

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

ALLYSON ANDRADE MENDONÇA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DE
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANO NA BACTÉRIA
*LACTOBACILLUS VINI***

RECIFE, PE

2014

ALLYSON ANDRADE MENDONÇA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DE
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANO NA BACTÉRIA
*LACTOBACILLUS VINI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio de Morais Júnior

Coorientador: Prof^aDr^a Márcia Maria Camargo de Morais

Recife

2014

Catálogo na Fonte:
Elaine Cristina Barroso
CRB 1728

Mendonça, AllysonAndrade

Identificação e caracterização dos genes de resistência a antimicrobianos na bactéria *Lactobacillus vini* Allyson Andrade Mendonça. – Recife: O Autor, 2014.

61 f.: il., fig., tab.

Orientador: Marcos Antonio Morais Júnior

Coorientadora: Márcia Maria Camargo de Morais

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Genética, 2014.

Inclui bibliografia e anexo

1. Lactobacilo 2. Fermentação I. Morais Júnior, Marcos Antonio (orientador) II. Morais, Márcia Maria Camargo (coorientadora) III. Título

579.37

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-205

ALLYSON ANDRADE MENDONÇA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DE
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANO NA BACTÉRIA
*LACTOBACILLUS VINI***

Aprovado em 13/03/2014

Banca Examinadora:

**Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dr^a. Márcia Maria Camargo de Moraes
Universidade de Pernambuco**

**Dr. Antônio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dr^a. Brígida Lucena
Universidade Estadual da Paraíba**

Recife

2014

Dedico este trabalho a minha família que com seu apoio me permitiu chegar até o dia de hoje. Em especial ao meu pai que não pôde me acompanhar em todo este caminho, mas que seus ensinamentos de retidão e perseverança me guiaram através dos obstáculos. Nem sempre através da trilha mais fácil, mas nunca me deixando próximo dos caminhos errados.

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

Benjamin Disrael

Agradecimentos

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Resistência Bacteriana que de forma direta ou indireta colaboraram com este trabalho. Em especial a Barbara de Oliveira, Amanda Cristina Guimarães, Kássia Aliança e Caio Aires. Ao Núcleo de Engenharia Metabólica pela estrutura e ajuda, em especial, ao doutorando André Ribas e a Dr^a Carolina Elztein. Por fim aos meus orientadores o Dr. Marcos Morais e a Dr^a Márcia M.C. Morais aos quais agradeço a oportunidade deste trabalho e a todo o conhecimento que adquiri com sua ajuda e orientação.

Resumo

Os *Lactobacillus* são encontrados compondo grande parte da população contaminante do processo de produção de bioetanol e consomem os nutrientes do meio destinados a levedura. Para controlar o crescimento bacteriano, são utilizados ácido sulfúrico e antimicrobianos. *Lactobacillus vini* é um dos principais contaminantes nas destilarias do Nordeste Brasileiro e possui escassas informações na literatura. Dados da anotação, realizada com o RAST, dos genomas de *L. vini* disponíveis no NCBI indicaram a presença de ORFs sugestivas de β -lactamases. As ORFs e seu ambiente genético foram caracterizado *in silico* com as ferramentas ORFfinder, Swiss-Model, TMHMM e pI/MW. Novos isolados foram obtidos na safra 2012-2013. Amostras de mosto fermentado das destilarias Japungu e Miriri foram submetidas a uma pré-selecção para drogas industriais e destas a drogas de maior potência. Duas ORFs foram encontradas. A primeira sugestiva de metalo β -lactamases e a segunda de serino β -lactamase. Os dados da caracterização destas ORFs sugerem que *in vivo* exerçam a função de Ribonuclease e PBP, respectivamente. Dos isolamentos seis espécies foram obtidas, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus vini* e *Enterococcus faecalis*. Dos *L. vini* obtidos apenas um foi resistente a Doxiciclina e transferiu por conjugação este fenótipo a *E. faecalis* ATCC 29212. Concluimos que não há genes de β -lactamases intrínsecas nos genomas de *L. vini*, e sugerimos que possui genes de resistência a Doxiciclina mobilizáveis por plasmídios.

Palavras-chave: *Lactobacillus vini*; Resistência bacteriana; Fermentação alcoólica.

Abstract

The *Lactobacillus* are found representing most of the contaminating population of the bioethanol production process and consume the nutrients of the medium for yeast. To control bacterial growth, sulfuric acid and antimicrobials are utilized. *Lactobacillus vini* is one of the main contaminants in the Brazilian Northeast distilleries and has few information in the literature. Annotation data, performed with RAST, of the *L. vini* genome available on the NCBI indicated the presence of ORFs suggestive of β -lactamases. The ORFs and their genetic environment were characterized *in silico* with tools ORFfinder, Swiss-Model, TMHMM and pI/MW. New isolates were obtained from the 2012-2013 harvest. Samples of fermented mash from distilleries Japungu and Miriri were subjected to a pre-selection for the industrial drugs and these to drugs with greater potency. Two ORFs were found. The first suggestive of metallo β -lactamases and the second a serine β -lactamase. The characterization data of these ORFs suggest that *in vivo* perform the function of Ribonuclease and PBP, respectively. The isolates obtained were of six species, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus vini* and *Enterococcus faecalis*. Only one of the *L. vini* obtained was resistant to Doxycycline and transferred by conjugation this phenotype to *E. faecalis* ATCC 29212. We conclude that there is no intrinsic genes of β -lactamases in the genomes of *L. vini*, and suggested that there is genes of resistance to Doxycycline mobilized by plasmids.

Keywords: *Lactobacillus vini*; bacterial resistance; Alcoholic fermentation.

Lista de Ilustrações

Item	Página
Figura 1. Coloração de gram de <i>Lactobacillus acidophilus</i> proveniente de raspado da mucosa oral.	18
Figura 2. Produtos fermentados produzidos com organismos do gênero <i>Lactobacillus</i> em A) leite fermentado e em B) coalhada.	19
Figura 3. Vias de metabolismo energético principal em <i>Lactobacillus</i> em A) a via glicolítica de Embden-Meyerhof dos homofermentadores e em B) a via da Fosfoquetolase usada pelos heterofermentadores.	22
Figura 4. Representação cronológica dos momentos de coleta nas destilarias e o intervalo entre estas.	32
Figura 5. Etapas metodológicas usada no isolamento.	34
Figura 6. Resultado do alinhamento, com a ferramenta BLAST, das ORFs com domínio Lactamase_B nos dois genomas, linhagem industrial (JP789) e linhagem de referência (DSM 20605).	43
Figura 7. Modelo molecular da metalo β -lactamase dos genomas de <i>Lactobacillus vini</i> (LMV). (A) Modelo 3D do monômero de LMV; (B) Sítio ativo de LMV com os átomos de zinco ligantes.	44
Figura 8. Mapa físico de <i>bla_{LVM}</i> e dos genes adjacentes a ele no genoma de DSM 20605 e JP789.	45
Figura 9. Árvore filogenética das MBLs e da ORF de <i>L. vini</i> (LMV) pelo método de Neighbour-Joining.	46
Figura 10. Ensaio de expressão gênica da ORF LMV.	47
Figura 11. Resultado do alinhamento, com a ferramenta BLAST, das ORFs com domínio Beta-lactamase nos dois genomas, linhagem de referência (DSM 20605) e linhagem industrial (JP789).	48
Figura 12. Mapa físico da ORF com domínio Beta-Lactamase.	49
Figura 13. Foto representativa dos resultados das PCRs do gene <i>pheS</i> usado na identificação dos isolados bacterianos.	49

Lista de Tabelas

Item	Página
Tabela 1. Antibióticos industriais utilizados na avaliação da resistência bacteriana nas amostras das destilarias estudadas na safra 2012-2013.	32
Tabela 2. Distribuição das espécies isoladas na destilaria Japungu	51
Tabela 3. Distribuição das espécies isoladas da destilaria Miriri.	52

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

µg: Micrograma

µl: Microlitro

989: Droga Busan 989

991: Droga Busan 991

AERO: Droga Aeroflux

Asp: Aspartato

CIP: Droga Ciprofloxacina

D.O.: Densidade óptica

DNA: Dextrorribonucleic acid

DOX: Droga Doxiciclina

EXO V: Subunidade alfa da exonuclease V

GRAS: Generally Recognized As Safe

His: Histidina

INO: Mio-inositol-1(ou 4)-monofosfatase

JP: Destilaria Japungu Agroindustrial

KAM: Droga Kamoran

LAB: Bactérias Láctica

LB: Luria Bertani

LMV: *Lactobacillus vini* metalo β-lactamase

M: Destilaria Miriri Açúcar e Energia

MBL: metalo β-lactamase

MER: Droga Meropenem

MH: Mueller Hinton

MIC: Concentração inibitória mínima

ml: Mililitro

MRS: Man Rugosa-sharpe

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ORF: Abertura de Matrix de Leitura

OXI: Droga Oxitetraciclina

Pb: Pares de base

PBP: Proteína Ligadora de Penicilina

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PED: Peptídeo Desformilase

PEN: Droga Penicilina

PTS: Sistema de Fosfotransferase

RMMBL: Metallo beta-lactamase de metabolismo de RNA

RNA: Ácido Ribonucleico

rRNA: Ácido ribonucleico Ribossomal

TRS: Regulador Transcricional

YPD: Yeast Peptone Dextrose

ZN: Zinco

Sumário

1. Introdução.....	15
2. Revisão da literatura	18
2.1 O gênero Lactobacillus visão geral	18
2.1.1 Taxionomia e Filogenia do grupo	19
2.1.2 Metabolismo	21
2.1.3 Genômica	23
2.2 Fermentação alcoólica	23
2.3 Contaminação bacteriana na fermentação	26
2.4 Lactobacillus vini.....	28
3. Objetivos.....	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
4. Material e Métodos	31
4.1. Linhagem bacteriana e meios de cultura.....	31
4.2. Isolamento bacteriano.....	31
4.3. Identificação bacteriana	34
4.4. Identificação das ORFs (Open Read Frame) de β -lactamases no genoma de Lactobacillus vini.....	36
4.5. Modelagem molecular e análise in silico da proteína	37
4.6. Análise filogenética	37
4.7 Perfil de susceptibilidade das linhagens isoladas de Lactobacillus vini	38
4.8 Conjugação bacteriana	39
4.9 Extração plasmídial.....	40
4.10 Ensaio de expressão gênica	40
5. Resultados.....	43
5.1.1 ORF Lactamase_B.....	43
5.1.2 Análise filogenética	45
5.1.3 Análise fenotípica da presença da ORF LMV	47
5.2 ORF com domínio Beta-lactamase	47

5.3 Identificação das espécies e do perfil de resistência à antibióticos das bactérias industriais	49
5.4 Caracterização dos isolados industriais de <i>Lactobacillus vini</i>	53
6. Discussão	54
7. Conclusões	60
Referências Bibliográficas.....	61
Anexo A- Curriculum vitae (Lattes)	71

1. Introdução

Os *Lactobacillus* são bactérias muito diversas que podem ser encontradas no ambiente e compondo a microbiota entérica do homem e outros mamíferos (Makarova and Koonin, 2007; Claesson et al., 2007). Este gênero vem se destacando como um dos principais contaminantes do processo fermentativo industrial para produção de etanol por *Sacharomyces cerevisiae* (Narendranath et al., 1997; Skinner and Leathers, 2004; Lucena et al., 2010). A contaminação resulta em perda na produção de modo direto pela competição com a levedura pelo açúcar do meio e de modo indireto pela produção de compostos, como o lactato e o acetato, que diminuem a viabilidade das leveduras (Narendranath et al., 1997; Muthaiyan et al., 2011).

Uma das principais espécie contaminantes nas destilarias do Nordeste brasileiro descrito por Lucena (2010) foi *Lactobacillus vini*. Essa bactéria é um bacilo gram positivo, móvel, não esporulado, anaeróbio facultativo, catalase negativo, mesófilo, homofermentador (Marí et al., 2006). Foi primeiro isolada em 1978, presente na fermentação de uvas para produção de vinho, sendo identificada apenas até o nível de gênero (Barres, 1978). Estudos posteriores ao seu isolamento, utilizando técnicas de biologia molecular, trouxeram dúvidas quanto a sua classificação ao nível de espécie (Rodas et al., 2005). Rodas e colaboradores (2005) encontraram um cluster de espécimes que possuíam diferenças moleculares suficientes para serem reclassificadas ao nível de espécie e inclusive de gênero. Um ano após este trabalho, a caracterização completa de *L. vini* foi realizada (Marí et al., 2006) e logo descrições deste bacilo começaram a

ser feitas como invasor dos processos fermentativos industriais associado com a levedura *Dekkera bruxellensis* (Passoth et al., 2007).

O controle da contaminação é essencial para otimização dos rendimentos fermentativos (Muthaiyan et al., 2011). Em estudos onde a infecção foi realizada em condições controladas constatou-se perda de até 22% do rendimento fermentativos por conta dos *Lactobacillus* contaminantes (Skinner and Leathers, 2004). O controle das infecções, geralmente, utilizam tratamentos físicos e químicos (Chang et al., 1997) dos quais a administração de antimicrobianos, como penicilinas e estreptograminas se destacam. Mesmo sendo dispendioso, o uso dos antimicrobianos possui a vantagem de ser seletivo quanto aos organismos alvo enquanto os outros tratamentos também afetam a viabilidade das leveduras.

Os *Lactobacillus sp.* possuem resistência intrínseca a muitas drogas como os aminoglicosídeos, cefoxitina, fluoroquinolonas, ácido fusídico, glicopeptídeos, nitrofurantoina, sulfametaxazol/trimetoprim e bacitracina de acordo com a literatura (Danielsen and Wind, 2003). Alguns relatos estão disponíveis na literatura de resistência adquirida a tetraciclina (Teuber et al., 1999) por meio dos gene da família *tet*, com origem plasmidial; a lincosamidas, conferida pelo gene *lnu(A)* (Kastner et al., 2006) e a eritromicina, por meio dos genes *erm* (Feld et al., 2008). O perfil de resistência pode variar dentro do gênero (Danielsen and Wind, 2003), e seus determinantes ainda são pouco estudados. Muitas dessas drogas como as penicilinas (Penicilina) e estreptograminas (Virginamicina) são usadas pelas indústrias para controle da contaminação bacteriana (Muthaiyan et al., 2011)

Além de ser uma preocupação para o setor sucroalcooleiro, estes organismos podem servir de reservatórios naturais de genes de resistência (Mathur and Singh, 2005). Dependendo de sua associação com elementos genéticos tais como transposons, integrons e plasmídios, esses determinantes de resistência podem ser mobilizados e disseminados entre as populações ambientais. Alguns autores vêm relatando esse fato como sendo um risco a saúde humana por muitas destas drogas possuírem representantes ou mesmo serem usadas para fins clínicos (Martinez, 2009). Em trabalhos recentes, já se comprovou a capacidade de transferência de genes de resistência entre *Lactobacillus* e *Enterococcus* um importante patógeno humano (Feld et al. 2008). Deste modo, estudos visando compreender os mecanismos de resistência dentro deste gênero e espécies de particular destaque para setor industrial, como por exemplo *L. vini*, torna-se insdipensável para melhor entender seu papel na disseminação de genes de resistência e guiar o uso de antimicrobianos para conter a contaminação.

O presente trabalho objetivou identificar os genes de resistência a antimicrobianos em *L. vini* através de metodologias *in silico* e isolar linhagens tolerantes aos biocidas industriais utilizados durante a safra 2012/2013.

2. Revisão da literatura

2.1 O gênero *Lactobacillus* visão geral

Os lactobacilos compõem um grupo de bactérias gram positivas, de morfologia bacilar, não esporulante, acidófilas, mesófilas e anaeróbias estritas, aerotolerantes ou anaeróbias facultativas (Slover and Danziger, 2008) (Fig. 1) que estão muito próximas do cotidiano dos seres humanos (Tannock, 2004). São comumente consumidas em produtos industrializados, principalmente os de origem láctea (Fig. 2) e muitas espécies deste grupo possuem o título de “Bactérias Seguras” (GRAS –Generally Recognized As Safe) (Salvetti et al., 2012). São componentes da microbiota entérica do homem e outros mamíferos (Sekirov et al., 2010) e estão associados a melhoras nos quadros de doenças como, por exemplo, a enterocolite necrotizante e até alguns tipos de câncer (Kumari et al., 2011). Esses organismos possuem diversos fatores que estimulam o sistema imune do hospedeiro e combatem as infecções entéricas, o que torna compreensível seu extenso uso como probiótico (Lebeer et al., 2008).

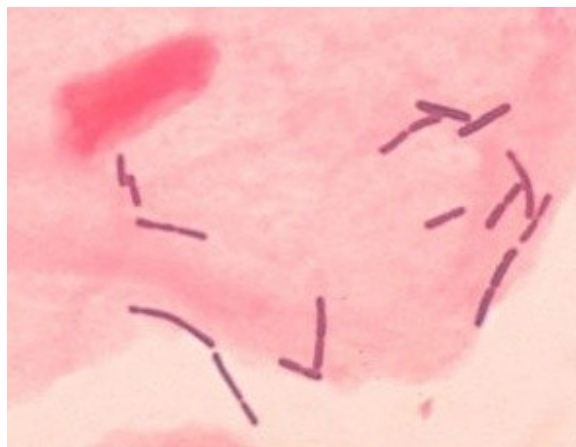


Figura 1. Coloração de gram de *Lactobacillus acidophilus* proveniente de raspado da mucosa oral. Disponível em <http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/NormalFlora.html>.

Mesmo não se tratando de bactérias comumente patogênicas, os lactobacilos podem vir a participar de eventos infecciosos (Duprey et al., 2012). Alguns autores têm afirmado que o consumo de produtos fermentados pode contribuir para alguns quadros infecciosos (Danielsen and Wind, 2003). As infecções cardíacas (See et al., 2006) são as mais comumente descritas na literatura (Slover and Danziger, 2008). Nesses casos, as doenças de base e o estado imunológico debilitado dos pacientes colaboraram muito mais para a infecção que a virulência e patogenicidade dos lactobacilos.



Figura 2. Produtos fermentados produzidos com organismos do gênero *Lactobacillus* em A) leite fermentado e em B) coalhada.

2.1.1 Taxionomia e Filogenia do grupo

Estas bactérias são organismos de difícil identificação ao nível de espécie por meio das metodologias microbiológicas clássicas. Principalmente devido ao alto grau de variabilidade bioquímica inter e intra-específica. São reconhecidas 145 espécies de acordo a última classificação taxonômica (Claesson et al., 2008). Várias técnicas foram propostas recentemente para sua identificação das quais a

FTIR (Fourier Transformation Infra-Red spectometry) se mostrou mais eficaz (Herbel et al.,2013). Basicamente, este ensaio analisa as rotações e o espectro de rotação das moléculas submetidas a diferentes comprimentos de onda de luz infravermelha (Dziuba et al., 2007). Mas, esta técnica não consegue discriminar entre os organismos do grupo casei (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus zeae* e *Lactobacillus sanfranciscensis*) (Herbel et al., 2013). De modo geral, Herbert (2013) sugere como melhor forma de identificação desses organismos uma combinação de técnicas. Preferencialmente, uma dessas técnicas deve ser baseada em sequenciamento onde os genes *pheS* e *rpoA* têm se mostrado bastante eficientes (Naser et al., 2007).

Em consonância com as dificuldades na taxonomia do grupo, sua filogenia é ainda mais problemática (Bernardeau et al., 2008). Ainda não se tem uma resposta bem definida para a pergunta se os lactobacilos são de fato um grupo natural ou um conjunto de fragmentos da evolução de grupos próximos (Claesson et al.,2008). Mesmo os estudos moleculares monogênicos com o rRNA 16S não conseguem responder de forma decisiva esta questão (Canchaya et al., 2006).

Por conta desse problema na filogenia do grupo é comum encontrarmos o uso de agrupamentos de organismos baseados em critérios dos próprios autores para refletir subgrupos monofiléticos. A relação entre os subgrupos podem mudar constantemente dependendo dos critérios de construção de árvore, método de agrupamento e do conjunto de dados utilizado (Claesson et al.,2008). Até o momento há concordância na literatura que para estudara evolução deste grupo deve-se usar mais de um marcador molecular. Isso porque eventos de

transferência horizontal com ganho e perda de genes foram estimados como muito comuns durante o curso evolutivo dos *Lactobacillus* (Nicolas et al., 2007).

2.1.2 Metabolismo

Metabolicamente, os lactobacilos podem ser agrupados em bactérias homofermentadoras e heterofermentadoras (Gänzle and Follador, 2012). As homofermentadoras produzem lactato como principal produto de seu metabolismo energético; já as heterofermentadoras produzem lactato juntamente com outros compostos como, por exemplo, o acetato (Kandler, 1983).

Nos homofermentadores, o início da via metabólica central se dá pela conversão da glicose a glicose-6-fosfato pela enzima Hexoquinase. Porém esta enzima pode estar ausente em alguns lactobacilos, sendo suprida pela ação de quinase do sistema de fosforilação e transporte de açúcares (PTS) (Gänzle and Follador, 2012). Normalmente o gene que codifica a Hexoquinase, quando presente, só é expresso em altas concentrações de glicose (Gänzle et al., 2007). A via continua com a conversão da glicose-6-fosfato a frutose-6-fosfato e deste a frutose-1,6-bisfosfato que é clivada pela Aldolase produzindo duas moléculas de trioses fosfatos que serão por fim convertidas em piruvato e deste a lactato (Fig. 3A) (Kandler, 1983).

No caso dos heterofermentadores, a glicose-6 fosfato é oxidada a glucanato-6 fosfato que posteriormente é descarboxilado a xilulose-5 fosfato (Fig. 3B). Esta molécula é clivada pela Fosfoquetolase para gerar duas moléculas: uma triose fosfato que será convertida a lactato, e uma molécula de acetil fosfato que será convertida a etanol ou acetato (Arsköld et al., 2008). Os heterofermentadores também possuem a via glicolítica presente nos homofermentadores, mas esta é

usada com menos frequência, como observado em *L. reuteri* (Arsköld et al., 2008).

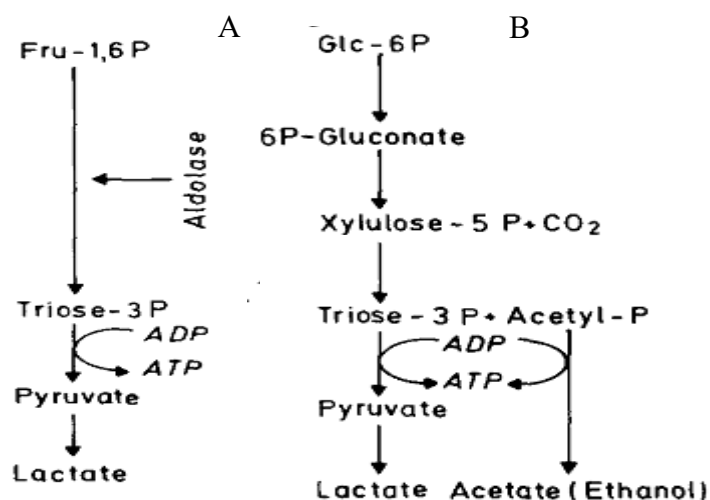


Figura 3. Vias de metabolismo energético principal em *Lactobacillus* em A) a via glicolítica de Embden-Meyerhof dos homofermentadores e em B) a via da Fosfoquetolase usada pelos heterofermentadores. Adaptado de Kandler, 1983.

As pentoses como Arabinose, Ribose, Xilose, assim como seus alcoóis correspondentes Arabitol, Ribitol e Xilitol também são metabolizados pelos lactobacilos (Kandler, 1983). De modo resumido, estes são convertidas a xilulose-5 fosfato (Gobbetti et al., 2000) e entram na via principal do metabolismo (Fig. 3B) do mesmo modo que em *Lactococcus lactis* (Tanaka et al., 2002). Sendo a xilulose substrado da Fosfoquetolase enzima encontrada até então em heterofermentadores, seria esperado que as pentoses fossem fermentadas apenas pelos heterofermentadores o que não é o caso (Kandler 1983). Estudos posteriores apontaram para a capacidade que alguns homofermentadores de também utilizarem as pentoses como fonte de energia. Foi proposto que nesses homofermentadores há o gene da Fosfoquetolase, ou outra enzima que desempenhe esta função, e que este é induzido apenas na presença de pentoses (Kandler, 1983).

2.1.3 Genômica

A organização genômica desses organismos é muito diversa. Seu genoma foi alvo de extensivos eventos de perda e ganho de genes durante a evolução (Makarova et al., 2006). Estima-se que cerca de 1.200 genes tenham sido perdidos desde sua divergência do último ancestral comum aos *Bacillus* (Makarova and Koonin, 2007). Dentre esses genes, estão os envolvidos no processo de esporulação, na biossíntese de várias substâncias, o da catalase *Kate* e os de metabolismo de certos carboidratos (Makarova et al., 2006). Algumas espécies perderam mais genes do que outras, conservando apenas os genes indispensáveis para sua sobrevivência nos seus respectivos nichos (Claesson et al., 2007). Mesmo quando os ortólogos são mantidos entre as espécies, estudos têm mostrado que sua localização física no genoma pode ser drasticamente alterada por eventos de recombinação, resultando em um baixo nível de sintenia entre os genomas (Canchaya et al., 2006).

Aparentemente os lactobacilos parecem estar sob constante e forte processo seletivo. O mesmo padrão de conservação de genes observados ao nível interespecífico também é visto no nível intraespecífico. Em um recente estudo com os genomas de 100 linhagens de *L. rhamnosus* foi observado um padrão de conservação de genes diretamente relacionado à disponibilidade nutricional no meio (Ja et al., 2013).

2.2 Fermentação alcoólica

Nas últimas décadas, as atividades humanas vêm requerendo quantidades crescente de energia (Mcmillan, 1997). Com a crise do petróleo da

década de 70, diversos países procuraram substitutos para os combustíveis fósseis, fonte importante de energia no período, dos quais o etanol era a principal opção (Balat et al., 2008). Como resposta ao panorama em crise o Brasil iniciou uma política de aumento de investimento e incentivos a produção e uso do álcool como combustível através do programa PROALCOOL (Sadeghinezhad et al., 2014), o que fez do programa brasileiro um modelo para os outros países.

A produção de etanol é um processo biológico comum a muitos organismos. A produção industrial é realizada quase que unicamente pela levedura *Sacharomyces cerevisiae* o que a faz ser alvo de diversos estudos e manipulações genéticas para otimização do processo (Nissen et al., 2000). Através da fermentação, a levedura converte o açúcar no meio, preferencialmente a glicose, em etanol e CO₂ (Gray et al., 2006). O primeiro passo que precisa ser superado para a produção em larga escala é a matéria prima biológica usada na fermentação. O Brasil utiliza o caldo de cana-de-açúcar proveniente da cana-de-açúcar como matéria prima (de Souza et al., 2012), mas essa planta só cresce em climas tropicais, o que impossibilita sua cultura em regiões europeias e nos E.U.A. (Bryan, 2006). Nesses locais outras matérias primas têm sido utilizadas como o milho (Koçar and Civaş, 2013), soja (Balat and Balat, 2009) e algas (Murphy et al., 2013). Após a fermentação, o etanol é recuperado através de destilação na forma hidratada podendo ser utilizado diretamente como combustível ou ser desidratado quimicamente para ser adicionado a gasolina.

O processo de fermentação industrial para produção de álcool combustível ocorre através de dois processos: a) o processo em batelada no qual toda fermentação se processa em dornas individuais com recuperação do fermento e sua reutilização em fermentações posteriores; b) o processo contínuo

que consiste na fermentação através de dornas interligadas nas quais a fermentação ocorre gradualmente em vários estágios. Nesse processo também ocorre à reutilização do fermento, pois o mesmo retorna a dorna inicial depois de centrifugado juntamente com o mosto para realimentação do processo (Whealset *al.*, 1999).

Até pouco tempo, as destilarias utilizavam linhagens de panificação para o início da fermentação (Silva-Filho et al., 2005a). Entretanto, dados recentes do acompanhamento da dinâmica da população de leveduras ao longo do período de safra têm mostrado que essas células não apresentam capacidade de dominância do processo e logo são substituídas por células de linhagens que são introduzidas pelo substrato não-estéril (Basso et al., 2008). Esta instabilidade causada pela constante substituição da população de leveduras pouco adaptadas ao processo pode contribuir para a instalação dos episódios de contaminação bacteriana. Entretanto, pode-se admitir também que a instalação de uma determinada espécie bacteriana ou mesmo de uma determinada linhagem bacteriana seja responsável pela instabilidade da população de levedura.

Neste sentido, esforços recentes têm sido direcionados para a busca de linhagens de *S. cerevisiae* cada vez mais adaptadas aos processos industriais, que sejam resistentes aos diversos fatores físicos, químicos e biológicos ali presentes, e que possuam alta capacidade fermentativa (Silva-Filho et al., 2005b; Basso et al., 2008). Assim, novas metodologias estão sendo desenvolvidas para aperfeiçoar o processo, aumentando a eficiência das diversas fontes de carboidratos na matéria prima e retirando os agentes complicantes do processo.

2.3 Contaminação bacteriana na fermentação

Na busca por melhorar o desempenho fermentativo diversos avanços têm sido empregados no entendimento e manipulação genética de *S. cerevisiae*, tratamento da biomassa e na própria tecnologia dos fermentadores (Muthaiyan et al., 2011). Um dos pontos principais que vem recebendo atenção é a contaminação que ocorre durante o processo (Skinner and Leathers, 2004). Mesmo ela sendo esperada, pelo fato do processo industrial não ser estéril e ser realizado em um sistema aberto, estudos têm mostrado que é uma das principais causas de perda na produção de etanol (Bayrock et al., 2003). A população contaminante atua consumindo o açúcar que seria destinado à levedura, o que impacta diretamente na produção de etanol (Bayrock and Ingledew, 2004).

A população bacteriana contaminante é principalmente composta por bactérias lácticas (LAB) e acéticas (Muthaiyan et al., 2011). Dentre estes dois grupos as LAB são as principais causadoras de perdas na produção, pois elas, além de consumir o açúcar, produzem ácido láctico e acético (Bayrock and Ingledew, 2004) que em sinergismo prejudicam a fermentação por *S. cerevisiae*. Estudos apontam que nessa população o gênero *Lactobacillus* é o principal componente com algumas espécies se destacando (Lucena et al., 2010). Dentre elas, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum* são comumente encontradas em estudos de caracterização populacional (Lucena et al., 2010). Essas espécies juntamente com *Lactobacillus paracasei* foram responsáveis pela reduções de 2% na produção de etanol por *S. cerevisiae* em sistemas de infecções controladas (Narendranath et al., 1997). Mas, outros trabalhos hipotetizam que esta perda pode chegar a 10% (Muthaiyan et al., 2011).

Por sua vez, *Lactobacillus vini* é outra espécie que nos últimos anos tem se destacado compondo a população contaminante nas destilarias do Nordeste brasileiro (Luckwu de Lucena et al., 2012). É encontrada em grande número e associada à levedura contaminante *Dekkera bruxellensis* (Passoth et al., 2007).

Para manter esta população sob controle, um dos tratamentos empregados pelas destilarias é o uso de ácido sulfúrico (Muthaiyan et al., 2011). Mas, este também estressa a levedura fermentadora e não tem ação eficaz contra as bactérias lácticas e provavelmente contribui para sua seleção no processo fermentativo mais que para sua eliminação. Outros tratamentos com melhor eficácia têm sido sugeridos como o uso de Sulfeto e Peróxido de Hidrogênio (Chang et al., 1997). Porém, deve-se levar em conta que nem todos são economicamente rentáveis ou facilmente praticáveis para serem usados em larga escala (Muthaiyan et al., 2011). O uso de antibióticos industriais também tem sido cogitado e utilizado em certas destilarias (Bischoff et al., 2009). Dentre as drogas utilizadas podem ser encontrados β -lactâmicos (Penicilina) (Bayrock and Ingledew, 2003), as tetraciclinas (Tetraciclina e Oxitetraciclina) e as streptogramínas (Virginamicina)(Bischoff et al., 2007).

Ainda há pouca informação na literatura quanto ao perfil de resistência das bactérias lácticas quando comparadas a outros gêneros, e, principalmente, quanto a mobilidade desses determinantes de resistência. Os *Lactobacillus* até o momento possuem um relato de alta capacidade de conjugação *in vivo* com *Enterococcus* (Feld et al., 2008) que é um patógeno humano oportunista. Demonstrando assim sua capacidade de transferir genes de resistência a patógenos humanos.

2.4 *Lactobacillus vini*

Lactobacillus vini é uma espécie relativamente recente com menos de uma década desde a sua descrição (Mari et al., 2006). Ela vem sendo relatada como uma das bactérias lácticas predominantes na fermentação alcoólica de destilarias no nordeste brasileiro, predominando no final do processo (Lucena et al., 2010). Esta bactéria é um bacilo Gram positivo, móvel, não esporulado, anaeróbio facultativo, catalase negativo, mesófilo e homofermentador. Foi primeiro isolada em 1978, presente na fermentação de uvas para produção de vinho, sendo identificada apenas até o nível de gênero e nomeada como Mont 4 (Barres, 1978). Estudos posteriores ao seu isolamento utilizando técnicas de biologia molecular trouxeram dúvidas quanto a sua classificação ao nível de espécie (Rodas et al., 2005). Rodas e colaboradores (2005) encontraram um cluster formado por bactérias relacionadas à Mont 4 que foram identificadas como novas espécies de *Lactobacillus*. No ano seguinte, a caracterização completa de *L. vini* foi realizada (Mari et al., 2006). Logo descrições deste bacilo começaram a ser feitas como invasor dos processos industriais relacionados à produção de álcool estando frequentemente associado com *Dekkera bruxellensis* (Passoth et al., 2007).

L. vini aparenta ser uma espécie adaptada ao ambiente fermentativo, mas as escassas informações ao seu respeito tornam difícil o completo entendimento das vantagens adaptativas que possui e que promovem ou contribuem para sua seleção durante a fermentação. Além das condições estressantes do próprio processo fermentativo, temperatura, pH, concentração de etanol, o tratamento antimicrobiano utilizado nas destilarias exerce um papel seletivo importante. São necessários maiores estudos sobre a resistência bacteriana da população

contaminante em particular de seus principais representantes como *L. vini*, que permitam entender o impacto que uso dessas drogas tem sobre a composição dessa população.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Investigar *in silico* a presença de as ORFs similares a β -lactamases nos genomas de *L. vini* e investigar a presença de linhagens desta bactéria resistentes a antimicrobianos industriais durante a safra 2012-2013.

3.2 Objetivos Específicos

- 1-Identificar e classificar ORFs com os domínios beta-lactamase e Lactamase_B
- 2-Investigar a presença de linhagens de *L. vini* resistentes aos biocidas industriais utilizados na fermentação 2012-2013.

4. Material e Métodos

4.1. Linhagem bacteriana e meios de cultura

A linhagem bacteriana JP 789 foi isolada do mosto fermentado da destilaria Japungu Agroindustrial S.A. (Santa Rita, PB) na safra 2007/2008 (Lucena et al, 2010) e foi utilizada como referência neste estudo. Os isolados bacterianos foram obtidos de destilarias de álcool na safra 2012-2013 como descrito no item 4.2. As células bacterianas foram cultivadas em meio MRS (Himedia) a 37°C em tubos estáticos de 1,5ml ou em placas de meio MRS a 37°C em jarras anaeróbicas. A anaerobiose foi mantida com o uso de gerador de anaerobiose Anaerocult A® (Mikrobiologie). Estoques foram preparados misturando-se 0,5 mL das culturas em caldo MRS com 0,5 mL de solução de glicerol estéril a 30% (concentração final de glicerol a 15%) e congelados a -80°C até o momento de uso.

4.2. Isolamento bacteriano

Amostras de mosto fermentado das destilarias Japungu (JP) Agroindustrial S.A. (Santa Rita, PB) e Miriri (M) Açúcar e Energia Ltda (Santa Rita, PB) foram obtidas em três períodos da safra 2012-2013 (Fig. 4). As amostras foram coletadas pela empresa Fermenta Biotecnologia Ltda (Recife, PE). Nesta empresa, foram realizados testes preliminares para avaliar o nível de resistência da população bacteriana aos antibióticos industriais utilizados em cada destilaria (Tabela 1).

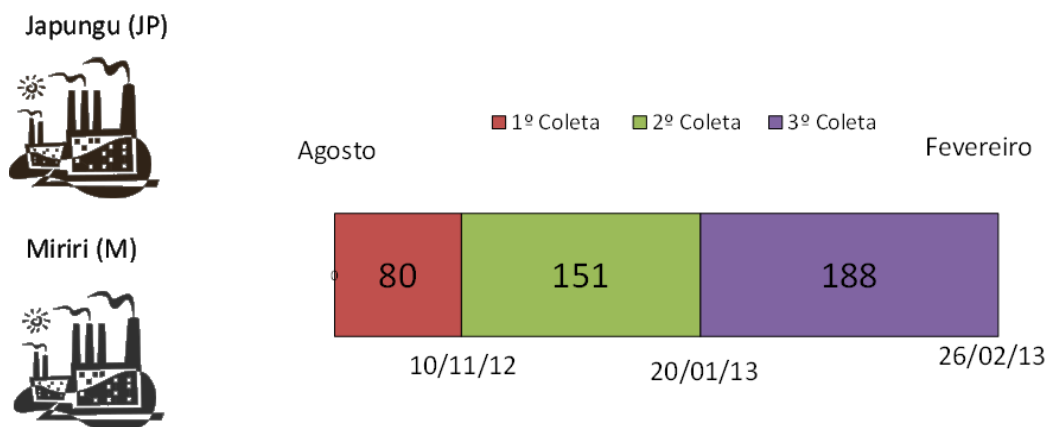


Figura 4. Representação cronológica dos momentos de coleta nas destilarias e o intervalo entre estas. A contagem dos dias se inicia com o início da fermentação em agosto de 2012 e finaliza em Fevereiro de 2013. A 1ª coleta foi realizada em 10/11/12, após 80 dias do início da fermentação, a 2ª em 20/01/13, após 151 dias e a 3ª em 26/02/13 após 188 dias.

Tabela 1. Antibióticos industriais utilizados na avaliação da resistência bacteriana nas amostras das destilarias estudadas na safra 2012-2013.

<i>Destilaria</i>	<i>Antibiótico</i>	<i>Classe</i>
Japungu	Penicilina	β -lactâmico
	Oxitetraciclina	Tetraciclina
	Aeroflux	-
	Kamoran	Monoenzina sódica
Miriri	Potensa	-
	Busan 989	Virginiamicina
	Busan 991	Monoenzina sódica
	Kamoran	Monoenzina sódica

As amostras foram avaliadas segundo os procedimentos estabelecidos pela Fermenta utilizando o meio de cultura YPD. Depois de processadas, as amostras de mosto fermentado das destilarias foram diluídas para a densidade

celular inicial de 0,1 D.O. $\lambda_{600\text{nm}}$ e divididas em tubos-teste tratadas com os antibióticos industriais (Tabela 1), nas concentrações de 2 $\mu\text{g/ml}$ ou 10 $\mu\text{g/ml}$, mantendo-se um tubo controle sem o tratamento. Esses tubos foram incubados por 24 h a 37°C, seguido de avaliação da densidade celular por determinação da absorbância a $\lambda_{600\text{nm}}$. Foram estabelecidos os seguintes critérios de avaliação: 1) população resistente ao antibiótico quando a densidade óptica da cultura tratada era $\geq 50\%$ daquela no tubo controle; 2) população sensível ao antibiótico quando a densidade óptica da cultura tratada era $< 50\%$ daquela no tubo controle.

As amostras do antibiograma consideradas resistentes nesta primeira etapa foram admitidas na segunda etapa de seleção, já como parte deste estudo, com os antibióticos de maior espectro de ação e potência em comparação aos usados como tratamento da contaminação industrial. Neste trabalho o termo potência usado como característica de um antibiótico se refere a sua maior resistência a degradação por enzimas bacterianas, espectro de ação amplo e de gerações mais recentes. Os antibióticos escolhidos foram o carbapenêmico Meropenem (MER) a 6,4 $\mu\text{g/ml}$ e a tetraciclina Doxiciclina (DOX). Foi acrescentado a essa segunda etapa de seleção um controle com a fluoroquinolona Ciprofloxacina (CIP) a 10 $\mu\text{g/ml}$, droga seletiva para a grande maioria das bactérias lácticas, em especial o gênero *Lactobacillus* (Danielsen and Wind, 2003). A fim de resguardar as bactérias lácticas que fossem resistentes as drogas industriais e sensíveis as drogas de maior potência. Nesta etapa de seleção 1 μl da cultura populacional resistente da primeira etapa foi inoculada em 1 ml de MRS com as drogas citadas acima.

Das culturas com crescimento nos tubos de MER, DOX e CIP foi realizado semeio em placa de meio MRS com 1 μl da cultura, seguido de incubação em

jarras de anaerobiose por 72 a 96h a 37°C em anaerobiose. As colônias bacterianas obtidas foram classificadas quanto à morfologia a partir dos seguintes parâmetros: textura, altura, cor, tipo de borda e tamanho. Colônia que diferiram em apenas um dos parâmetros foram tratadas como morfotipos diferentes. Apenas um representante de cada morfotipo foi selecionado, cultivado em meio MRS na presença do antibiótico selecionador da segunda etapa e estocado a -80°C como descrito acima (item 4.1).

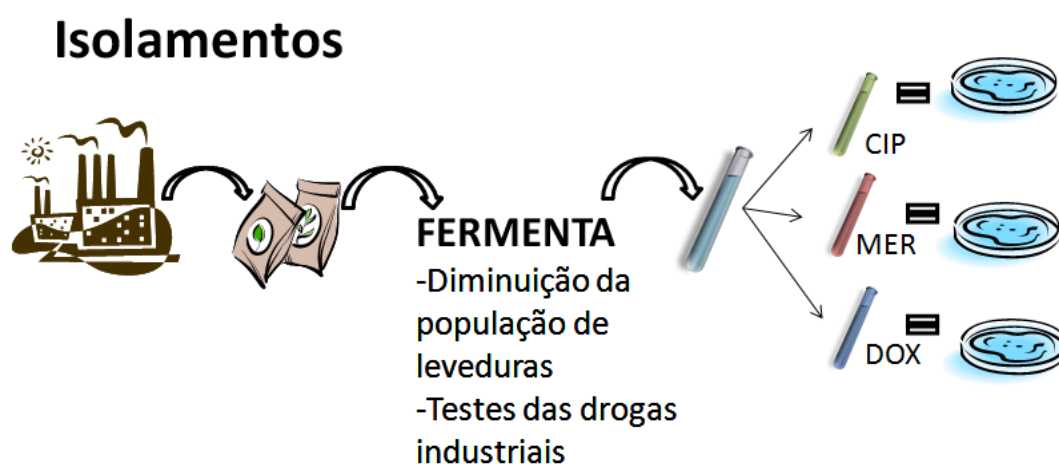


Figura 6. Etapas metodológicas usadas no isolamento. As amostras provenientes das usinas foram pré-processadas na Fermenta onde foram realizados os testes para as drogas industriais. As amostras resistentes foram então admitidas neste trabalho sendo submetidas a seleção novamente para as marcas de resistência CIP (Ciprofloxacina), MER (Meropenem) e DOX (Doxiciclina) de onde foram selecionadas as bactérias por morfologia de colônia.

4.3. Identificação bacteriana

A identificação dos isolados bacterianos foi realizada por análise da sequência nucleotídica do gene *pheS* (Lucena et al., 2010). Na primeira etapa, o DNA genômico das células cultivadas em meio MRS foi extraído e purificado por meio da técnica de lise alcalina (Sambrook and Russel, 2001 a), quantificado em equipamento Nanodrop® e 20 ng/μl de DNA de cada isolado foi utilizado na

reação de PCR para amplificação parcial do gene-alvo com os seguintes primers: 21-F (5'-CAYCCNGCHCGYGAYATGC-3') e 23-R (5'-GGRTGRACCATVCCNGCHCC-3'). O mix utilizado na PCR, por amostra, foi feito com 13,7 µl de água de injeção, 2,5 µl de Tampão da Taq polimerase, 3,1 µl da solução de DNTP a 2 mM, 2,5 µl de Cloreto de Magnésio a 25 mM, 1 µl de cada primer a 10 pMol/µl e por fim 0,2 µl da Taq polimerase. A ciclagem da PCR utilizada foi de 95°C por 5 minutos na desnaturação inicial, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto de desnaturação, 58,5°C por 40 segundo na etapa de anelamento, 72°C por 1 minuto na etapa de polimerização e de 72°C por 7 minutos na etapa de polimerização final. Os amplicons foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose a 1.2% por 30 minutos de corrida a 100 V e 50 mA. Os amplicons foram corados com Blue-green® ou Brometo de Etídio a 5 µg/ml e visualizados em transiluminador de luz UV. Os amplicons de cerca de 450 pb foram purificados com uso do kit de purificação @SV Gel and PCR Clean-Up System (PromegaCo.) e enviados para sequenciamento na plataforma de genômica e expressão gênica do CCB-UFPE.

As sequências obtidas do sequenciamento foram analisadas diretamente com o software Bioedit Versão 7.1.3.0. O cromatograma foi visualizado por inteiro e determinada a parte da sequência com melhor qualidade, com os picos bem definidos sem sobreposições, do resultado obtido da fita de cada primer. Após determinada a sequência de melhor qualidade para os dois primers estas foram utilizadas na construção de uma fita consenso que foi então utilizada para a identificação. Essas sequências foram submetidas à análise de alinhamento local tipo BLAST disponível no banco de dados GenBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSe

[arch&LINK LOC=blasthome](#)). Os resultados obtidos no alinhamento foram analisados diretamente. Os critérios utilizados para a identificação foram identidade $\geq 95\%$, o maior score obtido no alinhamento e menor E-value. Afim de evitar possíveis erros de anotações dos depósitos no banco de dados, foram adicionados aos critérios anteriormente citados a preferência por alinhamentos com genomas sobre os de depósitos individuais, parciais ou completos, do *pheS*. Quando não houve genoma depositado, a sequência com melhor alinhamento com a deste estudo foi acessada, traduzida com o ORFfinder e comparada com o resultado esperado para o *pheS*, a sequência da Fenilalanina tRNAsintase.

4.4. Identificação das ORFs (Open Read Frame) de β -lactamases no genoma de *Lactobacillus vini*

Os genomas da linhagem industrial JP 789 e da linhagem tipo DSM 20605 de *L. vini* (Lucena et al., 2010) estão disponíveis no banco de dados GenBank (acessos AHYZ000000000 e AHZ000000000, respectivamente) e foram utilizados para busca por contigs que possuíssem ORFs com domínios preditos para a atividade de β -lactamase. A busca primeiro foi realizada com dados preliminares da anotação provida pela ferramenta online RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Aziz et al. 2008). Os genomas completos foram utilizados em um alinhamento contra o banco de dados do NCBI e o resultado do alinhamento foi salvo e posteriormente usado na busca por contigs que tivessem alinhado com alguma β -lactamase ou enzimas similares.

Afim de acurar os resultados, estes contigs foram submetidos a uma análise com a ferramenta ORFFinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)

do NCBI com o código ajustado para Bacterial Code. A partir da análise da ferramenta foram aceitas as ORFs que tivessem maior tamanho, nas seis matrizes de leitura, dentre as ORFs preditas numa mesma região do contig. Posteriormente foi analisado o ambiente genético onde essas ORFs estavam inseridas. Foram aceitas as ORFs com o menor E-value e com score ≥ 200 e que apresentassem os domínios de beta_lactamase (presente nas serino β -lactamases) ou lactamase_B (presente nas metalo β -lactamases). Seleccionadas as ORFs, foram obtidas as sequência de nucleotídeos e de aminoácidos com auxílio da ferramenta ORFFinder.

4.5. Modelagem molecular e análise *in silico* da proteína

A partir da sequência de aminoácidos das ORFs aceitas foi realizada a modelagem molecular das proteínas preditas utilizando a plataforma SWISS-MODEL (Arnold et al., 2006) com a função automate mode. O arquivo PDB produzido pelo SWISS-MODEL foi visualizado com o software UCS-CHIMERA (Pettersen et al., 2004). Foram realizadas análises de predição do peso molecular e do ponto isoelétrico com a ferramenta Compute pI/Mw (Wilkins et al., 1999) e a presença de motivo transmembrana com a ferramenta TMHMM (Krogh et al., 2001). A quantificação do conteúdo de GC e o alinhamento da sequência de aminoácido das ORFs foi executada com a ferramenta ClustalW contida no software BioEdit version 7.1.3.0

4.6. Análise filogenética

Um dataset de metalo β -lactamases das subclasses B1, B2 e B3 disponível na literatura (Bebrone, 2007) foi utilizado para a classificação da proteína predita com o domínio Lactamase_B de *L. vini*. As sequências de aminoácidos dessas proteínas foram coletadas do NCBI e submetidas a alinhamento múltiplo juntamente com a proteína de *L. vini* com auxílio da ferramenta t-coffee (Notredame et al., 2000) disponível online (<http://www.tcoffee.org/>). Com base no alinhamento foram construídas árvores filogenéticas com os métodos de Neighbour-Joining, Máxima parcimônia e Evolução mínima disponíveis no software MEGA versão 5.05. Para os métodos de Neighbour-Joining e Evolução mínima foram realizadas 1000 repetições de Bootstrape. Foi utilizada à árvore consenso para cada método.

4.7 Perfil de susceptibilidade das linhagens isoladas de *Lactobacillus vini*

As linhagens de *L. vini* isoladas neste trabalho foram testadas quanto ao perfil de susceptibilidade a drogas de várias classes por meio da metodologia Kirby-Bauer de disco difusão (Bauer et al., 1959). As drogas testadas foram Cloranfenicol, Estreptomicina, Vancomicina, Penicilina e Doxiciclina. O inóculo foi preparado a partir de culturas cultivadas por 48h em anaerobiose. Essas foram utilizadas para o preparo de uma suspensão em solução salina (0,9% NaCl) a 0,5 na escala de McFarland e posterior semeio com *swab* em placas de MRS com a espessura do meio de 0,4 mm. Os discos foram mantidos separados por uma distância mínima de 25 mm dos demais em todas as direções. As culturas foram então mantidas a 37°C em Jarra de anaerobiose por 48h, posteriormente os halos de inibição de crescimento bacteriano foram medidos e comparados aos limites

preconizados pelo CLSI (2010) para *Enterococcus* seguindo a regulação da nota M45P deste mesmo órgão.

O ensaio para determinação da MIC (Minimum Inhibitory Concentration) para Doxiciclina foi realizado em MRS. As diluições foram seriadas sendo a menor de 0,25 e a maior de 512 µg/mL. A cepa ATCC 29212 *Enterococcus faecalis* foi utilizada como controle. O teste foi realizado em duplicada com os organismos testados e o controle. Admitiu-se os resultado da placa quando o controle se manteve na faixa de 2 a 8 µg/mL, como pré-determinado pelo CLSI (2010).

4.8 Conjugação bacteriana

Os isolados de *L. vini* que apresentaram resistência (item 4.7) foram testados quanto à mobilidade de suas marcas de resistência por conjugação. O ensaio foi realizado cultivando-se as bactérias testes em 10 ml de meio LB. A cepa receptora ATCC 29212 *Enterococcus faecalis* foi cultivada em 20 ml de LB. Após 24h de cultivo, ambas as culturas foram unidas em novos Erlenmeyers previamente esterilizados e postos em agitação leve por três horas. As proporções de culturas estabelecidas foi de 1/1 doadora e receptora, correspondendo a 5 ml de cada, acrescido de mais 3 ml de meio LB estéril.

Terminado o prazo de espera 0,5 ml dos testes foi semeado com alça de Drygalski em placas de meio MH (Mueller Hinton) acrescido de DOX a 16 µg/ml, e cultivado em aerobiose por 24h. A seletividade na placa é obtida pelo fato de *L. vini* não crescer em MH enquanto a cepa receptora sim, contudo, apenas os transconjugantes serão aptos a crescer visto que a concentração de DOX previne

o crescimento da cepa receptora em condições normais. Outro obstáculo para o crescimento de *L. vini* é a aerobiose. Apesar dos isolados deste estudo serem aptos a crescerem em aerobiose, isso se dá em uma velocidade extremamente lenta levando cerca de quatro dias para obter o crescimento próximo do que é observado em 24h em anaerobiose.

4.9 Extração plasmídial

Os transconjugantes e a cepa doadora 2M98D2 tiveram seus plasmídios extraídos por dois protocolos. O protocolo I foi obtido de uma otimização de extração de plasmídios para *Lactococcus* disponível na literatura (Sullivan et al., 1993). O protocolo II toma como base o método de Miniprep (Sambrook and Russel, 2001 b). Os organismos gram positivos tiveram um pré-tratamento com lisozima durante o 2ª passo do protocolo II com 20 µl de lisozima a 100 µg/mL por 40 minutos a 37° C sem agitação. Após esta etapa o protocolo foi seguido normalmente. Como controles plasmidiais foram utilizadas as linhagens de *Escherichia coli* DH5α e *E. faecalis* ATCC 29212 como controle de DNA cromossomal e da conjugação, respectivamente. As linhagens de *E. coli* 50193 e 50192 foram utilizadas como controles para a determinação de tamanho plasmidial. As extrações foram submetidas à separação eletroforética em gel de agarose a 0.8% com a voltagem ajustada para 100 V, a corrente para 50 mA e o tempo de corrida foi de 40 a 60 minutos.

4.10 Ensaios de expressão gênica

A fim de analisar a expressão da ORF com domínio Lactamase_B foi realizada uma RT-PCR com primers específicos. As células de JP 789 foram cultivadas em 1 mL de meio MRS por 24h a 37°C em anaerobiose. Após o cultivo a cultura foi separada em duas réplicas A e B e destas foi realizado o isolamento de RNA por meio do kit de extração NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel) seguindo as orientações do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro NANOVue a $DO_{\lambda 260}$. A integridade do RNA foi constatada por eletroforese em gel de agarose 1%, corrido a 100V e 50mA em tampão TE livre de nucleases. Usando como parâmetro a nitidez e a intensidade das bandas correspondentes às frações 23S, 16S e 5S do RNA ribossomal.

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total extraído com o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System Promega II (Promega, USA), seguindo as instruções do fabricante. Foi utilizado 0.5 µg de RNA total para sintetizar 20 µl de cDNA. A síntese foi realizada para cada réplica da extração. Nesta etapa foi escolhida aleatoriamente uma das réplicas e foi utilizada uma diluição do RNA a 0.5 µg/µl que foi tratada com RNase na concentração 20 µg/ml por 40 minutos a 37°C antes de ser submetida a síntese de cDNA. Esta última amostra foi nomeada de controle C onde é esperado ausência de amplificação nas PCRs, pois, o RNA foi degradado e, portanto, não poderia produzir cDNA. Caso houvesse amplificação a partir deste controle isso indica contaminação com DNA genômico o que invalidaria o ensaio de expressão.

Posterior a síntese foi realizada uma PCR teste para parte do gene do rRNA 16S onde foram utilizados as amostras das reações A, B e do controle C. O MIX da PCR por amostra foi feito com 4,25 µL de água de injeção, 3 µL de Tampão da Taq polimerase, 3 µL da solução de DNTP a 2 mM, 2,25 µL de

Cloreto de Magnésio a 25 mM, 1 µL de cada primer a 10 pMol/µL e por fim 0,5 µL da Taq polimerase. Adicionou-se um controle externo (Cex) na PCR sendo composto pelo MIX de reação, mas sem cDNA com o intuito de evidenciar contaminação dos reagentes com DNA exógeno. Os primers utilizados foram o 27F e 1093R anelando nas posições 27 e 1093 do rRNA 16S, respectivamente (Lucena et al., 2010). Os amplicons foram então corridos em gel de agarose a 1,2% a 100 V e 50 mA por 30 minutos em tampão TBE 0,5X pH= 8.

Os primers utilizados na RT-PCR foram desenhados neste trabalho a partir da sequência alvo disponível no genoma de JP 789 com o uso da ferramenta online Oligoanalyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>). O MIX da reação por amostra foi feito com 13,7 µl de água de injeção, 2,5 µl de Tampão da Taq polimerase, 3,1 µl da solução de DNTP a 2 mM, 2,5 µl de Cloreto de Magnésio a 25 mM, 1 µl de cada primer a 10 pMol/µl e por fim 0,5 µl da Taq polimerase (Invitrogen). Os amplicons foram então corridos em gel de agarose a 1,2% a 100 V e 50 mA por 30 minutos em Tampão TBE 0,5X pH=8. Aciclagem utilizada foi inicialmente 94°C por 10 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 62°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos, finalizando com 72°C por 7 minutos.

5. Resultados

5.1.1 ORF Lactamase_B

A primeira ORF estudada possui 1.677 nucleotídeos e foi encontrada no genoma da linhagem tipo DSM 20605 (contig 00068) e do isolado industrial JP789 (contig 00064) (Fig. 6). Seu conteúdo de GC é de 39,24% nas duas linhagens. Esta ORF codifica uma proteína de 558 aminoácidos que apresenta o domínio Lactamase_B indicativo de uma metalo β -lactamase, sendo denominada de LMV (*Lactobacillus vini* metalo β -lactamase), com ponto isoelétrico e o peso molecular calculados em 6.56 e 61326.59 Daltons, respectivamente. A modelagem de LMV (Fig. 7A) permitiu identificar a potencial interação com dois átomos de zinco (Zn) no sítio ativo desta enzima: o primeiro átomo interagindo com os resíduos de aminoácidos His74, His76 e His142 e o segundo átomo interagindo com os resíduos Asp78, His79, His390 e Asp164 (Fig. 7B). A ferramenta TMHMM indicou que a proteína predita não apresenta sítios de ligação à membrana plasmática ou mesmo regiões hidrofóbicas transmembrana.

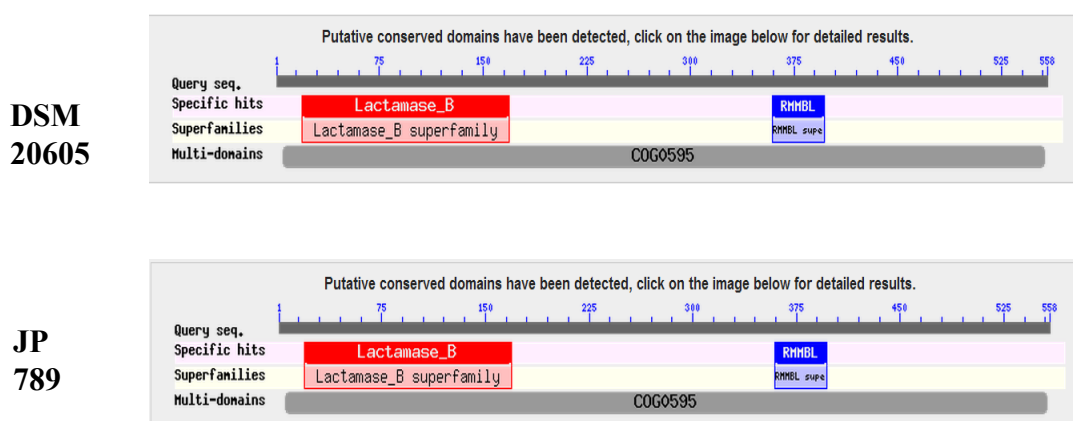


Figura 6. Resultado do alinhamento, com a ferramenta BLAST, das ORFs com domínio Lactamase_B nos dois genomas, linhagem industrial (JP789) e linhagem de referência (DSM 20605).

Em adição ao domínio Lactamase_B, também foi identificado na proteína LMV um segundo domínio. Com função de ligação a ribonucleotídeos e a moléculas de RNA chamado de RMMBL (Metallo Beta-lactamase de Metabolismo de RNA) (Fig. 6), o qual é característico das ribonucleases da família J de *Bacillus*.

A análise das ORFs circundantes a essa demonstrou um ambiente genético conservado em ambos os genomas com sintonia perfeita tanto na sequência das ORFs quanto no sentido de expressão das mesmas (Fig. 8). A montante da ORF de LMV há uma ORF codificadora de um regulador transcricional de atividade não identificada (TRS) seguida por uma ORF codificadora da subunidade alfa da exonuclease V (EXOV). A jusante da ORF de LMV encontra-se uma ORF codificadora da enzima peptídeo deformilase (PED) seguida da ORF codificadora da enzima mio-inositol-1(ou 4)-monofosfatase (INO) (Fig. 8).

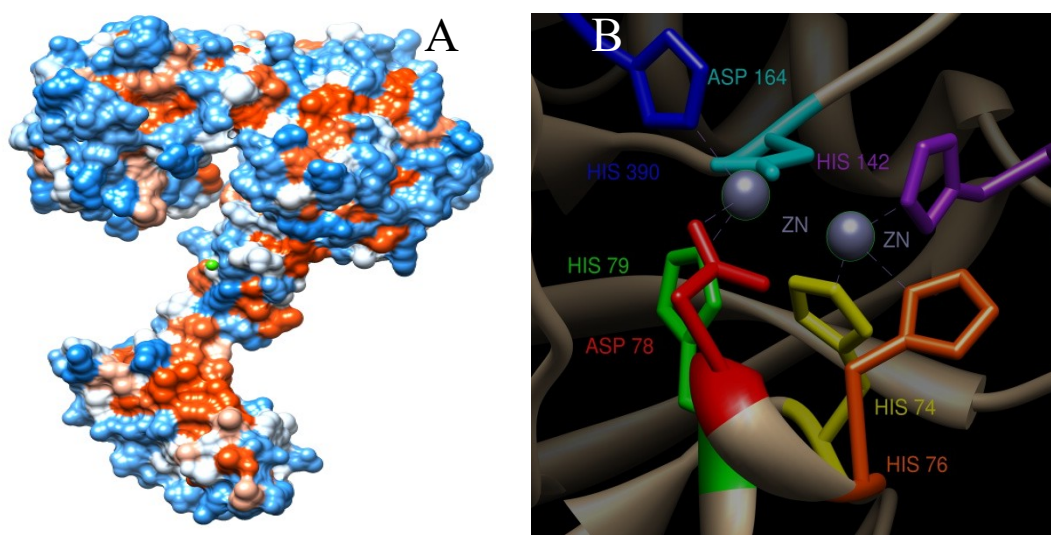


Figura 7. Modelo molecular da metalo β -lactamase dos genomas de *Lactobacillus vini*(LMV). (A) Modelo 3D do monômero de LMV; (B) Sítio ativo de LMV com os átomos de zinco ligantes.

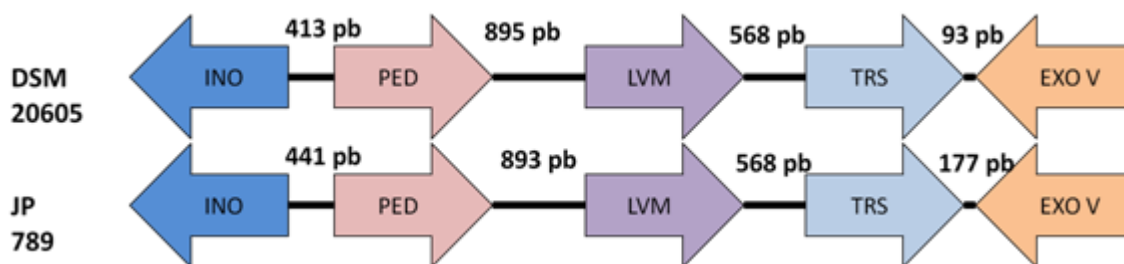


Figura 8. Mapa físico de *bla_{LMV}* e dos genes adjacentes a ele no genoma de . DSM 20605 e JP7.8.9. *bla_{LMV}* (LMV), mio-inositol-1(ou 4)-monofosfatase (INO), peptide deformilase (PED), regulador transcricional (TRS), subunidade alfa da exonuclease V (EXO). Os números acima das linhas indicam a distância em pb das ORFs.

O alinhamento da sequência de aminoácidos das ORFs com domínio de Lactamase_B indicou total semelhança entre elas em ambos os genomas. No alinhamento da ORF TRS, constatou-se seis substituições de aminoácido entre as linhagens tipo e industrial, conservando o tamanho da proteína. Na ORF EXOV observou-se a existência de várias substituições de aminoácidos na região terminal. A ORF INO por sua vez não estava completa no contig de JP 789 por conta do término da sequência do contig.

Além disso, foi possível caracterizar melhor a região onde essas ORFs estavam na linhagem tipo DSM 20605 pelo fato do contig 00068 ser mais extenso do que o equivalente na linhagem industrial. Foi observado a montante e a jusante ORFs similares a genes envolvidos na divisão celular como *ftsZ*, *ftsW*, *ftsQ*, *ftsA* e *DivVA* e entre outras associados a síntese de parede celular (dado não mostrado).

5.1.2 Análise filogenética

A sequência primária de aminoácidos de LMV foi avaliada quanto ao grau de similaridade genética com outras proteínas que contêm o domínio Lactamase_B. Esta análise foi realizada depois de retirada a porção

correspondente ao domínio RMMBL, de cerca de 228 aminoácidos. As árvores construídas produziram uma topologia idêntica na maioria dos métodos de construção de árvores usados, descritos no item 4.6. Com esta análise, foi possível posicionar a sequência de LMV na base da subclasse B1 do agrupamento B1/B2 das metalo β -lactamases (Fig. 9). Houve divergência apenas quanto ao método de máxima parcimônia no qual as relações filogenéticas entre as subclasses relatadas na literatura (Bebrone, 2007; Garau et al., 2005) não se mantiveram. A discussão sobre as implicações desse achado e sobre as causas dessa inconsistência filogenética estão além do escopo deste trabalho. Portanto, admitimos para nossas análises a topologia gerada pela maioria dos métodos, exemplificada na árvore construída com o método de Neighbour-joining (Fig. 9).

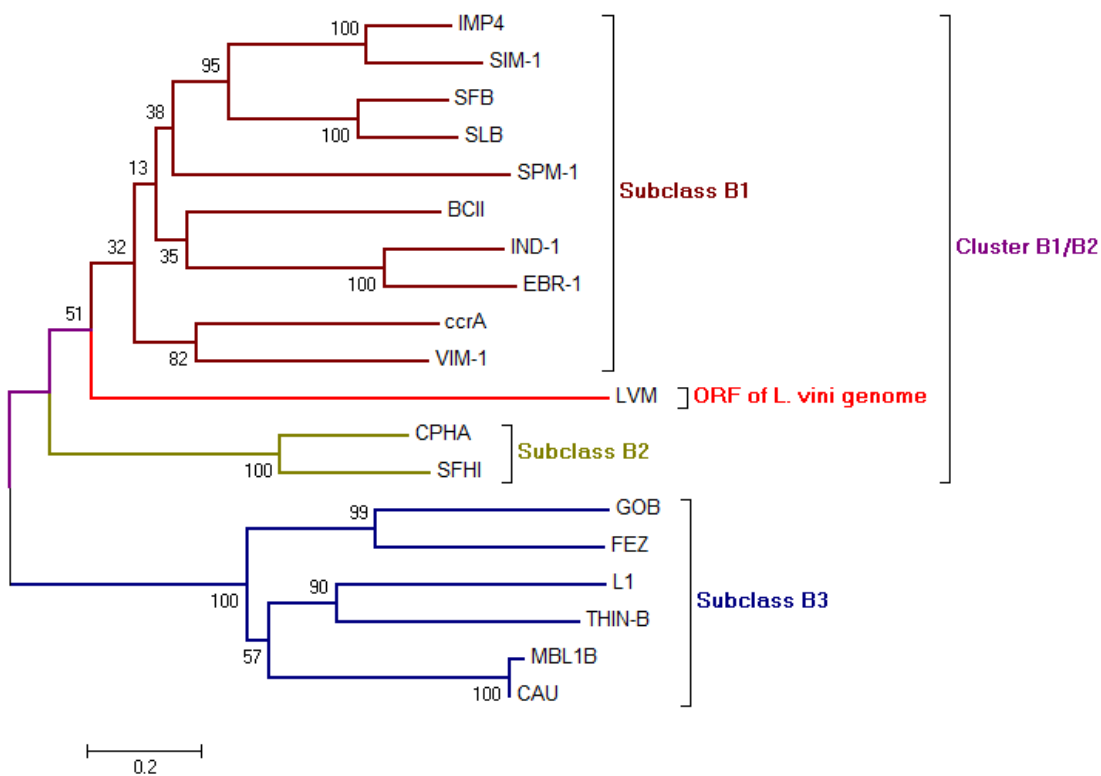


Figura 9. Árvore filogenética das MBLs e da ORF de *L. vini* (LMV) pelo método de Neighbour-Joining.

5.1.3 Análise fenotípica da presença da ORF LMV

A presença da ORF LMV que codifica uma proteína com domínio Lactamase_B levou à suspeita de que essas linhagens de *L. vini* seriam resistentes aos β -lactâmicos. Entretanto, os ensaios de disco difusão, executados de acordo o item 4.7, mostraram que a linhagem industrial JP 789 era sensível à Penicilina, substrato comum de todas as metalo β -lactamases (Bebrone, 2007; Garau et al., 2005). Posteriormente, os ensaios de RT-PCR sugeriram que não há expressão de LMV em níveis detectáveis nas células em fase exponencial de crescimento (Fig. 9 C).

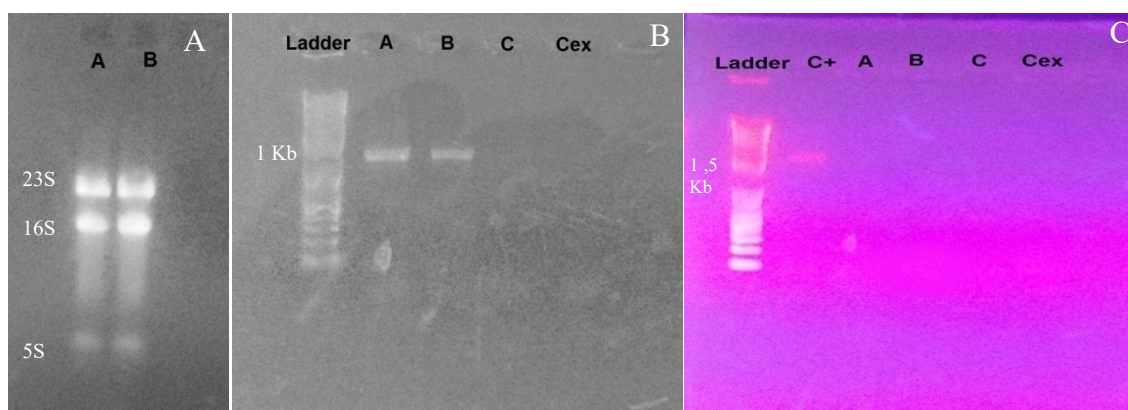


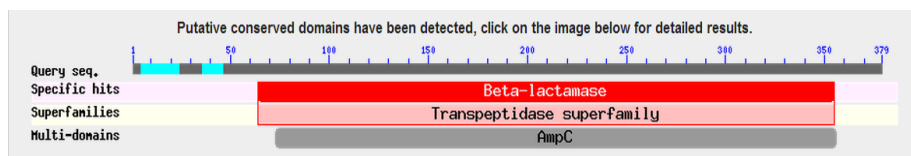
Figura 10. Ensaio de expressão gênica da ORF LMV. Painel A) Extração de RNA mostrando as bandas de rRNA bacteriano para verificar a qualidade do material (colunas A e B correspondem às réplicas da extração). Painel B) RT-PCR teste para amplificação de parte do gene rRNA 16S. Em sequência, o ladder (corresponde ao marcador molecular de 1 Kb), as amostras A e B, o controle negativo C e o controle Cex (corresponde ao controle externo da PCR possuindo apenas o mix da reação). Painel C) RT-PCR para a ORF LMV da linhagem JP 789. Em ordem, o controle C+ (correspondente a reação com o DNA genômico de JP 789), as amostras A e B (réplicas da extração de RNA usadas na síntese de cDNA), controle C (o controle negativo da síntese de cDNA) e o controle Cex (correspondente ao controle externo da PCR apenas com o mix da reação).

5.2 ORF com domínio Beta-lactamase

A segunda ORF identificada possui um domínio indicativo de β -lactamase de classe C, ou AmpC β -lactamase, presente nas linhagens JP 789 (contig

00062) e em DSM 20605 (contig 00222) (Fig. 11), com conteúdo de GC de 37,11% e 37,72% nas linhagens DSM 20605 e JP 789, respectivamente.

DSM
20605



JP
789

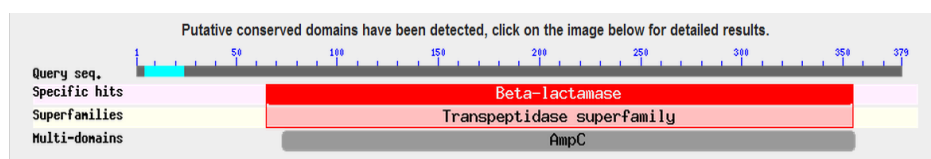


Figura 11. Resultado do alinhamento, com a ferramenta BLAST, das ORFs com domínio Beta-lactamase nos dois genomas, na linhagem de referência (DSM 20605) e na linhagem industrial (JP 789).

A análise do ambiente genético identificou que essa ORF está adjacente aos genes estruturais do operon DLT, distando 22 pb do gene *dltD* (Fig.12). O alinhamento dessas ORFs identificou a presença de 21 trocas de aminoácidos que revelaram que as proteínas produzidas pelas duas linhagens sofreram mutações diferenciais ao longo da evolução do genoma. A ORF ampC de JP 789 é composta por 1140 nucleotídeos e a proteína predita por 379 aminoácidos, com ponto isoelétrico e peso molecular de 9,78 e 42696,42 Daltons, respectivamente. Seu homólogo em DSM 20605 tem o mesmo tamanho em nucleotídeos e aminoácidos, mas diferindo no peso molecular de 42594.34 Daltons e 9,76 de ponto isoelétrico. A análise com a ferramenta TMHMM revelou a presença, com alta probabilidade (100%), de um sítio transmembrana na extremidade N terminal dos homólogos nas duas linhagens. Isto fortemente sugere que estas proteínas correspondem a proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) e não a β -lactamases verdadeiras. Sendo reforçado pelo perfil de susceptibilidade das linhagens de *L. vini* aos β -lactâmicos apresentado acima (item 5.1.3).

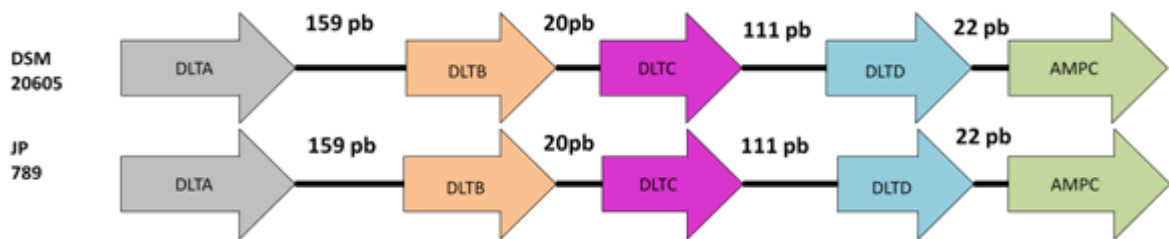


Figura 12. Mapa físico da ORF com domínio Beta-Lactamase. Em sequência temos os genes do operon DLT *dltA* (DLTA), *dltB* (DLTB), *dltC* (DLTC) e *dltD* (DLTD) a ORF com domínio beta-lactamase (AMPC).

5.3 Identificação das espécies e do perfil de resistência à antibióticos das bactérias industriais

Após o processo de seleção dos isolados, descritos no item 4.2, foram isolados inicialmente 138 morfotipos ao longo do processo fermentativo das destilarias Japungu (Tabela 2) e M (Tabela 3). Durante o processo de identificação, 34 destes isolados se mostraram leveduras ou não cresceram a partir do estoque congelado. Dos restantes, 90 isolados foram identificados a partir da amplificação parcial do gene *pheS* (Fig. 13), sendo classificados em seis espécies com base no sequenciamento deste gene. Um total de 14 isolados restam por ser identificados.

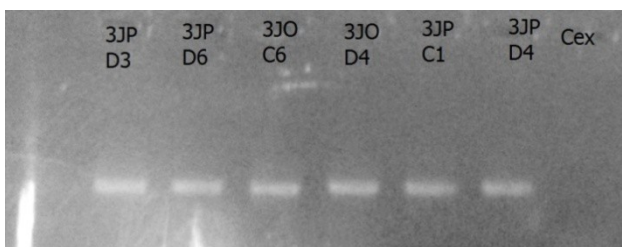


Figura 13. Foto representativa dos resultados das PCRs do gene *pheS* usado na identificação dos isolados bacterianos. Acima das colunas estão identificados os nomes das amostras utilizadas nesta amplificação e o controle Cex (correspondente ao controle externo da PCR apenas com o mix da reação)

As espécies identificadas foram *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus vini* e *Enterococcus faecalis*. As espécies predominantes, independente da destilaria trabalhada, foram *Lactobacillus fermentum* (66 isolados) e *Lactobacillus plantarum* (17 isolados). Dentre esses, *L. fermentum* se destacou em ambas as destilarias, 45 isolados da destilaria Japungu e 21 isolados da destilaria Miriri, aparecendo no começo da fermentação e se mantendo até o fim. *Lactobacillus plantarum*, por sua vez foi observado com a segunda maior frequência em ambas as destilarias, sendo mais freqüente na destilaria Miriri (12 isolados) do que na Japungu (5 isolados). *Lactobacillus plantarum* foi observado na 1ª coleta (2 isolados) e na 2ª coleta (3 isolados) da destilaria Japungu, mas não na 3ª coleta. Por outro lado, só foi detectado apenas na 1ª coleta (12 isolados) na destilaria Miriri. A espécie *E. faecalis* foi obtida na 1ª coleta da destilaria Miriri, enquanto *L. amylovorus* e *L. casei-paracasei* foram observadas na 2ª coleta da destilaria Japungu, ambas com tolerância a Penicilina (droga industrial) e a Meropenem (droga de maior potência). Já *L. mucosae* estava presente também na 2ª e 3ª coletas da Japungu, apresentando tolerância a Oxitetraciclina (droga industrial) e no controle com Ciprofloxacina. Na 3ª coleta *L. mucosae* também foi observada como tolerante a Penicilina (droga industrial) e a Doxiciclina (droga de maior potência). Apenas dois isolados de *L. vini* foram obtidos neste estudos, ambos na 2ª coleta da destilaria Miriri, com tolerância a Busan 989 (droga industrial) e a Doxiciclina (droga de maior potência).

5.4 Caracterização dos isolados industriais de *Lactobacillus vini*

Ao longo do processo de seleção bacteriana para o fenótipo de resistência aos antibióticos industriais e de referência, descritos nos itens 4.2 e 4.7, apenas dois isolados de *L. vini* foram identificados, ambos na 2ª coleta da destilaria Miriri. A identificação procedeu como descrito no item 5.3. Ambos se mostraram resistentes a preparação comercial Busan 989 (droga industrial) e ao antibiótico Doxiclina (droga de maior potência). Os ensaios de disco difusão mostraram diâmetros de halos de inibição de crescimento correspondentes a sensibilidade para todas as drogas testadas, exceto Vancomicina (para a qual *L. vini* possui resistência intrínseca) e a Doxiclina. Para esta última droga, o isolado 2M98D7 apresentou halo de 15 mm, que corresponde ao padrão de resistência intermediária (CLSI, 2010), enquanto que o isolado 2M98D2 apresentou halo de 12 mm, que corresponde ao padrão de resistência (CLSI, 2010). Estes dois isolados foram submetidos a ensaios de conjugação, como descrito no item 4.8, com a linhagem ATCC 29212 de *E. faecalis* como receptora e os resultados mostraram que apenas o isolado 2M98D2 foi capaz de transferir o fenótipo de resistência a Doxiclina para *E. faecalis*.

Deste experimento, foram obtidos dois transconjugantes. Os ensaios de MIC indicaram, como esperado, que a resistência observada na cepa doadora foi transferida para as duas receptoras em níveis iguais de 32 µg/mL. Nestes ensaios, a MIC do controle se manteve em 4 µg/mL, dentro da faixa esperada (2 a 8 µg/mL) de acordo com o CLSI (2010).

6. Discussão

A resistência bacteriana por muitos anos se manteve tópico de pesquisa em bactérias patogênicas, por conta da severidade dos problemas que esses organismos causam. Essas bactérias, durante décadas, vêm respondendo através da resistência ao uso dos antimicrobianos utilizados nos hospitais (Martinez, 2009). A cada novo antibiótico usado, um novo determinante de resistência surge e se alastra entre as populações, sendo adicionado ao “arsenal” de resistência já existente. Nos últimos anos, cada vez mais os antibióticos vêm sendo usados em outros ambientes, genericamente chamados de não hospitalares ou não clínicos. Na pecuária, são usados como promotores do crescimento animal e no tratamento de infecções (Martõ et al., 2001), mas eles também têm sido usados na agricultura e aquicultura (Mathur and Singh, 2005) e mais recentemente, no setor sucroalcooleiro (Muthaiyan et al., 2011).

Mesmo que seu uso não atinja grandes concentrações nos ambientes não clínicos, isto pode potencializar a seleção de genes de resistência, de acordo com a teoria da janela de seleção em concentrações sub-MIC, de Andersson e Hughes (2012). Segundo esses autores em concentrações sub-MIC mecanismos de resistência com baixo custo de fitness bacteriano são seletivamente favorecidos, quando presentes na população, tendendo a se disseminar e acumular na população enquanto for mantida a pressão seletiva (Andersson and Hughes, 2012). Uma outra teoria recente sugere que há uma flutuação desses genes em populações bacterianas ambientais (resistomas) (Walsh, 2013). Crescente atenção tem sido dada a esses organismos ambientais, pois, eles terminam por acumular genes de resistência e tornam-se reservatórios genéticos e propagadores destas marcas de resistência

(Mathur and Singh, 2005). Servindo, deste modo, de mediadores entre o meio ambiente e os hospitais sendo assim responsáveis pela introdução de novos genes de resistência nas populações hospitalares. O caso melhor documentado deste fluxo gênico é a resistência a glicopeptídeos nos hospitais europeus impulsionado pelo uso da Avoparcina que era usada como promotor do crescimento do gado (Wegener et al., 1999).

Neste panorama, gêneros bacterianos como *Lactobacillus* têm recebido privilegiada atenção por sua íntima relação com a indústria de alimentos (Kastner et al., 2006). De fato, alguns genes de resistência têm sido descritos nesse grupo, tais como os da família *tet* (Gevers et al., 2003), *Inu* (Rosander et al., 2008) e *erm* (Teuber et al., 1999). No setor de fermentação alcoólica para produção de álcool combustível, os genes da família *vat* têm sido investigados para justificar a tolerância a Virginamicina apresentada por alguns *Lactobacillus* contaminantes, mas não foi observado em muitas das linhagens resistentes (Bischoff et al., 2007).

Alguns desses genes foram encontrados em *L. fermentum* e *L. plantarum*, em particular *tet(M)* e *ermB* (Klare et al., 2007), mas apenas o *tet(M)* explicaria a tolerância a Doxiciclina visto nos isolados deste estudo. Drogas como Monensina Sódica, comercializada como Kamoran® e Busan 991®, ainda não possuem mecanismo de resistência elucidados. No presente trabalho, a espécie *L. fermentum* se destacou por ter apresentado tolerância a quase todas as drogas industriais utilizadas durante a safra, inclusive a drogas cujos genes descritos até o momento não explicam este fenótipo.

O Meropenem, por exemplo, carece na literatura de relatos de tolerância por parte das bactérias probióticas em especial os *Lactobacillus* (Klare et al., 2007). Mas, foi exatamente com esta marca de seleção que o maior número de espécies foi

obtido: *L. fermentum*, *L. amylovorus*, *L. plantarum* e *L. casei*. Todas estas espécies provenientes da população tolerante ao tratamento com Penicilina no mosto fermentado na destilaria Japungu. Esses dados sugerem o papel da Penicilina como agente seletivo de mecanismos de resistência com ação abrangente para outros β -lactâmicos, tais como o Meropenem. O fenótipo de tolerância a Meropenem ainda não foi descrito na literatura para lactobacilos. Mas, no presente trabalho, foi surpreendentemente encontrado em espécies como *L. casei*, que está presente em muitos produtos lácteos e com relatos de infecções cardíacas documentadas (Slover and Danziger, 2008).

Diferentemente de trabalhos prévios (Lucena et al., 2010), a espécie *L. vini* não foi encontrada de modo amplo nas amostras industriais das destilarias estudadas. Este perfil de sensibilidade aos β -lactâmicos é esperado para os isolados industriais de *L. vini* (já que não foram detectados após o tratamento com Meropenem e nem nas amostras tratadas com Penicilina). Este dado corrobora as análises *in silico* realizadas no genoma das linhagens JP 789 e DSM 20605 onde β -lactamases convencionais não foram encontradas.

As análises genômicas revelaram a presença de duas ORFs no genoma de *L. vini* com o potencial de codificar enzimas com atividade de β -lactamase. ORFs similares a β -lactamases foram relatadas em lactobacilos e estão depositadas no banco de dados UniProt. Elas são PEN P de *L. crispatus* linhagem ST 1, LCABL_19700 de *L. casei* linhagem BL23 e *bla1* de *L. plantarum* linhagem JDM1. Todas estas com funções preditas para serino β -lactamases. Essas ORFs não possuem até o momento estudos *in vivo* que comprovem sua atividade de β -lactamases. Mas, são importantes candidatas a explicarem a tolerância a Meropenem apresentada no caso dos *L. plantarum* e de *L. casei* isolados neste trabalho.

Das ORFs encontradas em *L. vini*, a primeira codifica uma proteína que se assemelha a uma metalo β -lactamase, denominada aqui como LMV. Esse grupo de enzimas está dispersa entre muitos patógenos (Bebrone, 2007) e em grupos próximos aos lactobacilos, como o gênero *Bacillus* (Chen et al., 2003). A análise da árvore filogenética produzida sugere uma relação de LMV com a subclasse B1 das metalo β -lactamases. Corroborando os trabalhos prévios, a árvore aponta para uma origem filogenética mais distinta da subclasse B3 em relação ao agrupamento B1/B2, como sugerido por Garau et al. (2005). Mas, os resultados *in silico* obtidos não apontam claramente esta ORF como uma verdadeira metalo β -lactamase.

A presença do domínio RMMBL e a ausência de resistência à Penicilina sugeriu uma função diferente para esta enzima. A organização de um domínio Lactamase_B seguido de um domínio RMMBL é encontrado num grupo particular de ribonucleases, as ribonucleases do tipo J, como as encontradas em *Bacillus subtilis* (Even et al., 2005). Este domínio é encontrado em ribonucleases envolvidas no metabolismo de ácidos nucléicos; processamento da extremidade 3' do RNA; reparo do DNA, recombinação e manutenção dos telômeros (Dominski, 2007). Sendo identificadas de bactérias (Condon, 2010) aos seres humanos (Callebaut et al., 2002). Esta enzima é parte de um complexo envolvido no processamento e degradação do RNA em *B. subtilis* (RNAdegradossomo) que é importante para o controle da expressão gênica nestas bactérias Gram-positivas (Lehnik-Habrink et al., 2012). A análise computacional de LMV previu que ela pode formar tetrâmeros *in vivo*, que também é uma característica das ribonucleases J (Richards and Belasco, 2011). Portanto, propomos que LMV pode estar envolvida no processamento primário de RNA no citoplasma de *L. vini*.

A segunda ORF identificada no genoma de *L. vini* apresentou o domínio beta-lactamase encontrado nas serino β -lactamases de classe C que confere resistência aos β -lactâmicos de um modo geral. Entretanto, os resultados obtidos no presente trabalho não suportam a hipótese de que esta ORF esteja relacionada com resistência aos β -lactâmicos. O resultado experimental, e mais relevante, é o fato de que as linhagens de *L. vini* JP789 (de cujo genoma a ORF foi identificada) e os isolados industriais 2M98D2 e 2M98D7 são sensíveis a Penicilina e Meropenem. O resultado *in silico* mostrou a presença de um domínio transmembrana na proteína teórica codificada pela ORF. Este domínio é característico das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) que se localizam na face externa da membrana plasmática, ligada a esta pelo domínio transmembrana e atuando na construção da parede celular (Scheffers and Pinho, 2005). Adicionalmente há o fato de que as β -lactamases até então conhecidas são exportadas para o meio extracelular, no caso das bactérias Gram-positivas, ou mantidas no espaço periplasmático, no caso das bactérias Gram-negativas. Deste modo, a presença destes domínios transmembrana entra em desacordo com as localizações biológicas das β -lactamases. Portanto, é muito provável que esta ORF codifique uma proteína com função de PBP e não de β -lactamase em *L. vini*.

Esta ORF está próxima do operon DLT, distando apenas 22pb do gene *dltD*, o que pode indicar sua participação dentre os genes estruturais desse sistema. Os genes deste operon participam da reestruturação do envelope celular em resposta a condições de estresse (Lebeer et al., 2008). Isto sugere que em *L. vini* a proteína codificada por esta ORF desempenhe realmente uma função de PBP e que esta participa na resposta a danos no envelope celular causados, por exemplo, pelos antibióticos β -lactâmicos. Estudos prévio em células de *L. reuteri* submetidas a

condições de estresse causados por sais de bile (O'Flaherty et al., 2010) ou por ácidos orgânicos (Wall et al., 2007) mostraram a sobre-expressão de uma ORF cuja proteína tem função predita para β -lactamase de classe C, semelhante à ORF identificada no presente trabalho. Estudos de expressão gênica devem ser realizados para se entender o papel desta ORF na biogênese e/ou regeneração do envelope celular de *L. vini*.

E finalmente, este trabalho identificou o fenótipo de tolerância a Virginiamicina (Busan 989®) e resistência a Doxiciclina em isolados industriais de *L. vini*, o que não foi observado na linhagem JP 789. Deve-se ressaltar que esta linhagem foi isolada do mosto de fermentação da destilaria Japungu na safra 2007-2008 (Lucena et al., 2010), a qual tem utilizado preferencialmente o produto Kamoran® que tem como princípio ativo a monoenzima sódica. Já os isolados 2M98D2 e 2M98D7 foram provenientes do mosto fermentado da destilaria Miriri na safra 2012-2013, que faz mais uso de Virginiamicina. Essa classe de compostos, Virginiamicina e Doxiciclina, atua na inibição da síntese protéica bacteriana em pontos diferentes do processo: a Doxiciclina atua se ligando e inibindo a ação da subunidade 30S (Chopra and Roberts, 2001) enquanto que a Virginiamicina atua na subunidade maior 50S. No entanto, outros inibidores da síntese protéica como Cloranfenicol e Estreptomicina apresentaram ação inibitória contra estes dois isolados, o que sugere um mecanismo de resistência específico para Doxiciclina, ou talvez para as Tetraciclinas, mediado pelos genes da família *tet* ou *otr* (Chopra and Roberts, 2001). Independente do espectro de ação deste mecanismo de resistência, nossos dados mostram que este pode ser transferido para células de *E. faecalis* por meio de transferência de plasmídeo via conjugação e por si só converter uma cepa sensível em resistente segundo os padrões do CLSI (2010).

7. Conclusões

Com os dados apresentados identificamos que *L. vini* pode apresentar resistência a drogas de uso industrial como a Virginiamicina e outras drogas, como a Doxiclina sendo apto a transferir esta resistência, mas o(s) gene(s) determinante(s) permanece(m) por ser(em) identificado(s). As ORFs primeiramente estudadas a partir do genoma de JP789 e DSM 20605 não contribuem para o fenótipo de resistência, mas sim provavelmente em processos celulares como a resposta a estresse de envelope celular e como degradossoma.

Referências Bibliográficas

- Andersson, Dan I, and Diarmaid Hughes. 2012. "Evolution of Antibiotic Resistance at Non-Lethal Drug Concentrations." *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* (April 17). doi:10.1016/j.drup.2012.03.005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22516308>.
- Arnold, Konstantin, Lorenza Bordoli, Jürgen Kopp, and Torsten Schwede. 2006. "The SWISS-MODEL Workspace: a Web-Based Environment for Protein Structure Homology Modelling." *Bioinformatics (Oxford, England)* 22 (2) (January 15): 195–201. doi:10.1093/bioinformatics/bti770. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16301204>.
- Arsköld, Emma, Elke Lohmeier-Vogel, Rong Cao, Stefan Roos, Peter Rådström, and Ed W J van Niel. 2008. "Phosphoketolase Pathway Dominates in *Lactobacillus Reuteri* ATCC 55730 Containing Dual Pathways for Glycolysis." *Journal of Bacteriology* 190 (1) (January): 206–12. doi:10.1128/JB.01227-07. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2223725&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Aziz, Ramy K, Daniela Bartels, Aaron a Best, Matthew DeJongh, Terrence Disz, Robert a Edwards, Kevin Formsma, et al. 2008. "The RAST Server: Rapid Annotations Using Subsystems Technology." *BMC Genomics* 9 (January): 75. doi:10.1186/1471-2164-9-75. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2265698&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Balat, Mustafa, and Havva Balat. 2009. "Recent Trends in Global Production and Utilization of Bio-Ethanol Fuel." *Applied Energy* 86 (11) (November): 2273–2282. doi:10.1016/j.apenergy.2009.03.015. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306261909000919>.
- Balat, Mustafa, Havva Balat, and Cahide Öz. 2008. "Progress in Bioethanol Processing." *Progress in Energy and Combustion Science* 34 (5) (October): 551–573. doi:10.1016/j.pecs.2007.11.001. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360128507000706>.
- Barres, P. 1978. "Identification of Thermobacteria and Homofermentative, Thermophilic, Pentose-Utilizing Lactobacilli from High Temperature Fermenting Grape Must." *J Appl Bacteriol* 44: 125–129.
- Basso, L C, de Amorim, H V, de Oliveira, A J, Lopes, M L. 2008. "Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil". *FEMS Yeast Res* 8: 1155-116.
- Bayrock, D P, K C Thomas, and W M Ingledew. 2003. "Control of *Lactobacillus* Contaminants in Continuous Fuel Ethanol Fermentations by Constant or Pulsed Addition of Penicillin G." *Applied Microbiology and Biotechnology* 62

- (5-6) (October): 498–502. doi:10.1007/s00253-003-1324-5.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12743751>.
- Bayrock, Dennis P, and W Michael Ingledew. 2004. "Inhibition of Yeast by Lactic Acid Bacteria in Continuous Culture: Nutrient Depletion And/or Acid Toxicity?" *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 31 (8) (September): 362–8. doi:10.1007/s10295-004-0156-3.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15257443>.
- Bebrone, Carine. 2007. "Metallo-Beta-Lactamases (classification, Activity, Genetic Organization, Structure, Zinc Coordination) and Their Superfamily." *Biochemical Pharmacology* 74 (12) (December 15): 1686–701. doi:10.1016/j.bcp.2007.05.021.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17597585>.
- Bernardeau, Marion, Jean Paul Vernoux, Ségolène Henri-Dubernet, and Micheline Guéguen. 2008. "Safety Assessment of Dairy Microorganisms: The Lactobacillus Genus." *International Journal of Food Microbiology* 126 (3) (September 1): 278–85. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17889388>.
- Bischoff, Kenneth M, Siqing Liu, Timothy D Leathers, Ronald E Worthington, and Joseph O Rich. 2009. "Modeling Bacterial Contamination of Fuel Ethanol Fermentation." *Biotechnology and Bioengineering* 103 (1) (May 1): 117–22. doi:10.1002/bit.22244. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19148876>.
- Bischoff, Kenneth M, Kelly a Skinner-Nemec, and Timothy D Leathers. 2007. "Antimicrobial Susceptibility of Lactobacillus Species Isolated from Commercial Ethanol Plants." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 34 (11) (November): 739–44. doi:10.1007/s10295-007-0250-4.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17726620>.
- Bryan, Michael. 2006. "Biofuelling Brazil." *Re-FOCUS* (June): 56–59.
- Callebaut I, Moshous D, Mornon J-P, De Villartay J-P. 2002. "Metallo-beta-lactamase fold within nucleic acids processing enzymes: the beta-CASP family". *Nucleic acids research* (Agosto) 30:3592–601.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC134238/>
- Canchaya, Carlos, Marcus J Claesson, Gerald F Fitzgerald, Douwe van Sinderen, and Paul W O'Toole. 2006. "Diversity of the Genus Lactobacillus Revealed by Comparative Genomics of Five Species." *Microbiology (Reading, England)* 152 (Pt 11) (November): 3185–96. doi:10.1099/mic.0.29140-0.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17074890>.
- Chang, I S, B H Kim, and P K Shin. 1997. "Use of Sulfite and Hydrogen Peroxide to Control Bacterial Contamination in Ethanol Fermentation." *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1) (January): 1–6.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=168295&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.

- Chen, Y., J. Succi, F. C. Tenover, and T. M. Koehler. 2003. "-Lactamase Genes of the Penicillin-Susceptible *Bacillus Anthracis* Sterne Strain." *Journal of Bacteriology* 185 (3) (February 1): 823–830. doi:10.1128/JB.185.3.823-830.2003. <http://jlb.asm.org/cgi/content/long/185/3/823>.
- Chopra, Ian, and Marilyn Roberts. 2001. "Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance" 65 (2). doi:10.1128/MMBR.65.2.232.
- Claesson, Marcus J, Douwe van Sinderen, and Paul W O'Toole. 2007. "The Genus *Lactobacillus*--a Genomic Basis for Understanding Its Diversity." *FEMS Microbiology Letters* 269 (1) (April): 22–8. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00596.x. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17343688>.
- Claesson, Marcus J, Douwe van Sinderen, and Paul W O'Toole. 2008. "Lactobacillus Phylogenomics--Towards a Reclassification of the Genus." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58 (Pt 12) (December): 2945–54. doi:10.1099/ijs.0.65848-0. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19060088>.
- Condon C. 2010. "What is the role of RNase J in mRNA turnover?". *RNA biology* (7) (Maio):316–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20458164>
- Danielsen, Morten, and Anette Wind. 2003. "Susceptibility of *Lactobacillus* Spp . to Antimicrobial Agents" 82: 1–11.
- De Souza, Rafael Barros, Billy Manoel dos Santos, Raquel de Fátima Rodrigues de Souza, Paula Katharina Nogueira da Silva, Brígida Thais Luckwu Lucena, and Marcos Antonio de Moraes. 2012. "The Consequences of *Lactobacillus Vini* and *Dekkera Bruxellensis* as Contaminants of the Sugarcane-Based Ethanol Fermentation." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 39 (11) (November): 1645–50. doi:10.1007/s10295-012-1167-0. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842986>.
- Dominski, Z. 2007." Nucleases of the metallo-beta-lactamase family and their role in DNA and RNA metabolism". *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 42(2), (Abril)67–93. doi:10.1080/10409230701279118
- Duprey, Kevin M, Leon McCrea, Bonnie L Rabinowitch, and Kamran N Azad. 2012. "Pyelonephritis and Bacteremia from *Lactobacillus Delbrueckii*." *Case Reports in Infectious Diseases* 2012 (January): 745743. doi:10.1155/2012/745743. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3465865&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Dziuba, Bartłomiej, Andrzej Babuchowski, Dorota Nałęcz, and Marta Niklewicz. 2007. "Identification of Lactic Acid Bacteria Using FTIR Spectroscopy and Cluster Analysis." *International Dairy Journal* 17 (3) (March): 183–189.

doi:10.1016/j.idairyj.2006.02.013.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694606000550>.

- Even, Sergine, Olivier Pellegrini, Lena Zig, Valerie Labas, Joelle Vinh, Dominique Bréchemmier-Baey, and Harald Putzer. 2005. "Ribonucleases J1 and J2: Two Novel Endoribonucleases in *B.subtilis* with Functional Homology to *E.coli* RNase E." *Nucleic Acids Research* 33 (7) (January): 2141–52. doi:10.1093/nar/gki505.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1079966&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Feld, Louise, Susanne Schjørring, Karin Hammer, Tine Rask Licht, Morten Danielsen, Karen Krogfelt, and Andrea Wilcks. 2008. "Selective Pressure Affects Transfer and Establishment of a *Lactobacillus Plantarum* Resistance Plasmid in the Gastrointestinal Environment." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61 (4) (April 1): 845–52. doi:10.1093/jac/dkn033.
<http://jac.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/61/4/845>.
- Gänzle, Michael G, and Rainer Follador. 2012. "Metabolism of Oligosaccharides and Starch in *Lactobacilli*: a Review" 3 (September): 1–15. doi:10.3389/fmicb.2012.00340.
- Gänzle, Michael G, Nicoline Vermeulen, and Rudi F Vogel. 2007. "Carbohydrate, Peptide and Lipid Metabolism of Lactic Acid Bacteria in Sourdough." *Food Microbiology* 24 (2) (April): 128–38. doi:10.1016/j.fm.2006.07.006.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008155>.
- Garau, Gianpiero, Anne Marie, Di Guilmi, and Barry G Hall. 2005. "Structure-Based Phylogeny of the Metallo- β Structure-Based Phylogeny of the Metallo- β -Lactamases" 49 (7). doi:10.1128/AAC.49.7.2778.
- Gevers, Dirk, Morten Danielsen, Geert Huys, and Jean Swings. 2003. "Molecular Characterization of Tet (M) Genes in *Lactobacillus* Isolates from Different Types of Fermented Dry Sausage" 69 (2): 1270–1275. doi:10.1128/AEM.69.2.1270.
- Gobbetti, M, P Lavermicocca, F Minervini, M de Angelis, and a Corsetti. 2000. "Arabinose Fermentation by *Lactobacillus Plantarum* in Sourdough with Added Pentosans and Alphaalpha-L-Arabinofuranosidase: a Tool to Increase the Production of Acetic Acid." *Journal of Applied Microbiology* 88 (2) (February): 317–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10736001>.
- Gray, Kevin a, Lishan Zhao, and Mark Emptage. 2006. "Bioethanol." *Current Opinion in Chemical Biology* 10 (2) (April): 141–6. doi:10.1016/j.cbpa.2006.02.035.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16522374>.
- Herbel, Stefan R, Wilfried Vahjen, Lothar H Wieler, and Sebastian Guenther. 2013. "Timely Approaches to Identify Probiotic Species of the Genus *Lactobacillus*." *Gut Pathogens* 5 (1) (January): 27. doi:10.1186/1757-4749-5-

27.

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3848994&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Ja, Hanna M, P Douillard, Angela Ribbera, Ravi Kant, Taija E Pietila, Stan J J Brouns, Reetta Satokari, Ingemar Von Ossowski, and Justus Reunanen. 2013. "Comparative Genomic and Functional Analysis of 100 Lactobacillus Rhamnosus Strains and Their Comparison with Strain GG" 9 (8). doi:10.1371/journal.pgen.1003683.
- Kandler, Otto. 1983. "Carbohydrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria The Term ' Lactic Acid Bacteria ' Gradually Emerged in the Years Around The." *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 209–224.
- Kastner, Sabine, Vincent Perreten, Helen Bleuler, Gabriel Hugenschmidt, Christophe Lacroix, and Leo Meile. 2006. "Antibiotic Susceptibility Patterns and Resistance Genes of Starter Cultures and Probiotic Bacteria Used in Food." *Systematic and Applied Microbiology* 29 (2) (March): 145–55. doi:10.1016/j.syapm.2005.07.009. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16464696>.
- Klare, I., C. Konstabel, G. Werner, G. Huys, V. Vankerckhoven, G. Kahlmeter, B. Hildebrandt, S. Muller-Bertling, W. Witte, and H. Goossens. 2007. "Antimicrobial Susceptibilities of Lactobacillus, Pediococcus and Lactococcus Human Isolates and Cultures Intended for Probiotic or Nutritional Use." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59 (5) (March 15): 900–912. doi:10.1093/jac/dkm035. <http://www.jac.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jac/dkm035>.
- Koçar, Günnur, and Nilgün Civaş. 2013. "An Overview of Biofuels from Energy Crops: Current Status and Future Prospects." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 28 (December): 900–916. doi:10.1016/j.rser.2013.08.022. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032113005625>.
- Krogh, a, B Larsson, G von Heijne, and E L Sonnhammer. 2001. "Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes." *Journal of Molecular Biology* 305 (3) (January 19): 567–80. doi:10.1006/jmbi.2000.4315. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152613>.
- Kumari, Archana, Catazaro, Roberto and Marotta, Francesco. 2011."Clinical importance of lactic acid bacteria: a short review".*Acta Biomed* (82) :177-80.
- Lebeer, Sarah, Jos Vanderleyden, and Sigrid C J De Keersmaecker. 2008. "Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 72 (4) (December): 728–64, Table of Contents. doi:10.1128/MMBR.00017-08. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2593565&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Lehnik-Habrink, Martin, Richard J Lewis, Ulrike Mäder, and Jörg Stülke. 2012. "RNA Degradation in *Bacillus Subtilis*: An Interplay of Essential Endo- and Exoribonucleases." *Molecular Microbiology* 84 (6) (June): 1005–17. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08072.x. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22568516>.
- Lucena, Brigida T L, Billy M dos Santos, João Ls Moreira, Ana Paula B Moreira, Alvaro C Nunes, Vasco Azevedo, Anderson Miyoshi, Fabiano L Thompson, and Marcos Antonio de Moraes. 2010. "Diversity of Lactic Acid Bacteria of the Bioethanol Process." *BMC Microbiology* 10 (1) (January): 298. doi:10.1186/1471-2180-10-298. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2999616&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Luckwu de Lucena, Brígida Thaís, Genivaldo G Z Silva, Billy Manoel Dos Santos, Graciela M Dias, Gilda Rose S Amaral, Ana Paula B Moreira, Marcos Antônio de Moraes Júnior, et al. 2012. "Genome Sequences of the Ethanol-Tolerant *Lactobacillus Vini* Strains LMG 23202T and JP7.8.9." *Journal of Bacteriology* 194 (11) (June 1): 3018. doi:10.1128/JB.00446-12. <http://jb.asm.org/cgi/content/long/194/11/3018>.
- Makarova, K, A Slesarev, Y Wolf, A Sorokin, B Mirkin, E Koonin, A Pavlov, et al. 2006. "Comparative Genomics of the Lactic Acid Bacteria." *PNAS* 103 (42): 15611–15616. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1622870/pdf/zpq15611.pdf>.
- Makarova, Kira S, and Eugene V Koonin. 2007. "Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria." *Journal of Bacteriology* 189 (4) (February): 1199–208. doi:10.1128/JB.01351-06. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1797341&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mari, Ana, Empar Chenoll, M Carmen Macia, Sergi Ferrer, Isabel Pardo, and Rosa Aznar. 2006. "Lactobacillus Vini Sp . Nov ., a Wine Lactic Acid Bacterium Homofermentative for Pentoses": 513–517. doi:10.1099/ijs.0.63877-0.
- Martinez, Jose L. 2009. "The Role of Natural Environments in the Evolution of Resistance Traits in Pathogenic Bacteria." *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 276 (1667) (July 22): 2521–30. doi:10.1098/rspb.2009.0320. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2684669&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Martõ, Â L, Ana Alonso, and Patricia Sa. 2001. "Minireview Environmental Selection of Antibiotic Resistance Genes" 3: 1–9.
- Mathur, Shalini, and Rameshwar Singh. 2005. "Antibiotic Resistance in Food Lactic Acid Bacteria--a Review." *International Journal of Food Microbiology* 105 (3) (December 15): 281–95. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289406>.

- Mcmillan, James D. 1997. "BIOETHANOL PRODUCTION: STATUS AND PROSPECTS." *Renewable Energy* 10 (213): 295–302.
- Murphy, Fionnuala, Ger Devlin, Rory Deverell, and Kevin McDonnell. 2013. "Biofuel Production in Ireland—An Approach to 2020 Targets with a Focus on Algal Biomass." *Energies* 6 (12) (December 4): 6391–6412. doi:10.3390/en6126391. <http://www.mdpi.com/1996-1073/6/12/6391/>.
- Muthaiyan, Arunachalam, Alya Limayem, and Steven C. Ricke. 2011. "Antimicrobial Strategies for Limiting Bacterial Contaminants in Fuel Bioethanol Fermentations." *Progress in Energy and Combustion Science* 37 (3) (June): 351–370. doi:10.1016/j.pecs.2010.06.005. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360128510000547>.
- Narendranath, N V, S H Hynes, K C Thomas, and W M Ingledew. 1997. "Effects of Lactobacilli on Yeast-Catalyzed Ethanol Fermentations." *Applied and Environmental Microbiology* 63 (11) (November): 4158–63. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=168732&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Naser, Sabri M, Peter Dawyndt, Bart Hoste, Dirk Gevers, Katrien Vandemeulebroecke, Ilse Cleenwerck, Marc Vancanneyt, and Jean Swings. 2007. "Identification of Lactobacilli by pheS and rpoA Gene Sequence Analyses." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57 (Pt 12) (December): 2777–89. doi:10.1099/ijs.0.64711-0. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18048724>.
- Nicolas, Pierre, Philippe Bessières, S Dusko Ehrlich, Emmanuelle Maguin, and Maarten van de Guchte. 2007. "Extensive Horizontal Transfer of Core Genome Genes Between Two Lactobacillus Species Found in the Gastrointestinal Tract." *BMC Evolutionary Biology* 7 (January): 141. doi:10.1186/1471-2148-7-141. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1994166&tool=pm-centrez&rendertype=abstract>.
- Nissen, T L, M C Kielland-Brandt, J Nielsen, and J Villadsen. 2000. "Optimization of Ethanol Production in Saccharomyces Cerevisiae by Metabolic Engineering of the Ammonium Assimilation." *Metabolic Engineering* 2 (1) (January): 69–77. doi:10.1006/mben.1999.0140. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10935936>.
- Notredame, C, D G Higgins, and J Heringa. 2000. "T-Coffee: A Novel Method for Fast and Accurate Multiple Sequence Alignment." *Journal of Molecular Biology* 302 (1) (September 8): 205–17. doi:10.1006/jmbi.2000.4042. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10964570>.
- O'Flaherty, Sarah J, and Todd R Klaenhammer. 2010. "Functional and Phenotypic Characterization of a Protein from Lactobacillus Acidophilus Involved in Cell Morphology, Stress Tolerance and Adherence to Intestinal Cells."

- Microbiology (Reading, England)* 156 (Pt 11) (November): 3360–7. doi:10.1099/mic.0.043158-0. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20829293>.
- Passoth, Volkmar, Johanna Blomqvist, and Johan Schnürer. 2007. "Dekkera Bruxellensis and Lactobacillus Vini Form a Stable Ethanol-Producing Consortium in a Commercial Alcohol Production Process." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (13) (July): 4354–6. doi:10.1128/AEM.00437-07. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1932793&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pettersen, Eric F, Thomas D Goddard, Conrad C Huang, Gregory S Couch, Daniel M Greenblatt, Elaine C Meng, and Thomas E Ferrin. 2004. "UCSF Chimera-- a Visualization System for Exploratory Research and Analysis." *Journal of Computational Chemistry* 25 (13) (October): 1605–12. doi:10.1002/jcc.20084. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15264254>.
- Richards, J., & Belasco, J. G. 2011." Ribonuclease J: how to lead a double life. Structure" (London, England: 1993), 19(9) (Setembro) 1201–3. doi:10.1016/j.str.2011.08.004. [http://www.cell.com/structure/abstract/S0969-2126\(11\)00283-8](http://www.cell.com/structure/abstract/S0969-2126(11)00283-8)
- Rodas, a M, S Ferrer, and I Pardo. 2005. "Polyphasic Study of Wine Lactobacillus Strains: Taxonomic Implications." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55 (Pt 1) (January): 197–207. doi:10.1099/ijs.0.63249-0. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15653876>.
- Rosander, Anna, Eamonn Connolly, and Stefan Roos. 2008. "Removal of Antibiotic Resistance Gene-Carrying Plasmids from Lactobacillus Reuteri ATCC 55730 and Characterization of the Resulting Daughter Strain, L. Reuteri DSM 17938." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (19) (October): 6032–40. doi:10.1128/AEM.00991-08. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2565949&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sadeghinezhad, E., S.N. Kazi, Foad Sadeghinejad, a. Badarudin, Mohammad Mehrali, Rad Sadri, and Mohammad Reza Safaei. 2014. "A Comprehensive Literature Review of Bio-Fuel Performance in Internal Combustion Engine and Relevant Costs Involvement." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 30 (February): 29–44. doi:10.1016/j.rser.2013.09.022. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032113006813>.
- Salveti, Elisa, Sandra Torriani, and Giovanna E. Felis. 2012. "The Genus Lactobacillus: A Taxonomic Update." *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 4 (4) (November 7): 217–226. doi:10.1007/s12602-012-9117-8. <http://link.springer.com/10.1007/s12602-012-9117-8>.

- Sambrook, J., and D. W. Russel. 2001. "Plasmid and Their Usefulness in Molecular Cloning." In *Molecular Cloning: Laboratory Manual*, 1.32–1.34.
- Scheffers, Dirk-jan, and Mariana G Pinho. 2005. "Bacterial Cell Wall Synthesis : New Insights from Localization Studies Bacterial Cell Wall Synthesis : New Insights from Localization Studies" 69 (4). doi:10.1128/MMBR.69.4.585.
- See, Joseph R H, John S Czachor, and George R Brown. 2006. "Case Report and Literature Review" 14 (3): 134–136.
- Sekirov, Inna, Shannon L Russell, L Caetano M Antunes, and B Brett Finlay. 2010. "Gut Microbiota in Health and Disease": 859–904. doi:10.1152/physrev.00045.2009.
- Silva-Filho E A, dos Santos, S K B, Resende, A M, de Moraes, J O F, de Moraes Jr, M A, Simões, D A. 2005. "Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCRfingerprinting". *Antonie van Leeuwenhoek* 88:13–23.
- Silva-Filho, E A, Melo, H F, Antunes, D F, Dos Santos, S K B, Resende, M A, Simões, D A, Moraes, M A Jr. 2005. "Isolation by genetics and physiological characteristics of a fuel ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation". *J Ind Microbiol Biotechnol* 32:481–486.
- Skinner, Kelly a, and Timothy D Leathers. 2004a. "Bacterial Contaminants of Fuel Ethanol Production." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 31 (9) (October): 401–8. doi:10.1007/s10295-004-0159-0. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15338420>.
- Slover, Christine M, and Larry Danziger. 2008. "Lactobacillus: a Review." *Clinical Microbiology Newsletter* 30 (4) (February): 23–27. doi:10.1016/j.clinmicnews.2008.01.006. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019643990800007X>.
- Sullivan, Daniel J O, Todd R Klaenhammer, and North Carolina. 1993. "Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* Spp . t" 59 (8).
- Tanaka, K, a Komiyama, K Sonomoto, a Ishizaki, S J Hall, and P F Stanbury. 2002. "Two Different Pathways for D-Xylose Metabolism and the Effect of Xylose Concentration on the Yield Coefficient of L-Lactate in Mixed-Acid Fermentation by the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus Lactis* IO-1." *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (1-2) (October): 160–7. doi:10.1007/s00253-002-1078-5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12382058>.
- Tannock, Gerald W. 2004. "A Special Fondness for Lactobacilli MINIREVIEWS A Special Fondness for Lactobacilli" 70 (6). doi:10.1128/AEM.70.6.3189.

- Teuber, M, L Meile, and F Schwarz. 1999. "Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Food." *Antonie van Leeuwenhoek* 76 (1-4): 115–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10532375>.
- Wall, Torun, Klara Båth, Robert a Britton, Hans Jonsson, James Versalovic, and Stefan Roos. 2007. "The Early Response to Acid Shock in *Lactobacillus Reuteri* Involves the ClpL Chaperone and a Putative Cell Wall-Altering Esterase." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (12) (June): 3924–35. doi:10.1128/AEM.01502-06. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1932720&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Walsh, Fiona. 2013. "Investigating Antibiotic Resistance in Non-Clinical Environments." *Frontiers in Microbiology* 4 (February) (January): 19. doi:10.3389/fmicb.2013.00019. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3573686&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Weneger, H, Aarestrup, F, Jensen, LB, Hammerum, AM and Flemming, B. 1999. "Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe". *Emerging infectious diseases* 5 (3)(Junho) : 329-35. doi: 10.3201/eid0503.990303. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2640785&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wilkins, M R, E Gasteiger, a Bairoch, J C Sanchez, K L Williams, R D Appel, and D F Hochstrasser. 1999. "Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 112 (January): 531–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10027275>.
- Wheals, E A, Basso, L C, Alves, D M G, Amorim, H V. 1999. "Fuel ethanol after 25 years". *Trends Biotechnol* 17:482–48.1

Anexo A- Curriculum vitae (Lattes)

Allyson Andrade Mendonça
Curriculum Vitae

Agosto/2013

Allyson Andrade Mendonça
Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Allyson Andrade Mendonça
Filiação Jose Luiz de Mendonça e Maria Helena de Andrade Mendonça
Nascimento 07/03/1990 - Paulista/PE - Brasil
Carteira de Identidade 7343319 sds - PE - 13/08/2004
CPF 089.284.454-00

Endereço residencial Travessa Maria Ivete Lopes
Paratibe - Paulista
53415181, PE - Brasil
Telefone: 081 34382819

Endereço profissional Universidade de Pernambuco
Rua Arnóbio Marques 310
Santo Amaro - Recife
50100130, PE - Brasil

Endereço eletrônico
E-mail para contato : allysonbiol@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2012 Mestrado em Genética e Biologia Molecular.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Identificação e caracterização dos genes de resistência a antibióticos na bactéria *Lactobacillus vini*.
Orientador: Marcos Antonio de Moraes Junior
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
Áreas do conhecimento : Microbiologia Industrial, Genética Molecular e de Microorganismos
- 2008 - 2011 Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil
Título: Mecanismos Moleculares de Disseminação do gene blaKPC
Orientador: Márcia Maria Camardo de Moraes
- 2005 - 2007 Ensino Médio (2o grau) .
Escola Custódio Pessoa, ECP, Brasil
- 1997 - 2004 Ensino Fundamental (1o grau) .

Formação complementar

- 2013 Curso de curta duração em Epigenetic Control of Gene Expression.
The University of Melbourne, UNIMELB, Melbourne, Austrália
- 2013 - 2013 Comunicação Escrita.
Escola Virtual Bradesco, EVB, Brasil
-

Áreas de atuação

1. Genética Molecular e de Microorganismos
-

Projetos

Projetos de pesquisa Projetos de pesquisa 2012 - Atual Identificação e caracterização dos genes de resistência a antibióticos na bactéria *Lactobacillus vini*.

Descrição: *Lactobacillus vini* é um dos principais contaminantes do processo fermentativo para obtenção de álcool nas destilarias do nordeste. O recente sequenciamento de seu genoma revelou, por homologia de sequência, vários determinantes de resistência pouco caracterizados até o momento. É objetivo deste estudo identificar os genes e discrimina-los quanto ao alelo, relacioná-los a plasmídios, transposon e integrons, determinar a MIC dos isolados a várias drogas de uso no setor sucro-alcooleiro e as padrões de uso contra bactérias gram positivas nos isolados provenientes de coletas futuras na Safra de 2012/2013.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (2);

Integrantes: Allyson Andrade Mendonça (Responsável); ; Márcia Maria Camargo de Moraes; Marcos Antônio Moraes Júnior

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente , Fala Pouco , Escreve Pouco , Lê Razoavelmente

Totais de produção

Produção bibliográfica	
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	1
Eventos	
Participações em eventos (congresso).....	2
Participações em eventos (seminário).....	1
Participações em eventos (simpósio).....	1
Participações em eventos (outra).....	2