons de linhagens de *Z. mobilis* também já foram sequenciados por grupos de pesquisa. Entre esses estão genes relacionados com o metabolismo da *Z. mobilis*, como por exemplo o gene da frutoquinase (ZEMBRZUSKI et al., 1992), piruvatoquinase (STEINER et al., 1998) e genes do metabolismo da sacarose (SONG et al., 1993, 1994; ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999).

3.1.4 Importância Biotecnológica: Aplicação na indústria

Z. mobilis tem sido alvo de inúmeras pesquisas devido ao seu alto potencial fermentativo, do qual resulta na produção de etanol com velocidade três a quatro vezes maior que *Saccharomyces cerevisiae* (ROGERS et al., 1979; BARROW et al., 1984; DOELLE et al., 1993; KANNAN et al., 1998; RUANGLEK et al., 2006).

Diversos estudos, em diferentes países, têm explorado o potencial de *Z. mobilis* na produção de etanol. Na Austrália, Canadá, Estados Unidos e Japão, esta bactéria tem sido utilizada para produção de álcool etílico em larga escala (TANAKA et al., 1999; MCLELLAN et al., 1999; SHANE et al., 2000).

Diferentes tipos de substratos têm sido utilizados para produção de etanol em fermentações com *Z. mobilis* como o caldo da cana-de-açúcar (TANO ; BUZATO, 2003), farinha e farelo de trigo (PALMAROLA-ADRADOS *et al.*, 2005), resíduos industriais (KÁDÁR *et al.*, 2004), algaroba (SILVA, 2007), além de meios sintéticos como misturas de glicose/frutose (SHENE ; BRAVO, 2001).

Além de etanol, subprodutos de importância biotecnológica são formados a partir do metabolismo de *Z. mobilis*, como levana e sorbitol. A levana é utilizada pela indústria de alimentos como agente espessante, produtos dietéticos e fixador de cores e sabores (YUN, 1996). Além disso, sua hidrólise produz frutose que tem poder adoçante superior à sacarose (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005). Dentre os organismos produtores de levana a *Z. mobilis* é o mais promissor para produção em escala industrial (ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999; MELO *et al.*, 2007). O sorbitol apresenta uma ampla aplicação na indústria de alimento (KRETCHMER; HOLLENBECK, 1991), cosméticos, têxtil e farmacêutica (HOUGH *et al.*, 1979).

Também é conhecida a capacidade de *Z. mobilis* produzir frutooligossacarídeos (BEKERS *et al.*, 1993), glutamato, ácido acético, acetaldeído (COTON *et al.*, 2005), ácido glicônico (SILVEIRA *et al.*, 1999) e mais recentemente a produção de asparaginase (ABUD *et al.*, 2003; CASOTTI *et al.*, 2007).

3.1.5 Uso terapêutico de *Zymomonas mobilis*

Estudos realizados por vários pesquisadores mostraram que *Z. mobilis* apresenta atividade antagônica contra bactérias, leveduras, fungos filamentosos e helmintos (GONÇALVES DE LIMA *et al.*, 1968; WANICK *et al.*, 1970; GONÇALVES DE LIMA *et al.*, 1970; WANICK *et al.*, 1971; SOUZA; SOUZA, 1973; LOPES *et al.*, 1980; SCHUMACHER *et al.*, 1997; FERRAZ *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2004).

A ingestão de preparações líquidas de *Z. mobilis* já foi utilizada no tratamento de várias infecções entéricas (GOMES, 1959; GONÇALVES DE LIMA *et al.*, 1970) e urogenitais (WANICK *et al.*, 1970; WANICK; SILVA, 1971; SOUZA; SOUZA, 1973) as quais promoveram resultados promissores.

Com a finalidade de observar o comportamento de *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* frente a pacientes que apresentam infecções genitais, Wanick e Silva (1971) realizaram estudo utilizando duas formas de aplicação de *Z. mobilis* var. *recifensis*:

líquida ou sob a forma de geléia para o tratamento de pacientes que apresentavam infecções genitais causadas por *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans* e *Trichomonas vaginalis*. As infecções causadas por *N. gonorrhoeae* foram curadas em um período de 10 a 12 dias utilizando a forma de geléia e de 15 dias para a forma líquida. Para a tricomoníase e candidíase o tempo de cura foi de 6 dias sob a forma de geléia.

Souza e Souza (1973) observaram o efeito antagônico de *Z. mobilis* sobre *Escherichia coli*, *Haemophilus vaginalis*, *N. gonorrhoeae*, *Trichomonas mobilis* e *Staphylococcus aureus*. Tampões vaginais impregnados de *Z. mobilis* sob a forma de geléia foram inoculados em pacientes portadores de colpíte e vulvovaginite. Os tampões eram substituídos a cada 24 h e em média a duração do tratamento foi de 6-10 dias, com obtenção de resultados significativos, a citar a recuperação da coloração normal da mucosa vaginal e o desaparecimento dos sintomas clínicos.

Lima (2002) relatou a produção de bacteriocinas em linhagens de *Z. mobilis* exibindo um amplo espectro de ação contra patógenos como *E. coli* e *S. enteritidis*.

A ação anti-helmíntica da cultura bacteriana de *Z. mobilis* foi avaliada pelo tratamento de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*. Nesse estudo, foi observada uma redução significativa de 60,91% no grupo tratado quando comparado com o controle, cujos camundongos não haviam tomado o fermentado (SANTOS et al., 2001). Posteriormente, SANTOS et al. (2004), administraram oralmente cultura de *Z. mobilis* a camundongos C57Bl/10 do sexo masculino, infectados com *S. mansoni*. Estes autores observaram uma proteção de 61% nestes camundongos, que foi confirmada através de estudos histopatológicos do fígados e do intestino desses animais.

3.2 Técnicas moleculares para a identificação e caracterização bacteriana

Tradicionalmente, as técnicas de identificação e diferenciação de linhagens bacterianas são baseadas nas características morfológicas e fenotípicas das amostras. Contudo, essas técnicas convencionais são, muitas vezes, limitadas por sua baixa capacidade de diferenciação entre linhagens de uma determinada espécie e também devido, muitas vezes, à baixa reprodutibilidade dos testes (OLIVE; BEAN, 1999).

Com o avanço da biologia molecular, diversas técnicas foram desenvolvidas para a identificação e caracterização de micro-organismos, contribuindo

significativamente para um grande avanço do conhecimento da diversidade microbiana. Em geral, essas técnicas baseiam-se na análise das proteínas e principalmente dos ácidos nucleicos, apresentando diferentes níveis de resolução para a detecção da variabilidade genética entre linhagens bacterianas (PALLERONI, 1993).

Diversas técnicas moleculares estão disponíveis para a caracterização molecular de isolados bacterianos, as quais fornecem diferentes níveis de diferenciação taxonômica (Figura 1). Dentre as mais utilizadas estão: a) RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism); b) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); c) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism); d) seqüências de subunidades do rDNA; e) ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis); (VAN ELSAS *et al.*, 1998; MCDONALD, 1997; AMICUCCI *et al.*, 2001; PENNANEN *et al.*, 2001; TAYLOR *et al.*, 2001; OLIVEIRA; COSTA, 2002).

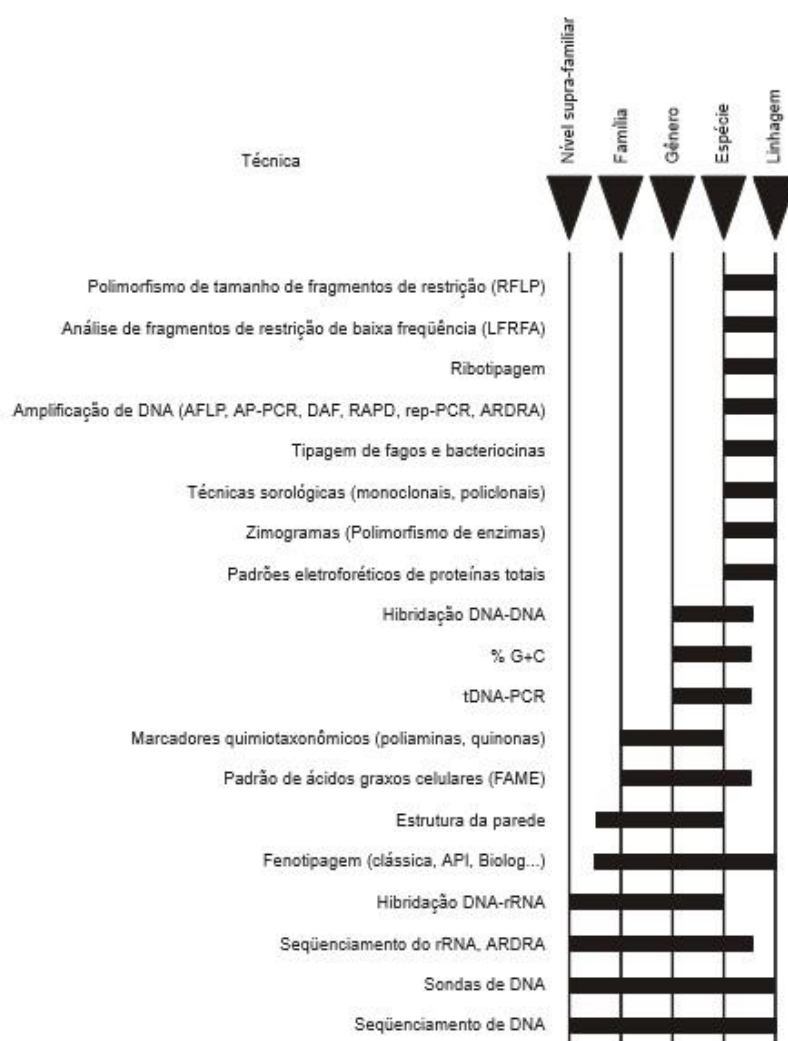


Figura 1: Resolução taxonômica das técnicas mais utilizadas na caracterização de micro-organismos. Modificado a partir de Swings (1996).

3.2.1 Genes ribossomais como marcadores filogenéticos

Um fator importante para o crescimento, manutenção e reparo celular dos micro-organismos é a síntese proteica, que depende da participação do RNA ribossômico (rRNA) para a formação do ribossomo e tradução de informação genética.

O ribossomo das células procarióticas é constituído pelo RNA ribossomal e por várias proteínas. Ele é composto de duas subunidades principais, a 50S (subunidade maior) e a 30S (subunidade menor). Na subunidade maior estão as moléculas de 23S, 5S rRNA e mais 31 proteínas. Na subunidade menor estão o 16S rRNA e mais 21 proteínas (WOODSON; LEONTIS, 1998).

Os genes que codificam os rRNAs procarióticos são organizados em operons (*rrn* operon) formados pelos três genes que codificam os rRNA: *16S rDNA*, *23S rDNA* e *5S rDNA*. Cada um desses genes é separado por uma região espaçadora intergênica (ISRs), que contém um ou mais genes de RNA transportador (tRNA) (Figura 3.2).

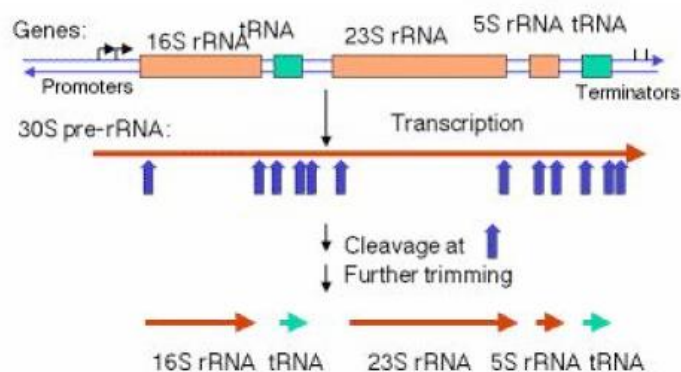


Figura 2: Organização do operon do RNA ribossômico
(Fonte: <http://www.personal.psu.edu/.../image002.png>)

Esses genes correspondentes aos RNAs ribossômicos são utilizados para as determinações filogenéticas, pois apresentam todas as características que definem um marcador molecular, tais como: a) estão universalmente distribuídos e têm a mesma função em todos os organismos; b) originaram-se de genes ancestrais comuns, portanto são homólogos; c) possuem regiões bastante conservadas e outras mais variáveis, onde a taxa de variação nucleotídica pode ser estatisticamente correlacionada com a distância entre gêneros e espécies (CLARRIDGE, 2004); d) os rRNAs 16S e 23S são moléculas

razoavelmente grandes, tendo portanto informações suficientes para comparações estatisticamente significativas (ROSADO et. al., 1997).

O gene 16S rDNA possui aproximadamente 1500 nucleotídeos e geram grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas. O gene 23S rDNA tem aproximadamente 3000 nucleotídeos e contem duas vezes mais informações que o gene 16S rDNA, apesar disso, esta região por ser menor, tem maior facilidade de sequenciamento, sendo assim a mais utilizada para propósitos taxonômicos. Contudo, o 23S rDNA tem sido utilizado como suplemento para os dados gerados pelo estudo do 16S rDNA em organismos intimamente relacionados (STAHL, 1997).

A análise comparativa de sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA tem sido largamente utilizada em estudos taxonômicos e de identificação de bactérias. A vantagem de utilizar essa técnica é a disponibilidade de um grande número de sequências desse gene depositadas em bancos de dados como Gen-Bank, RDP, EMBL, possibilitando a comparação de novas sequências obtidas com as sequências presentes nessas bases (COUTINHO et al., 1999).

As regiões espaçadoras intergênicas 16S-23S rDNA (ISR) recebem uma menor pressão de seleção evolucionária que os genes que codificam os rRNA 16S e 23S e por isso apresentam grande variação genética. Este polimorfismo consiste principalmente em inserções e/ou deleções na ISR (ANTON *et al.*, 1998; LUZ *et al.*, 1998) e a análises desta região tem sido extremamente útil na detecção de variações intra-específicas (BOURQUE *et al.*, 1995).

A análise de sequências das regiões espaçadoras entre os genes 16S-23S rDNA disponíveis em bancos de dados revelou que não existem regiões altamente conservadas nessa molécula e que pode ocorrer variação considerável entre as espécies, tanto no tamanho como na sequência de bases (GÜRTLER; STANISICH, 1996).

A amplificação dos genes rDNA por Reação em Cadeia da Polimerase – PCR, permite realizar a Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA). Esta técnica baseia-se em padrões de restrição enzimática utilizando enzimas selecionadas com base na sua habilidade de revelar polimorfismos nos fragmentos de DNA e no grau de conservação dos sítios de restrição do rRNA, que refletem padrões filogenéticos.

A ARDRA tem sido utilizada como uma ferramenta molecular rápida, barata e eficaz para análise de diversidade genética (GRIFONI et al, 1995). O polimorfismo dos

perfis de bandas (ribotipos) observados por eletroforese em géis de agarose vem sendo utilizado para estudos de filogenia, variabilidade ou agrupamento genotípico de isolados bacterianos (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; LEI et al., 2008; LUVITTO, 2008; MOCALI et al, 2003; SOUZA, 2005; SUN et al., 2008).

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Foram utilizadas 32 linhagens de *Zymomonas mobilis*, previamente isoladas em diferentes fontes, locais e ano, e depositadas na Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, UFPEDA (Tabela1) (FALCÃO DE MORAIS et al., 1993). Todas as linhagens de *Z. mobilis* foram mantidas liofilizadas desde setembro de 2008. Para a utilização no presente estudo, em abril de 2013, as linhagens foram reativadas em meio padrão SSDL (Anexo 1). A pureza dos isolados foi avaliada pela ausência de crescimento em meio Ágar-Nutriente, à temperatura de 30°C, por 24h. Durante todo o estudo, repiques contínuos, em meio padrão SSDL, foram realizados a cada 3 meses.

4.2 Extração de DNA cromossômico

A extração do DNA cromossômico foi realizada por meio da técnica descrita por Sambrook et al. (1989), com algumas modificações. As linhagens de *Z. mobilis* foram cultivadas em tubos de ensaio contendo meio padrão SSDL e incubadas à 30°C. Após 16 horas, 5 mL de cultivo foram centrifugados em tubo Falcon por 5 min a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 1,5 mL de tampão TAS (Anexo 1) para a lavagem do sedimento. O material foi ressuspensionado e centrifugado a 12.000 rpm por 3 minutos. Este procedimento de lavagem e centrifugação foi repetido por duas vezes.

Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 500 µL de tampão TAS. A amostra foi tratada com proteinase K (150µg/mL) e SDS 10% e incubada a 50°C por 60 minutos. Em seguida, foi adicionado 400 µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico), homogeneizado por inversão e centrifugado por 2 minutos a 12.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e 400 µL de CIA e SDS 2% foi adicionado, a amostra foi novamente homogeneizada e centrifugada nas mesmas condições anteriores.

Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, no qual foi adicionado acetato de potássio (pH 5,2) 30mM. Em seguida a amostra foi

precipitada com isopropanol (0,6v), incubada a -20°C por 60 minutos e centrifugada a 12.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado formado foi lavado com etanol 70% (gelado) por 3 vezes, sendo centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos. Depois de centrifugadas, as amostras foram secadas em temperatura ambiente. Em seguida foram ressuspensas em 30 µL de TE+RNAse, incubadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos e estocadas a -20°C.

Para avaliar a qualidade DNA extraído, foi retirado 1µL de cada amostra, o qual foi misturado a 3µL de tampão de amostra e 1µL do corante SYBR Green. Essa mistura foi aplicada em gel de agarose 0,8%, em tampão de corrida TBE 0,5x. Após a corrida, o gel foi observado em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentado.

Tabela 1: Linhagens de *Zymomonas mobilis* UFPEDA.

Coleção UFPEDA	Linhagens	Fonte de isolamento	Autor	Local
198	AG-11	Suco de <i>Agave atrovirens</i>	Gonçalves de Lima <i>et. al.</i> , 1951	México
199	CP ₁	Caldo de cana Fermentado	Gonçalves de Lima <i>et. al.</i> , 1970	Recife/PE
200	CP ₂	Caldo de cana Fermentado	Gonçalves de Lima <i>et. al.</i> , 1970	Recife/PE
201	CP ₃	Caldo de cana Fermentado	Gonçalves de Lima <i>et. al.</i> , 1970	Recife/PE
202	CP ₄	Caldo de cana Fermentado	Gonçalves de Lima <i>et. al.</i> , 1970	Recife/PE
203	Z-1-80	Caldo de cana + melaço	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1980	Usina Massauassu, Escada/PE
204	Z-2-80	Caldo de cana + melaço	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1983	São Paulo
205	ZAP	Água residual açucarada	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1980	Refinaria de Açúcar/PE
206	P ₃	Caldo de Cana	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1983	Engenho Pitu, Vitória de Santo Antão/PE
207	P ₄	Caldo de Cana	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1983	Engenho Pitu, Vitória de Santo Antão/PE
208	Z-1-81	Caldo de Cana	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1983	Usina Bulhões, Jaboatão/PE
209	Z-1-81A	Caldo de Cana	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1983	Usina Bulhões, Jaboatão/PE
210	T ₂	Caldo de Cana + melaço	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1993	Usina Massauassu, Escada/PE
238	ZAG-4	Recombinante (AG11+ZAP)	Calazans <i>et. al.</i> , 1989	-
240	ZAG-10	Recombinante (AG11+ZAP)	Calazans <i>et. al.</i> , 1989	-
241	ZAG-12	Recombinante (AG11+ZAP)	Calazans <i>et. al.</i> , 1989	-
353	Z-1-86A	Caldo de cana + melaço	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1993	Usina Maravilhas, Goiana/PE
354	Z-1-86B	Caldo de cana + melaço	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1993	Usina Maravilhas, Goiana/PE
355	Z-1-87	Caldo de cana fermentado	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1993	Engenho de Alagoas/AL
356	Z-1-88	Caldo de Cana	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1993	Usina Laranjeiras, Vicência/PE
357	Z-2-88	Caldo de cana	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1993	Destilaria GIASA, Paraíba/PE
358	Z-3-88	Caldo de cana	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1993	Usina Cruangí, Timbaúba/PE
359	Z-4-88	Caldo de cana + melaço	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1993	Usina Cruangí, Timbaúba/PE
360	Z-5-88	Caldo de cana + melaço	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1993	Usina Maravilhas, Goiana/PE
361	Z-6-88	Caldo de cana + melaço	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1993	Destilaria Alvorada, Chã-de-Alegria/PE
362	Z-1-97	Caldo de cana	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1997	Destilaria PEMEL, Maratoca/PB
363	Z-1-96	Caldo de cana + melaço	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1996	PE
386	Z-1-85	Bagaço da cana	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1993	Fábrica de papel Portela, Jaboatão/PE
387	Z-2-85	Caldo de cana + melaço	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1993	Destilaria Alvorada, Chã-de-Alegria/PE
388	ZAG-6	(AG11+ZAP)	Calazans <i>et. al.</i> , 1989	-
633	ZM4/(ATCC31821)	-	-	-
634	Z-2-97	Caldo de cana	Falcão de Moraes <i>et. al.</i> , 1997	PE

4.4 Amplificação e purificação do gene 16S rDNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O gene do RNA ribossomal 16S (16S rDNA) foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores: fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg *et al.*, 1991).

A amplificação das amostras foi efetuada em volume final de 25 µL contendo tampão 10X, dNTPs (10mM.), MgCl₂ (50mM.) e Taq polimerase (2,5 U/µL), iniciadores (50pmol/cada) e 1 µL da amostra de DNA (Tabela 2). As reações foram realizadas em termociclador (C1000 Thermal Cycler – BioRad), programado com um ciclo inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos, cada ciclo consistindo de uma etapa de desnaturação (95°C por 45 segundos), uma etapa de anelamento (60,0°C por 45 segundos) e uma etapa de extensão (72°C por 2 minutos) e, por fim, uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos (Tabela 3).

Após o processo de amplificação, cada reação foi avaliada por eletroforese. Para isso, foram adicionados às reações: 7 µL de tampão de amostra e 3 µL de SYBR Green. Essa mistura foi aplicada em gel de agarose a 1,2%, em tampão de corrida TBE 0,5x, utilizando como marcador DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). Em seguida, o gel foi observado em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentado.

Tabela 2: Componentes das reações de amplificação do gene 16S rDNA por PCR

Reagentes	Volume para uma reação (µl)	Concentração final
Água Mili Q	17,5	-
Tampão de reação	2,5	1x
MgCl ₂	1,0	2 mM
dNTP	0,5	0,2 mM
Primer <i>forward</i>	1,0	1,0 µmol
Primer reverse	1,0	1,0 µmol
DNA molde	1,0	10-15 ng/ µL
Taq polimerase	0,5	1,5U/µL
Total	25,0	-

Os produtos do gene 16S rDNA amplificados foram purificados, seguindo o protocolo do kit de purificação PureLink (Invitrogen) e em seguida sequenciados em sequenciador automático de DNA ABI 3100.

Tabela 3: Primers e condições de amplificação do gene 16S rDNA das linhagens de *Z. mobilis* – UFPEDA.

Gene	Primers	Sequências	Condições de PCR
16S rDNA	fd1	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	5 min a 95°C, 30x (45s a 95°C; 45s a 60,6°C; 2 min a 72°C) e 5 min a 72°C
	rD1	5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'	

4.5 Determinação dos perfis de restrição teórico

As sequências do gene 16S rDNA de *Z. mobilis* obtidas foram utilizadas para determinar os perfis de restrição teórico das enzimas *HaeIII*, *NdeII* e *StuI*. Sequências de linhagens de coleções internacionais, previamente depositadas no GenBank, foram utilizadas para comparação com as linhagens da Coleção de Micro-organismos UFPEDA. Os perfis de restrição teóricos foram determinados pelo programa WebCutter 2.0 disponível online (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>).

4.6 Análise de restrição do gene 16S rDNA (ARDRA)

Os produtos do gene 16S rDNA amplificados e purificados foram clivados com as enzimas de restrição *HaeIII*, *NdeII* e *StuI* (Tabela 4). Para as reações enzimáticas, foram utilizados 1U de cada enzima, 10 µL do produto amplificado, 2,5 µL de tampão de reação 10X para a *HaeIII* e *StuI* e 12,5 de tampão reação 2x para a *NdeII*. Foi adicionada água Miliq em cada uma das reações para obter-se o volume final de 20 µL (Tabela 5). Todas as reações ocorreram no termociclador, a 37°C, durante 1 hora.

Tabela 4: Sítios de clivagem das enzimas de restrição *Hae III*, *StuI* e *NdeII*.

Enzimas de Restrição	Sítios de Clivagem
<i>Hae III</i>	GG/CC
<i>StuI</i>	AGG/CCT
<i>NdeII</i>	/GATC

Os produtos das reações foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v). Para isso foram retirados 10 µL de cada reação, no qual foi adicionado 3 µL de tampão de amostra, e 2µL do corante SYBER Green. A mistura foi aplicada ao gel de agarose, em tampão de corrida TBE 1x, juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Invitrogen), a 75V por 2 horas. Posteriormente, os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados.

Tabela 5: Componentes das reações de restrição do gene rDNA das linhagens de *Z. mobilis*.

Reagentes	Volume para cada reação (µl)		
	<i>HaeIII</i>	<i>StuI</i>	<i>NdeII</i>
<i>Água Mili Q</i>	12	12	2,0
<i>Tampão da enzima</i> (10x <i>HaeII</i> e <i>StuI</i> ; 2x <i>NdeII</i>)	2,5	2,5	12,5
<i>Enzima(1U)</i>	0,5	0,5	0,5
<i>Produto de PCR</i>	10,0	10,0	10,0
<i>Volume final</i>	25	25	25

4.6 Análises dos dados

As sequências do gene 16S rDNA das linhagens de *Z. mobilis* obtidas foram comparadas com outras sequências depositadas no banco de dados Genbank do NCBI usando a ferramenta BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A qualidade do

sequenciamento foi analisada com o auxílio dos programas Pregap4 4.0 e Gap4 4.0 que fazem parte do Staden, o valor de Phred assumido para a análise das sequências foi 30.

As sequências obtidas foram alinhadas multiplamente com os software Mega 5.2 e Multialin juntamente com sequências de linhagens padrão de coleções internacionais depositadas no GenBank. O programa ClustalW foi utilizado para a construção de um dendograma pelo método neighbor-joining.

Para a análise dos resultados dos perfis de restrição teórico foi utilizado o programa NTSYS-pc. Os resultados, expressos em termos de presença ou ausência de cada fragmento, foram colocados em matrizes binárias, em que “1” representava a presença da banda e “0” representava sua ausência. Desta forma, este programa construiu uma matriz de similaridade, através do coeficiente de similaridade Jaccard. Estes dados da matriz de similaridade foram utilizados pelo programa para a construção do dendograma pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average) estabelecendo as relações genéticas entres os diferentes isolados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração de DNA cromossômico

A metodologia utilizada para a extração de DNA cromossômico das linhagens de *Z. mobilis*, mostrou-se eficiente para o isolamento do DNA de todas as linhagens estudadas, como pode ser observado na figura 3. A concentração de DNA foi estimada por comparação com amostras de DNA de fago lambda, colocadas no gel e contendo concentrações conhecidas. Todas as amostras de DNA obtidas foram diluídas em água miliq para se obter no final uma concentração aproximadamente de 10-15ng/μL.

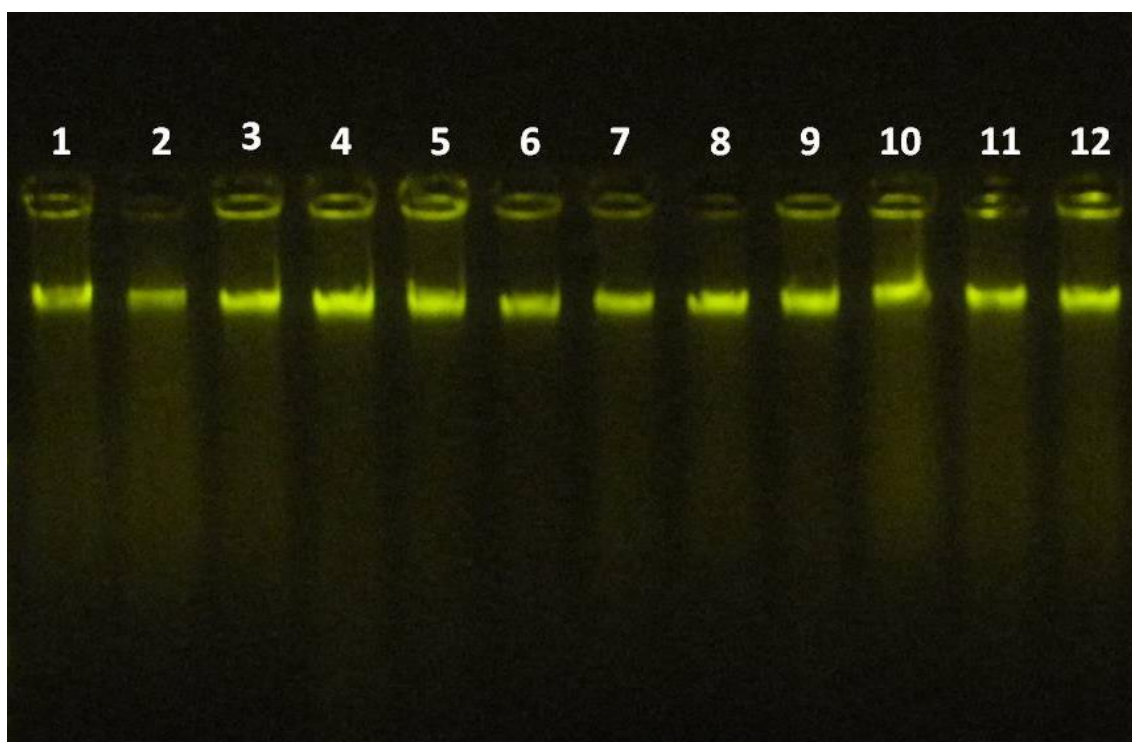


Figura 3: DNA das linhagens de *Zymomonas mobilis* – UFPEDA. 1: CP₂; 2: CP₃; 3: CP₄; 4: Z-1-80; 5: Z-2-80; 6: ZAP; 7: T₂; 8: ZAG-4; 9: ZAG-12; 10: Z-1-86A; 11: Z-1-86B; 12: Z-4-88.

5.2 Amplificação do gene 16S rDNA por PCR

Os produtos da amplificação do gene 16S rDNA das diferentes linhagens de *Z. mobilis* apresentaram um peso molecular de aproximadamente 1500 pares de bases, (Figura 4). O tamanho dos fragmentos obtidos está de acordo com os fragmentos da amplificação do gene 16S rDNA descrito na literatura.

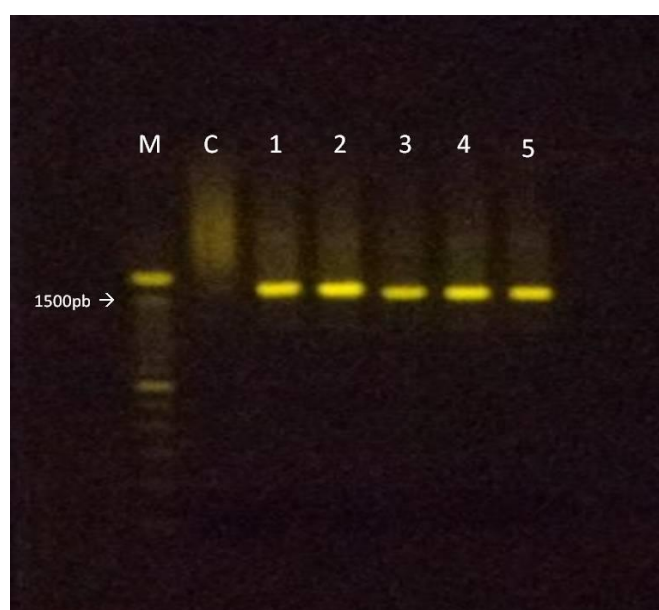


Figura 4: Produtos de amplificação do gene 16S rDNA de algumas linhagens de *Z. mobilis* UFPEDA. M: DNA Ladder 100 pb; C: controle negativo; 1: CP₂; 2: CP₄; 3: ZAP; 4: ZAG-12; 5: Z-1-86B.

5.3 Análises das sequências do gene 16S rDNA

As coleções de culturas de microrganismos têm assumido um papel importante no desenvolvimento de pesquisas científicas, por representarem um depósito para a preservação e manutenção de linhagens de microrganismos produtores de insumos biotecnológicos. Diante desse contexto, as linhagens de *Z. mobilis* depositadas na Coleção de Culturas da UFPEDA representam um patrimônio de grande importância biotecnológica em decorrência dos vários metabólitos produzidos por esta bactéria.

De acordo com o grau de similaridade genética observado, as linhagens foram agrupadas em quatro genótipos (G1-G4). O Genótipo G1 agrupou 20/32 linhagens apresentando 99% de similaridade com todas as linhagens padrão. O G2 reuniu 06/32 linhagens com 98% de similaridade com a linhagem *Z. mobilis* subsp. *francensis* AN0101 e 99% com as demais linhagens padrão. Já o genótipo G3 possuiu 04/32 linhagens que apresentaram 99% de similaridade com *Z. mobilis* subsp. *mobilis* LGM 445 e 98% com *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* LGM 448 e *Z. mobilis* subsp. *francensis* AN0101. O G4 agrupou 02/32 linhagens com 98% de similaridade com *Z. mobilis* subsp. *mobilis* LGM 445 e 97% para as demais linhagens padrão (Tabela 2).

Tabela 2: Similaridade entre as linhagens de *Zymomonas mobilis* da UFPEDA e linhagens depositadas no banco de dados Genbank.

Genótipos	Linhagens	Similaridade com <i>Z. mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> LMG 445 (NR_074274.1)	Similaridade com <i>Z. mobilis</i> subsp. <i>pomaceae</i> LMG 448 (NR_028793.1)	Similaridade com <i>Z. mobilis</i> subsp. <i>francensis</i> AN0101 (NR_104791.1)
G1	AG-11; CP ₁ ; CP ₂ ; CP ₃ ; Z-2-80; T ₂ ; Z-1-8; Z-1-81A; ZAG-10; Z-1-87; Z-1-88; Z-2-88; Z-4-88; Z-6-88; Z-1-97; Z-1-96; Z-1-85; ZAG-6; Z-2-9; ZM4	99%	99%	99%
G2	Z-1-80; P ₃ ; P ₄ ; ZAP; Z-3-88; Z-5-88	99%	99%	98%
G3	CP ₂ ; ZAG-4; Z-1-86A	99%	98%	98%
G4	Z-1-86B; ZAG-12	98%	98%	97%

O gene 16S rDNA é amplamente utilizado como marcador filogenético, pois apresenta sequências altamente conservadas entre regiões variáveis, estando presente e desempenhando a mesma função em todos os procariotos, não sendo afetado por mudanças ambientais e apresentando um tamanho suficiente para ser utilizado em

inferências taxonômicas [21-23]. As sequências de 16S já foram determinadas para um número grande de linhagens bacterianas e estão, em sua maioria, depositadas no GenBank [24-25], podendo ser utilizadas para a comparação com as sequências de isolados em estudo.

As sequências do gene 16S rDNA obtidas no presente estudo apresentaram similaridade igual ou superior a 97% com as espécies de *Z. mobilis* depositadas no GenBank. De acordo com Stackebrandt e Goebel (1994) [25], apenas se a sequência 16S apresentar similaridade inferior a 97%, é possível classificar um isolado como uma espécie diferente. Dessa forma, pode-se confirmar que as 32 amostras UFPEDA pertencem a espécie *Z. mobilis*.

O alinhamento múltiplo das sequências do gene 16S rDNA das linhagens de *Z. mobilis* UFPEDA revelou regiões gênicas com elevado grau de conservação. A partir destes resultados é possível revelar a estabilidade e o grau de conservação da região do gene 16S rDNA em todas as linhagens de *Z. mobilis* UFPEDA utilizadas no presente estudo. Também foi possível observar que as linhagens de coleções internacionais diferem das linhagens de *Z. mobilis* UFPEDA por algumas mutações de bases.

Essas mutações pontuais são também chamadas de polimorfismos de base única (SNPs – *Single Nucleotide Polymorphism*). Os SNPs ocorrem ao longo de todo genoma e apresentam vantagens para a caracterização bacteriana, além de um grande número de plataformas desenvolvidas para analisar tais marcadores [26-27]. Por esses fatores, vários pesquisadores utilizam esta técnica para estabelecer relações filogenéticas entre isolados bacterianos. Marques *et al.* (2011) [28] e Wang *et al.* (2010) [29], que analisaram a variabilidade genética por meio da detecção de SNPs nas sequências do gene 16S rDNA em isolados de *Ureoplasma diversum* e *Mycobacteria*, respectivamente, concluíram que esta técnica pode ser utilizada para estabelecer padrões epidemiológicos diferenciando isolados de diferentes espécies.

5.4 Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA)

Desde 1976, os métodos utilizados na identificação de *Z. mobilis*, a nível de subespécie, são baseados em testes fisiológicos (Swings e Deley, 1977) [1]. Esses testes consomem tempo e são duvidosos. Por esta razão, técnicas moleculares são propostas como uma alternativa para identificação dessas bactérias. Dentre as várias técnicas moleculares disponíveis para a caracterização de isolados bacterianos, uma das mais

sequências foram obtidos a partir da clivagem *in silico* através do programa WebCutter 2.0. Para a enzima *HaeIII*, foram obtidos três perfis de restrição, um para as linhagens de *Z. mobilis* da Coleção de Micro-organismos UFPEDA e para a linhagem *Z. mobilis* subsp. *mobilis* LGM 445, no qual foi possível observar 8 fragmentos de 487, 281, 222, 131, 85, 71, 48 e 4pb. Outro perfil foi obtido para a linhagem *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* LMG 448, contendo 8 fragmentos de 487, 281, 179, 156, 85, 71, 66 e 4pb. Já *Z. mobilis* subsp. *francensis* AN0101 apresentou um perfil de restrição contendo 9 fragmentos de 487, 281, 156, 131, 85, 71, 66, 48 e 4pb (Tabela 7).

A partir da restrição teórica com a enzima *StuI*, foram observados dois perfis: um para as linhagens de *Z. mobilis* UFPEDA e para a linhagem *Z. mobilis* subsp. *mobilis* LGM 445, contendo 3 fragmentos de 947, 311 e 71pb; e outro para as linhagens *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* LMG 448 e *Z. mobilis* subsp. *francensis* AN0101, no qual foi observado 4 fragmentos de 947, 160, 151 e 71pb (Tabela 7).

Para a enzima *NdeII*, também foram observados dois perfis de restrição: um para *Z. mobilis* subsp. *francensis* AN0101, com 6 fragmentos de 945, 103, 98, 83, 76 e 24pb, e o outro para as demais linhagens, contendo 8 fragmentos de 588, 318, 103, 98, 83, 76, 39, 24pb.

Srutková *et al.* (2011) [37], estudaram a eficiência de vários métodos de identificação molecular baseados em PCR, e observaram que o ARDRA foi a técnica mais rápida e eficiente para a identificação das subespécies de *Bifidobacterium longum*. Coton *et al.* (2005) [10], sugeriram a utilização das endonucleases de restrição *NdeII*, *HaeIII* e *StuI* na técnica ARDRA para identificar as subespécies de *Z. mobilis*. Ao combinar o perfil de restrição teórico para essas três endonucleases (Figura 2), foi possível distribuir as 32 amostras de UFPEDA conforme descrito anteriormente na análise de sequências. Contudo, a diversidade genética adicional só pode ser detectada através do sequenciamento, que apresenta maior poder discriminatório, considerando SNPs não detectados pelo ARDRA.

A relação de proximidade entre as linhagens de *Z. mobilis* UFPEDA revelada pelos perfis de restrição teórico foi confirmada pelos perfis de bandas obtidos pela digestão do produto de PCR do gene 16S rDNA com as enzimas *Hae III*, *NdeII* e *StuI*.

Na digestão com a enzima *Hae III* foi observado apenas um perfil de restrição, com 5 fragmentos de aproximadamente 600, 400, 300, 200 e 100pb (Figura 6). A digestão com as enzimas *NdeII* e *StuI* também foi observado apenas um único perfil de

restrição, com 3 fragmentos com pesos moleculares de aproximadamente 600, 400 e 200pb e 2 fragmentos de 1000 e 500 pb, respectivamente (Figuras 7 e 8).

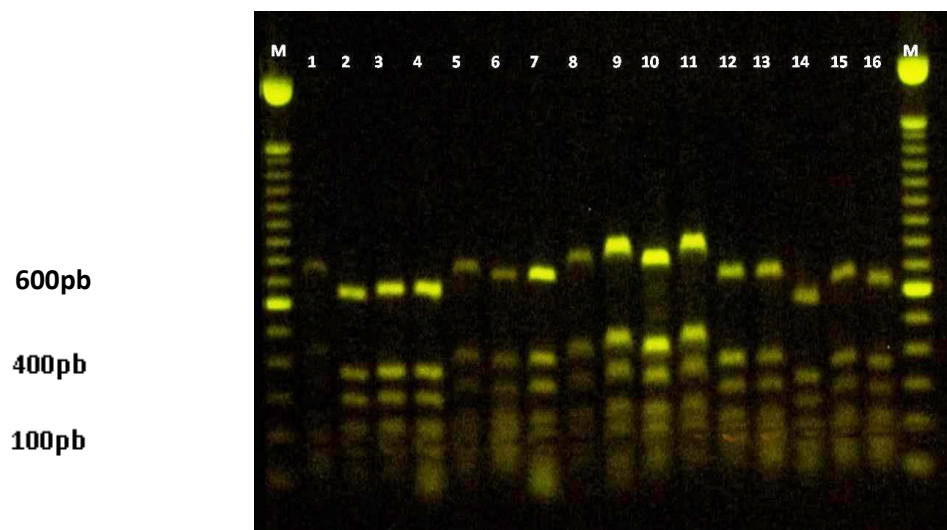


Figura 6: Perfil de restrição do gene 16S rDNA de algumas linhagens de *Zymomonas mobilis* UFPEDA após digestão com a enzima *Hae III*. M: DNA Ladder 100 pb; 1: CP₁; 2: CP₃; 3: ZAP; 4: ZAG-4; 5: Z-1-86B; 6: P4; 7: Z-1-81A; 8: Z-1-87; 9: Z-3-88; 10: Z-5-88; 11: Z-1-96; 12: Z-2-85; 13: AG-11; 14: Z-6-88; 15: Z-1-97; 16: ZM4.

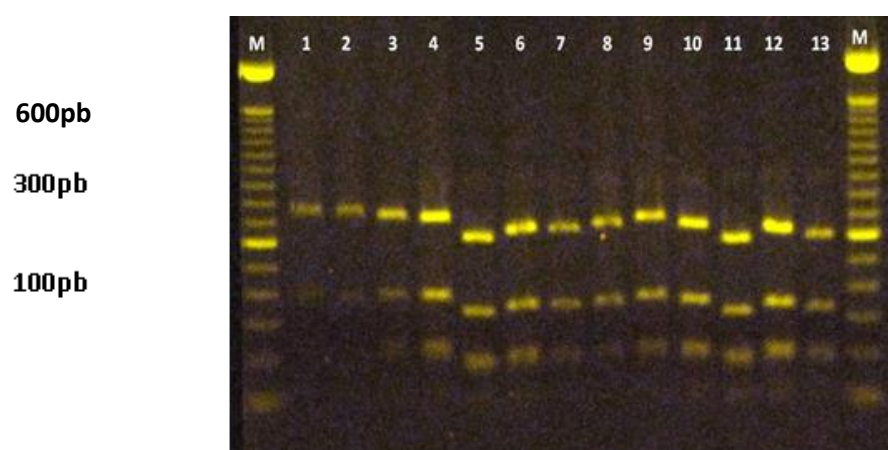


Figura 7: Perfil de restrição do gene 16S rDNA de algumas linhagens de *Zymomonas mobilis* UFPEDA após digestão com a enzima *Nde II*. M: DNA Ladder 100 pb; 1: CP₂; 2: CP₄; 3: ZAP; 4: ZAG-12; 5: Z-1-86B; 6: ZAG-12; 7: Z-1-87; 8: Z-1-88; 9: Z-3-88; 10: Z-1-97; 11: Z-1-85; 12: Z-2-85; 13: Z-2-97.



Figura 8: Perfil de restrição do gene 16S rDNA de algumas linhagens de *Zymomonas mobilis* UFPEDA após digestão com a enzima *StuI*. M: DNA Ladder 100 pb; 1: CP2; 2: CP4; 3: ZAP; 4: ZAG-12; 5: Z-1-86B; 6: Z-2-80; 7: Z-1-87; 8: Z-1-88; 9: Z-2-88; 10: Z-1-97; 11: Z-1-96; 12: Z-2-85; 13: ZAG-6.

5.5 Análises filogenéticas

A partir das sequências de 16S rDNA de linhagens de *Z. mobilis* UFPEDA e outras *Z. mobilis* previamente depositadas no GenBank, um dendograma foi gerado pelo programa ClustalW (Figura 4). Através do dendograma, foi observado que as linhagens da Coleção de Micro-organismos UFPEDA formaram um grupo único com *Z. mobilis* subsp. *mobilis* LMG445, sugerindo que as linhagens depositadas nesta coleção pertencem a esta subespécie. As linhagens *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* LMG448 e *Z. mobilis* subsp. *francensis* AN0101, representantes das outras subespécies, formaram grupos distintos (Figura 9).

A análise do perfil de restrição teórico do gene 16S rDNA permitiu a construção de um dendograma para cada enzima utilizada no presente estudo: *HaeIII*, *NdeII* e *StuI*. O dendograma gerado a partir do padrão de restrição da enzima *HaeIII*, formou três grupos distintos: um para as linhagens *Z. mobilis* UFPEDA e *Z. mobilis* subsp. *mobilis* LMG 445; outro para a *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* LMG 448 e o terceiro para a *Z. mobilis* subsp. *francensis*, diferenciando as linhagens à nível de subespécies (Figura 10).

O dendograma construído a partir do perfil de restrição da enzima *NdeII* agrupou as linhagens de *Z. mobilis* UFPEDA juntamente com a *Z. mobilis* subsp. *mobilis* LMG 445 e *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* LMG 448, diferenciando a *Z. mobilis*

subsp. *francensis* (Figura 11). A análise do perfil de restrição teórico da enzima *StuI* gerou um dendograma que formou dois grupos distintos, um agrupando as linhagens de *Z. mobilis* UFPEDA e *Z. mobilis* subsp. *mobilis* e outro *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* e *Z. mobilis* subsp. *francensis* (Figura 12).

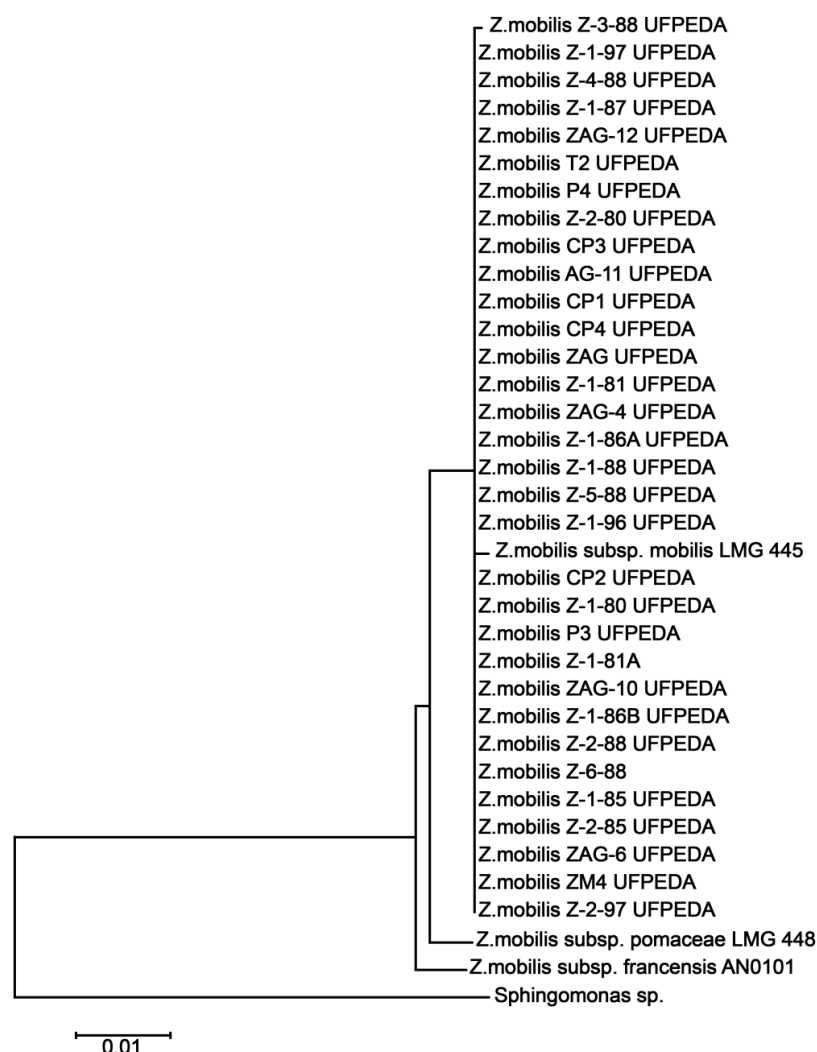


Figura 8: Dendrograma gerado a partir das sequências de 16S rDNA de linhagens de *Zymomonas mobilis* UFPEDA e de dados obtidos no GenBank (ClustalW, Neighbor-Joining).

A análise dos dendogramas confirmam os resultados obtidos pela análise das sequências do gene 16S e pelas análises dos perfis de restrição teóricos das enzimas estudadas. A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se confirmar a estabilidade e o grau de conservação das linhagens de *Z. mobilis* depositadas na Coleção de Micro-organismos UFPEDA, além de sugerir que todas pertencem à subespécie *Z. mobilis* subsp. *mobilis*.

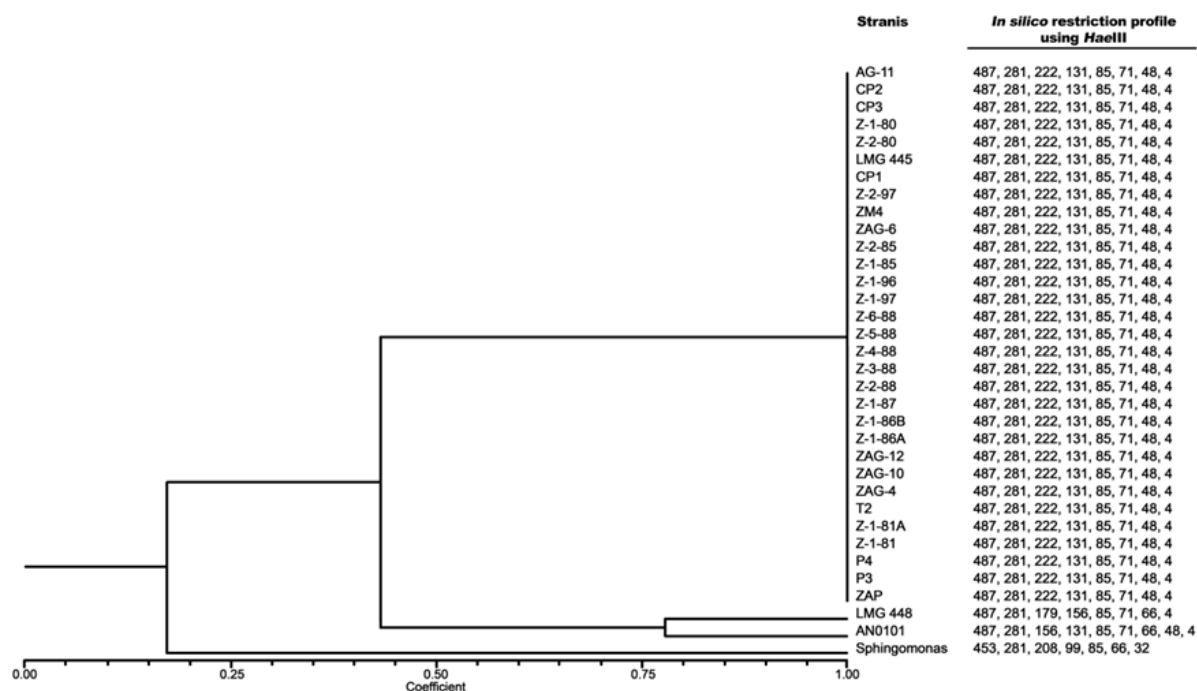


Figura 9: Dendrograma gerado a partir dos perfis de restrição teóricos do 16S rDNA com a enzima *HaeIII* de linhagens de *Zymomonas mobilis* UFPEDA e de dados obtidos no GenBank (NTSYSpc v.2.1, coeficiente de Jacard, UPGMA).

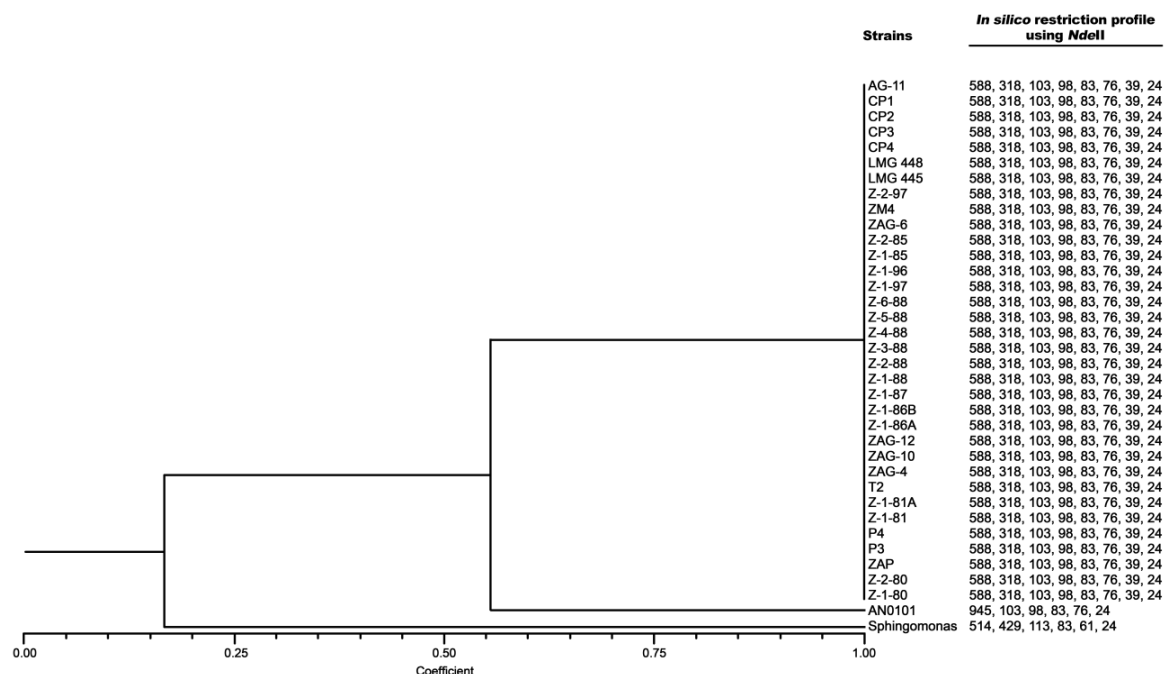


Figura 10: Dendrograma gerado a partir dos perfis de restrição teóricos do 16S rDNA com a enzima *NdeII* de linhagens de *Zymomonas mobilis* UFPEDA e de dados obtidos no GenBank (NTSYSpc v.2.1, coeficiente de Jacard, UPGMA).

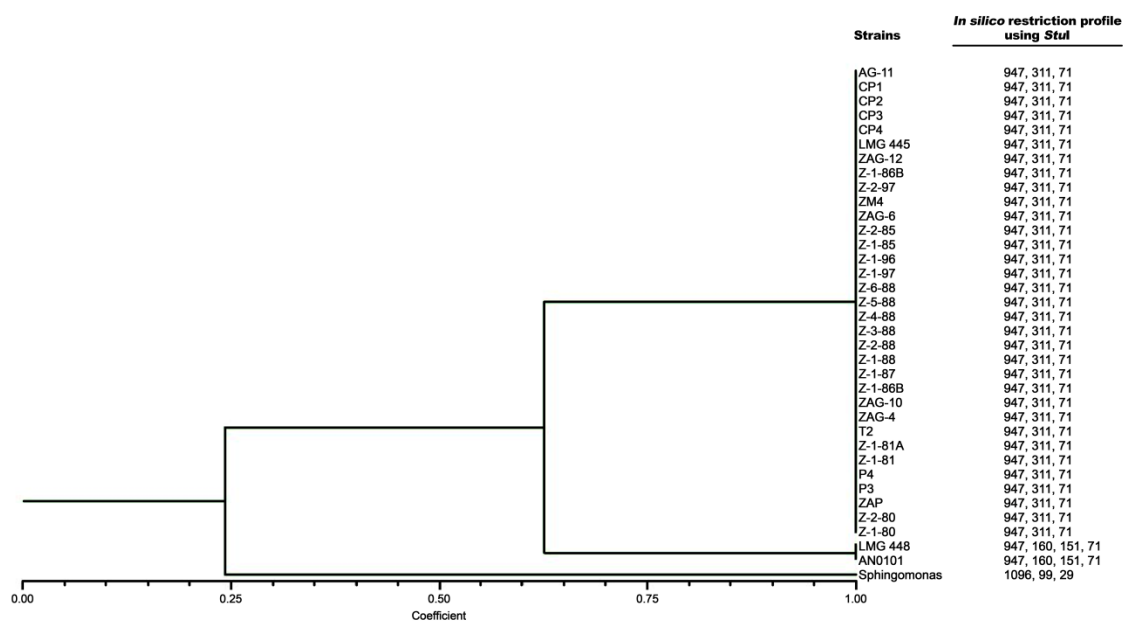


Figura 11: Dendrograma gerado a partir dos perfis de restrição teóricos do 16S rDNA com a enzima *StuI* de linhagens de *Zymomonas mobilis* UFPEDA e de dados obtidos no GenBank (NTSYSpc v.2.1, coeficiente de Jacard, UPGMA).

6. CONCLUSÃO

A análise das sequências obtidas no presente estudo revelou o elevado grau de conservação no gene 16SrDNA, confirmando a relação de proximidade das linhagens de *Zymomonas mobilis* depositadas na Coleção de Micro-organismos UFPEDA e a proximidade com a *Z. mobilis* subsp. *mobilis* LMG445, sugerindo que as linhagens desta coleção pertencem a esta subespécie.

Além disso, conclui-se que a análise do perfil restrição teórico do gene 16S rDNA possibilita a diferenciação de *Z. mobilis*, a nível de subespécie, mas não é eficaz para analisar a variabilidade genética entre as linhagens de *Z. mobilis* UFPEDA.

Baseados nestes resultados, outros marcadores filogenéticos devem ser empregados para analisar a variabilidade genética destas linhagens, possibilitando um melhor conhecimento da diversidade desta bactéria.

7. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F.M. 2004. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. **Journal of veterinary medicine. B. Infectious diseases and veterinary public health**, 51:380-388.

ABUD, A. K. S.; CARNEIRO, C. C.; ALVES, T. L. M.; PINTO, J. C.; PINHEIRO, I. O. 2003. Estudo da cinética da produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis*. In: **SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTACÕES**, Florianópolis. *Anais do Simpósio Nacional de Fermentações*. Florianópolis: UFSC, CD-ROM.

ANANTHALAKSHMY, V.K.; GUNASEKARAN, P. 1999. Overproduction of levan in *Zymomonas mobilis* by using cloned *sacB* gene. **Enzyme and Microbial Technology**, 25:109-115.

ANTON, A. I.; MARTINEZ, A. J.; RODRIGUEZ-VALERA, F. 1998. Sequence diversity in the 16S–23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons in representatives of the *Escherichia coli* ECOR collection. **Journal of Molecular Evolution** 47: 62–72.

BARKER, B.T.P., HILLIER, V.F. 1912 Cider sickness. **J Agric Sci**. 5:67-85.

BARROW, K. D.; COLLINS, J. G.; LEIGHT, D. A.; ROGERS, P. L.; WARR, R. G. 1984. Sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 20: 225-232.

BEKERS, M.; SHVINKA, J.; RAIPULIS, J.; LAIVENIEKS, M.; PANKOVA, L.; MEZBARDE, I. 1993. Strain *Zymomonas mobilis* – The producer of levan. **Latvian Patent 5909**.

BOURQUE, S. N.; VALERO, J.R.; LAVOIE, M. C.; LEVESQUE, R. C. 1995. Comparative analysis of the 16S to 23S ribosomal intergenic spacer sequences of *Bacillus thuringiensis* strains and subspecies and of closely related species. **Applied Environmental Microbiology** 61: 1623–1626.

CALAZANS, G. M. T.; RIOS, E. M.; FALCÃO DE MORAIS, J. O.; SOUZA, M. F. V. Q.; MARÇAL, S. F.; LOPES, C. E. 1989. Produção de etanol e levana por *Zymomonas*

mobilis amostra ZAP, em meio de sacarose. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 32, 4: 631-636.

CARR, J. G. Genus *Zymomonas*. In: *Bergey's: Manual of determinative bacteriology*. 8. ed. Baltimore:Williams& Wilkins. P.8-21. 1974.

CASOTTI, J. F. NETO, D. C.; BRUZON, G.; MACHADO, R. A. M.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. 2007. Uso de matérias primas da agroindústria – garapa e extrato de levedura – na produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis* CP4. **Semina: Ciências Agrárias** 28:653-658.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SCARMINO, I. S.; SILVA, R. S. F. 2005. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. **Process Biochemistry** 40:747- 751.

CLARRIDGE III, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, 17 (4):840-862.

CORNISH-BOWDEN, A.; CARDENAS, M. L. 2000. From genome to cellular phenotype—a role for metabolic flux analysis? **Nature Biotechnology**, 18:267–268.

COTON, M.; LAPLACE, J.; AUFRAY, Y.; COTON, E. 2006. Polyphasic study of *Zymomonas mobilis* strains revealing the existence of a novel subspecies *Z. mobilis* subsp. *francensis* subsp. nov., isolated from French cider. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 56: 121–125.

COTON, M.; LAPLACE, J.; COTON, E. 2005. *Zymomonas mobilis* subspecies identification by amplified ribosomal DNA restriction analysis. **Letters in Applied Microbiology** 40: 152–157.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVER, V. M.; MANFIO, G. P.; ROSADO, A. S. 1999. Evaluating the microbial diversity of soil samples: metodological innovation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 71(3): 491-503.

COTON, M.; LAPLACE, J.; COTON, E. 2005. *Zymomonas mobilis* subspecies identification by amplified ribosomal DNA restriction analysis. **Letters in Applied Microbiology** 40: 152–157.

DADDS, M. J.; MARTIN, P. A. 1973. The genus *Zymomonas* a review. **Journal of the Institute of Brewing**, 79:386-391.

DALLY, E.L.; STOKES, H.W.; EVELEIGH, D.E. 1982 A genetic comparison of strains of *Zymomonas mobilis* by analysis of plasmid DNA. **Biotechnology Letters**, 4:91-96.
 ERNANDES, F.M.P.G. Produção de levana por *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* utilizando três meios de cultura sintéticos e um alternativo (caldo de cana-de açúcar). 2006. **Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos)**. Universidade Estadual Paulista. 2006

DOELLE, H. W.; GREENFIELD, P. F. 1985. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* at high sucrose concentrations. **Applied Microbiology Biotechnology**, 22: 411-415.

ERNANDES, F. M. P. G; GARCIA-CRUZ, C. H. 2005. Levana bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências agrárias**, 26: 71-82.

FAGBOLA, O.; ABANG, M. M. 2004. Colletotrichum circinans and Colletotrichum coccodes can be distinguished by DGGE analysis of PCR-amplified 18S rDNA fragments. **African Journal of Biotechnology** 3: 195-198.

FALCÃO DE MORAIS, J. O. 1982. *Zymomonas mobilis* e seu possível emprego como agente de fermentação alcoólica. **Revista do Instituto de Antibióticos** 21:169-182.

FALCÃO DE MORAIS, J. O.; ARAÚJO, J. M.; RIOS, E. M.; MELO, B. R. 1983. Isolamento de *Zymomonas mobilis* em mosto de caldo de cana de fermentações alcoólicas industriais. **Review Microbiology** 14: 6-10.

FALCÃO DE MORAIS, J. O.; RIOS, E. M. M. M.; CALAZANS; G. M. T.; LOPES, C. E. 1993. *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. **Journal of Biotechnology** 31: 75-91.

FERRAZ, E. M. BACELAR, T. S.; MATHIAS, C. A. C.; ARAUJO JUNIOR, J. G. C.; SCHUMACHER, I. E.; PISCIOTTANO, M. N. C.; FERRAZ, A. A. B. 1998. *Zymomonas mobilis* antibiosis – A coadjuvant strategy in the prevention of experimental intraabdominal infection. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva** 13: 3-6.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M.; NAYAK, R. 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. **Infections, Genetic and Evolution**, 9:430–440.

GONÇALVES DE LIMA, O., ARAÚJO, J. M., SCHUMACHER, I. E. ; CAVALCANTI DA SILVA, E. 1970. Estudos de microrganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas usadas pelo povo do Recife. I – Sobre uma variedade de *Zymomonas mobilis* (Lindner) Kluyver e Van Niel (1936): *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* (GONÇALVES DE LIMA; ARAÚJO; SCHUMACHER; CAVALCANTI) (1970), isolada da bebida popular “caldo de cana picado”. **Revista Instituto de Antibióticos** 10: 57-69.

GONÇALVES DE LIMA, O.; CARMONA , L. 1951. Aislamento y propiedades antagonistas de *Pseudomonas lindneri*. **UNAM Congreso Científico Mexicano**.

GONÇALVES DE LIMA, O; SCHUMACHER, I.E.; ARAÚJO, J.M. 1968. Novas observações sobre a ação antagonista de *Zymomonas mobilis* (Lindner) (1928), Kluyver e Van Niel (1936). **Revista do Instituto de Antibióticos** 8: 19-48.

GRIFONI, A.; BAZZICALUPO, M.; DI SERI, C.; FANCELL, S.; FANI, R. 1995. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA of the histidine operon. **FEMS Microbiological Letters**, 127:85-91.

GUTLER, V.; STANISICH, V. A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology** 142: 3–16.

HATZIMANIKATIS, V.; EMMERLING, M., SAUER, U.; BAILEY, J.E. 1998. Application of mathematical tools for metabolic design of microbial ethanol production. **Biotechnology and Bioengineering**, 58: 154–161.

HOUGH, C.A.M.; PARKER, K.J.; VLITOS, A.J. 1979. Developments in sweeteners. **Applied Science Publisher**.

JEREZ, M. C. D. Estudo comparativo de diferentes métodos e condições de fermentação de melão de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis*. 1993. **Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos)** – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

KÁDÁR, Z. S.; SZENGYEL, Z. S; RÉCZEY, K. 2004. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products* 20: 103-110.

KANNAN, T. R., SANGILIYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. 1998. Improved ethanol production from sucrose by a mutant of *Zymomonas mobilis* lacking sucrases in immobilized cell fermentation. **Enzyme and Microbial Technology** 22: 179-184.

KANG, H-L; KANG, H-S.1998. A physical map of the genome of ethanol fermentative bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4 and localization of genes on the map. **Gene**, 206:223-22.

KANG, A. S.; HONG, K.; JANG, K.; KIM, Y. Y.; CHOUE, R.; LIM, Y. 2006. Altered m-RNA expression of hepatic lipogenic enzyme and PPAR α in rats fed dietary levan from *Zymomonas mobilis*. **Journal of nutritional Biochemistry** 17: 419-426.

KOUVELIS, V. N. et al., 2009. Complete genome sequence of the ethanol producer *Zymomonas mobilis* NCIMB 1163. **Journal of Bacteriology**, 193: 7140-1.

KOUVELIS, V. N. et al., 2011. Genome sequence of the ethanol-producing *Zymomonas mobilis* subsp. *Pomaceae* lectotype strain ATCC 29192. **Journal of Bacteriology**, 193: 5049-5050.

KRETCHMER, N.; HOLLENBECK, C.B. 1991. Sugars and Sweeteners. Florida: CRC Press.

KUKLINSKY-SOBRA, J.; ARAU, W. L.; MENDES, R.; PIZZIRANIKLEINER, A.A.; AZEVEDO, J. L.2005. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine Max*) grown in the soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, The Hague, 273:91-99.

LEE, J.S.; JIN, S.J.; KANG, H.S. 2001. Molecular organization of the ribosomal RNA transcription unit and the phylogenetic study of *Zymomonas mobilis* ZM4. **Molecules and Cells**, 11:68–74.

LEI, X; WANG, E. T.; CHEN, W. F.; SUI, X. H.; CHEN, W.X. 2008. Diverse bacteria isolated from root nodules of wild *Vicia* species grown in temperate region of China. **Archiver of Microbiology**, 190:657-671.

LIMA, G. M. S. 2002. Ocorrência de Bacteriocina e Caracterização Molecular de linhagens de *Zymomonas mobilis*. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia de produtos Biotivos. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

LOPES, C.A.C.; GONÇALVES DE LIMA, O; FILHO, A. A. S.; SILVA, E. C.; MELO, B. R. 1980. Efeitos obtidos com o emprego de cultura de *Zymomonas mobilis* variedade *recifensis* em pacientes portadores de enterocolites bacterianas. **Revista do Instituto de Antibióticos** 20: 69-78.

LUVITTO, D. M. 2008. Caracterização fisiológica e molecular de Burkholderia ssp. Associadas às raízes de cana-de-açúcar. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**. Universidade de São Paulo.

MARSHALL, M. N.; COCOLIN, L.; MILLS, D. A.; VANDERGREYNST, J. S. 2003. Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electroforesis analysis of fungal communities in compost. **Journal of Applied Microbiology** 95: 934-948.

MCDONALD, B. A. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. **Phytopathology** 87:448-453.

McGILL, D.J.; DAWES, E. A. 1971. Glucose and fructose metabolism in *Zymomonas anaerobia*. **Biochemical Journal**, 125:1059-10668.

MCLELLAN, P. J.; DAUGULIS, A. J.; LI, J. 1999. The Incidence of Oscillatory Behaviour in the Continuous Fermentation of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Progress** 15: 667-680.

MELO, I. R.; PIMENTEL, M. F.; LOPES, C. E.; CALAZANS, G.M.T. 2007. Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal of Microbiology** 38: 45-51.

MILLIS, N.F. A study of the cider-sickness *Bacillus*: a new variety of *Zymomonas anaerobia*. **Journal of General Microbiology**. V.15, p.521-528, 1956.

MILLIS, N.F. Some bacterial fermentationsof cider. **Ph.D. thesis**, University of Bristol, Bristol, U.K. 1951.

MOCALI, S. et. al. 2003. Fluctuation of bacteria isolated from tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, 154(4):105-114.

MURAYAMA, M.; KAKINUMA, Y.; MAEDA, Y.; RAO, J. R.; MATSUDA, M.; XU, J.; MOORE, P. J. A.; MILLAR, C. B.; ROONEY, P. J.; GOLDSMITH, C. E.; LOUGHREY, A.; MCMAHON, M. S.; MCDOWELL, D. A.; MOORE, J. E. 2010. Molecular identification of airborne bacteria associated with aerial spraying of bovine

slurry waste employing 16S rRNA gene PCR and gene sequencing techniques. **Ecotoxicology and environmental safety**.73: 443-447.

OLIVEIRA, V. C.; COSTA, J. L. S. 2002. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira** 27: 631-634.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, 37(6): 1661-1669.

OLSEN, J. E.; BROWN, D. J.; SKOV, M. N.; CHRISTENSEN, J. P. 1993. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis applications in investigations of salmonellosis among livestock. **Veterinary Quarterly**, 15(4):125-135.

PALLERONI, N. J. 1993. Pseudomonas classification – a new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, 64: 231-251.

PALMAROLA-ADRADOS, B.; CHOTEBORSKÁ, P.; GALBE, M.; ZACCHI G. 2005. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. **Bioresource technology** 96: 843-850.

PAPPAS, K. M. et al., 2011. Genome sequence of the ethanol-producing *Zymomonas mobilis* subsp. *Mobilis* lectotype strain ATCC 10988. **Journal of Bacteriology**, 193: 5051-5052.

PENNANEN, T.; PAAVOLAINEN, L.; HANTULA, J. 2001. Rapid PCR-based method for the direct analysis of fungal communities in complex environmental samples. *Soil Biology* ; **Biochemistry** 33: 697-699.

ROGERS, P.L.; LEE, K. J.; TRIBE, D. E. 1979. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentrations. **Biotechnology Letters** 1:165-170.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; ELSAS, J.D. 1997. Molecular microbial ecology: a minireview. **Rev. Microbiologia**, 28: 135-147.

RUANGLEK, V.; MANEEWATLHANA, D.; TRIPETCHKUL, S. 2006. Evaluation of thai agro industrial wastes for bio-ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry** 41: 1432-1437.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratoryManual**, 2ª edição. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANTOS, J. F. M.; VASCONCELOS, J.; SOUZA, J. R.; COUTINHO, E. M.; MONTENEGRO, S. M. L.; AZEVEDO-XIMENES, E. 2004. The effect of *Zymomonas mobilis* culture on experimental *Schistosoma mansoni* infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 37: 502-504.

SCHUMACHER, I.E.; AMORIN, F.T.P.; CAETANO, M.N.P. *Zymomonas mobilis* I-ensaio de antibiose frente a 15 cepas de *S. aureus* multirresistentes isoladas no Recife. **In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, n.MH-240, 1997, Rio de Janeiro, Anais do XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997, p. 100

SHANE, G. S.; JOACHIMSTHAL, E. L.; DUNN, N. W.; ROGERS, P. L. 2000. Isolation and preliminary characterization of a *Zymomonas mobilis* mutant with an altered preference for xylose and glucose utilization. **Biotechnology Letters** 22: 157-164.

SHENE, C.; BRAVO, S. 2001. *Zymomonas mobilis* CP4 fed-batch fermentations of glucose-fructose mixtures to ethanol and sorbitol. **Applied Microbiology and Biotechnology** 57: 323-328.

SILVA, C. G. M. 2007. Processo biotecnológico para conversão de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) Tese de Doutorado em Nutrição. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE.

SILVA, J. M. 2000. Caracterização molecular de linhagens selvagens de *Zymomonas mobilis* (Ag11 e ZAP) e suas recombinantes. Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

SILVEIRA, M. M.; WISBERCK, E.; LEMMEL, C.; ERZINGER, G.; COSTA, J. P. L.; BERTASSO, M. 1999. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Biotechnology** 75: 99-103.

SONG, K.B. et al. Nucleotide and derived amino acid sequences of an extracellular sucrase gene (*inv B*) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC10988). 1994. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1219:63-166.

SOUZA, C.; SOUZA, L.A.G. 1973. Colpitis and vulvovaginitis treatment using *Zymomonas mobilis* var. *recifensis*. **Revista do Instituto de Antibióticos** 13: 85-87.

SPRENGER, G. A. 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. Mini review. **FEMS Microbiology Letters** 145: 301-307.

SWINGS, J. (1996) Exploration of prokaryotic diversity employing taxonomy. **In: Microbial diversity and ecosystem function**. Eds. D. Allsopp, R.R. Colwell, D.L. Hawksworth, Egham: CAB International, p.482.

STAHL, D. A. 1997. Molecular approaches for the measurement of density, diversity and phylogeny. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MCINERNEY, M. J.;

STETZENBACH, L. D.; WATER, M. W. **Manual of environmental microbiology**. Washington: ASM Press, p. 102-114.

STEINER, P. et al. Cloning and expression of the *Zymomonas mobilis* pyruvate kinase gene in *Escherichia coli*. 1998. **Gene**, 220: 1-38.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.E. 1994. 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** 44, 846–849.

SUN, L.; QUIU, F; ZHANG, X.; DAI, X.; DONG, X.; SONG, W. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. **Microbial Ecology**, 55(3): 415-424.

SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriological Reviews**. 41:1–46, 1977.

TANAKA, H.; EBATA, T.; KUWAHARA, I.; MATSUO, M.; OGBONNA, J. C. 1999. Development and application of a system for analysis of mixed cultures of microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 80: 51-64.

TAYLOR, E.; BATES, J.; KENYON, D.; MACCAFERRI, M.; THOMAS, J. 2001. Modern molecular methods for characterization and diagnosis of seed-borne fungal pathogens. **Journal of Plant Pathology** 83: 75-81.

TANO, M. S.; BUZATO, J. B. 2003. Effect of the presence of initial ethanol production in sugar cane juice fermented by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal of Microbiology** 34: 242-244.

TOMA, M. M.; KALNENIEKS, U.; BERZINS, A.; VIGANTS, A.; RIKMANIS, M.; VIESTURS, U. 2003. The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture. **Process Biochemistry**, 38:1347-1350, 2003.

TONOMURA, K.; TONOMURA, K.; KUROSE, N.; KONISHI, S.; KAWASAKI, H. 1982. Occurrence of plasmid in *Zymomonas mobilis*. **Agricultural and Biological Chemistry** 46: 2851-2853.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

UENO, M.; JORGE, A. O. C. 2001. Caracterização de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, envolvidos em infecções nosocomiais, por meio de técnicas fenotípicas e análise de perfil plasmidial. **Revista Biociência**, 7 (2):15-22.

VAN ELSAS, J. D.; DUARTE, G. F.; ROSADO, A. S.; SMALLA, K. 1998. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. **Journal of Microbiological Methods** 32: 133-154.

VIGNOLI, J. A.; CELLIGOI, M. A. P. C.; SILVA, R. S. F. Development of a statical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa Cylindrica*. **Process Biochemistry** 41: 240-243, 2006.

VIIKARI, L. 1984a Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 19: 225-252.

VIIKARI, L. 1984b. Formation of sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 20: 118-123.

WANICK, M.C. ARAÚJO, J. M.; SILVA, E. C.; SCHUMACHER, I. E. 1970. Cura de vaginites de etiologia variada pelo emprego de cultura de *Zymomonas mobilis*

(LINDNER, 1928), KLUYVER ; VAN NIEL (1936). **Revista do Instituto de Antibióticos** 10: 47-50.

WANICK, M.C.; SILVA, E. C.1971. Novas observações sobre o emprego de *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* em infecções por *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans* e *Trichomonas vaginalis*. **Revista do Instituto de Antibióticos** 11: 69-71.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology** 173:697-703, 1991.

WOODSON, S. A.; LEONTI, N. B. 1998. Structure and dynamics of ribosomal RNA. *Current Opinion in Structure Biology*, 8(3): 294-300.

YABLONSKY, M.D. et al. *Zymomonas mobilis* CP4: a clarification of strains via plasmid profile. **Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 71-80, 1988.

YANG, S.; TSCHAPLINSKI, T. J.; ENGLE, N. L.; CARROLL, S. L.; MARTIN, S. L.; DAVISON, B. H.; PALUMBO, A. V.; RODRIGUEZ JR, M; BROWN, S. D. Transcriptomic and metabolomic profiling of *Zymomonas mobilis* during aerobic and anaerobic fermentations. **BMC Genomics**, v. 10, n. 34, 2009.

YUN, J. W. 1996. Fructooligosaccharides: Occurrence, preparation and application. **Enzyme and Microbial Technology**.19:107-117.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 56:17-34.