

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

Allyson Andrade Mendonça

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E GENÉTICOS DA BACTÉRIA
LACTOBACILLUS VINI EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE**

**Recife
2018**

Allyson Andrade Mendonça

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E GENÉTICOS DA
BACTÉRIA *LACTOBACILLUS VINI* EM CONDIÇÕES DE
ESTRESSE**

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

Área de concentração: Genética de microrganismos

Orientador: Dr Marcos Antônio de Moraes Jr

Coorientadora: Dr^a Carolina Elsztein

**Recife
2018**

Catálogo na fonte
Elaine C. Barroso (CRB4/1728)

Mendonça, Allyson Andrade

Aspectos fisiológicos e genéticos da bactéria *Lactobacillus vini* em condições de estresse / Allyson Andrade Mendonça- 2018.

185 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Marcos Antonio de Moraes Junior

Coorientadora: Carolina Elzstein

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética.
Recife, 2018.

Inclui referências e anexo

1. *Lactobacillus vini* 2. Expressão gênica 3. Estresse (Fisiologia) I.
Moraes Junior, Marcos Antonio de (orient.) II. Elzstein, Carolina
(coorient.) III. Título

579.37

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-437

ALLYSON ANDRADE MENDONÇA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E GENÉTICOS DA BACTÉRIA
LACTOBACILLUS VINI EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE**

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

Aprovado em: 31/08/2018

Banca Examinadora:

Dr. Marcos Antonio de Moraes Jr
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Antônio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Ana Catarina de Souza Lopes
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Jose Vitor Moreira Lima Filho
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Evandro Leite de Souza
Universidade Federal da Paraíba

Agradecimentos

AGRADEÇO AOS MEUS ORIENTADORES PELA SIGNIFICATIVA CONTRIBUIÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DESTE TRABALHO. AOS DEMAIS ALUNOS DA LINHA DE PESQUISA COM LACTOBACILOS DO LABORATÓRIO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS-LGM, A DOUTORANDA PAULA K. NOGUEIRA E O MESTRANDO TIAGO S. CALAZANS, PELA CONTRIBUIÇÃO QUE TIVERAM NESTA PESQUISA. AO INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS – IATA, EM ESPECIAL AO DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA DE ALIMENTO E AO MEU SUPERVISOR DR. MANUEL ZÚÑIGA CABRERA, PELO RECEBIMENTO E FORMAÇÃO NO CAMPO DE MODIFICAÇÕES GENÉTICA EM BACTÉRIAS LÁCTICAS. POR FIM, AOS ÓRGÃOS DE FOMENTO QUE ALOCARAM RECURSOS NESTE ESTUDO, A FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO (FACEPE) E À COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES).

Resumo

Lactobacillus vini é uma bactéria identificada apenas no ambiente de fermentação alcoólica. Um ambiente que impõem uma variedade de estresse à célula. Neste trabalho foram identificados elementos fenotípicos e genéticos da resposta celular de *L. vini* JP 789 a condições de estresse. A linhagem JP 789 demonstrou tolerância próxima ou superior as condições de estresse do ambiente industrial. Sua população se manteve viável numa faixa de concentração de agentes estressores encontradas na indústria por até 24h. Foi identificado um fenômeno de resistência a lisozima induzido por estresse ácido sendo único caso descrito. Genes de proteínas universais de estresse (*uspII* and *uspIV*) e fatores de transcrição (*pspC* and *furR*) foram induzidos na maioria das condições de estresse, sugerindo que esses genes fazem parte do regulon da resposta geral a estresse. Uma metodologia de transformação foi desenvolvida e uma linhagem defectiva para resposta estrigente construída. O mutante apresentou viabilidade inalterada para estresse por ácidos láctico e pH ácido, mais sensível a etanol e ácido acético, e mais tolerante a estresse oxidativo e osmótico. Deste modo, os dados presentes neste trabalho sugerem que as condições de estresse encontradas no ambiente de fermentação alcoólica são bem toleradas pela linhagem JP 789, que esta espécie possui elementos genéticos e fenotípicos singulares na sua resposta a condições de estresse.

Palavras-chave: *Lactobacillus vini*. Estresse. Expressão gênica.

Abstract

Lactobacillus vini is a bacterium identified only in the alcoholic fermentation environment. That environment imposes several stresses to the cell. In this work, phenotypic and genetic elements of *L. vini* JP 789 cellular response to stress conditions were identified. The JP 789 strain demonstrated tolerance near or superior to the stress conditions of the industrial environment. Its population remained viable within a range of stressors found in the industry for up to 24 hours. Was identified a phenomenon the lysozyme resistance induction by acid stress and this is the only case described in literature. Universal stress protein genes (*uspII* and *uspIV*) and transcription factors (*pspC* and *furR*) were induced in most stress conditions suggesting that these genes are part of the regulon response regulon stress. A transformation methodology was developed and a defective strain for strident response constructed. The mutant presented viability unaltered for lactic acid and acid pH stress, more sensitive to ethanol and acetic acid, and more tolerant to oxidative and osmotic stress. Thus, the data present in this work suggest that stress conditions found in the alcoholic fermentation environment are well tolerated by the JP 789 strain, which has unique genetic and phenotypic elements in its response to stress conditions.

Key words: *Lactobacillus vini*. Stress. Genetic expression.

Lista de ilustração

Referencial teórico

Figura 1	Vias centrais de metabolismo de carbono lactobacilos.....	16
Figura 2	Árvore filogenética do grupo <i>Lactobacillus</i> senso latu.	21
Figura 3	Mecanismo de funcionamento de fatores de transcrição.....	31
Artigo- Stress tolerance and USP gene expression in <i>Lactobacillus vini</i>		
Figure 1	Growth curve of <i>Lactobacillus vini</i> in increasing concentrations of lactic acid, acetic acid, ethanol, sodium chloride, hydrogen peroxide and hydrochloric acid.....	67
Figure 2	Specific growth rate	68
Figure 3	Survival of <i>Lactobacillus vini</i>	69
Figure 4	Physical map of genetic environment of <i>usp</i> genes in <i>Lactobacillus vini</i> genome.....	70
Figure 5	The change in gene expression in different stressing conditions.....	71
Artigo- <i>Lactobacillus vini</i>: mechanistic response to stress by medium acidification		
Figure 1	Phenotypic profile of <i>Lactobacillus vini</i> cultures exposed to Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of several stressing agents.....	97
Figure 2	Growth kinetics of <i>Lactobacillus vini</i> cells.....	98
Figure 3	Effect of the acid-protective amino acids on the profile of lysozyme resistance in <i>Lactobacillus vini</i>	99
Figure 4	Pathway of peptidoglycan biosynthesis.....	100

Figure 5.	Transcriptional profile of cell wall related genes of <i>Lactobacillus vini</i>	101
-----------	---	-----

Artigo- Tolerância a estresse na linhagem JP 789 de *Lactobacillus vini* defectiva para resposta estrigente

Figura 1	Extração de plasmídeo digerida com enzima de restrição <i>BamHI</i>	115
Figura 2	Características fenotípicas da linhagem de <i>L. vini</i> com resposta estrigente defectiva.....	118

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Item	Definição
%	Porcentagem
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ATP	Adenosina trifosfato
CO ₂	Dióxido de carbono
Ct	Cycle Threshold
D.O.	Densidade ótica
DNA	Ácido dextrorribonucleico
GC	Guanina citosina
<i>glmM</i>	Glucosamina mutase
<i>glmS</i>	Glucosamina sintase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
MIC	Minimum inhibitory concentratrion
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MRS	Man Rugosa Sharp
<i>murB</i>	UDP-N-Acetenolpiruvoyl glucosamine redutase
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	National Center for biotechnology information

ORF	Open read frame
Pb	Pares de base
PBP	Penicillin binding protein
pH	Potencial hidrogênio iônico
RAST	Rapid annotation using sub-system technology
RNA	Acido ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
TF	Fator de transcrição
OCS	Sistema de um componente
TCS	Sistema de dois componentes
Ω	Ohms
V	Voltagem
μF	microfarad

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS.....	14
1.1.1 Objetivo geral.....	14
1.1.2 Objetivo específico.....	14
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	15
2.1 O GÊNERO LACTOBACILLUS: LACTOBACILLUS VINI	15
2.2 RESPOSTA A ESTRESSE EM BACTÉRIAS	26
2.3 RESPOSTA A ESTRESSE ÁCIDO EM BACTÉRIAS LÁCTICAS	34
3 MÉTODO.....	36
3.1. LINHAGEM E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	36
3.2 DETERMINAÇÃO DE CONDIÇÕES DE ESTRESSE	37
3.3 ENSAIO DE LISE	38
3.4 PREPARO DE CÉLULA COMPETENTES E ELETROPORAÇÃO	38
3.5 CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE INTERRUPTÃO	41
3.6 ANOTAÇÃO DAS ORFS, DESENHO E VALIDAÇÃO DOS PRIMERS PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	44
3.7 CONDIÇÕES DE TRATAMENTO, EXTRAÇÃO DE RNA E ANÁLISE DE EXPRESSÃO.....	47
4 STRESS TOLERANCE AND USP GENE EXPRESSION IN LACTOBACILLUS VINI	49
5 LACTOBACILLUS VINI: MECHANISTIC RESPONSE TO STRESS BY MEDIUM ACIDIFICATION.....	72

6 TOLERÂNCIA A ESTRESSE NA LINHAGEM JP 789 DE LACTOBACILLUS VINI DEFECTIVA PARA RESPOSTA ESTRINGENTE	102
7 CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
ANEXO A – INSTRUÇÕES PARA AUTORES DO PERIÓDICO MICROBIOLOGY (ISSN: 1350-0872).	138
APÊNDICE A – TRABALHO PUBLICADO EM PARCERIA COM DISCENTE.....	162
APÊNDICE B – TRABALHO SUBMETIDO AO PERIÓDICO YEAST EM PARCERIA COM DISCENTE.	163
APÊNDICE C – TRABALHO A SER SUBMETIDO EM PARCERIA COM O DISCENTE.	164
APÊNDICE D – TRABALHO SUBMETIDO AO PERIÓDICO INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AND CHEMOTHERAPY PELO DISCENTE.	165
APÊNDICE E – ANOTAÇÃO DAS ORFS UTILIZADAS NO TRABALHO UTILIZANDO A FERRAMENTA RAST E BLASTP... ..	166
CURRICULO VITAE (LATTES)	173

1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Lactobacillus vini* é um lactobacilo unicamente encontrado no ambiente de fermentação alcoólica. Mesmo tendo sido isolado pela primeira vez no fim da década de 70 na fermentação de vinho, seu perfil fermentativo incomum impediu que fosse classificada até o nível de espécie. Décadas depois de seu isolamento, o status de nova espécie foi confirmado.

Este lactobacilo também foi identificado na fermentação alcoólica para produção de bioetanol. Enquanto outras espécies, pouco adaptadas, são eliminadas durante os meses de fermentação, *L. vini* se mantém. A presença de até o final indica que esta espécie possui mecanismos adaptativos capazes de assegurar sua sobrevivência nesse ambiente. No entanto, esses mecanismos adaptativos não são conhecidos.

No presente trabalho, iniciamos os estudos relativos à identificação dos sistemas celulares e moleculares que possibilitam a adaptação de *L. vini* ao ambiente industrial. Foram realizados experimentos de determinação da tolerância celular a diferentes condições de estresse, revelando mecanismos moleculares que parecem próprios desta espécie. Em seguida, identificamos no genoma desta bactéria genes que estariam associados a esses mecanismos de resposta a estresse. E por fim, desenvolvemos um procedimento de modificação genética para *L. vini* que possibilitou a geração de linhagens mutantes para genes importantes da resposta a estresse. A análise fisiológica desses mutantes, embora ainda de maneira preliminar, nos indicou a função biológica de proteínas codificadas por estes genes na regulação do metabolismo celular. Estes resultados deverão contribuir no desenvolvimento de estratégias de controle industrial mais eficientes, para entendimento da biologia desta bactéria e para outros de gênero *Lactobacillus*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Identificar o padrão de resposta fenotípica e genética da bactéria *Lactobacillus vini* a diversas condições de estresse.

1.1.2 Objetivo específico

1-Determinar o nível de tolerância a diferentes agentes estressores e suas concentrações letais, com ênfase aos principais estressores encontrados no ambiente de fermentação alcoólica;

2-Determinar os efeitos das condições de estresse no padrão de expressão gênica de fatores σ alternativos e genes de resposta a estresse;

3-Determinar o fenótipo de tolerância de linhagem isogênica defectiva para o gene *relA* da resposta estrigente.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 O GÊNERO *LACTOBACILLUS*: *LACTOBACILLUS VINI*

O gênero *Lactobacillus* foi descrito no início do século XX (Bull et al. 2013; Duar et al. 2017) sendo sua classificação baseada em critérios morfológicos e fisiológicos básicos (Slover and Danziger 2008). As bactérias desse gênero possuem morfologia bacilar, são gram positivas, produzem energia exclusivamente através de fermentação, não produzem esporos e são encontradas espécies aerotolerantes (Slover and Danziger 2008) ou anaeróbias estritas (Maeno et al. 2016; Duar et al. 2017). Com essas características foi formado um grupo de organismos extremamente heterogêneo.

Durante as décadas seguintes a descrição do gênero, foram propostos esquemas de classificação numa tentativa de agrupar as espécies em subgrupos mais homogêneo. O esquema mais eficientemente nessa subdivisão, utilizado ainda hoje, teve como critério o perfil de produção de metabólitos a partir da fonte de carbono (Fig.1) (Kandler 1983). Um subgrupo desse sistema foi inicialmente formado por espécies que produzem apenas ácido láctico a partir de hexoses, esse perfil fermentativo recebeu a classificação de homofermentadores (Kandler 1983; Gänzle 2015). Um segundo subgrupo foi formado por espécies capazes de produzir ácido láctico e CO₂ concomitantemente com outras moléculas como etanol, acetato ou succinato, esse perfil recebeu a classificação de heterofermentadores (Kandler 1983; Gänzle et al. 2007).

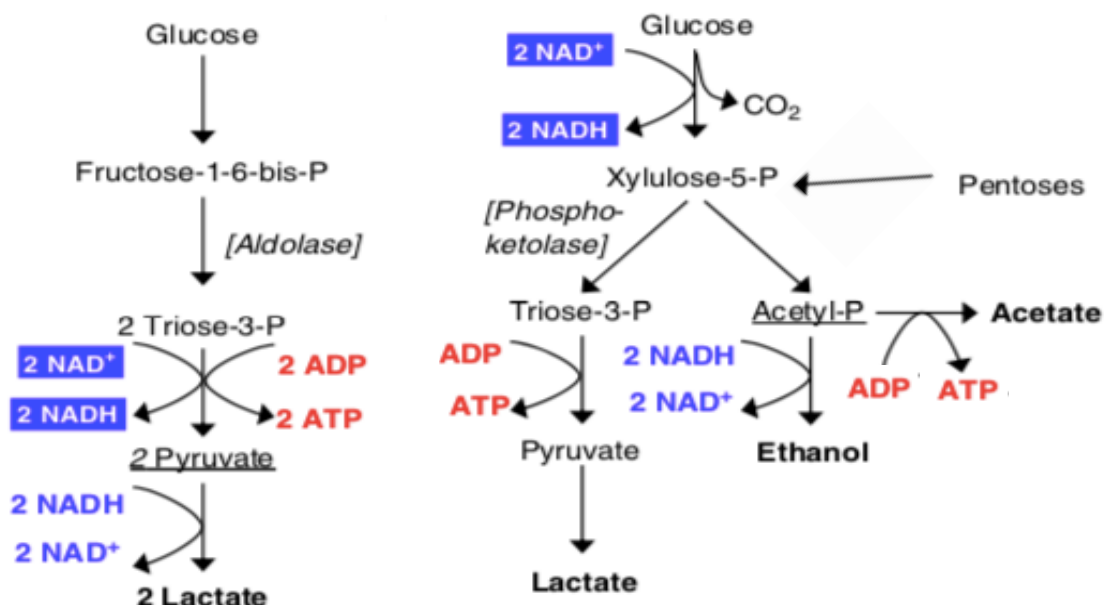


Figura 1. Vias centrais de metabolismo de carbono lactobacilos. Imagem modificada de Gänzle (2015). À esquerda a via homofermentativa e à direita a via heterofermentativa.

Todas as espécies heterofermentadoras são capazes de fermentar pentoses mantendo o perfil heterofermentativo, mas diferente da fermentação de hexoses a fermentação de pentoses não produz CO₂ (Kandler 1983; Gänzle 2015). No caso dos homofermentadores o grupo se divide em espécies capazes de fermentar pentoses e espécies que não são capazes. Os homofermentadores capazes de fermentar pentoses apresentavam um perfil heterofermentativo e foram separados num terceiro subgrupo (Gänzle et al. 2007). Esse subgrupo inicialmente foi designado como homofermentadores facultativos (Kandler 1983), mas na literatura atual é referido como heterofermentador facultativo (Gänzle et al. 2007). O subgrupo dos heterofermentadores, que heterofermentam hexoses e pentoses, foi modificado para heterofermentadores obrigatório para diferenciar dos heterofermentadores facultativos. Essas classificações fisiológicas ainda

são utilizadas embora os recentes dados na literatura indiquem que necessite de uma atualização (Barres 1978; Mari et al. 2006).

Os homofermentadores e heterofermentadores, facultativos ou obrigatórios, produzem ácido láctico pela mesma via metabólica. A partir da fonte de carbono é formado um gliceraldeído-3-fosfato (GA3P) que seguira a via descrita por Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Sánchez-Pascuala et al. 2017) até piruvato (Gänzle et al. 2007). Durante a via EMP, um mol do co-fator NAD^+ é reduzido a NADH. Se o NADH não for oxidado, regenerando o NAD^+ , a célula entra em desequilíbrio redox. O consumo do NAD^+ sem sua regeneração resultaria em falta de co-fator para manter a via EMP funcionando levando a uma parada na produção de energia. Para impedir que isso ocorra tanto os homofermentadores quanto os heterofermentadores usam o piruvato produzido como aceptor orgânico de elétrons (Gänzle 2015). A redução do piruvato é catalisada por enzimas chamadas de Lactato-desidrogenases (EC. 1.1.1.27) que reduz um mol de piruvato a ácido láctico e no processo oxidam um mol de NADH a NAD^+ . A partir de um mol de hexose dois moles de GA3P são produzidos no metabolismo homofermentativo, mas apenas um mol de GA3P no metabolismo heterofermentativo (Kandler 1983).

Os heterofermentadores obrigatórios fermentam hexoses e pentoses pela mesma via, a via da fosfocetolase (PK) (Kandler 1983; Gänzle et al. 2007; Arsköld et al. 2008). Os heterofermentadores facultativos fermentam apenas as pentoses pela via PK enquanto usam a via glicolítica para as hexoses (Salveti et al. 2012). A PK (EC 4.1.2.9) é uma enzima que quebra a xilulose-5-fosfato (XI5P) em um GA3P e uma molécula de acetil-Fosfato (acetil-P) (Tanaka et al. 2002b). Nesses organismos a XI5P pode ser produzida a partir da hexoses por

parte das reações da via das pentoses fosfato (Arsköld et al. 2008) ou através de reações de isomerização a partir de outras pentoses (Okano et al. 2009). Na literatura é recorrente serem aplicados os termos de via das pentose (Lebeer et al. 2008; Salvetti et al. 2012) ou via PK (Tanaka et al. 2002a; Kleerebezem et al. 2003) para designar a conversão da fonte de carbono a XI5P e posteriormente a GA3P e acetil-P. No presente trabalho será utilizado o termo via PK para designar a produção de GA3P e acetil-P a partir de hexose e via das pentose fosfato para designar a produção de pentose a partir de hexose, mas sem incluir a reação catalisada pela enzima PK.

O destino do acetil-P produzido dependerá do balanço redox da célula. Durante a via PK dois moles de equivalente redutor NAD^+ são reduzidos a NADH. Um mol é reoxidado a NAD^+ com a produção de ácido láctico a partir de piruvato, como descrito anteriormente (Gänzle et al. 2007). O outro NADH pode ser regenerado a partir do acetil-P, que neste caso é convertido a acetil-CoA liberando o fosfato inorgânico (Gänzle 2015). Após esta substituição, o acetil-CoA é reduzido a etanol, regenerando o NAD^+ e liberando o CoA. Produzindo ácido láctico e etanol, no metabolismo heterofermentativo, é produzido apenas um mol de ATP (Gänzle 2015). O NADH pode ser oxidado utilizando outras moléculas aceptoras de elétrons como compostos fenólicos (Filannino et al. 2015), glicerol (Chen et al. 2016) ou frutose (Endo and Salminen 2013) dependendo da espécie de lactobacilo. Na presença de aceptores de elétrons alternativos ao acetil-CoA, a célula mantém o seu balanço redox preservando o acetil-P. Neste caso, o acetil-P é convertido a acetato com a produção de um mol de ATP por mol de acetil-P (Kandler 1983; Salvetti et al. 2012). Deste modo, a produção de ácido láctico e ácido acético a partir da fonte de carbono produz

dois moles de ATP com um rendimento energético igual ao da via homofermentativa (Gänzle et al. 2007; Gänzle 2015).

A necessidade de manter o balanço redox e maximizar a produção de energia a partir da fonte de carbono resultou em adaptações singulares em algumas espécies de lactobacilos, como o observado no recente grupo das bactérias lácticas frutofílicas (FLAB) (Endo and Salminen 2013). O grupo das FLAB é formado por espécies que fermentam glicose apenas em aerobiose e usam a frutose tanto como fonte de carbono como aceptor preferencial de elétrons (Maeno et al. 2016; Duar et al. 2017). Neste grupo são encontradas espécies especializadas a ambientes ricos em frutose e encontradas compondo a microbiota residente do trato intestinal de insetos (Endo and Salminen 2013). Nessas espécies o equilíbrio redox não pode ser mantido com a produção de etanol pois o gene da álcool desidrogenase (EC1.1.1.10) foi perdido sendo a produção de acetato obrigatória.

Em termos filogenéticos o subgrupo dos heterofermentadores obrigatórios é derivado, ou seja mais recente na evolução do grupo a partir de um determinado ancestral comum, e o grupo dos homofermentadores primitivo, mais antigo (Zheng et al. 2015; Duar et al. 2017). A derivação dos heterofermentadores foi um processo que passou pela perda de vários genes (Duar et al. 2017). Genes da via glicolítica, como a fosfofrutoquinase, transportadores, em particular de sistemas de transferência de fosfato (PTS), e genes da via das pentoses, estão incluídos entre as principais perdas (Gänzle and Follador 2012; Zheng et al. 2015). As perdas gênicas tiveram um grande impacto na ecologia das espécies e no seu processo evolutivo.

As filogenias recentes mantêm que os homofermentadores para hexoses e os heterofermentadores obrigatórios formam clados separados e apontam para uma relação próxima dos *Lactobacillus* com outros grupos de bactérias lácticas (Claesson et al. 2008). O gênero *Pediococcus* é um dos grupos de LABs filogeneticamente próximo aos *Lactobacillus* (Zheng et al. 2015). Os *Pediococcus* e os *Lactobacillus* são membros da mesma família, a *Lactobacillaceae*, e juntos formam um clado nomeado de *Lactobacillus* senso lato (Zheng et al. 2015). Outros grupos de bactérias lácticas como os *Leuconostoc* e *Weisellas* também são intermediários entre o clado dos homofermentadores e heterofermentadores (Claesson et al. 2007; Claesson et al. 2008). Estes, porém, compartilham com os *Lactobacillus* apenas até o nível taxonômico da ordem Lactobacillales. A junção dos *Lactobacillus* e demais gêneros fora da família Lactobacillaceae, como os *Leuconostoc*, forma um clado denominado de complexo gênero *Lactobacillus* (Duar et al. 2017).

A artificialidade do gênero foi determinada a décadas (Stackebrandt and Teuber 1988). Parte da artificialidade filogenética dos lactobacilos deriva da taxonomia microbiológica empregada nas primeiras décadas após sua descrição (Bull et al. 2013). Contudo, a resistência apresentada pela indústria, que rejeita mudanças drásticas nesse gênero, contribui para a manutenção desse clado parafilético (Duar et al. 2017). A popularização do termo “lactobacilos” ligado ao conceito de promoção de saúde (Lebeer et al. 2008) e bactérias seguras (Herbel et al. 2013), agregou ao gênero um valor comercial além do taxonômico e a indústria teme que mudanças possam ter efeitos comerciais negativos (Duar et al. 2017). De todo modo, o crescente interesse em corrigir os vieses filogenéticos na taxonomia tem resolvido algumas questões pontuais. Várias espécies

inicialmente incluídas neste gênero foram reclassificadas ao longo dos anos como no caso de *Eggerthia catenaformis* inicialmente classificada como *Lactobacillus catenaformis* (Salvetti et al. 2011), *Kandleria vitulina* inicialmente *Lactobacillus vitulina* (Salvetti et al. 2011) e *Bifidobacterium bifidus* inicialmente *Lactobacillus bifidus* (Breed et al. 1957).

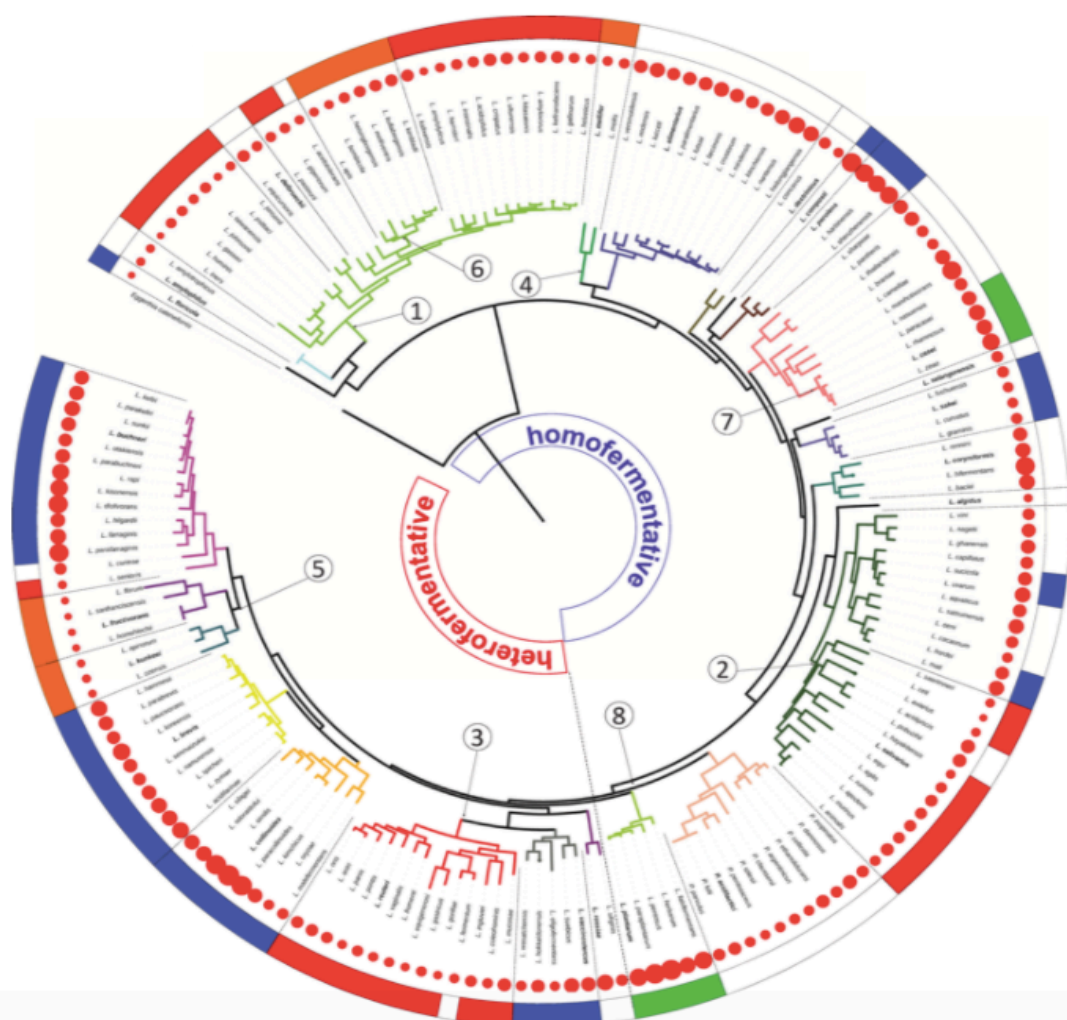


Figura 2. Árvore filogenética do grupo *Lactobacillus* senso lato. Cada grupo filogenético na árvore é representado por uma cor diferente, as espécies são classificadas em três nichos ecológicos, espécies de vida livre (■), hospedeiras de vertebrados (■), hospedeiras de invertebrados (■) e as que podem ser encontradas tanto como formas de vida livre quanto como em espécies hospedeiras, classificadas como nômades(■). Árvore publicada por Zheng e colaboradores (2015) e modificada por Duar e colaboradores (2007). A seta indica a posição de *Lactobacillus vini*.

A heterogeneidade do grupo pode ser constatada em nível genético além do fisiológico. O conteúdo de GC, por exemplo, pode variar entre 50% a 32% entre as espécies (Felis and Dellaglio 2005). O tamanho dos genomas varia amplamente sendo o maior já documentado possuindo 4,91 Mb, *Lactobacillus parakefiri* (Tanizawa et al. 2017) e o menor 1,3 Mb, *Lactobacillus iner* (Macklaim et al. 2011). Essa variação no tamanho dos genomas segue uma tendência de adaptação a nichos ecológicos específicos (Duar et al. 2017). O processo evolutivo dos lactobacilos foi marcado por extensas perdas gênicas desde sua divergência da ordem Bacillales, onde estima-se que cerca de 3000 genes tenham sido perdidos (Makarova et al. 2006). Essa extensa perda gênica impôs uma limitação na capacidade de biossíntese de compostos essenciais como vitaminas e co-fatores restringindo os habitats de ocorrência dessas bactérias a ambientes nutricionalmente ricos (Savijoki et al. 2006).

O ambiente gastrointestinal de animais, vertebrados ou invertebrados, preenche esses requerimentos nutricionais. A associação dessas bactérias com hospedeiros foi uma estratégia evolutiva bem sucedida e responsável pela expansão do clado dos *Lactobacillus* sensu lato (Tailliez 2001). O trato gastrointestinal provê um suporte nutricional rico e mantém um ambiente estável em comparação ao meio ambiente natural (Moran 2002). A interação dos lactobacilos com os hospedeiros provavelmente surgiu independentemente várias vezes dentro grupo (Duar et al. 2017). Algumas espécies passaram por um processo de adaptação nicho específico durante a co-evolução com os seus hospedeiros resultando em diferentes graus de especialização.

L. iner é um exemplo de uma espécie altamente especializada. Essa espécie é apenas encontrada na microbiota vaginal da espécie humana onde

seu pequeno genoma é composto de genes necessários para utilização dos recursos e sobrevivência nesse ambiente (Macklaim et al. 2011). Por sua vez, *L. reuterii* é uma espécie que apresenta uma especialização menor sendo encontrada na microbiota intestinal residente de vários mamíferos (Su et al. 2012). Contudo, isolados obtidos a partir de uma mesma espécie hospedeira possuem uma série de características em comuns que os isolados obtidos de espécies hospedeiras diferentes. Por exemplo, as linhagens obtidas de humanos apresentam uma baixa variabilidade genética, genomas menores (Walter et al. 2011) e não conseguem colonizar o trato gastrointestinal de roedores (Frese et al. 2011). Enquanto os isolados obtidos de roedores apresentam uma alta variabilidade genética (Walter et al. 2011) e possuem uma série de genes de adesinas (Frese et al. 2013). Tais variações podem indicar um processo de especialização ao hospedeiro ainda em curso em *L. reuterii*. Por fim, algumas espécies se mantêm pouco seletiva quanto ao hospedeiro, como no caso de *L. salivarius*. *L. salivarius* é encontrada em vários sítios anatômicos da espécie humana (Molin et al. 1993; Martín et al. 2006) e em outras espécies como equinos (Yuki et al. 2000) e aves (Hammons et al. 2010).

A maioria das espécies de *Lactobacillus* são encontradas no ambiente, superfícies de folhas e solo, como formas de vida livre (Duar et al. 2017). As espécies de vida livre são encontradas dispersas na árvore filogenética do grupo sugerindo que este tenha sido um carácter ancestral e a associação com hospedeiros seja uma característica derivada (Duar et al. 2017). O genoma de espécies de vida livre tendem a ser maiores e com maior quantidade de genes que o das espécies adaptadas a hospedeiros (Moran 2002). Essa tendência é entendida como uma necessidade da célula em manter um repertório genético

para poder se manter viável nas diversas condições adversas que podem surgir no meio ambiente (Lo et al. 2016).

O processo evolutivo dentro deste gênero é marcado por perdas gênicas e rearranjos. Motivo pelo qual análises de genômica comparativa entre as espécies revela pouca sintonia (Canchaya et al. 2006). Estima-se que 1800 genes tenham sido perdidos durante a separação do grupo dos *Bacillus* (Makarova et al. 2006) e mais 1200 – 1400 no processo de diferenciação de algumas espécies (Duar et al. 2017). Dentre esses genes estão os envolvidos no metabolismo de vários compostos indispensáveis como vitaminas, co-fatores e lipídios (Makarova and Koonin 2007). Incapazes de sintetizar esses compostos a célula passou a depender de fontes alternativas do meio. Resultando num comportamento nutricional predominantemente fastidioso ao grupo.

A espécie *Lactobacillus vini* é uma das espécies que evidenciam a necessidade de reorganização dos sistemas de classificação deste gênero. Na classificação atual esta espécie não se enquadra em nenhum dos subgrupos previamente descritos. *L. vini* apresenta um perfil homofermentador tanto para hexoses quanto para pentoses (Marı et al. 2006). Esta espécie foi primeiramente isolada a partir de amostras de mosto de uva da fermentação de vinho (Barres 1978), mas suas características singulares impediram seu posicionamento no nível de espécie. O caráter homofermentativo obrigatório para pentoses de *L. vini* nunca havia sido identificado em outras espécies na época de seu isolamento (Barres 1978; Kandler 1983) e claramente indicava se tratar de uma nova espécie. Nenhuma outra espécie foi descrita com um perfil homofermentador para pentoses até o momento. Esta espécie possui poucos casos de isolamento, mas todos restritos ao ambiente de fermentação alcoólica.

Não se pode fazer inferências quanto ao papel de *L. vini* na natureza pois nunca foi identificado fora do ambiente artificial de fermentação (Passoth et al. 2007; Lucena et al. 2010; Mendonça et al. 2016). Possivelmente esta espécie é inserida no processo fermentativo juntamente com a matéria prima vegetal, sugerindo que esta espécie esteja associada a microbiota vegetal e por tanto seja uma espécie de vida livre.

No cenário brasileiro *L. vini* foi identificada em usinas de produção de bioetanol (Lucena et al. 2010). Quando identificada, a população desta espécie se mantém estável mesmo quando a diversidade da população bacteriana diminui, por volta da metade da estação (Lucena et al. 2010). A perda de diversidade no processo está relacionada as condições estressantes particulares ao processo de fermentação alcoólica, com destaque para concentração de etanol. A fermentação industrial é um ambiente com um conjunto de condições de estresses singular (Basso et al. 2011). Além de possuir uma alta concentração de etanol, 8-12%, impõem um estresse osmótico, devido alta concentração de açúcares no meio, eventuais estresses térmicos, devido picos de temperatura do verão, e alta competitividade nutricional e baixo pH, como tratamento antimicrobiano (Basso et al. 2011)

Os dados da literatura sugerem que esta espécie esteja bem adaptada ao processo de fermentação alcóolica. Possivelmente, sua população seja favorecida neste ambiente e por isso se mantenha estável durante o processo sem ser eliminada como outras espécies. Diversos fatores podem estar contribuindo para instalação bem sucedida de *L. vini* no processo industrial como, por exemplo, a tolerância as condições de estresse encontradas nesse ambiente.

2.2 RESPOSTA A ESTRESSE EM BACTÉRIAS

As bactérias estão amplamente distribuídas na natureza, colonizando tanto superfícies do ambiente quanto de organismos (Walter 2008; Philippot et al. 2010). Contudo, sua distribuição não é homogênea, grupos bacterianos se distribuem em diferentes proporções e especificidades nos diferentes ambientes naturais (Philippot et al. 2010). Embora as células bacterianas possam ser movidas facilmente, por ação biótica ou abiótica, sua fixação numa população depende da capacidade de competir por recursos (Borer et al. 2018). Outro fator que exerce um importante filtro seletivo para fixação das espécies numa população é a capacidade de se manter viável frente ao conjunto de condições adversas características do ambiente colonizado (Fierer et al. 2003; Schimel et al. 2007).

Um estado de estresse é uma condição que limite a proliferação de uma população bacteriana que na ausência da condição estressante se desenvolveria rapidamente (Papadimitriou et al. 2016). Um estresse pode ser causado por escassez de nutrientes necessários para o funcionamento do metabolismo celular (Hecker and Völker 2001; Wang et al. 2011). Esse aporte nutricional insuficiente interfere na homeostase celular tendo impactos na composição enzimática, vias metabólicas e morfologia da célula (Nyström 2004). Na natureza está é a condição mais frequente a qual as células estão submetidas (Hecker and Völker 2001). No estresse causado por agentes físico-químico, moléculas presentes no meio intra ou extracelular podem modificar propriedades bioquímicas de componentes celulares sensíveis (Cotter and Hill 2003; Lebeer

et al. 2008; Papadimitriou et al. 2016). Essas modificações resultariam em redução da eficiência com que tais componentes exercem sua função biológica levando a um comprometimento da homeostase celular.

Para manter a funcionalidade das vias metabólicas afetadas pela condição de estresse, a célula passa por modificações na constituição dos seus componentes celulares (Wang et al. 2011) e características fisiológicas que em conjunto configuram o padrão de resposta celular ao estresse. Parte da resposta celular aos estresses envolve o desvio de recursos destinados ao crescimento para os mecanismos que garantam a sobrevivência da célula (Schimel et al. 2007). Dentre esses mecanismos estão os relacionados diretamente na prevenção ou reparo de danos (Hecker and Völker 2001).

Como resultado do processo de seleção natural, os organismos evoluíram para responderem mais eficientemente as condições de estresse do meio em que naturalmente ocorrem (Bijlsma and Loeschcke 2005). No decorrer desse processo evolutivo, as bactérias desenvolveram mecanismos para perceberem sinais de mudanças nas condições do meio (Bury-Moné et al. 2009; Krämer 2010) e responder para evitarem danos letais. Um dos primeiros efeitos perceptível de uma condição de estresse é a limitação do processo de divisão celular (Bergkessel and Basta 2016). Devido a redução de recursos investidos no processo de crescimento e divisão, células sob estresse apresentam um crescimento lento ou mesmo ausente (Hecker and Völker 2001). Em culturas laboratoriais, cultivos em condições estressantes podem influenciar no tempo de duração da fase lag, fase em que há o ajuste fisiológico da célula as condições do meio (Rolfe et al. 2012). Resultando num maior tempo nessa fase e retardando a entrada na fase de crescimento exponencial.

A sensibilização da célula a um agente estressor depende da natureza da condição de estresse. No estresse osmótico, por exemplo, tanto alterações na composição do citosol quanto modificações morfológicas fazem parte dos estímulos para ativação dos mecanismos de resposta celular (Krämer 2010). A resposta celular a uma condição estressante é resultado de uma grande rede regulatória que responde a diversos sinais simultaneamente.

Independente do sistema regulatório, ao menos duas funções precisam ser preenchidas, a de sensor e de regulador. O sensor é o responsável por identificar a presença do estímulo oriundo do ambiente (Shpakov and Pertseva 2008), que podem ser diretamente as moléculas do agente estressor. Enquanto a proteína reguladora é responsável por intermediar a ativação da resposta celular. O estímulo da proteína sensor é passado a proteína reguladora num processo chamado de transdução de sinal (Podgornaia and Laub 2013). Um sensor pode passar o sinal para uma proteína reguladora específica ou para múltiplas proteínas reguladoras, ou uma proteínas reguladora poder ser ativada por diferentes sensores (West and Stock 2001).

Nos casos mais simples ambas as funções são desempenhadas por uma mesma proteína, como nos sistemas de um componentes (OCS) (Ulrich et al. 2005). Em outros casos duas proteínas diferentes desempenham essas funções, como no caso do sistema de dois componentes (TCS) (Mitrophanov and Groisman 2008). Nesse sistema de dois componentes, a proteína sensor geralmente é uma proteína transmembrana com a porção sensor na face externa da membrana plasmática (Mitrophanov and Groisman 2008). Quando em contato com o estímulo a proteína sensor sofre uma modificação estrutural e passa o sinal para a proteína reguladora no citoplasma (Podgornaia and Laub

2013). Seja no OCS ou TCS a transdução de sinal é feita através de mudanças no estado de fosforilação dessas proteínas. Em sistemas de fosfotransferência, várias proteínas intermediárias existem entre a proteína sensor e a proteína reguladora. Em procariotos, de modo geral, o TCS são os principais mecanismos de ativação da resposta celular a mudanças nas condições ambientais (Gao et al. 2007).

Seja por OCS, TCS ou fosfotransferência, na maioria das vezes, a modulação da resposta celular é feita através da regulação transcricional (Galperin 2006). Em condições estressantes várias características fisiológicas podem ser modificadas para aumentar as chances de sobrevivência da célula. Essas modificações podem ser alcançada através da ativação de fatores de transcrição (TF) que são proteínas capazes de se ligar ao DNA e modular a eficiência de transcrição de genes alvos (Salama and Stekel 2010). Os TF são os alvos de muitas proteínas reguladoras dos sistemas regulatórios (Podgornaia and Laub 2013), mas em alguns casos as próprias proteínas reguladoras são TFs (West and Stock 2001).

Os TFs podem interagir diretamente com a maquinaria de transcrição atuando como facilitadores da transcrição e/ou recrutadores para os genes alvos (Salama and Stekel 2010). A RNA polimerase, responsável pela síntese do RNA a partir do molde de DNA do gene, não é capaz de reconhecer os sítios de ligação ao DNA na região promotora. Essa função é desempenhada por um conjunto de proteínas chamadas de fatores sigma (σ) (Boor 2006). Geralmente, uma espécie bacteriana possui vários fatores σ que reconhecem diferentes sequências de ligação ao DNA na região protomotora (Boor 2006). A presença de uma sequência de ligação de um fator σ na região promotora de um gene

indica que este fator σ pode direcionar a RNA polimerase para esta região promotora e iniciar a transcrição deste gene. Os genes cuja transcrição possa ser iniciada por um determinado fator σ compõem o regulon deste fator σ (Boor 2006).

Os TFs influenciam positivamente a iniciação do processo de transcrição através de dois mecanismos básicos. Nos TF de classe I e II seu sítio de ligação é localizado na região promotora e eles interagem fisicamente com a RNA polimerase ou ao fator σ ligado a ela (Browning and Busby 2004). Promovendo a ligação da maquinaria de síntese de RNA ao DNA do gene, assim, contribuindo para o aumento na taxa de transcrição deste gene. Nos TF de classe III não há interação física com a RNA polimerase ou com o fator σ , mas há uma modificação física na dupla fita de DNA da região promotora que permite a exposição dos sítios de ligação do fator σ (Browning and Busby 2004). Além da indução da transcrição, os TF podem também estar envolvidos na repressão. Por mecanismos similares aos descritos para a indução, os TF podem reduzir a taxa de expressão de um gene por dificultar a ligação da RNA polimerase a região promotora do gene (Browning and Busby 2004).

Os TFs podem modular a expressão de um ou de múltiplos genes além de poderem atuar como ativadores ou repressores dependendo do gene alvo (Browning and Busby 2004). Por exemplo, o regulador Fad R em *Escherichia coli* atua como ativador de genes cujas as proteínas codificadas estão envolvidas na biossíntese de ácidos graxos, mas como repressor dos genes das proteínas da via de degradação de ácidos graxos (Parsons and Rock 2013). Por outro lado, os fatores σ apenas atuam no início da transcrição, posicionando a RNA

polimerase e quebrando as pontes de hidrogênio na dupla fita (Mooney et al. 2005). Deste modo, os fatores σ não atuam, diretamente, na repressão de nenhum gene (Britton et al. 2002).

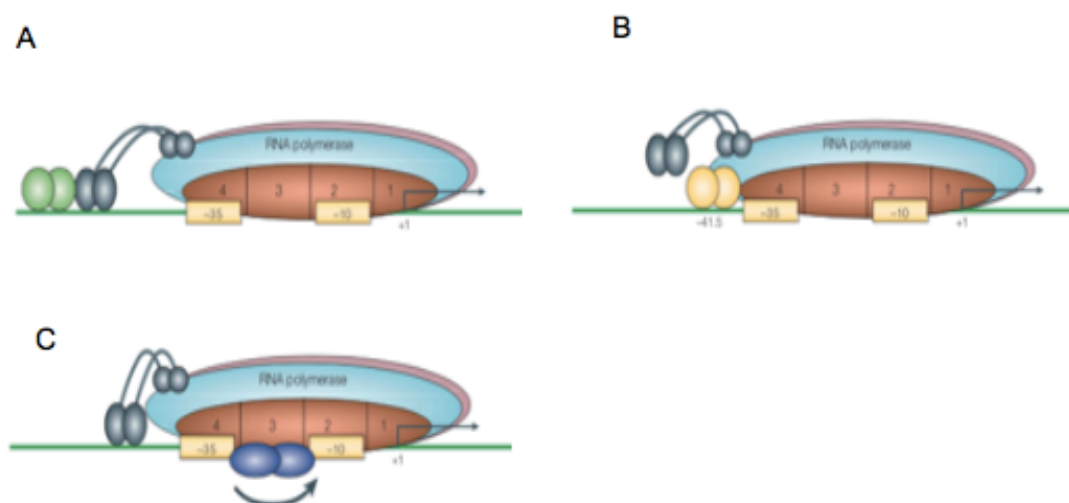


Figura 3. Mecanismo de funcionamento de fatores de transcrição de classe I (A), classe II (B) e classe III (C). Imagem modificada de Browning and Busby (2004).

É comum em bactérias que genes de proteínas envolvidos numa mesma via metabólica ou num mesmo estado fisiológico sejam coregulados. Essa coregulação é o resultado de um mesmo circuito regulatório, onde a transcrição é modulada por um mesmo fator σ e conjunto de TFs (Binder et al. 2016). O fator σ^{70} , por exemplo, é o responsável pela expressão de genes de metabolismo básico, genes das proteínas do processo de replicação, transcrição, tradução, metabolismo energético entre outros (Binder et al. 2016). Por outro lado, fatores σ alternativos possuem regulons mais específicos (Paget 2015). Em *E. coli* os fatores σ^{24} , σ^{28} e σ^{54} são responsáveis por iniciar a transcrição de genes envolvidos na integridade do envelope celular (Ruiz and Silhavy 2005), na formação de flagelo (Claret et al. 2007) e no metabolismo de nitrogênio (Reitzer 2003), respectivamente. Algumas respostas celulares possuem uma rede

regulatória complexa e dependente de vários fatores σ , como é o caso do processo de esporulação em *Bacillus subtilis* (Britton et al. 2002).

Na natureza as células bacterianas podem ser expostas a uma grande variedade de formas de estresse, inclusive simultaneamente. Em organismos modelos como *E. coli* e *B. subtilis* foi demonstrados que as respostas celulares a diferentes condições de estresse se sobrepõem em determinado ponto. Esse ponto de sobreposição é o componente comum a toda as condições de estresse e foi denominado de resposta geral a estresse (GSR). A GSR é possui elementos regulatórios centrais que são ativados independentemente da condição de estresse. Diferentes circuitos com OCs, TCs e sistemas de fosfotransferência resultam na ativação da GSR juntamente com os componentes de resposta específica a condição de estresse. Efeito comum da GSR é a redução da expressão do regulon de σ^{70} em favorecimento de regulons de fatores σ alternativos.

Em organismos modelos foi descoberto que os genes envolvidos na GSR são majoritariamente componentes de regulons de fatores σ alternativos específicos, em *E. coli* o fator σ^S (Battesti et al. 2011) e em *B. subtilis* σ^B (Hecker et al. 2007). Diferentes mecanismos regulam esses fatores σ alternativos e sua maioria são mecanismos de controle pós-transcricionais. Independente do modelo, esses fatores σ , e por tanto a GSR, são mantidos sobre forte controle negativo em condições favoráveis ao crescimento. Quando um determinado estresse surge e dispara um circuito regulatório os mecanismos de repressão desses fatores σ são aliviados e a GSR é ativada. Seja no caso de σ^S ou σ^B , diferentes circuitos regulatório convergem para diminuir a repressão desses

fatores σ . Mutantes para σ^S ou σ^B apresentam em comum uma susceptibilidade maior que as linhagens selvagens a condições estressantes no meio.

Embora a GSR seja um importante mecanismo de resposta da célula não é a única via de resposta generalista da célula a condições de estresse. A resposta estrigente tem se mostrado outro importante mecanismo regulatório em condições de estresse. A resposta estrigente é caracterizada pela produção do alarmônio ppGpp(p) pelas proteínas Rel A ou Spo T. O alarmônio produz um efeito pleiotrópico na célula aumentando a força de promotores de fatores σ alternativos, como σ^S , e reduzindo a eficiência de promotores de σ^{70} . A resposta estrigente atua diminuindo a eficiência da formação do complexo da RNA polimerase com σ^{70} favorecendo a formação da holoenzima RNA polimerase com fatores σ alternativos. A ativação da resposta estrigente leva a uma intensificação do circuito da GSR.

Enquanto a resposta estrigente tem sido amplamente descrita em diversos grupos bacterianos, inclusive os lactobacilos, fatores σ específicos associados a condições de estresse não foram descobertos em todos os organismos. No gênero lactobacilos a própria GSR, caso exista, não foi propriamente definida. Devido a distância dos lactobacilos aos organismos modelos comparações mais específicas se tornam difíceis. Embora se tenha uma quantidade considerável de conhecimento sobre circuitos regulatórios, estes estão relacionados a condições de estresse específica. Compreender esses mecanismo generalistas que controlam a resposta celular é um importante componente para se compreender a biologia desses organismos e seus mecanismos adaptativos na natureza.

2.3 RESPOSTA A ESTRESSE ÁCIDO EM BACTÉRIAS LÁCTICAS

O estresse ácido é uma condição bastante comum a qual as células dos *Lactobacillus* estão submetidas. Em virtude deste gênero ser composto por espécies produtoras de ácidos orgânicos (Kandler 1983; Gänzle et al. 2007), ácido láctico e ácido acético concomitante ao consumo da glicose, a acidificação do meio é um processo natural como resultado do metabolismo celular. Os efeitos da redução do pH no meio extracelular pode levar a redução do pH no citoplasma, caso não controlado, pode levar a desnaturação das proteínas e a hidrólise do DNA (Cotter and Hill 2003).

Diferente de células de outras espécies bacterianas que mantém o pH intracelular constante, as bactérias lácticas toleram a acidificação do citoplasma até o pH máximo de 5,5 (Siegumfeldt et al. 2000). Quando o estresse ácido é muito intenso e induza uma acidificação do citoplasma a baixo de pH 5,5 a célula precisa ativar mecanismos de controle para manter a homeostasia celular. Dentre estes mecanismos de controle o principal é a bomba de efluxo de prótons F_0F_1 que consome 1 mol de ATP para expulsar 1 mol de prótons livre do citoplasma para o meio extracelular (van de Guchte et al. 2002; Cotter and Hill 2003). A bomba F_0F_1 é um mecanismo que consome muita energia da célula e não pode ser usado como único mecanismo de controle do pH.

Reações de descarboxilação redutiva podem ser utilizadas pela célula como mecanismo de controle do pH juntamente com a bomba de extrusão se prótons. A descarboxilação redutiva pode utilizar como substrato aminoácidos ou ácidos orgânicos (Cotter and Hill 2003; Teixeira et al. 2014). Nessas reações, 1 mol de CO_2 é produzida por mol de substrato utilizado, 1 mol de próton do

citoplasma é consumido e os produtos da reação são exportados da célula (Teixeira et al. 2014). Os principais aminoácidos que são utilizados nessa reação são glutamato, histidina, arginina e lisina produzindo GABA, histamina, agamantina e cadaverina, respectivamente (Cotter and Hill 2003). Os ácidos orgânicos utilizados são o malato, que é reduzido a lactato na fermentação malolática, e o oxalacetato, que é descarboxilado a piruvato como parte da via de assimilação de citrato (Cotter and Hill 2003).

Em algumas espécies a acidificação do citoplasma é controlada com a produção de compostos alcalinos que atuam elevando o pH. O principal composto alcalino produzido é a amônia. Dentre essas vias se destaca a via da arginina deiminase que consome um mol de arginina e produz dois moles de amônia e um mol de ornitina (Arena et al. 2002). A catabolização da glutamina, via glutaminase (EC 3.5.1._), produz um mol de amônia e glutamato (Teixeira et al. 2014). Algumas espécies podem utilizar a ureia, via uréase (EC 3.5.1.5), onde um mol de uréia é convertido a dois moles de amônia (Cotter and Hill 2003). De todas as vias acima descritas a mais frequente é a da arginina deiminase descritas em muitas espécies de bactérias lácticas.

3 MÉTODO

3.1 LINHAGEM E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A linhagem de *L. vini* utilizada neste estudo foi a JP 789 isolada a partir de amostras de mosto fermentado durante a safra de 2008 da usina Japungu situada na Paraíba. Esta linhagem teve o seu genoma sequenciado (Lucena et al. 2012) e está disponível no NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore?linkName=biosample_nuccore&from_uid=2471381). Os cultivos foram realizados em meio MRS sólido (2% ágar) ou caldo a 37°C, estático, em anaerobiose gerada com o gerador de anaerobiose Anaerocult A® (Mikrobiologie). A linhagem foi estocada em meio MRS caldo 15% de glicerol a -80°C.

Quando necessário, o antibiótico eritromicina (Sigma Aldrich ®) foi adicionado ao meio na concentração final de 5 µg/mL. A linhagem de *Escherichia coli* D11 foi utilizada na construção dos cassetes de interrupção e foi mantida em meio Luria Bertani (LB) (Difco™) caldo ou sólido contendo 2% de ágar. Quando necessário foi acrescentado ao meio ampicilina na concentração final de 50 µg/mL, IPTG a 1 mM e X-Gal a 0,1 mM. Os cultivos foram realizados em aerobiose, com agitação constante (180 RPM) e a 37°C.

A linhagem de *Lactococcus lactis* NZ 9000 foi cultivada em meio M19 (Difco™) com 5g/L de glicose, caldo ou em meio sólido contendo 2% ágar a 30°C. Quando necessário foi adicionado ao cultivo eritromicina na concentração final de 5 µg/mL. Todas as linhagens foram mantidas em estoque congelado a 15% de glicerol com antibiótico seletivo específico.

3.2 DETERMINAÇÃO DE CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Os agentes estressores testados foram, ácido láctico, ácido acético e etanol, representando os principais metabólitos que se acumulam durante o processo fermentativo industrial. Como estressor osmótico foi usado o cloreto de sódio (NaCl), como estressor oxidativo foi utilizado o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como estressor ácido foi usado ácido clorídrico (HCl), para ajustar o pH do meio MRS. Para determinação da resposta fisiológica ao estresse térmico foram realizados cultivos em diferentes temperaturas.

As curvas de crescimento foram realizadas a partir de cultivos de 24 horas de crescimento submetidos a um pré-cultivo de 3 horas no dia do experimento em meio MRS fresco pré-aquecido a 37°C. Após o pré-cultivo as células foram coletadas por centrifugação, aferida a D.O_{λ600} e ajustada para a D.O_{λ600} de 0,005 no meio MRS caldo na concentração teste do agente estressor. Os cultivos foram realizados em placas de microtitulação onde uma alíquota de 150 µL do cultivo em meio teste foi aplicada em triplicata em poços. O ensaio foi repetido nas mesmas condições de teste e com a mesma linhagem em dias diferentes para determinação da resposta da réplica biológica. As curvas de crescimento foram realizados em multileitor de placas Sinergy HT (Biotek, Suíça) e acompanhadas por 48 horas com pontos coletados a cada 0,5 hora. O cálculo da velocidade específica de crescimento foi feito a partir da região linear da curva logarítmica dos dados de D.O_{λ600} do crescimento e cada réplica técnica foi analisada individualmente. Os testes de estresse térmico foram realizados nas mesmas condições descritas acima, mas no volume de 1 mL em microtubos. Os agentes estressores foram testados em diferentes concentrações até que se observasse a completa inibição do crescimento..

Foram realizados cultivos em pH sub-inibitório de 3,5 com a adição de cada um dos 20 aminoácidos na concentração final de 50 mM, concentração usada em trabalhos prévios na literatura (Wu et al. 2013). As curvas de crescimento foram realizadas como descritos anteriormente.

3.3 ENSAIO DE LISE

Os experimento foram realizados em tampão de lise composto de 50% de sacarose, tampão TE (10 mM Tris-HCl e 50 mM de EDTA-NaOH, pH final de 8.0) e lisozima (AMRESCO) na concentração final de 1 mg/mL. As culturas foram preparadas segundo descrito no item 4.2 e tratadas com todos os agentes estressores em condições sub-MIC. A D.O_{λ600} usada nos tratamentos foi de 0,5 e o volume total do ensaio foi de 1 mL.

Após o tratamento as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em 0,5 mL do tampão de lise, resultando numa D.O_{λ600} final de 1.0. Uma cultura cultivada apenas em meio MRS caldo, foi utilizada como o controle positivo da lise e uma réplica deste controle foi usada como controle negativo da lise. No tampão do controle negativo da lise não foi adicionado lisozima. As curvas de lise foram acompanhadas por 24 horas nas mesmas condições descritas no item 3.2 para as curvas de crescimento e em réplica técnica e biológica como descrito previamente.

3.4 PREPARO DE CÉLULA COMPETENTES E ELETROPORAÇÃO

A capacidade de transformação de células da espécie *L. vini* foi testada a partir de diferentes protocolos de preparo de células eletrocompetentes em diferentes condições de eletroporação. Em todos os protocolos foram usadas

células de um cultivo fresco de 24h que foi re-inoculada em meio MRS caldo no dia do experimento. Os cultivos foram realizados em diferentes concentrações de glicina adicionada ao meio MRS, variando de 5 g/L a 100 g/L em réplica biológica e a $D.O_{\lambda 600}$ inicial foi de 0,1. Em todos os protocolos testados, as células foram mantidas em cultivo até atingir a D.O pré-determinada. As células foram coletadas quando as culturas atingiram $D.O_{\lambda 600}$ entre 0,3 a 0,7 a 600nm.

No protocolo 1, as células foram coletadas por centrifugação a 10.000 rpm, a 4°C e ressuspensas em solução de transformação 1 (Sacarose 0,3M; fosfato de sódio 5 mM pH de 7,4; $MgCl_2$ 1mM) em mesmo volume inicial de cultura utilizada. Este procedimento foi repetido duas vezes. Mas na segunda vez, as células foram ressuspensas em 1/100 do volume inicial, e logo divididas em volumes de 50 μ L e estocadas a -80°C até o dia de uso.

No protocolo 2, as células foram coletadas quando a cultura atingiu a $D.O_{\lambda 600}$ específica, incubadas diretamente em gelo por 3 minutos, centrifugadas a 10.000 rpm a 4°C, em seguida ressuspensas em solução de $MgCl_2$ 1 mM gelada para igual volume de cultura utilizada. Novamente, as células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em igual volume de solução de Polietilenoglicol 1500 (PEG) a 30% (m/v) gelada. Por fim, as células foram novamente centrifugadas, ressuspensas com a solução de PEG acima para 1/100 do volume inicial, distribuídas em alíquotas de 50 μ L e estocadas a -80°C até o dia de uso.

O protocolo 3 foi baseado em descrições da literatura de indução de eletrocompetência em *L. salivarius* (Mason, Collins and Thompson 2005) representante do grupo filogenético de *L. vini* (Zheng *et al.* 2015). Neste, as células de um cultura de 24 h foram coletadas e re-inoculadas em meio MRS

contendo diferentes concentrações de glicina, como descrito acima, e sacarose variando de 0,3 a 1,0 M. As células foram mantidas em cultivo por 90 minutos, coletadas por centrifugação a 10.000 rpm a 4°C, ressuspensas em água deionizada gelada estéril. Esse passo de lavagem foi repetido mais uma vez. Em seguida as células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 1 mL de solução estéril de EDTA a 50 mM e incubadas no gelo por 5 minutos. Novamente as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em água deionizada, coletadas por centrifugação e ressuspensas em solução de sacarose 0,3 M. Este passo repetido mais uma vez. Por fim as células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas com 100 µL (para cada 12 mL de cultura inicialmente utilizada) de solução de sacarose 0,3 M e estocadas a -80°C até o dia de uso.

Para aumentar a eficiência de transformação foram testados dois procedimentos. O primeiro foi um pré-cultivo de 24h em meio MRS caldo contendo glicina nas concentrações de 2%, 4%, 6%, 8% e 10%. Após este pré-cultivo foram realizados os procedimentos descritos acima. No segundo, as células de cultura que atingiram os valores de $D.O_{\lambda 600}$ pré-definidos foram tratadas com ampicilina a 10 µg/mL por 2 h ou lisozima a 10 mg/mL por 10 minutos como descrito na literatura (Wei *et al.* 1995). Em seguida as células foram preparadas de acordo com os protocolos de preparo das células competentes acima.

A eficiência de transformação das células preparadas nos diferentes protocolos foi testada através de experimentos de eletroporação com o vetor pNG 8048e em concentrações variando de 100 ng a 500 ng. As condições de eletroporação levaram em consideração as variáveis de resistência (de 100 Ω a

400 Ω) e corrente (de 1000 a 2000 V), mas com manutenção da capacitância em 25 μ F. Depois de cada procedimento de eletroporação, as células foram incubadas por 3 h a 37°C em meio de recuperação (MRS; 2 mM CaCl₂; 20 mM MgCl₂; 0,3M sacarose). A viabilidade das células em cada protocolo foi aferida submetendo uma amostra das células preparadas em cada protocolo a eletroporação sem a adição de DNA plasmidial. Em seguida, essas células foram diluídas 1/10⁵ ou 1/10⁶ e semeadas em meio MRS sem adição de antibiótico. O experimento foi realizado em duplicata técnica e biológica.

3.5 CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE INTERRUPÇÃO

Os plasmídeos foram extraídos com o kit QIAGEN Plasmid Midi seguindo as orientações do fabricante. O DNA genômico foi extraído com o kit AxyPrep™ Bacterial Genomic DNA Purification Miniprep seguindo as orientações do fabricante. O cassete de inativação foi construído a partir do vetor pRV300. Este vetor não possui o gene *repA* necessário para sua replicação, forçando-o a se manter em baixo número de cópia no citoplasma, e sendo perdido durante a divisão celular.

A linhagem D11 de *E. coli* possui o gene *repA* integrado ao seu genoma, permitindo assim a replicação do vetor pRV300. Em *E. coli*, o vetor é mantido no citoplasma e o gene de resistência *ampR* é expresso por um promotor específico de *E. coli*. As bactérias lácticas transformadas com esse vetor podem ser selecionadas pela marca de resistência a eritromicina conferida pelo gene *ermB*. Como este gene não tem promotor próprio, a única forma de ser expresso nos transformantes é pela integração do vetor numa região transcritionalmente ativa do genoma da célula receptora. Deste modo, o promotor dessa região poderá

dirigir a transcrição do gene *ermB* tornando o transformante resistente a eritromicina.

Fragmentos da ORF identificada no genoma da linhagem JP 789 como homólogo ao gene *relA* foi amplificado por PCR com primers específicos. Nas extremidades 5' do primer foi adicionado um sítio de restrição para a enzima *xhoI* no primer forward (TTT TAC TCG AGA GGG CGA TGT CTT GGA GTT G) e da enzima *speI* no reverse (TTT TAC TAG TTT GAT GAT CCC CAA GGG TGC). Os respectivos sítios de restrição das enzimas estão sublinhados na sequencias do primers.

As reações de PCR foram realizadas em 1X do tampão da enzima, 0,25 mM de cada dextronucleotídeo, 1,2 µM do mix dos primer, 1U da enzima Taq polimerase da Thermo scientific. A ciclagem das reações foi composta por 5 minutos a 90°C seguido de 30 ciclos de 45 segundo a 90°C, 45 segundo a 60°C e 1 minuto a 72°C. Ao término dos ciclos, as reações foram mantidas a 72°C por 7 minutos. Para confirmação da linhagem, foi desenhado um par de primer específico para o gene *dltB* da linhagem JP 789 de *L. vini*, forward (AAAACTC GAG ACT GCC GTC ACG TCA AGA AT) e reverse (AAAAACT AGT ACC AGG TTA AAC CGT GCC AA). O fragmento amplificado do gene *relA* de *L. vini*, e o vetor foram digeridos em reação de digestão dupla com as enzimas *xhoI* e *speI* nas seguintes condições de reação, buffer G 1X, 20 U de cada enzima, 500 ng de DNA do vetor ou do amplicon do gene *relA*, por fim o volume foi completado para 25 µL com água miliQ estéril. A reação para enzima *BamHI* foi realizada nas seguintes condições buffer G 1X, 10 U da enzima, 500 ng de DNA plasmidial, por fim o volume foi completado para 25µL com água miliQ estéril. Todas as

reações de digestão foram incubadas a 37°C por 1h e foram interrompidas por incubação a 80°C por 10 minutos.

O resultado da digestão foi aferido através de separação eletroferética em gel de agarose 1% com os seguintes parâmetros ajustados 100 V, 50 mA e tempo de corrida de 45 minutos e o resultado. O DNA foi corado com Sybr-Safe SYBR™ Safe DNA Gel Stain, Invitrogen™, seguindo as orientações do fabricante. O vetor e o inserto foram submetido a reação de ligação nos seguintes parâmetro 180 ng da purificação vetor digerido, 60 ng do inserto digerido, 1x tampão da ligase, 1U da ligase do fago T4 e o volume foi completado para 20 µL com água miliQ. A reação foi mantida a 16°C por 24h. O inserto e o plasmídeo digerido foram purificados antes de serem utilizados na reação de ligação com o QIAquick PCR Purification Kit, seguindo as orientações do fabricante.

A construção foi transformada nas células de *E. coli* D11 eletrocompetentes por eletroporação com os seguintes parâmetros ajustados: resistência de 200 Ω; voltagem de 2500 V e capacitância de 25 µF. Depois da eletroporação, as células foram mantidos por 1h em meio LB em agitação constante e posteriormente semeadas em placas de meio sólido LB contendo ampicilina, IPG e X-gal, como descrito no item 3.1. As colônias brancas foram repicadas para novo meio seletivo e, após 24h de cultivo, foram submetidas a PCR de colônia para identificação da presença do inserto. As células das colônias que apresentaram resultados positivos foram mantidas em estoque congelado.

Aliquotas do cassete de integração portando o inserto foram utilizadas para os experimentos de eletroporação com célula de *L. vini* JP 789

eletrocompetentes preparadas segundo o protocolo I, descrito no item 3.4. Foram utilizados 300 ng do vetor de integração e as células foram eletroporadas nas seguintes condições 200 Ω , 1250 V e 25 μ F. Após a eletroporação as células passaram por um período de recuperação em meio de recuperação como descrito no item 3.4.

Após a fase de recuperação, as células foram distribuídas em meio MRS seletivo com 5 μ g/mL de eritromicina. As placas foram mantidas em jarras de anaerobiose, mantidas a 37°C. Para visualização das colônias, os cultivos tiveram duração de 5 dias. As colônias obtidas desse cultivo foram mantidas em meio MRS seletivo, caldo ou placa, e estocada a -80°C em mesmo meio de cultivo, acrescido de 15% de glicerol. A confirmação da espécie foi realizada através da amplificação parcial do gene *dltC* com primers específicos desenhados a partir do genoma da linhagem JP 789.

Embora a expressão do fenótipo de resistência a eritromicina seja um indicativo do correto posicionamento no vetor na região interna do gene *reIA*, uma etapa adicional foi realizada para confirmação da integração. Uma nova PCR foi realizada com os transformantes para amplificação do gene *reIA*. Devido a integração do vetor a amplificação deste gene não deveria ser possível visto o distanciamento dos sítios de anelamento dos primers por mais de 4.5 Kbs.

3.6 ANOTAÇÃO DAS ORFS, DESENHO E VALIDAÇÃO DOS PRIMERS PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

O genoma de *L. vini* JP 789 está atualmente em montagem sendo disponibilizado na forma de contigs. Os 838 contigs foram utilizados na

ferramenta online de anotação de genomas procariotos RAST (Aziz et al. 2008) utilizando os parâmetros pré-definidos do programa. Após a anotação as ORFs de interesse foram selecionadas através de busca por termos chaves da anotação no banco de dados ou por análise dos subsistemas relacionados às funções biológicas dos genes de interesse. Após esta etapa as ORFs pré-selecionadas foram convertidas a sequência de aminoácidos correspondente pelo RAST e foram submetidas ao alinhamento com o bando de dados de proteínas do NCBI com a ferramenta online BLASTp. As ORFs que tiveram os maiores scores foram utilizadas para análise. Após a comparação dos resultados do BLASTp e da anotação do RAST as ORFs que se adequaram a função dos genes de interesse para o estudo foram utilizadas na etapa de desenho de primers.

Foram desenhados primers para os genes codificantes das enzimas de biosíntese intracelular da parede celular, *glmS*, *glmU* e *murB*, e da etapa extracelular celular da síntese, ORFs nomeadas neste estudo como PBP 1 A α , PBP 1 A β e *MTT*. Os respectivos genes das enzimas alanina transaminase, alanina racemase e alanina ligase, foram usados para o desenho de primers. Os genes do operon DLT tiveram primers desenhados incluindo o gene da *pbp2X* que se encontra diretamente após gene *dltD*, último gene do opero DLT. Como genes candidatos a genes de referência foram usados os descritos na literatura *groES*, *recA*, *rpoB*, *fusA* e *pcrA* (Marco and Kleerebezem 2008). Adicionalmente foram desenhados primers para os genes dos fatores sigma δ^{70} , δ^{54} , δ^{24} -like, δ^V , anti- δ^V e *mut-L*. ORFs anotadas com proteínas universais de estresse (USP), um regulador responsivo a estresse (SRTR) e de resposta a peróxido de hidrogênio (PSR) também tiveram suas sequências coletadas e utilizadas para

desenhos de primers. Reguladores universais de estresse foram adicionados ao trabalho

Os primers foram desenhados com o uso da ferramenta online Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) com os seguintes parâmetros ajustados: tamanho do amplicon de 70 a 150 pb; tamanho do primer de 19-21 pb; conteúdo de GC mínimo de 20% e máximo de 80%; temperatura de melting do primer mínima de 59°C, máxima de 61°C e ideal de 60°C; máximo de dois G ou C nas últimas 5 bases da extremidade 3'; temperatura de melting máxima do amplicon $\geq 80^{\circ}\text{C}$; máximo de 4 repetições de um mesmo nucleotídeo em qualquer posição do primer. Os pares de primer desenhados foram analisados na ferramenta online oligoanalyser (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>) para a determinação de formação de estruturas secundárias intramolecular e entre os primers do par. Os pares com estruturas secundárias mais termolábeis, estáveis até 50°C, foram utilizados no trabalho.

Os primers foram validados para os experimentos de expressão gênica após a análise de eficiência de amplificação do par em amostras de cinco diluições seriadas de DNA genômico, usado com molde. As diluições foram seriadas com fator de diluição de 10. A diluição mais concentrada iniciou a 1 ng/ μL e a menos concentrada a 0,00001 ng/ μL . O mix de reação foi composto do Sybr Green TM 1x, 0,2 μM de cada primer do par, amostra de DNA genômico em diferentes concentrações e o volume foi completado para 10 μL com água miliQ estéril. As reações foram realizadas em triplicata técnica. Após as amplificações a eficiência de amplificação foi calculada a partir do slope da curva construída no gráfico com o Ct das amostras (abscissas) pela concentração das

amostras (ordenadas). Os primers que obtiveram um slope entre -3.1 e -3.5 (Ginzinger 2002), o que corresponde a eficiências limítrofes de 90% e 110 %, respectivamente, foram utilizados para quantificar a expressão dos genes em estudo.

3.7 CONDIÇÕES DE TRATAMENTO, EXTRAÇÃO DE RNA E ANÁLISE DE EXPRESSÃO

As culturas usadas no tratamento e posterior extração do RNA seguiu a metodologia descrita no item 3.2 correspondente ao pré-cultivo e origem das células da cultura. Após o pré-cultivo as células foram coletadas por centrifugação, a $D.O_{\lambda 600}$ foi ajustada para 1,0 no volume final de 10 mL do meio MRS caldo na presença de concentrações sub-inibitórias de ácido láctico (60 mM), ácido acético (150 mM), meio com pH ácido ajustado com HCl (3,5), cloreto de sódio (0,6 M), peróxido de hidrogênio (0.8 mM). Para o estresse térmico foi utilizada uma cultura em meio MRS cultivada a temperatura de 40°. Para posterior controle dos ensaios de expressão gênica, uma condição de tratamento adicional, apenas com o meio MRS foi adicionada. O tratamento teve duração de 1 hora e as culturas foram mantidas nas condições de cultivo como descrito no item 3.1. Ao fim do tratamento as células foram coletadas por centrifugação (10 minutos a 7.000 RPM) e imediatamente iniciou-se a extração. Os tratamentos foram realizados em réplicas biológicas.

Após 1 h de incubação estática a 37 ° C, exceto em estresse térmico, as células foram coletadas por centrifugação e o RNA total foi extraído com um protocolo de fenol quente. Resumidamente, o sedimento celular foi ressuspenso em 500 µL de tampão AE (10 mM EDTA, 50 mM de acetato de sio, pH final de

5,3). Depois, adicionou-se sequencialmente volumes de 50 μ L de SDS 10% e 500 μ L de fenol equilibrado (fenol puro ajustado para pH 5,3 com solução de acetato de sódio a 50 mM) a suspensão celular. A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada durante 10 minutos a 65°C, com homogeneizações intermitente com o auxílio de um vortex a cada dois minutos. Após esse período, os tubos foram mantidos em gelo. Adicionou-se um volume igual de solução de fenol-clorofórmio (5 partes de fenol equilibrado para cada 1 parte de clorofórmio) e homogeneizou-se a solução por 1 minuto com um vortex. Os tubos foram submetidos a centrifugação a 20.000 g à temperatura ambiente. A fase superior aquosa foi recolhida para tubos novos, misturados com igual volume de clorofórmio puro, e o procedimento acima foi repetido. Por fim, a fase superior foi coletada em novos tubos e o RNA foi purificado com o Kit illustra[™] RNAspin Mini RNA isolation (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. A integridade do RNA foi avaliada diretamente em gel de agarose 1%, preparado com tampão TAE (40 mM de tris; 10 mM de EDTA; 20 mM de ácido acético) e corado com 0,5 mg/mL de brometo de etídio. A concentração da amostra foi estimada em Nanodrop (Thermo Fisher, EUA). As amostras de RNA foram armazenadas a -80 até o dia de uso.

O cDNA foi sintetizado com o sistema de transcrição reversa ImProm-II[™] Promega II (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Cada reação foi realizada com 0,5 μ g de RNA em um volume final de 20 μ L. Como controle negativo uma amostra das extrações de RNA foram preparados com a mesma quantidade de RNA, mas diluído em água miliQ estéril. As amostras foram armazenadas a -20 ° C até o dia de uso. O cDNA foi utilizado em reações de qPCR nas mesmas condições descritas acima para validação de primers,

descrito no item 3.4, em duplicatas biológicas e triplicatas técnicas. Os valores de Cq de cada réplica de genes de referência e genes testados foram usados para normalização e quantificação da expressão relativa de acordo com as diretrizes do MIQE.

4 STRESS TOLERANCE AND USP GENE EXPRESSION IN *LACTOBACILLUS VINI*

Artigo a ser submetido a Microbiology (ISSN: 1350-0872).

Stress tolerance and the USP genes expression in *Lactobacillus vini*

Allyson Andrade Mendonça¹, Paula Katharina Nogueira da Silva¹, Tiago Luiz Santana Calazans¹, Rafael Barros de Souza², Will de Barros Pita², Carolina Elsztein¹ and Marcos Antonio de Moraes Junior¹

¹Department of Genetics, ²Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

³Institute for Biological Sciences, University of Pernambuco, Recife, Brazil.

*Correspondence to:

Marcos A Moraes Jr

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco

Av. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária 50670-901 Recife PE Brasil

E-mail: marcos.moraisjr@ufpe.br

Phone: 55-81-21267817 Fax: 55-81-21268522

Abstract

This work describes the phenotypic and genetic response of *Lactobacillus vini* in set of stress conditions. This bacterium is found in industrial ethanol fermentation process which is an environment that imposes a set of stress to cell. The most affected parameters by the presence of stressing conditions were the lag phase. In addition, the specific growth rate responded to acid and osmotic stresses. The population survived to high concentration of all tested agents found at industrial level. The expression of sigma factors, universal stress protein (USP) and transcriptional regulators were measure in stress conditions. Factors sigma showed lower level of transcriptional variation while the transcriptional regulators were more responsive to the conditions tested. The gene *uspII* responded to all treatments while *uspIV* showed transcriptional response coordinated with the transcriptional regulators. The chaperonin *groES* were up-regulated in oxidative, acid and ethanolic stress indicating that its expression is regulated by protein damage. The other genes tested presented variable response. In conclusion, *L. vini* showed significant tolerance to the set of stress faced in industrial fermentation and its cellular response depends on genes with generalist profile of response, such as *uspII*, *uspIV*, *pspC* and *furR*.

Key words: universal stress protein; *Lactobacillus vini*; transcriptional regulator.

Introduction

Lactobacillus vini is a specie identified in the last decade from ethanol fermentation process [1–3]. The first isolation was made from samples of fermented grape for wine production [4] and decades later the status of a new species was confirmed [1]. Soon after its identification, reports of this lactobacilli invading the fermentation for bioethanol production arose from Sweden [2] and Brazil [3]. The natural environment and niche of *L. vini* still unknown but is likely be introduced in the process together with non-sterile raw material. The fermentation in the Brazilian distilleries is an open process and the contamination is expected but has to be contained to prevent loss in the production [5]. The bacterial diversity in the ethanol fermentation beginning high but decrease in following months. That is consequence to the harsh conditions of the process that has high concentration of ethanol, organic acid and osmotic pressure by high concentration of sugar [6]. However, after *L. vini* detection its population remain until the end of the fermentation with increasing number [3]. To control the contaminant population are applied a sulfuric acid wash in the pre-fermenter that expose the cell to a extreme acid environment [7].

The survival of the bacterial cell in the environment requires that the cells acclimatizes to stressful conditions faced in the nature [8]. In the industrial environment, the bacterial cells that are not able to adapt to the stress environment are naturally eliminated to the process. On the hand, very well adapted species are a recurrent problem to the processes as their cells consume sugars and direct impacts the ethanol yield, besides producing organic acid that are toxic to the fermenting yeasts [9]. Improvement of the antimicrobial treatment includes changes in the bactericidal agent like sulfite and

hydrogen peroxide [10], antibiotics like penicillin G [11] or virginiamycin [12]. Otherwise, less attention has been given to the physiological traits in the stress conditions of the well adapted species in the industrial process and the genes implicated in the response to stressful environment. The aim of this work was identified gene of stress response in *Lactobacillus vini*.

Material and methods

Strain, medium, growth kinetics and Minimal Bactericidal Condition (MBC) determination

Lactobacillus vini JP 789 was isolated from industrial ethanol fermentation process [3]. The genome of this strain, as well as the type strain DSM 20605 were sequenced [13], and are available in Genbank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=lactobacillus+vini>). Bacterial cells were maintained in MRS broth (Merck) containing 2% agar. Cultivations (seed cultures) were performed in MRS broth for 24 h at 37 °C without shaking. For Growth kinetic assays, cells from seed cultures were used to inoculate 1 mL of MRS broth containing stressor agents in the range of lactic acid 20 to 100 mM, acetic acid 50 to 250 mM, ethanol 2.5 to 12%, sodium chloride 0.2 to 0.8 M, hydrogen peroxide 0.6 mM to 1.2 mM or medium pH adjusted, with HCl and NaOH, 8.0 to 3.0, with initial cell density of 0.005 absorbance unit at 600nm (A_{600nm}). Then, 150 μ L of each condition was transferred to wells in sterile microtiter plates. Cultivations were performed in Sinergy HT multireader device (Biotek, Switzerland) at 37 °C and continuous shaking. Absorbance measurements were automatically recorded every 30 min for 48 h. The specific growth rate was calculated

from the slope of the linear portion of the exponential growth phase for each curve. The experiments were performed with technical triplicates and biological duplicates.

The MBC were determined with seed cultures cells with OD adjusted to 0.1 absorbance unit at 600nm (A_{600nm}) at increasing concentrations of stressor agents higher than MIC. The cell viability was evaluated by taking 10 μ L of the cultures at 0 h, 24 h and 48 h and dropping it onto MRS agar plates. Plates were incubated for 96 h in anaerobic jar with anaerobiosis generator Anaerocult A (Merck).

ORF annotation, primer design and validation

The annotation ORFs was performed in the automatic system RAST (<http://rast.nmpdr.org>) [14] with the available genome of the strain *L. vini* JP 789 [15]. An additional step to confirm the ORF annotation was made with the amino acid sequences of those ORFs compared with NCBI database with the tool BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Due the lack of information about general stress response of lactobacillus, genes related with stress response, in model organism like *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* were selected. Altogether eleven ORFs were selected, five are universal stress protein (USP) identified. In both *E. coli* or *Bacillus subtilis*, alternative sigma factor, sig B and sig S, the alternative sigma factor in *E. coli* and *B. subtilis*, respectively, play a central role in regulation of GSR genes expression. However in lactobacillus homologous sigma factors to sig B or sig S, were not identified. Therefore all three alternative sigma factors identified in *L. vini* genome, sig 24, sig V and sig 54, were selected to test its responsiveness under stress conditions. Other two ORFs annotated how transcriptional factors a Stress-Responsive Transcriptional regulator (SRTR) and a Peroxide Sensitive Regulator (PSR) and the chaperonin GRO ES were include. To normalize the gene expression six candidates genes selected sigma 70, fusA, recA, rpoB, pcrA and mutL. The sequence of test and reference

candidates genes were identified and the nucleotide sequence collected for primer design. The reference genes were indicated by GeNorm analysis to the pair with M-value lower than 0.15.

The primers were designed with the online tool Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) with the parameters: amplicon size 70-150 pb; primer size 19-21 pb; minimum GC content of 20%-80%; primer melting temperature from 59 °C to 61 °C; maximum G or C in the last 5 bases in the 3' end; amplicon melting temperature $\geq 80^{\circ}\text{C}$; Moreover, the maximum acceptable length for a mononucleotide repeat was 4. The primers designed were additionally analysed with the online tool oligoanalyser (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>). The PCR reaction mix was made with 1x Sybr green master mix, 0.2 μM of primer mix and a final volume of 10 μL . The reactions were performed in technical triplicates. The primer was considered as validated when the slope of the regression curve ranged from -3.1 to -3.5 as in previous studies [16–18].

RNA isolation, cDNA synthesis and gene expression

To RNA isolation, seed cells were suspended in 10 mL MRS to 1.0 $A_{600\text{nm}}$ and treated in same conditions of stressor agents used in adaptive response determination, lactic acid (60 mM), acetic acid (150 mM), ethanol (8%), sodium chloride (0.6M), hydrogen peroxide (0.8 mM), pH adjusted medium (pH 3.5) and high temperature (40 °C). After 1 h of static incubation at 37 °C, except in thermic stress, cells were collected by centrifugation and total RNA was extracted with a hot acid phenol protocol. Briefly, the cell sediment was re-suspended in 500 μL of AE buffer (10 mM EDTA, 50 mM of sodium acetate, final pH 5.3). Then, volumes of 50 μL of SDS 10 % and 500 μL of equilibrated phenol (pure phenol adjusted to pH 5.3 with 50mM sodium acetate solution) were sequentially added to cells suspension. The mixture was mixed by vortex to

homogenisation and incubated for 10 minutes at 65 °C, with intermittent mixing by vortex every two minutes. After this time the tubes were chilled and kept on ice. An equal volume of phenol-chloroform solution (5 equilibrated phenol: 1 chloroform) was added and the mixtures vortexed for 1 minute. Tubes were submitted to centrifugation at 20,000 g at room temperature. The aqueous upper phase was collected to new tubes, mixed with equal volume of pure chloroform, and the procedure above was repeated. At last, the upper phase was collected in new tubes and the RNA was purified with Kit illustra™ RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare) following the manufacturer's instruction. RNA integrity was evaluated directly on 1% agarose gel prepared with TAE buffer (40 mM of tris; 10 mM of EDTA; 20 mM of acetic acid) and stained with 0.5 mg/mL of ethidium bromide, and its concentration performed in Nanodrop (Thermo Fisher, USA). RNA samples were stored at -80 °C until use.

The cDNA was synthesized with ImProm-II™ Reverse Transcription System Promega II (Promega, USA), following the manufacturer's instructions. Each reaction was performed with 0.5 µg of RNA in a final volume of 20 µL. RT negative controls, in order to estimate contamination with genomic DNA were also prepared with the same amount of RNA diluted in water (same concentration of cDNA sample). The samples were stored at -20 °C until use. The cDNA was used for qPCR reaction in the same conditions described above for primer validation, in biological duplicates and technical triplicate. The Cq values of each replicate from reference genes and tested genes were used for normalization and relative expression quantification according to MIQE guidelines [19].

Results and discussion

Growth rate is an important trait that is sensitive to environment stress conditions. In a nutritional rich medium and without stressors, the bacterial cells increasing their numbers until the depletion of nutrient, or accumulation of toxic metabolites, impair this growing state. In a nutritional rich medium but in presence of stressor agent, the cells have to adjust its metabolism to avoid accumulate damage in cell structures like membrane and enzymes. In growth curves of *L. vini* JP 789 the major effect of the stressor agents on curves profile was the extending the lag phase (Fig. 1). In ethanolic (Fig. 1C) and oxidative (Fig. 1E) stresses, growth was re-established after the lag phase at the similar rate as calculated for the reference condition (Fig 2C and D). On the other hand, more severe effect of reduction in exponential growth rate was observed for the acidic stresses, produced by lactic, acetic or hydrochloric acids (in the last case by lowering initial medium pH), as well as for osmotic stress caused by NaCl (Fig. 2). In extreme conditions for all type of cell stress, impairment of cell growth was caused by complete loss of viability. The exposition for 48 h of *L. vini* in the presence of 200 mM lactic acid, 600 mM acetic acid, 10 mM HCl (pH 2.0), 12% ethanol, 1.6 M sodium chloride, 2 mM hydrogen peroxide or at 49° C drastically impact the population viability and no growth was observed (Fig. 3). Interesting, it was observed that the minimal bactericidal concentration (MBC) value of ethanolic stress was close to the minimal inhibitory concentration (MIC) for this agent. Hence, it might be concluded that that ethanolic stress does not induce bacteriostatic effect in *L. vini* cell and only bactericidal effect. Noteworthy, the MBC values observed for *L. vini* JP 789 were higher than the concentrations/conditions reported for industrial environments, with exception of ethanol and medium pH that reached inhibitory activities at the level of industrial fermentations.

The lag phase is the more sensitive phase of the populational cell growth of *L. vini* to harmful environment when the nutrients are not limited. Conventionally, this is the

phase in which the cells adjust their metabolism to medium conditions, and its extension might indicate the activations of adaptive mechanisms that counteract the stressors effects over the cells. However, acid and osmotic stresses not only extended lag phase but reduced growth rate as well. In both types of stresses the metabolism of carbon and amino acids are directly affected. The cellular response to cytoplasm acidification in other lactic acid bacteria involves alkalization mechanism that deviate carbon and amino acids from biomass production towards internal pH maintenance. In addition, production of osmolytes, like betain [20], is also triggered by osmotic stress to prevent dehydration of cytosol. These responses consume carbon and amino acids, limiting cell division and reducing growth rate.

Ethanol stress promotes perturbation in the cell membrane fluidity and the cell reacts by increasing the saturation of lipids in this compartment [21]. On the other hand, oxidative stress acts by denaturing labile cell components like proteins. The yeast cells oppose these damages by increasing the content of reducing agents like thioredoxin and glutathione. In both cases, the requirement of reducing power by the cells to resist to harmful conditions might bleed energy that should be used for anabolic reaction, and cell growth as consequence.

Identification of stress response genes

Following those phenotypic analysis, genes that might be involved in the mechanisms on cell tolerance to those stressing conditions were mined from the deposited genome of *L. vini* JP7.8.9 (Lucena et al 2012) by combining RAST annotation and Blastp confirmation (Supplementary material Table S1). The first ORF identified was encoded a putative stress response transcriptional regulator (SRTR) with similarity to phage shock protein C (PSP C) in others lactobacilli and was henceforth classified as *pspC* gene. In

addition, an ORF encoding a putative peroxide stress regulator (PSR) with similarity to transcriptional repressor of Fur protein family in lactobacilli. This protein family consist of a group of regulators that control the expression of genes responsive to hydrogen peroxide or to metal cations. Each regulator has its cation specificity and are named accordingly, such as *fur* regulator towards iron, *zur* regulator for zinc and *mur* regulator for manganese [22]. In the present case, this *L. vini* ORF was named as *furR* gene.

In addition, five ORFs were identified as encoding putative universal stress proteins (USPs) which is widespread in eubacterial domain of life [23], named as *uspI* to *uspV*. Analysis of similarity indicated that their nucleotide sequences did not represent gene duplications, since the highest level of similarity of 50% was observed between *uspI* and *uspIII* genes. Their genetic environments were also diversified in different contigs in the database (Fig. 5). Also, the neighborhood of the *L. vini usp* genes differs greatly from that found in the genome of *E. coli* [24]. It is note worth the fact that LAB USPs do not share high amino acids similarity and are identified solely by the presence of putative USP domain in the protein [25]. In the present report, each of *usp* genes in *L. vini* might encode a protein with a single predicted USP domain. It differs, for instance, from *E. coli uspE* gene whose protein contains two USP domains, indicating the fusion of two *usp* ancestral genes [20]. It might also be highlighted that these genes are not essential to the bacterial cells, although their inactivation lead to reduced viability than wild-type in stressful conditions [26]. In *Listeria innocua*, one *usp* gene was identified from proteomics analysis from cells exposed to acid stress [25].

In addition to those genes above, we also considered in the present analysis some genes the encodes for the chaperonin *groES* and alternative sigma factors (σ^v , σ^{24} and σ^{54}) as implicated in the response to stress condition that were recovered from our data mining. Regarding these sigma factors, it has been well reported that this kind of

alternative regulators are involved in general stress response, like σ^S and σ^B in *E. coli* [8] and *B. Subtilis* [27], respectively. However, these two factors were not found in the genome of *L. vini* JP7.8.9 strain. The factors σ^v and σ^{24} are associated to response to envelope stress in *B. subtilis* and *E. coli*, respectively, while σ^{54} is associated to nutritional stress like nitrogen starvation in *E. coli* [28–30].

The expression of all those genes above was measured in cells submitted to treatment with stressing agents at sub-MIC. Overall, treatment with NaCl lead to increase in the transcript level for most of the tested genes relative to untreated condition, while hydrogen peroxide showed the opposite profile by acting on the regulation of only two of the tested genes (Fig. 5 B). For the other five stressing conditions, there were observed variations in the pattern of gene expression as detailed below.

The protein encoded by *groES*, together with *groEL* protein in *B. subtilis*, is involved in repairing of denaturated proteins produced by different stressing conditions [31] [32, 33]. In the present work, it was observed a slightly upregulation of this gene in *L. vini* in the presence of acetic acid (2.8 times) and sodium chloride (2.3 times) treatments, a moderate upregulation by HCl (5.6 times) and a high upregulation by ethanol (9.1 times) and hydrogen peroxide (15.2 times) (Fig. 5 B). Its overexpression by those last three agents indicated protein denaturation as one of the causes of their toxic effect. Ethanol was also reported to promote protein denaturation in *L. plantarum* [21] in addition to the canonical action on membrane permeability. No significant change in *groES* expression was observed for cells treated with lactic acid or high temperature. Interesting, thermic stress is known to overexpress *groES* genes in bacilli that encode heat shock proteins, which might not be the case for *L. vini*.

Genes classified as *uspI* and *uspV* displayed narrow range of transcript variation in most of the stressing treatments (Fig. 5 B), although *uspI* was highly upregulated (21

times) by NaCl. On the other hand, *uspII* showed wide range of transcript variation in all stressing treatments analyzed, from 6.1 times at 40°C to 52 times in NaCl. This was also observed for *uspIV* that was upregulated by all treatments, except hydrogen peroxide, a profile shared by *pspC* and *furR* gene (Fig. 5 B). A more complex profile of regulation was observed for *uspIII* from downregulation by hydrogen peroxide (-3.4 times) and NaCl (-13 times) to highly upregulation by lactic acid (9.0 times) (Fig. 5 B). So far, there are no clear indications for the biological functions of the proteins encoded by *usp* gene family in eubacteria. The most relevant information in this respect is related to the action of UspA protein from *E. coli* that is responsible for growth arrest when the cells face stressing conditions [26]. Since the only similarity among Usp proteins regards on their shared USP domain, it is plausible to suppose that they are implicated in different biological roles in different bacterial species. In this sense, and taking in consideration the scarcity of information relative to LABs, we could use gene expression profiles to figure out the role of each Usp proteins in the response of *L. vini* to stressing environment. First of all, the results indicated that Usp proteins take part in different regulons responsible for modulation of different physiological traits.

Indeed, deletions of individual *usp* genes in *E. coli* impacted different features of cell biology like increasing susceptibility to oxidative stress and decreasing cell motility and adhesion [26]. In this bacterium, *uspA* is responsive to different sort of stress conditions [24], similar to what observed herein for *uspII* of *L. vini*. Therefore, it is plausible to suppose that the protein encoded by *uspII* would function as unspecific sensor for stress condition that might contribute to trigger the general stress response network in *L. vini*. In addition, the proteins encoded by *uspIV*, *pspC* and *furR* seem to be involved in a mechanism that respond to non-oxidative stresses. The lack of upregulation of *furR* by hydrogen peroxide corroborated the profile expected for iron-uptake *fur* regulators [34]

and diverged from *perR* [35]. Besides being involved in iron starvation response, *fur* regulators present pleiotropic effect [36] that include participation in stringent response in *B. subtilis* [37]. Hence, it seems to be the case also for *L. vini furR* gene.

In *E. coli*, σ^{24} and the *psp* regulon are activated by injuries in cell envelope [38]. The PspC protein play a crucial role in activation of the *psp* regulon though its binding to PspF enhancer protein [38]. Remarkably, *L. vini* does not contain in its genome the elements of the *psp* operon other than *pspC*. This gene was highly upregulated by osmotic treatment (53 times), thermic shock (28 times) and ethanolic treatment (20 times) (Fig. 5 B). These results suggest that *pspC* could be implicated in membrane integrity maintenance, similar to what was reported to *E. coli* [30, 39]. From these results, it can be proposed that despite the pleiotropic consequences of the thermal stress, the lack of *groES* induction and the overexpression of *pspC* indicated that this stress response might be mostly signaled through damages in membrane fluidity than protein denaturation in *L. vini*.

Out from σ^{54} , the expression of none of other three sigma factor genes was significantly changed by any of the stressing conditions tested (Fig. 5 A). In addition, it can be observed the profile of complete co-expression of these three genes. It revealed that the so-called alternative σ^V and σ^{24} factors have their expression similar to the constitutive σ^{70} factor. Hence, we conclude that they are not associated to stress response in *L. vini* as classically reported for other bacteria. On the other hand, σ^{54} factor displayed a specific expression profile, with opposite behavior to other three gene in acetic, oxidative and thermal stresses (Fig. 5 A). Given the different responses observed for these three types of stress, it is difficult so far to predict any involvement of σ^{54} factor in any biological responses. These four genes were the only sigma-encoding sequences found in

the *L. vini* genome in the present analysis. Therefore, it seems that there is no sigma factor dedicated to regulation of stress response in this bacterium.

Conclusion

The tolerance profile of strain JP 7.8.9 demonstrated the stress conditions of industrial environment is well tolerable for *L.vini*. The adaptive mechanism implicated in this tolerance still unknown in detailed, but some genes could be implicated, like the *uspII*, *uspIV*, *pspC* and *furR* that were the most responsive gene in almost all the stress conditions.

References

1. **Mari A, Chenoll E, Macia MC, Ferrer S, Pardo I, et al.** Lactobacillus vini sp . nov ., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. 2006;513–517.
2. **Passoth V, Blomqvist J, Schnürer J.** Dekkera bruxellensis and Lactobacillus vini form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:4354–6.
3. **Lucena BTL, dos Santos BM, Moreira JL, Moreira APB, Nunes AC, et al.** Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiol* 2010;10:298.
4. **Barres P.** Identification of thermobacteria and homofermentative, thermophilic, pentose-utilizing lactobacilli from high temperature fermenting grape must. *J Appl Bacteriol* 1978;44:125–129.
5. **Beckner M, Ivey ML, Phister TG.** Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Lett Appl Microbiol* 2011;53:387–94.

6. **Zhao XQ, Bai FW.** Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *J Biotechnol* 2009;144:23–30.
7. **Muthaiyan A, Limayem A, Rieke SC.** Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. *Prog Energy Combust Sci* 2011;37:351–370.
8. **Battesti A, Majdalani N, Gottesman S.** The RpoS-Mediated General Stress Response in Escherichia coli. *Annu Rev Microbiol* 2011;65:189–213.
9. **Skinner K a, Leathers TD.** Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2004;31:401–8.
10. **Chang IS, Kim BH, Shin PK.** Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:1–6.
11. **Bayrock DP, Thomas KC, Ingledew WM.** Control of Lactobacillus contaminants in continuous fuel ethanol fermentations by constant or pulsed addition of penicillin G. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003;62:498–502.
12. **Bischoff KM, Liu S, Leathers TD, Worthington RE, Rich JO.** Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. *Biotechnol Bioeng* 2009;103:117–22.
13. **de Lucena BTL, Silva GGZ, Manoel Dos Santos B, Dias GM, Amaral GRS, et al.** Genome sequences of the ethanol-tolerant Lactobacillus vini strains LMG 23202T and JP7.8.9. *J Bacteriol* 2012;194:3018.
14. **Aziz RK, Bartels D, Best A a, DeJongh M, Disz T, et al.** The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 2008;9:75.
15. **Lucena BTL de, Silva GGZ, Manoel Dos Santos B, Dias GM, Amaral GRS, et al.** Genome sequences of the ethanol-tolerant Lactobacillus vini strains LMG 23202T and JP7.8.9. *J Bacteriol* 2012;194:3018.

16. **Ginzinger DG.** Gene quantification using real-time quantitative PCR. *Exp Hematol* 2002;30:503–512.
17. **Stenico V, Baffoni L, Gaggia F, Biavati B.** Validation of candidate reference genes in *Bifidobacterium adolescentis* for gene expression normalization. *Anaerobe* 2014;27:34–39.
18. **Løvdal T, Saha A.** Reference gene selection in *Carnobacterium maltaromaticum*, *Lactobacillus curvatus*, and *Listeria innocua* subjected to temperature and salt stress. *Mol Biotechnol* 2014;56:210–222.
19. **Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla a.** Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005;6:279–284.
20. **Krämer R.** Bacterial stimulus perception and signal transduction: Response to osmotic stress. *Chem Rec* 2010;10:217–229.
21. **van Bokhorst-van de Veen H, Abee T, Tempelaars M, Bron PA, Kleerebezem M, et al.** Short- and Long-Term Adaptation to Ethanol Stress and Its Cross-Protective Consequences in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:5247–5256.
22. **Fillat MF.** The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch Biochem Biophys* 2014;546:41–52.
23. **Tkaczuk KL, Shumilin IA, Chruszcz M, Evdokimova E, Savchenko A, et al.** Structural and functional insight into the universal stress protein family. DOI: 10.1111/eva.12057.
24. **Kvint K, Nachin L, Diez A, Nyström T.** The bacterial universal stress protein: Function and regulation. *Curr Opin Microbiol* 2003;6:140–145.
25. **Tremonte P, Succi M, COPPOLA R, Sorrentino E, Tipaldi L, et al.** Homology-based modeling of Universal Stress Protein from *Listeria innocua* up-regulated under acid stress conditions. *Front Microbiol* 2016;7:1998–1998.

26. **Nachin L, Nannmark U, Nyström T, Nystro T.** Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance , adhesion , and Motility. *J Bacteriol* 2005;187:6265–6272.
27. **Hecker M, Pané-Farré J, Uwe V.** SigB-Dependent General Stress Response in *Bacillus subtilis* and Related Gram-Positive Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2007;61:215–236.
28. **Guariglia-Oropeza V, Helmann JD.** *Bacillus subtilis* σ V Confers Lysozyme Resistance by Activation of Two Cell Wall Modification Pathways, Peptidoglycan O-Acetylation and d-Alanylation of Teichoic Acids. *J Bacteriol* 2011;193:6223–6232.
29. **Binder SC, Eckweiler D, Schulz S, Bielecka A, Nicolai T, et al.** Functional modules of sigma factor regulons guarantee adaptability and evolvability. *Sci Rep* 2016;6:22212–22212.
30. **Joly N, Engl C, Jovanovic G, Huvet M, Toni T, et al.** Managing membrane stress: The phage shock protein (Psp) response, from molecular mechanisms to physiology. *FEMS Microbiol Rev* 2010;34:797–827.
31. **KILSTRUP M, JACOBSEN S, HAMMER K, VOGENSEN FK.** Induction of Heat Shock Proteins DnaK, GroEL, and GroES by Salt Stress in *Lactococcus lactis*. *APPL Env MICROBIOL* 1997;63:12.
32. **Cotter PD, Hill C.** Surviving the Acid Test : Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH Surviving the Acid Test : Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 2003;67:429–453.
33. **Imlay JA.** Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. *Curr Opin Microbiol* 2015;24:124–131.
34. **Troxell B, Hassan HM.** Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* 2013;3:1–13.

35. **Lee J-W, Helmann JD.** The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* 2006;440:363–367.
36. **Yuhara S, Komatsu H, Goto H, Ohtsubo Y, Nagata Y, et al.** Pleiotropic roles of iron-responsive transcriptional regulator Fur in Burkholderia multivorans. *Microbiology* 2008;154:1763–1774.
37. **Miethke M, Westers H, Blom E-J, Kuipers OP, Marahiel MA.** Iron Starvation Triggers the Stringent Response and Induces Amino Acid Biosynthesis for Bacillibactin Production in Bacillus subtilis. *J Bacteriol* 2006;188:8655–8657.
38. **Bury-Moné S, Nomane Y, Reymond N, Barbet R, Jacquet E, et al.** Global Analysis of Extracytoplasmic Stress Signaling in Escherichia coli. *PLoS Genet* 2009;5:e1000651–e1000651.
39. **Jovanovic G, Engl C, Mayhew AJ, Burrows PC, Buck M.** Properties of the phage-shock-protein (Psp) regulatory complex that govern signal transduction and induction of the Psp response in Escherichia coli. *Microbiology* 2010;156:2920–2932.

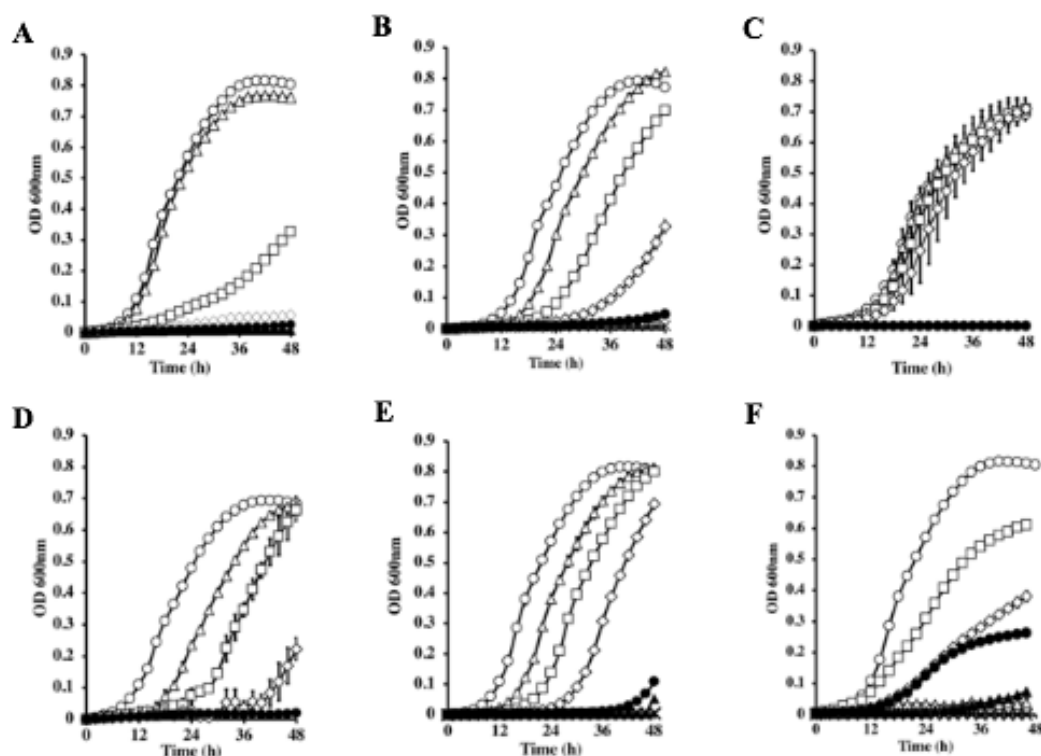


Figure 1. Growth curve of *Lactobacillus vini* in increasing concentrations of lactic acid, acetic acid, ethanol, sodium chloride, hydrogen peroxide and hydrochloric acid. In all conditions the growth in the control conditions is shown (○). (Panel A) Growth curves in 20 mM (△), 40 mM (□), 60 mM (◇), 80 mM (●) and 100 mM (▲) of lactic acid. (Panel B) growth in 50 mM (△), 100 mM (□), 150 mM (◇), 200 mM (●) and 250 mM (★) of acetic acid. (Panel C) growth in 2.5% (△), 5% (□), 7.5 % (◇) and 10 % (●) of ethanol. (Panel D) growth in 200 mM (△), 400 mM (□), 600 mM (◇) and 800 mM (●) of sodium chloride. (Panel E) growth in 0.6 mM (△), 0.8 mM (□), 0.9 mM (◇), 1.0 mM (●), 1.1 mM (▲) and 1.2 mM (★) of hydrogen peroxide. (Panel F) growth in pH 7.0 (△), 6.0 (□), 5.0 (◇), 4.0 (●), 3.5 (▲) and 3.0 (★) adjusted with hydrochloric acid .

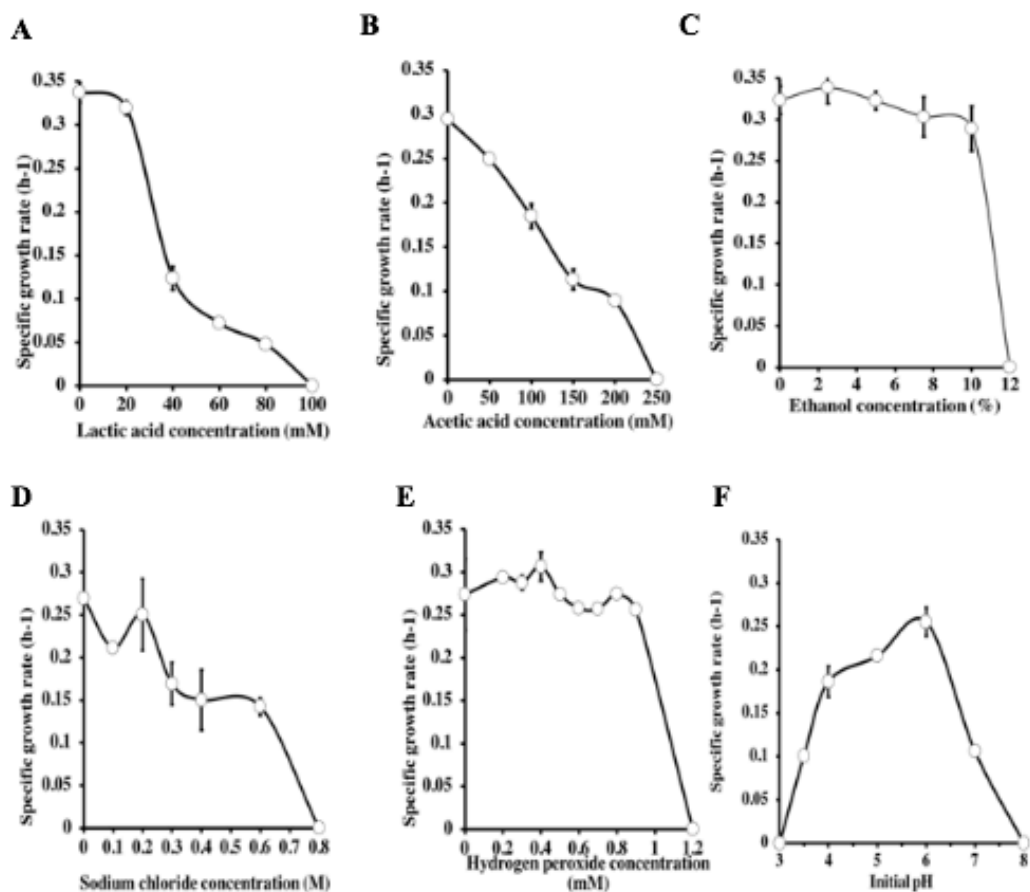


Figure 2. Specific growth rate ($\mu \cdot h^{-1}$) of *Lactobacillus vini* growth in increasing concentrations of lactic acid (A), acetic acid (B), ethanol (C), sodium chloride (D), hydrogen peroxide (E) and hydrochloric acid (F).

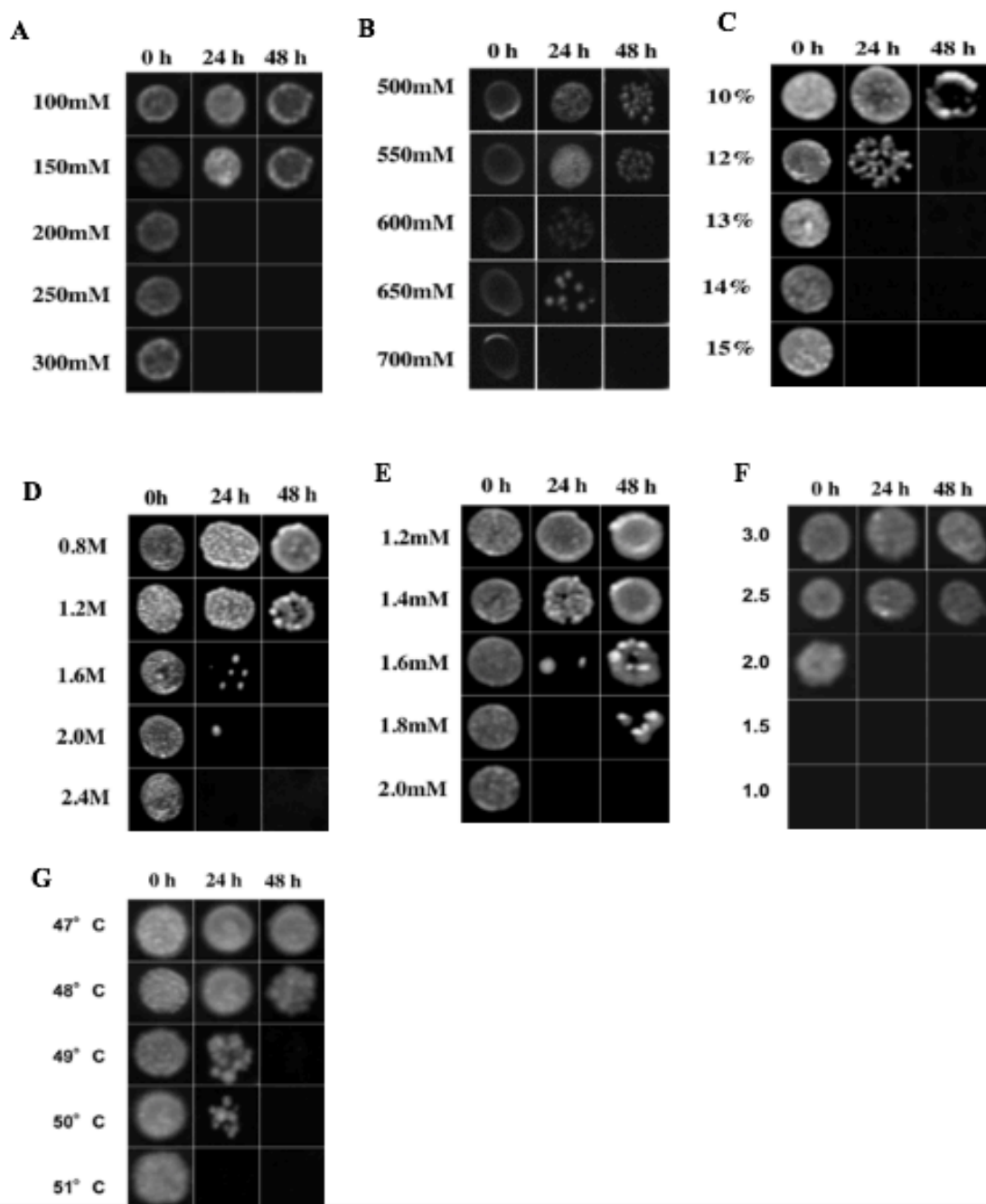


Figure 3. Survival of *Lactobacillus vini* in high concentration of lactic acid (panel A), acetic acid (panel B), ethanol (panel C), sodium chloride (panel D), hydrogen peroxide (panel E), hydrochloric acid (panel F) and in high temperature (panel G).

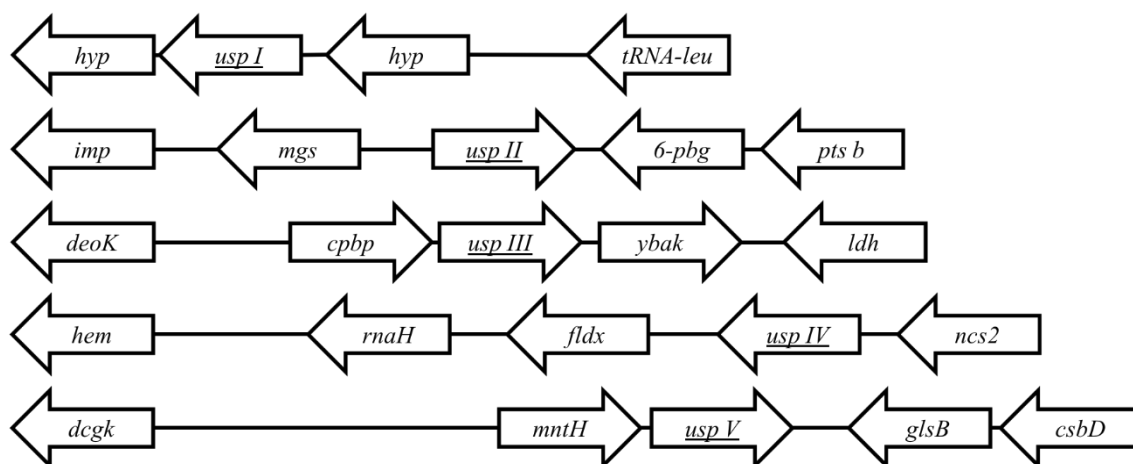


Figure 4. Physical map of genetic environment of *usp* genes in *Lactobacillus vini* genome.

The ORFs were named in accord with blastP annotation, universal stress protein (*usp*), hypothetical protein (*hyp*), tRNA of leucine condon CAG (*tRNA-leu*), Integral membrane protein (*imp*), Methylglyoxal synthase (*mgs*), 6-phospho-beta-glucosidase (*6-pbg*), PTS system, beta-glucoside-specific (*pts b*), Deoxyadenosine kinase (*deoK*), CPBP family intramembrane metallo protease (*cpbp*), ybak/Ebsc family protein (*ybak*), lactate dehydrogenase (*ldh*), hemolisin III (*hem*), RNase H (*rnaH*), Flavodoxin family protein (*fldx*), NCS2 family protein (*ncs2*), Diacyl glycerol kinase (*dcgk*), manganese transporter MntH (*mntH*), GLSB/yeaQ/ymgE family stress response membrane protein (*glsB*) and CsdD family protein (*csbD*).

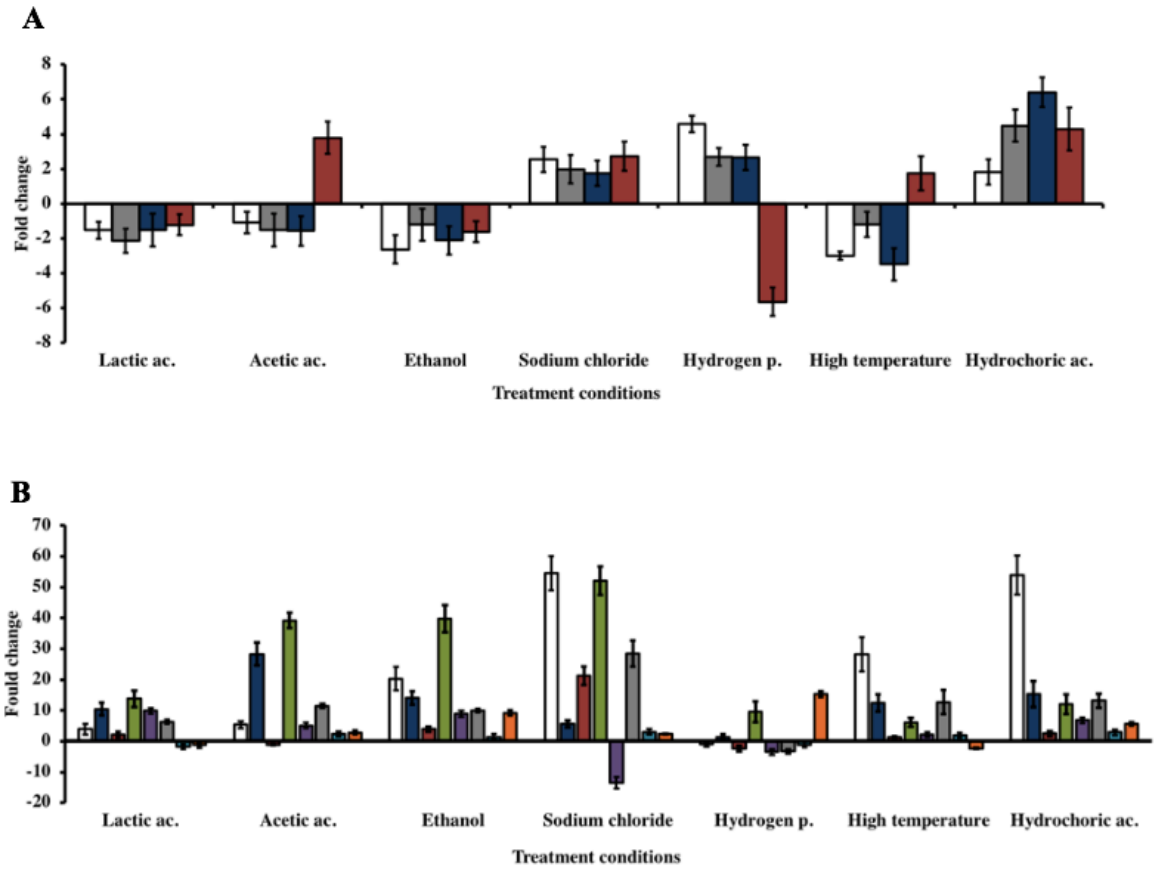


Figure 5. The change in gene expression in different stressing conditions. (Panel A) expression of the sigma factors in *Lactobacillus vini* genome, the sigma factors of sigma 70 family of protein, the housekeeping expression genes factor σ^{70} (□), the extracellular sigma factors σ^{24} (■) and σ^V (■), and factor sigma 54 family the factors σ^{54} (■). (Panel B) transcriptional regulators *pspC* (□) and *furR* (■), the *uspI* (■), *uspII* (■), *uspIII* (■), *uspIV* (■), *uspV* (■) and the chaperonin *gro ES* (■).

5. *LACTOBACILLUS VINI*: MECHANISTIC RESPONSE TO STRESS BY MEDIUM ACIDIFICATION

Artigo submetido a Microbiology (ISSN: 1350-0872).

***Lactobacillus vini*: mechanistic response to stress by medium acidification**

Allyson Andrade Mendonça¹, Paula Katharina Nogueira da Silva¹, Tiago Luiz Santana Calazans¹, Rafael Barros de Souza³, Will de Barros Pita², Carolina Elsztein¹ and Marcos Antonio de Moraes Junior¹

¹Department of Genetics, ²Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

³Institute for Biological Sciences, University of Pernambuco, Recife, Brazil.

*Correspondence to:

Marcos A Moraes Jr

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco

Av. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária 50670-901 Recife PE Brasil

E-mail: marcos.moraisjr@ufpe.br

Phone: 55-81-21267817 Fax: 55-81-21268522

Abstract

This work describes the response of *Lactobacillus vini*, a bacterium found as contaminant of winemaking and fuel-ethanol fermentation processes, to acid stress caused by inorganic or weak organic acids. It combined physiological analyses to gene expression quantification data to reveal what is behind acid tolerance in *L. vini*. First, we show for the first time that bacterial cells become resistant to lysis by lysozyme when submitted to acidic stress. Then, we show that the predicted effect of intracellular acidification can be reversed by the presence of glutamine in the medium. However, glutamine was not able to reverse the effect of resistance to lysis. This shows the independence between these mechanisms. In general, the reduction in the expression of the main genes involved in the synthesis and deposition of material in the cell wall was observed, whereas genes involved in the reabsorption of this structure showed increased expression. From these data, we present a mechanistic proposal in which *L. vini* responds to the acidification of the medium by the early entry in the stationary phase, firing in a coordinated way two signals for cell wall remodelling and for maintenance of intracellular pH by alkalization and proton extrusion process. If this picture is conserved among Lactobacilli, it may have impact in the research associated not only to fermentation processes but also to probiotic improvement.

Key words: internal pH control; glutamine; lysozyme; peptidoglycan; probiotics

Introduction

Microbial cells found in the industrial alcoholic fermentation process generally face several stressful conditions. In fact, the environment is so unwelcoming that, despite the huge biodiversity of the processes, only a few species of bacteria are able to establish and promote episodes of contamination [1–4]. To avoid contaminations, two main strategies deployed by the industries involves (i) the use of industrial antibiotics and (ii) the treatment of recycled yeast biomass by acidification of the wort to pH <3 with inorganic acids [5]. The first procedure presents a clear drawback, which is the fact that resistant strains might eventually enter the process, making this treatment ineffective and/or ecologically and clinically undesired [6, 7]. The second one is more effective, although the potential emergence of stress-resistant strains would lead to the need for the combination of two or more stressing agents [8, 9]. In the list of relevant potential contaminants, *Lactobacillus vini* was recently appeared as relevant bacteria in the fermentation processes related to fuel-ethanol production [1, 10] along with other recurrent siblings contaminants, such as *L. fermentum* and *L. plantarum* [3, 11, 12]. Despite the considerable amount of information on the last two species, no information is available to date regarding the biological characteristics of *L. vini* that can explain its adaptation to those processes. The recognition of *L. vini* as a new Lactobacilli species was first reported by Rodas et al [13] from fermented grape must, although the isolation of its representative MONT4 strain had been done long time ago [14]. This bacterium was originally isolated by its high-temperature resistance phenotype as part of multi-tolerant phenotype. This feature makes it a potential spoiling agent in fermentation processes for the production of foods, beverages and fuel-ethanol.

However, no systematic studies were performed so far to uncover the cellular and molecular mechanisms behind this tolerance. In this sense, the present work intends to start the studies of the mechanisms of stress tolerance in this bacterium in the continuation of the definition of its genomic composition [15].

The lactobacilli cell wall can be considered the first barrier of the cells against the stressful environmental conditions. It is composed by a glycanpolymer chain of N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid linked to each other by β 1-4 bounds [16]. The glycan strands are cross-linked by short stem peptides attached to each N-acetylmuramic acid molecule [17, 18]. The amino acid composition of the stem peptides may change amongst species [16, 17], but the last two D-Ala-D-Ala dipeptide is very conserved. This peptidoglycan structure is responsible for maintaining cell integrity, as well as its shape [19]. Long strands of glycerolphosphate, the lipoteichoic acid (LTA), are attached to cell membrane or linked directly to cell wall [17, 20]. LTA might often undergo insertions of D-alanine in its chain, which are performed by the proteins coded by the *dlt* operon. It comprises four genes coding for enzymes involved with activation, transport and esterification of LTA with D-alanine residues [21].

The way how the components of peptidoglycan are modified when bacterial cells are challenged by stressing agents is critical for the maintenance of cell viability and its establishment in the environment [19]. In order to survive in stressful environments, the peptidoglycan might be chemically changed, which in turn, interferes in the normal cell wall metabolism, such as its sensitivity to autolysins [19, 22]. Those hydrolytic enzymes displays muramidase lysozyme-like activity required for the relaxation of peptidoglycan cross-linked network, allowing cell elongation and ultimately cell division [23]. These enzymes are found from prokaryotes to

eukaryotes and conserve their biological activity of muramidase [24]. In mammals, these enzymes are part of the immune system responsible for killing pathogens (Davis and Weiser 2011). On the other hand, the pathogens developed mechanisms that lead to resistance of cell wall to degradation by mammalian lysozymes (Bera et al. 2007; Davis and Weiser 2011).

In model organisms, such as *Bacillus subtilis*, the protective mechanism against cell wall hydrolysis by lysozyme involves activation of modifiers, which acetylates the peptidoglycan components or esterifies LTA (Guariglia-Oropeza and Helmann, 2011). These modifications are performed by (i) the enzyme encoded by the gene *oatA* as well as (ii) by enzymes encoded by genes in *dlt* operon, all of them under the regulatory control of σ^V transcription factor (Guariglia-Oropeza and Helmann 2011). In an inactivated state, σ^V is linked to the anti-sigma factor RsiV in the inner face of cell membrane. However, the presence of lysozyme activates the Regulated Intermembrane Proteolysis (RIP) system that releases σ^V from RsiV (Hastie et al. 2016). Free σ^V recruits RNA polymerase to target promoters of *oatA*, *pbpX* and *dlt* operon (Guariglia-Oropeza and Helmann 2011). Inactivation of *dlt* operon in *L. plantarum* leads to an abnormal sensitivity to autolysin (Palumbo et al. 2006). So far, there are only few descriptions regarding the mechanism of resistance to lysozyme in lactobacilli, but there is already an indication that it is an inducible mechanism triggered by stressful medium conditions (Piuri et al., 2005).

The list of adverse conditions that can damage the cell envelope in the industrial fermentation process includes a pH variation of the fermentation wort promoted by the yeast fermentative activity, or also due to the production of weak organic acids (acetic and lactic) by the bacterial contaminant population itself [25, 26]. The use of inorganic acids, such as hydrochloric or sulphuric, in order to control

the microbial contamination [5], imposes a severe acid stress that can damage the cell envelope. In addition, variation in temperature, ethanol concentration, solutes concentration (triggering osmotic stress) and the presence of oxidant molecules can also affect that cell component. Therefore, we aimed to study the major mechanisms used by *L. vini* cells to resist to and tolerate the presence of stressing agents and conditions that naturally occur in or that are imposed to the processes for the control of bacterial population.

In the present work, we challenged bacterial cells against a set of stressing agents and evaluated how they affect the cell envelope structure, using the resistance to lysozyme as an indicative of peptidoglycan network re-organisation. The results showed that an inducible mechanism of resistance to lysozyme was activated only upon acid stress (caused by weak organic or strong inorganic acids) in a way that it was independent from the mechanisms of internal pH maintenance. The genetic response evaluated by relative expression of key genes indicated that the mechanistic process behind this adaptation induced by acid stress is dependent on the reduction of peptidoglycan deposition and/or its stimulated reabsorption. The energetics of this process was also discussed. The results presented herein provide information to elucidate the mechanisms of acid resistance in LABs, which is relevant for their use as (i) probiotic, facing acid environment in gastro-intestinal tract, as (ii) dairy producer, and also (iii) for improving strategies to combat the spoilage of food and ethanol fermentation processes.

Material and methods

Strain, medium and Minimal Inhibitory Condition (MIC) determination

Lactobacillus vini JP 789 was isolated from industrial ethanol fermentation process [1]. The genome of this strain, as well as the type strain DSM 20605 were sequenced [15], and are available in Genbank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=lactobacillus+vini>). Bacterial cells were maintained in MRS broth (Merck) containing 2% agar. Cultivations (seed cultures) were performed in MRS broth for 24 h at 37 °C without shaking. For MIC assays, cells from seed cultures were used to inoculate 1 mL of MRS broth containing stressing agents at different concentrations for initial cell density of 0.005 absorbance unit at 600nm (A_{600nm}). Then, 150 μ L of each condition was transferred to wells in sterile microtiter plates. The stress agents lactic and acetic acid (weak organic acids), hydrochloric acid (inorganic acid), hydrogen peroxide (oxidative stress) and sodium chloride (osmotic stress) were added to different concentrations. Cultivations were performed for 48 h at 37 °C without shaking. For heat-shock assays, cultures were prepared as above and cultivated for 48 h in thermoshaker TS-100 (Biosan) in different temperatures.

Growth kinetic analyses were performed by preparing microtiter plates as above and cultivating cells in Sinergy HT multireader device (Biotek, Switzerland) at 37 °C and continuous shaking. Absorbance measurements were automatically recorded every 30 min for 48 h. The specific growth rate was calculated from the slope of the linear portion of the exponential growth phase. Cell viability at MIC condition was evaluated by taking 10 μ L of the cultures at 0 h, 24 h and 48 h and dropping it onto MRS agar plates. Plates were incubated for 96 h in anaerobic jar with anaerobiosis generator Anaerocult A (Merck). The acid protective effect of amino acids, as previously reported by Wu et al. [27], was also tested by supplementing MRS broth with each one of the 20 amino acids to 50 mM. Variation

in MRS pH was achieved by adjusting the initial pH to 3.5 after amino acids supplementation. Afterwards, media were filter sterilised. All experiments were performed in biological duplicate with technical triplicates each. Therefore, numbers represented the mean value of six measurements ($\pm$ SD) for each sample.

Cell lysis by lysozyme

Seed cells were diluted to 0.1 A_{600nm} in MRS containing 60 mM lactic acid, 150 mM acetic acid, 600 mM sodium chloride, 0.8 mM hydrogen peroxide or 316 μ M H^+ (medium adjusted to pH of 3.5 with HCl) and incubated for 60 min at 37 °C. For heat-shock assay, seed cells diluted in MRS broth were incubated for 60 min 42 °C. As positive control, seed cells were diluted in MRS and incubated without treatment. Afterwards, cells were collected by centrifugation and re-suspended for the same volume in the STE buffer (300 mM sucrose, 100 mM tris-HCl and 500 mM EDTA-NaOH, pH 8) containing lysozyme at 10 mg/mL. The buffered cell suspensions were transferred (150 μ L) to microtiter plates and incubated at 37 °C. Variations in absorbance were recorded every 30 min for 24 h in the Sinergy HT multireader device. As negative control, untreated cells from positive control were incubated without enzyme. Experiments in all conditions were performed in biological duplicate, with technical triplicates each. Therefore, numbers represented the mean value of six measurements ($\pm$ SD) for each sample.

ORF annotation, primer design and validation

The annotation of ORFs was performed in the automatic system RAST (<http://rast.nmpdr.org>) [28] with the available genome of the strain *L. vini* JP 789 (Lucena et al 2012). An additional step to confirm the ORF annotation was made

with the amino acid sequences of those ORFs compared with NCBI database with the tool BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). The ORFs representative of σ^V regulon (σ^V , *dltD* and *pbpX*), peptidoglycan precursor biosynthesis (*glmS*, *glmU* and *murB*) and extra-cellular peptidoglycan biosynthesis (*pbp1A*-like ORFs) and D-alanine metabolism (*al-L*, *al-R* and *al-T*) were identified and the nucleotide sequence collected for primer design. The genes *groES*, *fusA*, *rpoB*, *recA* and *pcrA* as candidates reference gene as previously described [29]. The homologous were identified in the *L. vini* genome and the nucleotide sequence was then collected to primer design.

The primers were designed with the online tool Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) with the parameters: amplicon size 70-150 pb; primer size 19-21 pb; minimum GC content of 20%-80%; primer melting temperature from 59 °C to 61 °C; maximum G or C in the last 5 bases in the 3' end; amplicon melting temperature $\geq 80^\circ\text{C}$; Moreover, the maximum acceptable length for a mononucleotide repeat was 4. The primers designed were additionally analysed with the online tool oligoanalyser (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>). The PCR reaction mix was made with 1x Sybr green master mix, 0.2 μM of primer mix and a final volume of 10 μL . The reactions were performed in technical triplicates. The primer was considered as validated when the slope of the regression curve ranged from -3.1 to -3.5 as in previous studies [30–32].

RNA isolation, cDNA synthesis and gene expression

To RNA isolation, seed cells were suspended in 10 mL MRS to 1.0 $A_{600\text{nm}}$ and treated with 60 mM lactic acid, 150 mM acetic acid or 316 μM H^+ (medium adjusted to pH of 3.5 with HCl). After 1 h of static incubation at 37 °C, cells were

collected by centrifugation and total RNA was extracted with a hot acid phenol protocol. Briefly, the cell sediment was re-suspended in 500 μ L of AE buffer (10 mM EDTA, 50 mM of sodium acetate, final pH 5.3). Then, volumes of 50 μ L of SDS 10 % and 500 μ L of equilibrated phenol (pure phenol adjusted to pH 5.3 with 50mM sodium acetate solution) were sequentially added to cells suspension. The mixture was mixed by vortex to homogenisation and incubated for 10 minutes at 65 °C, with intermittent mixing by vortex every two minutes. After this time the tubes were chilled and kept on ice. An equal volume of phenol-chloroform solution (5 equilibrated phenol: 1 chloroform) was added and the mixtures vortexed for 1 minute. Tubes were submitted to centrifugation at 20,000 g at room temperature. The aqueous upper phase was collected to new tubes, mixed with equal volume of pure chloroform, and the procedure above was repeated. At last, the upper phase was collected in new tubes and the RNA was purified with Kit illustra™ RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare) following the manufacturer's instruction. RNA integrity was evaluated directly on 1% agarose gel prepared with TAE buffer (40 mM of tris; 10 mM of EDTA; 20 mM of acetic acid) and stained with 0.5 mg/mL of ethidium bromide, and its concentration performed in Nanodrop (Thermo Fisher, USA). RNA samples were stored at -80 °C until use.

The cDNA was synthesized with ImProm-II™ Reverse Transcription System Promega II (Promega, USA), following the manufacturer's instructions. Each reaction was performed with 0.5 μ g of RNA in a final volume of 20 μ L. RT negative controls, in order to estimate contamination with genomic DNA were also prepared with the same amount of RNA diluted in water (same concentration of cDNA sample). The samples were stored at -20 °C until use. The cDNA was used for qPCR reaction in the same conditions described above for primer validation, in biological

duplicates and technical triplicate. The Cq values of each replicate from reference genes and tested genes were used for normalization and relative expression quantification according to MIQE guidelines [33].

Results and Discussion

Stress response induced resistance to lysozyme

One can reasonably assume that the establishment of *L. vini* in the industrial process might be the consequence of its tolerance to the stressful conditions observed in that environment [1, 34], such as high concentrations of ethanol, organic acids, osmotic pressure and high temperature [26]. This assumption arises mainly because this species was originally isolated from wine production as temperature-resistant bacteria [13, 14]. To test the tolerance of *L. vini* JP 789, we performed several assays with increasing concentration of several stressor agents. Figure 1A shows the MIC values determined for lactic acid, acetic acid, ethanol, medium pH, sodium chloride, hydrogen peroxide and heat-shock stress. However, none of those inhibitory conditions led to a significant loss of viability (Fig. 1A), meaning that we were dealing with bacteriostatic conditions. On the other hand, long term exposition (48h) to ethanol at MIC resulted in a decrease of the population viability (Fig. 1A). The intensity of each stress condition endured by the strain is superior or at least equal to the reported values in the bioethanol industrial environment [26]. This tolerance profile should contribute to the establishment of *L. vini* in the process as it has been reported in Brazil [35] and Sweden [34].

Additionally, we evaluated whether the stressor agents had any impact on the cell resistance to lysozyme after treatment with sub-MIC doses. The cell lysis

profile was not changed by the incubation with ethanol, NaCl, hydrogen peroxide and heat-shock stress (Fig. 1B and C). However, incubation with lactic, acetic or hydrochloric acids increases the resistance of the bacterial cell wall to lysis (Fig. 1C). Acid stress is the most frequent stressing condition faced by the LAB, since it is a self-imposed condition that arises from the production of organic acids (Cotter and Hill, 2003). In bioethanol industries, other sources of acid stress can be found, such as (i) the extrusion of H^+ by the fermenter yeast during fermentative activity, which has a lesser contribution to the overall acidification, and (ii) the pre-treatment of yeast biomass for cell recycling using inorganic acid to control the contamination [36]. The acid treatment is employed before each fermentation cycle, which means that every 8 to 12 h cells have to face an acid treatment that drops medium pH close to 2.0. This treatment is repeatedly used during the months of fermentation season [26]. In spite of being the major stress condition studied for LABs, acid stress has never been reported as changing the resistance to lysozyme in any bacterial species. It seems, indeed, that the phenomenon might contribute to the increase of bacterial survival during the industrial acid treatment. In this context, it is important now to understand how do *L. vini* cells deal with the medium acidification and how do they respond to such stressful condition.

Induction of lysozyme resistance has been reported to *L. fermentum* after entry to stationary phase [37] or to *L. casei* upon exposition to osmotic stress [38]. Unlike other microorganisms, the entrance to stationary phase in Lactobacilli is influenced by the accumulation of organic acids, such as lactic acid [39, 40]. Therefore, we assumed that exposure to lactic acids would mimic the entry to stationary phase in *L. vini*. To test this possibility, we submitted 48 h-grown cultures of *L. vini*, which had already reached stationary growth phase (according to growth

kinetics of control condition in Fig. 2A), and submitted them to the lysozyme test. The results showed that bacterial cells in stationary phase were more resistant to lysozyme than fresh cultured cells (data not shown). This indicated that *L. vini* behaves similar to *L. fermentum*, by changing the envelope structure upon entry in stationary phase, which makes it inaccessible to the action of lysozyme.

Amino acid catabolism influences to lysozyme induction in acid environment

It is well-known that the drop in the medium pH leads to acidification of cell cytoplasm in *Lactobacillus* genus [41]. A wide spread mechanism to control internal pH in LAB employs reactions involving amino acids as substrates for the production of alkaline compounds or for the consumption of protons from the cytoplasm [42]. To test whether such protective effect of amino acids is also present in *L. vini*, we performed growth experiments in the presence of sub-MIC condition of inorganic acid (medium adjusted to pH 3.5 with HCl) in MRS supplementation with amino acids. Three out of 20 amino acids showed acid protective effect improving growth in the acid medium (Fig. 2A), restoring the specific growth rates near to the level of control cultures (Fig. 2B). Arginine restored cell growth, although final cell biomass achieved only 67% of the control cultures. Arginine deiminase pathway is most likely the cause of protective effect of arginine against acid stress by releasing ammonium ions, an alkaline-like molecule that helps cells to maintain its internal pH [43, 44]. We identified the genes of this pathway in the genome of *L. vini* for both strains JP789 and DSM20605 (data not shown). Thus, we might assume that arginine deiminase pathway is also present in *L. vini* and could protect cells against acid stress. Glutamine also restored growth rate to the control level, but the final biomass

was only 87% of the control condition. The catabolism of this amino acids goes through glutamine lyase reaction that also releases ammonium [43, 44]. However, the gene encoding glutamine lyase was not also found in *L. vini* genome. At last, histidine showed the most protective effect by restoring both growth rate and final biomass to the control levels. This effect has been reported for other LABs by a decarboxylation H^+ -consuming mechanism that produces histamine and CO_2 [45]. However, the gene that encode histidine decarboxylase was also not found in *L. vini* genome. So far, these are the only protective mechanisms described for glutamine and histidine, which indicates that new mechanisms should be operating in *L. vini*. Furthermore, we observed that supplementation of MRS with methionine, glycine or asparagine had a synergistic negative effect to the acid stress by reducing final biomass production (Fig. 2A) and growth rate (Fig. 2B). The mechanisms underlying this phenomenon is so far unknown and they are beyond the scope of the present work. The remaining 14 amino acids showed neither positive nor negative effect on growth and lysozyme resistance upon bacterial exposure to acid stress (data not shown).

At this point we showed that stress by acid (organic or inorganic) produced a bacteriostatic effect accompanied by increasing in cell resistance to lysozyme. Since the addition of histidine, glutamine or arginine reverted that bacteriostatic effect, we tested whether these amino acids could also restore the lysozyme-sensitivity phenotype. The results showed that none of them were able to revert the profile of cell lysis of acid-treated cells to the control level (Fig. 3), indicating that control of both cell growth and lysis resistance rely on different mechanisms.

Genetic response to acid stress regarding σ^V regulon response

The data presented above indicated that acid stress, both by weak organic or inorganic acid, might have important implications for growth and maintenance of *L. vini* in industrial conditions, leading to changes in resistance to cell lysis. In addition to the physiological aspects reported above, we analysed the genes that could be involved with acid stress response. Several genes were recovered from *L. vini* genome by RAST annotation as being responsible for the structure and maintenance of the cell envelope integrity, the first barrier against unfavourable environmental conditions.

The first set of genes included those of the σ^V regulon, which includes σ^V gene itself. This gene encodes an extracellular σ transcription factor that interacts with RNA polymerase to transcribe genes required for resistance to lysozyme [46, 47]. Since pre-treatment with HCl, lactic acid and acetic acid leads to lysozyme resistance (Fig. 1C), it was expected a direct co-relation with σ^V gene expression levels. However, it was observed a three-fold up-regulation of this gene only upon exposure to HCl, while we observed down-regulation by exposure to organic acids (Fig. 4A). In addition, we evaluated the expression of σ^V -controlled *pbpX* gene that encodes for a penicillin-binding protein with D,D-carboxypeptidase activity, involved in recycling of the alanine by cleaving the D-alanyl-D-alanine in steam peptides [16, 19]. The results showed no significant change in its transcriptional level after treatment with any of the three acids (Fig. 4A). Other σ^V factor-regulated genes tested are those located in the operon *dlt* (*dltA-dltD*) responsible for the incorporation of D-alanine residues into the lipoteichoic acids (LTAs) of cell envelope [20]. This operon is responsible for the resistance to cationic antimicrobial [21], such as vancomycin. By using *dltD* gene as representative of *dlt* operon, the

results showed down-regulation upon treatments with HCl and acetic acid and no change when the cells were exposed to lactic acid (Fig. 4A). Therefore, we concluded that in *L. vini* the TF σ^V is not the main regulator, or actually not involved, in the genetic regulation of lysozyme resistance in response to acid stress (Fig. 1C).

The physiological role of the *dlt* operon is still poorly understood. Although the function of its corresponding enzymes and the chemical modification in the cell wall are rather well known, their biological consequences are not completely understood. The main information of the biological implication of this operon is derived from mutant strains that are more susceptible to autolysis [19, 48], acid stress [42], antimicrobial agents, such as vancomycin [49] and cationic antimicrobials [21]. In part, the mutant phenotype is due to the modification of the cell wall overall charge, which becomes more negative than wild-type and more susceptible to positively charged compound like cationic antimicrobial or protons in the medium generated by the presence of acid compounds.

Genetic regulation of peptidoglycan metabolism

Following the transcriptional level of genes involved in D-alanine incorporation in LTA, we evaluated to expression of genes involved in D-alanine biosynthesis: *al-L*, *al-R* and *al-T*. The *al-T* is involved with the endogenous production of L-alanine from pyruvate, in a transamination reaction using glutamate as amino donor. The *al-R* encodes a racemase that can reversely interconvert L-alanine to D-alanine. *al-L* gene encodes a D-alanyl-D-alanine synthetase used in the steam peptide synthesis. Analyses of the transcriptional level showed that *al-L* gene was only marginally up-regulated while the other two genes remained unchanged

or showed down-regulation in response to stress condition (Fig. 4B). Together, altogether these results pointed out that *L. vini* cells respond to acidic environment by decreasing the transcription level of genes involved in D-alanine biosynthesis (*al* genes) and its incorporation to cell envelope (*dlt* genes), which may result in modification of the cell envelope that leads to increased resistance to lysozyme.

To complement this genetic analysis, we examined the transcription levels of genes involved in peptidoglycan precursor biosynthesis (*glmS*, *glmU* and *murB*) and extra-cellular peptidoglycan biosynthesis (*pbp1A*-like ORFs), as well as the gene involved in peptidoglycan re-absorption (*nagA*), in response to acidic stress. Overall, all these genes were down-regulated in acid-treated cells related to untreated cells (Fig. 4C), indicating reduction in peptidoglycan biosynthesis as part of the cellular response to acidic stress. In Gram-positive bacteria the main regulation point of peptidoglycan precursor biosynthesis pathway is the expression of *glmS* gene [50]. This gene codes for glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase, the first enzyme in the pathway (Fig. 5), and its regulation has a direct impact in overall production of peptidoglycan precursor. In lactobacilli, it is observed the down-regulation of *glmS* in response to cytoplasm acidifying agents, such as bile salt in *L. casei* [51]. Under this kind of stress, there is an increasing demand for ATP by the F_0F_1 extrusion pumps to keep the internal pH. So, down-regulation of *glmS* gene decreases the level of glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase activity and reduces the flux of carbon to peptidoglycan biosynthetic pathway. As consequence, all fructose-6P is driven towards glycolysis for higher production of ATP [51]. Our results showed that expression of *glmS* was reduced by nine, four and two times in *L. vini* cells after exposure to HCl, lactic and acetic acids, respectively (Fig. 4C). This indicates that biosynthesis of peptidoglycan is reduced

in response to acidic stress. The side-effect of this mechanism should be the preservation of the glutamine pool, which has a protective effect against acidic stress (as showed in Fig. 2), likely dependent on glutamine lyase activity that releases ammonium to keep internal pH.

The protein encoded by *glmU* gene is a bifunctional enzyme responsible for the biosynthesis of UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), one of the precursor of peptidoglycan structure. Two sequential reactions are catalysed: 1) its C-terminal domain transfers the acetyl group from acetyl coenzyme A to glucosamine-1-phosphate to produce N-acetylglucosamine-1-phosphate (GlcNAc-1-P); 2) afterwards, its N-terminal domain catalysis a reaction that substitutes the phosphate group by uridine 5-monophosphate to ultimately produce UDP-GlcNAc. Our results showed that *glmU* gene was down-regulated (two-fold) after treatment of cells with any of the three acids tested (Fig. 4C). Moreover, we measured the expression of *murB* gene, whose protein display UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase activity that produces UDP-N-acetylmuramic acid as an important constituent of the bacterial cell wall [52]. This gene was also down-regulated (two-fold) in HCl and remained unchanged upon weak organic acid treatment (Fig. 4C). Altogether, we can conclude that exposing *L. vini* cells to acidic stress by inorganic acid impacts the regulation of key genes involved with the bacterial cell wall biosynthesis, which might lead to a reduction in the biosynthesis of this major cell component.

We also analysed the orthologous of genes coding for PBP 1A protein. This is a bifunctional protein composed by one catalytic domain involved in transglycosylation reaction and one domain necessary for transpeptidation reaction, both domains required for the biosynthesis of extracellular peptidoglycan [18]. The

search in the genome of both strains of *L. vini* revealed the presence of two ORFs (*pbp 1A α* and *pbp 1A β*) annotated as PBP 1A protein (Fig. 5). These two theoretical proteins presented half of the size of PBP 1A from the model organism *Escherichia coli*. Each one of these *L. vini* ORFs seemed responsible for encoding a peptide with one of the active domains of *E. coli* PBP 1A: *pbp1A α* aligned to C-terminal domain responsible for transpeptidase activity of PBP 1A, while *pbp 1A β* aligned to N-terminal domain responsible for transglycosylase activity of PBP 1A. It indicated that each protein is monofunctional in *L. vini* that might act co-ordinately for the biosynthesis of peptidoglycan in *L. vini* as the single bifunctional protein do in other bacteria. Our results showed that both genes were down-regulated after cell exposure to any of the acids tested (Fig. 4C). Based on our previous results, we hypothesised that a reduction in the biosynthesis of peptidoglycan precursors, as indicated by down-regulation of its key genes reported above, might reduce the availability of substrate for PBP reactions. Consequently, transcriptional activity of both *pbp 1A α* and *pbp 1A β* genes is reduced in response to acidic stress.

The genetic analyses presented above pointed out for a reduced synthesis of peptidoglycan possibly due to the high demand for maintenance ATP required to proton extrusion. In order to meet this demand upon more intense cytoplasm acidification, the carbon trapped in cell wall could be recycled and used for energy production in the glycolytic pathway. The *nagA* is one of the genes involved in the cell wall reabsorption pathway by the production of N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase. This enzyme breaks down N-acetylglucosamine-6-phosphate (GlcNAc-6-P) to produce glucosamine 6-phosphate and acetate [23], somehow reverting the reaction catalysed by *glmU* gene product referred above, and providing intermediate molecules that could provide carbon for the glycolysis,

such as fructose-6-phosphate. In the present work we report a two-fold up-regulation of this cell wall catabolic gene *nagA* upon treatment with HCl (Fig. 4C), the condition that promoted the highest negative effect on the expression of cell wall biosynthetic genes *glmS* and *murB* (Fig. 4C). In *L. casei* [51] and *L. rhamnosus* [53] the protein NAGA was reported to be accumulated in the cytoplasm in stress conditions that resulted in cytoplasm acidification. On the other hand in *L. casei* also was observed decreasing level of GLM-S protein [51]. Therefore, stress by HCl might be triggering a response mechanism that reduces biosynthetic activity of the bacterial cell wall for saving carbon to attend the increasing energetic demand. Moreover, it might accelerate cell wall reabsorption to supply the glycolytic flux with hexose to increase energy production.

Conclusion

In *L. vini* the acid stress response is a complex biological phenomenon that acts co-ordinating two complementary, albeit independent, mechanisms. Since the control of internal pH seems the major problem bacterial cells must deal with, all efforts must be done to neutralise the excess of protons in the cytoplasm by the external presence of acids. The increased demand for glutamine, for cytosol alkalinisation, and for energy-maintenance ATP, for proton extrusion, may lead to anticipated entry in stationary cell growth phase. It reduces the deposition of components of the cell wall while signalling for its reabsorption. As consequence, cell wall structure is re-modelled to become resistant to the hydrolytic activity of lysozyme. Altogether, these physiological changes might improve the cell survival and its competitiveness in stressful environments such the industrial. This is a phenomenon scarcely described among Lactobacilli and that has never been

associated to acid stress. It makes this feature, so far, the signature of *L. vini* acid stress response.

Acknowledgements

AML thanks to PBPG-FACEPE PhD scholarship program (Brazil). This work was sponsored by the Bioethanol Research Network of the State of Pernambuco (CNPq-FACEPE/PRONEM APQ-1452-2.01/10)

Ethical approval: This article does not contain any studies with human participants or animals performed by the author.

Conflict of interest: The author declares no conflict of interest

References

1. **Lucena BTL, dos Santos BM, Moreira JL, Moreira APB, Nunes AC, et al.** Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiol* 2010;10:298.
2. **Beckner M, Ivey ML, Phister TG.** Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Lett Appl Microbiol* 2011;53:387–94.
3. **Basso TO, Gomes FS, Lopes ML, De Amorim HV, Eggleston G, et al.** Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol* 2014;105:169–177.
4. **Rich JO, Leathers TD, Bischoff KM, Anderson AM, Nunnally MS.** Biofilm formation and ethanol inhibition by bacterial contaminants of biofuel fermentation. *Bioresour Technol* 2015;196:347–354.
5. **Muthaiyan A, Limayem A, Ricke SC.** Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. *Prog Energy Combust Sci* 2011;37:351–370.
6. **Mendonça AA, De Lucena BTL, De Morais MMC, De Morais MA.** First identification of tn916-like element in industrial strains of lactobacillus vini that spread the tet-m resistance gene. *FEMS Microbiol Lett* 2015;363:1–5.

7. **Murphree CA, Heist EP, Moe LA.** Antibiotic resistance among cultured bacterial isolates from bioethanol fermentation facilities across the United States. *Curr Microbiol* 2014;69:277–285.
8. **Rasmussen ML, Koziel JA, Jane JL, Pometto AL.** Reducing bacterial contamination in fuel ethanol fermentations by ozone treatment of uncooked corn mash. *J Agric Food Chem* 2015;63:5239–5248.
9. **Costa MAS, Cerri BC, Ceccato-Antonini SR.** Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate *Lactobacillus fermentum* from the fermentation process for fuel ethanol production. *Lett Appl Microbiol* 2018;66:77–85.
10. **Tiukova I, Eberhard T, Passoth V, Biocenter U.** Interaction of *Lactobacillus vini* with the ethanol producing yeasts *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Appl Biochem* 2014;1–19.
11. **Skinner K a, Leathers TD.** Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2004;31:401–8.
12. **Lucena BTL, Dos Santos BM, Moreira JLS, Moreira APB, Nunes AC, et al.** Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiol*;10. Epub ahead of print 2010. DOI: 10.1186/1471-2180-10-298.
13. **Rodas AM, Ferrer S, Pardo I.** Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: Taxonomic implications. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:197–207.
14. **Barres P.** Identification of thermobacteria and homofermentative, thermophilic, pentose-utilizing lactobacilli from high temperature fermenting grape must. *J Appl Bacteriol* 1978;44:125–129.
15. **de Lucena BTL, Silva GGZ, dos Santos BM, Dias GM, Amaral GRS, et al.** Genome sequences of the ethanol-tolerant *Lactobacillus vini* strains LMG 23202T and JP7.8.9. *J Bacteriol* 2012;194:3018.
16. **Scheffers D, Pinho MG.** Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies Bacterial Cell Wall Synthesis : New Insights from Localization Studies. 69. Epub ahead of print 2005. DOI: 10.1128/MMBR.69.4.585.
17. **Münch D, Sahl HG.** Structural variations of the cell wall precursor lipid II in Gram-positive bacteria - Impact on binding and efficacy of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2015;1848:3062–3071.
18. **Sauvage E, Terrak M.** Glycosyltransferases and Transpeptidases/Penicillin-Binding Proteins: Valuable Targets for New Antibacterials. *Antibiotics* 2016;5:1–27.
19. **Chapot-Chartier M-P, Kulakauskas S.** Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb Cell Factories* 2014;13 Suppl 1:S9.
20. **Weidenmaier C, Peschel A.** Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:276–87.

21. **Abi Khattar Z, Rejasse A, Destoumieux-Garzón D, Escoubas JM, Sanchis V, et al.** The dlt operon of *Bacillus cereus* is required for resistance to cationic antimicrobial peptides and for virulence in insects. *J Bacteriol* 2009;191:7063–73.
22. **Bernard E, Rolain T, Courtin P, Guillot A, Langella P, et al.** Characterization of O-acetylation of N-acetylglucosamine: A novel structural variation of bacterial peptidoglycan. *J Biol Chem* 2011;286:23950–23958.
23. **Reith J, Mayer C.** Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-Positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;92:1–11.
24. **Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S.** Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* 2008;32:259–286.
25. **Narendranath N V, Hynes SH, Thomas KC, Ingledew WM.** Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:4158–63.
26. **Basso LC, Basso TO, Rocha SN.** Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. In: *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*. 2011. pp. 85–100.
27. **Wu C, Zhang J, Du G, Chen J.** Aspartate protects *Lactobacillus casei* against acid stress. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97:4083–93.
28. **Aziz RK, Bartels D, Best A a, DeJongh M, Disz T, et al.** The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 2008;9:75.
29. **Marco ML, Kleerebezem M.** Assessment of real-time RT-PCR for quantification of *Lactobacillus plantarum* gene expression during stationary phase and nutrient starvation. *J Appl Microbiol* 2008;104:587–594.
30. **Ginzinger DG.** Gene quantification using real-time quantitative PCR. *Exp Hematol* 2002;30:503–512.
31. **Stenico V, Baffoni L, Gaggia F, Biavati B.** Validation of candidate reference genes in *Bifidobacterium adolescentis* for gene expression normalization. *Anaerobe* 2014;27:34–39.
32. **Løvdal T, Saha A.** Reference gene selection in *Carnobacterium maltaromaticum*, *Lactobacillus curvatus*, and *Listeria innocua* subjected to temperature and salt stress. *Mol Biotechnol* 2014;56:210–222.
33. **Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla a.** Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005;6:279–284.
34. **Passoth V, Blomqvist J, Schnürer J.** *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:4354–6.
35. **Lucena BTL, dos Santos BM, Moreira JL, Moreira APB, Nunes AC, et al.** Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiol* 2010;10:298.

36. **De Lucena RM, Elsztein C, Simões DA, De Morais MA.** Participation of CWI, HOG and Calcineurin pathways in the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to low pH by inorganic acid. *J Appl Microbiol*;113. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05362.x.
37. **Logardt IM, Neujahr HY.** Lysis of Modified Walls from *Lactobacillus-Fermentum*. *J Bacteriol* 1975;124:73–77.
38. **Piuri M, Sanchez-Rivas C, Ruzal SM.** Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. *J Appl Microbiol* 2005;98:84–95.
39. **Goffin P, van de Bunt B, Giovane M, Leveau JHJ, Höppener-Ogawa S, et al.** Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth. *Mol Syst Biol* 2010;6:413.
40. **Papadimitriou K, Alegría Á, Bron PA, Angelis M De, Gobbetti M, et al.** Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. 2016;80:837–890.
41. **Siegunfeldt H, Björn Rechinger K, Jakobsen M.** Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:2330–2335.
42. **Cotter PD, Hill C.** Surviving the Acid Test : Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH Surviving the Acid Test : Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 2003;67:429–453.
43. **Arena ME, Manca de Nadra MC, Muñoz R.** The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X1B: Structural and functional study of the arcABC genes. *Gene* 2002;301:61–66.
44. **Teixeira JS, Seeras A, Sanchez-Maldonado AF, Zhang C, Su MSW, et al.** Glutamine, glutamate, and arginine-based acid resistance in *Lactobacillus reuteri*. *Food Microbiol* 2014;42:172–180.
45. **Molenaar D, Bosscher JS, Ten Brink B, Driessen AJM, Konings WN.** Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *J Bacteriol* 1993;175:2864–2870.
46. **Hastie JL, Williams KB, Bohr LL, Houtman JC, Gakhar L, et al.** The Anti-sigma Factor RsiV Is a Bacterial Receptor for Lysozyme: Co-crystal Structure Determination and Demonstration That Binding of Lysozyme to RsiV Is Required for σ^V Activation. *PLoS Genet* 2016;12:1–30.
47. **Guariglia-Oropeza V, Helmann JD.** *Bacillus subtilis* V Confers Lysozyme Resistance by Activation of Two Cell Wall Modification Pathways, Peptidoglycan O-Acetylation and D-Alanylation of Teichoic Acids. *J Bacteriol* 2011;193:6223–6232.
48. **Palumbo E, Deghorain M, Cocconcelli PS, Kleerebezem M, Geyer A, et al.** D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus plantarum* results in a major

modification of lipoteichoic acid composition and cell wall perforations at the septum mediated by the Acm2 autolysin. *J Bacteriol* 2006;188:3709–15.

49. **Peschel A, Vuong C, Otto M.** The d-Alanine Residues of Staphylococcus aureus Teichoic Acids Alter the Susceptibility to Vancomycin and the Activity of Autolytic Enzymes The D -Alanine Residues of Staphylococcus aureus Teichoic Acids Alter the Susceptibility to Vancomycin and the Acti. 2000;8–11.
50. **Komatsuzawa H, Fujiwara T, Nishi H, Yamada S, Ohara M, *et al.*** The gate controlling cell wall synthesis in Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol* 2004;53:12211231.
51. **Alcántara C, Zúñiga M.** Proteomic and transcriptomic analysis of the response to bile stress of Lactobacillus casei BL23. *Microbiology* 2012;158:1206–1218.
52. **Barreteau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S, *et al.*** Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008;32:168–207.
53. **Koskenniemi K, Laakso K, Koponen J, Kankainen M, Greco D, *et al.*** Proteomics and Transcriptomics Characterization of Bile Stress Response in Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Mol Cell Proteomics* 2011;10:M110.002741.

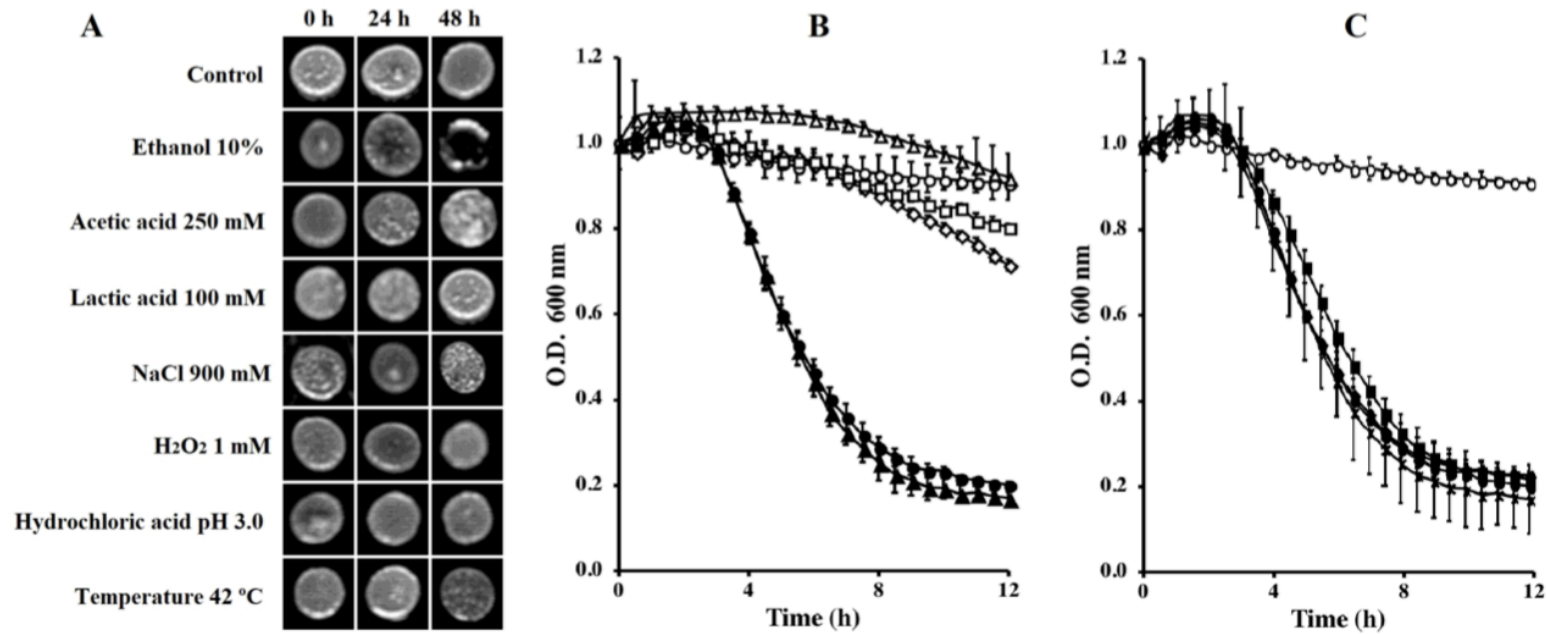


Figure 1. Phenotypic profile of *Lactobacillus vini* cultures exposed to Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of several stressing agents for 0 h, 24 h and 48 h of incubation. (Panel A) Spot-test for cell viability at the respective MIC of the tested agents. (Panels B and C) Effect of pre-treatment of *L. vini* with sub-MIC of each stressor agents on the susceptibility to lysozyme. Bacterial cells with pre-treated with 0.6 M of sodium chloride (▲), 0.8 mM of hydrogen peroxide (●) and temperature of 40 °C (■) (panel B) and with 150 mM of acetic acid (▲), 60 mM lactic acid (■), pH 3.0 with chloridric acid (○), 8.5% ethanol (◆) (panel C). Negative control of lysis in both panels (□) refers to lysozyme untreated cells, while positive control in both panels (◇) refers bacterial cells not submitted to sub-stress pre-treatment.

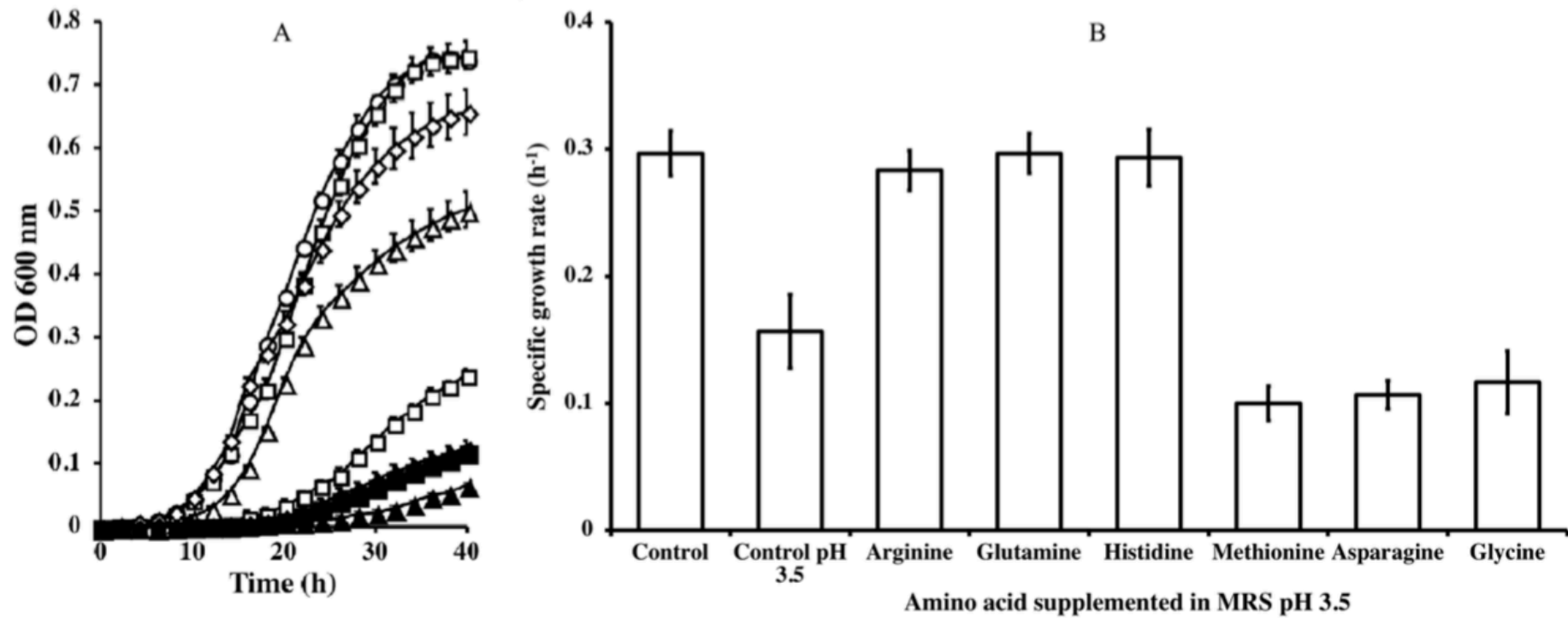


Figure 2. Growth kinetics (panel A) of *Lactobacillus vini* cells in MRS medium adjusted to pH 3.5 with hydrochloric acid and supplemented with arginine (▲), glutamine (◆), histidine (○), asparagine (●), methionine (■) or glycine (△). References were MRS medium not adjusted to acid pH (◇) or pH-adjusted MRS without amino acids supplementation (□). Specific growth rates of each set of experiments were calculated from the slope of log portion of growth curves (panel B).

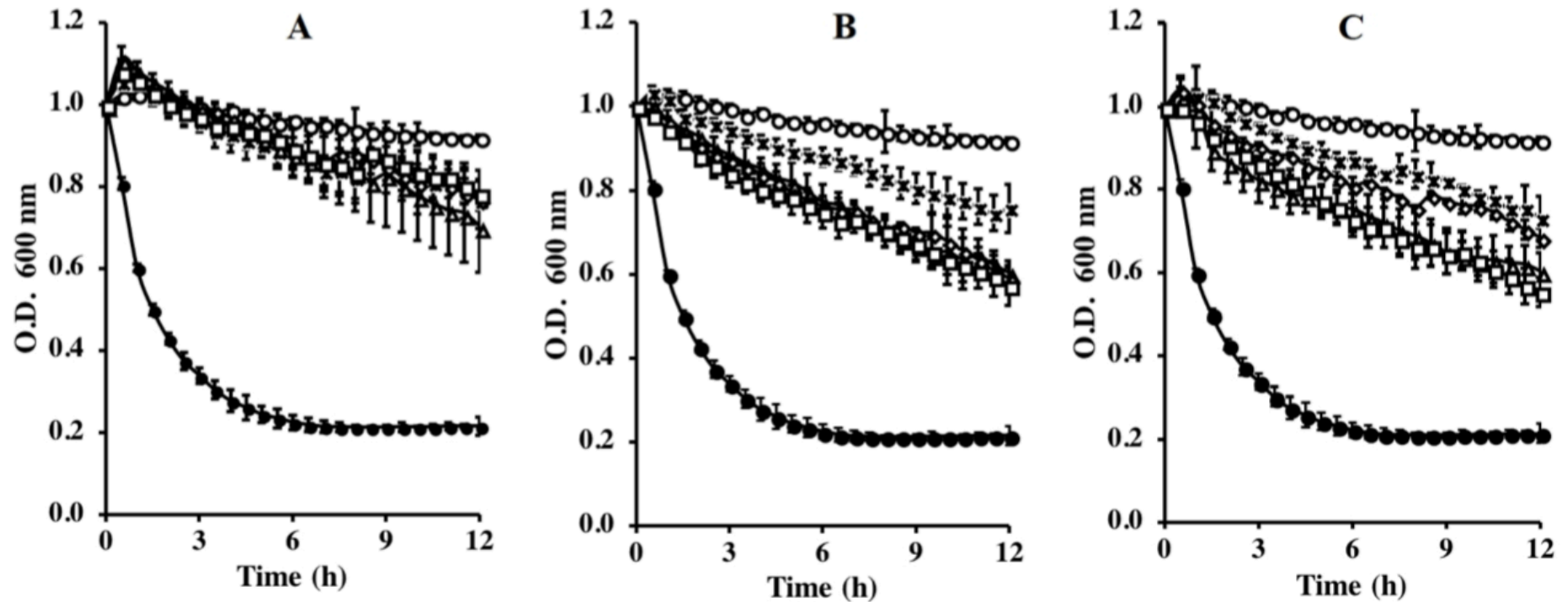


Figure 3. Effect of the acid-protective amino acids on the profile of lysozyme resistance in *Lactobacillus vini*. Bacterial cells were incubated in MRS medium adjusted to sub-MIC pH (3.5) with hydrochloric acid (Panel A), or in MRS containing sub-MIC of lactic acid (60 mM) (panel B) or acetic acid (150 mM) (panel C). Media was previously supplemented with arginine (▲), glutamine (△) or histidine (□). Controls refer to cells treated with lysozyme in the absence of amino acids (●) and cells without lysozyme treatment (◇).

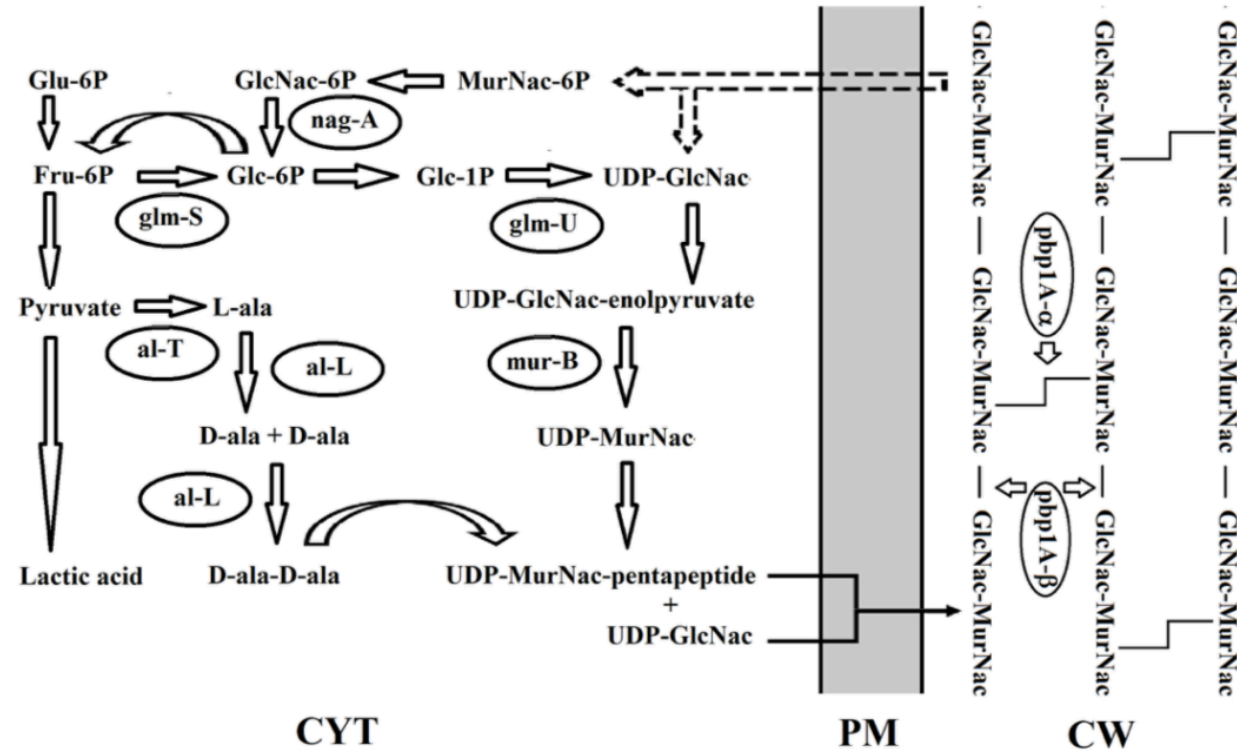


Figure 4. Pathway of peptidoglycan biosynthesis. The consecutive intermediates in the pathway are indicated by continuous arrow, while not consecutive intermediates by interrupted arrow. Enzymes are indicated by underlying abbreviation and close to their catalyzed reactions. Carbon from the glucose enters to glycolytic pathway towards lactic acid to produce energy, or alternatively can be deviated to cell wall precursor biosynthesis in the cytoplasm (CYT). The precursors of peptidoglycan are assembled in the cell wall monomer during the translocation process through plasma membrane (PM) to the cell wall (CW). A glycosidic bond (—) is made to connect the new monomer in the growing peptidoglycan strand and a peptide bond (—) crosslink close strands in a mature peptidoglycan. Glucose (Glu), Fructose-6P (Fru-6P), Pyruvate (Pyr), Lactic acid (Lac. ac), Glucosamine (Glc), N-acetyl-glucosamine (GlcNac), N-acetyl-muramate (MurNac), Alanine (Ala), Glutamine (Gln), Glutamate (Glt), 2-oxo-glutarate (2-OGL) represent the ligands. Glucosamine-synthase EC 2.6.1.16 (GLM S), bifunctional UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase EC 2.7.7.23/Glucosamine-1-phosphate N-acetyltransferase EC 2.3.1.157 (GLM U), UDP-N-acetylmuramate dehydrogenase EC 1.3.1.98 (MUR B), peptidoglycan transglycosylase PBP 1A EC 2.4.1.129 (PBP 1A-β), DD-transpeptidase EC 3.4.16.4 (PBP 1A-α), Alanine aminotransferase EC 2.6.1.21 (AL-T), Alanine racemase EC 5.1.1.1 (AL-R), Alanine ligase EC 2.6.1.21 (AL-L), N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase EC 3.5.1.25 (NAG A) are the enzymes involved.

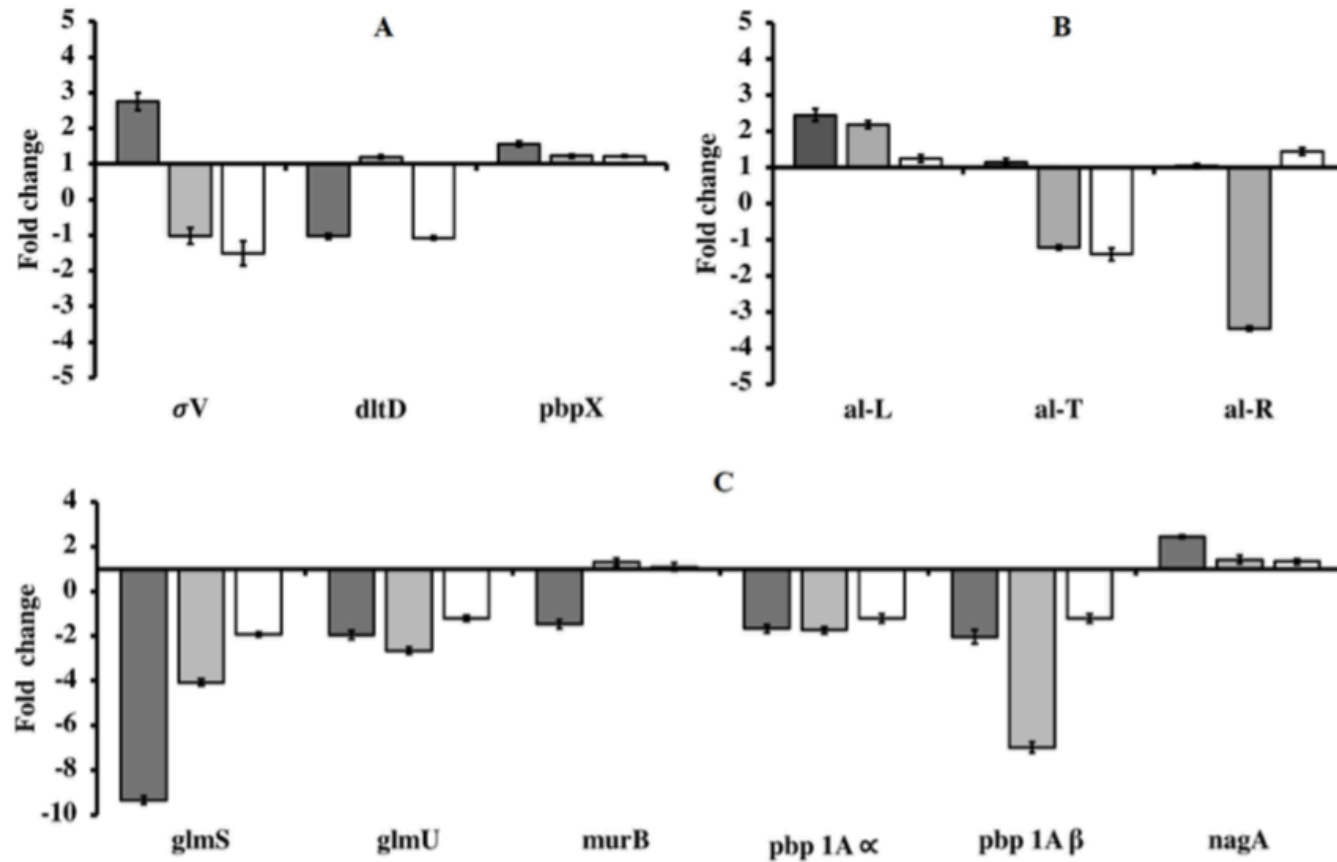


Figure 5. Transcriptional profile of cell wall related genes of *Lactobacillus vini* in response to treatment with the acidifying agents hydrochloric acid at pH 3.5 (white columns), acetic acid (light gray columns) or lactic acid (dark grey columns). (panel A) Genes of σ^V regulon. (panel B) Genes of D-alanine synthesis. (panel C) Genes of peptidoglycan biosynthesis.

6. TOLERÂNCIA A ESTRESSE NA LINHAGEM JP 789 DE *LACTOBACILLUS VINI* DEFECTIVA PARA RESPOSTA ESTRINGENTE

**Tolerância a estresse na linhagem JP 789 de *Lactococcus vini*
defectiva para resposta estrigente**

Allyson A. Mendonça, Paula K. Nogueira, Tiago S. Calazans, Carolina Elsztein,
Manuel Zuñiga, Marcos A. Morais Jr.

Departamento de genética - Universidade Federal de Pernambuco

Instituto de agroquímica y tecnologia de alimentos-IATA

Resumo

Neste trabalho é descrito pela primeira vez a padronização de um protocolo de transformação genética da bactéria *Lactobacillus vini*, um bacilo contaminante do processo industrial de fermentação alcoólica. O protocolo desenvolvido foi utilizado para construção de uma linhagem isogênica da linhagem industrial de JP 789 com a interrupção do gene *relA*. A linhagem mutante foi investigada quanto a sua tolerância a condições de estresse. Os resultados mostraram que a ausência do gene *relA* não produz efeito na viabilidade celular em estresse por ácido láctico e clorídrico. Por outro lado, a ausência deste gene reduziu a viabilidade da população submetida a estresse etanólico e acético e produziu aumento da tolerância a estresse oxidativo e osmótico. Estes dados sugerem um papel regulatório estresse-específico da resposta estrigente em *L. vini* comandado pela proteína RelA e que esta via regulatória contribui para sobrevivência deste lactobacilo na indústria que apresenta altas concentrações de etanol.

Palavras-chave: *Lactobacillus vini*; Transformação; Resposta estrigente.

Introdução

A resposta estrigente é uma via de sinalização intracelular induzida por condições adversas ao crescimento (Magnusson, Farewell and Nyström 2005). De Gram positivos a Gram negativos, condições de estresse induzem a síntese do alarmônio ppGpp(p) (Dalebroux and Swanson 2012) pela ativação da resposta estrigente (Traxler *et al.* 2008). O alarmônio é sintetizado por uma ppGpp(p) sintase produto do gene *relA* ou *spoT* (Traxler *et al.* 2008). Enquanto a proteína RelA apenas sintetiza o alarmônio, o produto do gene *spoT* é capaz tanto de sintetizar quanto de degradar o alarmônio a partir de sua atividade fosfatase (Boutte and Crosson 2013). Em *Escherichia coli*, o acúmulo de ppGpp(p) no citoplasma tem efeito pleiotrópico na regulação do metabolismo celular (Magnusson, Farewell and Nyström 2005). Este reduz a eficiência de transcrição de promotores dependentes do fator σ^{70} enquanto aumenta a eficiência de fatores σ alternativos, como no caso do fator σ^S que é central na resposta geral a estresse (Battesti, Majdalani and Gottesman 2011). Em bactérias Gram positivas, a resposta estrigente interage com outras vias de regulação celular como no caso daquela controlada pelo gene *codY* (Geiger and Wolz 2014). A proteína CodY é um repressor global que mantém reprimidos os genes envolvidos no metabolismo de fontes alternativas de carbono, competência e motilidade durante o crescimento (Sonenshein 2005). A molécula de GTP funciona como co-repressor dos genes regulados por CodY, e a redução do pool de GTP para síntese do alarmônio alivia a repressão do regulon de CodY (Ratnayake-Lecamwasam 2001). Deste modo, a indução da resposta estrigente tem efeito pleiotrópico na fisiologia celular em *B. Subtilis* (Ababneh and Herman 2015), mas não afeta a regulação de fatores sigma alternativos da resposta global a estresse (RGE), tal como o σ^B , o que é diferente do que acontece em *E. coli*

(Eymann *et al.* 2002). O comprometimento na regulação da resposta estrigente por inativação do gene *relA* em *E. coli* produz redução na viabilidade celular em condições de estresse, sugerindo a necessidade da resposta estrigente para ativação dos mecanismos adaptativos das células.

Dados da literatura mostram que a produção do alarmônio ppGpp(p) é um componente crucial para sobrevivência das células em condições de estresse (Boutte and Crosson 2013). No ambiente industrial de fermentação alcoólica os microrganismos são expostos a um conjunto de estresses singular que dificilmente os é encontrado no ambiente natural. Além da alta concentração de etanol, que pode chegar a mais de 10% (v/v), as células devem enfrentar um estresse osmótico devido a alta concentração de açúcar, eventuais picos de temperatura durante o verão e acúmulo de metabólicos tóxicos como ácido láctico e acético (Basso, Basso and Rocha 2011). A cada ciclo de fermentação, que tem duração de 8 h, as células dos microrganismos são recolhidas e tratadas com ácido sulfúrico com um pH que pode chegar até 2.5 (Muthaiyan, Limayem and Ricke 2011), impondo um intenso estresse ácido. Neste ambiente inóspito eventualmente se instala populações de microrganismos contaminantes (Beckner, Ivey and Phister 2011), de leveduras e bactérias, por conta do matéria-prima não estéril adicionada na fermentação. Dentre os gêneros bacterianos predominantes na população contaminante encontram-se vários do grupo das bactérias lácticas (LAB) (Skinner and Leathers 2004). A diversidade dessa população rapidamente é reduzida durante o período de fermentação (Lucena *et al.* 2010) possivelmente como resultado das condições estressantes da fermentação. Contudo, algumas espécies têm se estabelecido nesse processo de maneira bastante eficiente.

Lactobacillus vini teve seu primeiro isolamento no início da década de 1970 (Barres 1978; Kandler 1983), mas neste período não foi possível concluir sua classificação no nível de espécie. Inicialmente, uma linhagem denominada MONT 4 foi isolada como *Lactobacillus sp.* e teve seu status de espécie nova determinado posteriormente a partir de dados moleculares (Rodas, Ferrer and Pardo 2005), seguida de sua descrição completa (Mari *et al.* 2006). Deste então este lactobacilo tem sido identificado no ambiente de fermentação alcoólica (Passoth, Blomqvist and Schnürer 2007; Lucena *et al.* 2010; Mendonça *et al.* 2016) enquanto seu nicho ecológico se mantém desconhecido. Os dados disponíveis sugerem que ambiente industrial de fermentação não promove uma eliminação eficiente desta espécie pois sua população se mantém estável quando identificada no processo (Lucena *et al.* 2010). Trabalho anteriores mostraram que a linhagem JP 789 de *L. vini* apresenta tolerância significativa às condições de estresse abióticos desse ambiente (trabalho submetido). Contudo, não se conhece os mecanismos regulatórios envolvidos nessa tolerância, mas há indícios que apontam para o envolvimento de proteínas universais de estresse e fatores de transcrição (trabalho em submissão). A resposta estrigente tem sido conservada em vários grupos bacterianos, mas seu entendimento em lactobacilos ainda é escasso. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi identificar o impacto na tolerância a condições de estresse abióticos numa linhagem de *L. vini* defectiva para resposta estrigente controlada pelo gene *relA*.

Metodologia

Linhagem e condições de cultivo

A linhagem JP 789 foi obtida a partir de amostras industriais (Lucena *et al.* 2010) e teve seu genoma sequenciado (de Lucena *et al.* 2012). A manutenção das culturas foi realizada em meio Man Rugosa Sharp (MRS) Merck caldo ou meio sólido contendo 2% de ágar. Os cultivos foram realizados a 37°C, sem agitação em jarra de anaerobiose com gerador de anaerobiose Anaerocult A® (Mikrobiologie). Quando necessário, o antibiótico eritromicina (Sigma Aldrich ®) foi adicionado ao meio na concentração final de 5 µg/mL. A linhagem de *Escherichia coli* D11 foi utilizada na construção dos cassetes de interrupção e foi mantida em meio Luria Bertani (LB) (Difco™) caldo ou sólido contendo 2% de ágar. Quando necessário foi acrescentado ao meio ampicilina na concentração final de 50 µg/mL, IPTG a 1 mM e X-Gal a 0,1 mM. Os cultivos foram realizados em aerobiose, com agitação constante (180 RPM) e a 37°C. A linhagem de *Lactococcus lactis* NZ 9000 foi cultivada em meio M19 (Difco™) com 5g/L de glicose, caldo e meio sólido contendo 2% ágar a 30°C. Quando necessário foi adicionado ao cultivo eritromicina na concentração final de 5 µg/mL. Todas as linhagens foram mantidas em estoque congelado a 15% de glicerol com antibiótico seletivo específico.

Preparo de célula competentes e eletroporação

Os experimento foram realizados em tampão de lise composto de 50% de sacarose, tampão TE (10 mM Tris-HCl e 50 mM de EDTA-NaOH, pH final de 8.0) e lisozima (AMRESCO) na concentração final de 1 mg/mL. As culturas foram preparadas segundo descrito no item 4.2 e tratadas com todos os agentes estressores em condições sub-MIC. A D.O_{λ600} usada nos tratamentos foi de 0,5 e o volume total do ensaio foi de 1 mL.

Após o tratamento as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em 0,5 mL do tampão de lise, resultando numa D.O_{λ600} final de

1.0. Uma cultura cultivada apenas em meio MRS caldo, foi utilizada como o controle positivo da lise e uma réplica deste controle foi usada como controle negativo da lise. No tampão do controle negativo da lise não foi adicionado lisozima. As curvas de lise foram acompanhadas por 24 horas nas mesmas condições descritas no item 3.2 para as curvas de crescimento e em réplica técnica e biológica como descrito previamente.

3.4 Preparo de célula competentes e eletroporação

A capacidade de transformação de células da espécie *L. vini* foi testada a partir de diferentes protocolos de preparo de células eletrocompetentes em diferentes condições de eletroporação. Em todos os protocolos foram usadas células de um cultivo fresco de 24h que foi re-inoculada em meio MRS caldo no dia do experimento. Os cultivos foram realizados em diferentes concentrações de glicina adicionada ao meio MRS, variando de 5 g/L a 100 g/L em réplica biológica e a D.O_{λ600} inicial foi de 0,1. Em todos os protocolos testados, as células foram mantidas em cultivo até atingir a D.O pré-determinada. As células foram coletadas quando as culturas atingiram D.O_{λ600} entre 0,3 a 0,7 a 600nm.

No protocolo 1, as células foram coletadas por centrifugação a 10.000 rpm, a 4°C e ressuspensas em solução de transformação 1 (Sacarose 0,3M; fosfato de sódio 5 mM pH de 7,4; MgCl₂ 1mM) em mesmo volume inicial de cultura utilizada. Este procedimento foi repetido duas vezes. Mas na segunda vez, as células foram ressuspensas em 1/100 do volume inicial, e logo divididas em volumes de 50 µL e estocadas a -80°C até o dia de uso.

No protocolo 2, as células foram coletadas quando a cultura atingiu a D.O_{λ600} específica, incubadas diretamente em gelo por 3 minutos, centrifugadas a 10.000

rpm a 4°C, em seguida ressuspensas em solução de MgCl₂ 1 mM gelada para igual volume de cultura utilizada. Novamente, as células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em igual volume de solução de Polietilenoglicol 1500 (PEG) a 30% (m/v) gelada. Por fim, as células foram novamente centrifugadas, ressuspensas com a solução de PEG acima para 1/100 do volume inicial, distribuídas em alíquotas de 50 µL e estocadas a -80°C até o dia de uso.

O protocolo 3 foi baseado em descrições da literatura de indução de eletrocompetência em *L. salivarius* (Mason, Collins and Thompson 2005) representante do grupo filogenético de *L. vini* (Zheng *et al.* 2015). Neste, as células de um cultura de 24 h foram coletadas e re-inoculadas em meio MRS contendo diferentes concentrações de glicina, como descrito acima, e sacarose variando de 0,3 a 1,0 M. As células foram mantidas em cultivo por 90 minutos, coletadas por centrifugação a 10.000 rpm a 4°C, ressuspensas em água deionizada gelada estéril. Esse passo de lavagem foi repetido mais uma vez. Em seguida as células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 1 mL de solução estéril de EDTA a 50 mM e incubadas no gelo por 5 minutos. Novamente as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em água deionizada, coletadas por centrifugação e ressuspensas em solução de sacarose 0,3 M. Este passo repetido mais uma vez. Por fim as células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas com 100 µL (para cada 12 mL de cultura inicialmente utilizada) de solução de sacarose 0,3 M e estocadas a -80°C até o dia de uso.

Para aumentar a eficiência de transformação foram testados dois procedimentos. O primeiro foi um pré-cultivo de 24h em meio MRS caldo contendo glicina nas concentrações de 2%, 4%, 6%, 8% e 10%. Após este pré-cultivo foram realizados os procedimentos descritos acima. No segundo, as células de cultura

que atingiram os valores de $D.O_{\lambda 600}$ pré-definidos foram tratadas com ampicilina a 10 µg/mL por 2 h ou lisozima a 10 mg/mL por 10 minutos como descrito na literatura (Wei *et al.* 1995). Em seguida as células foram preparadas de acordo com os protocolos de preparo das células competentes acima.

A eficiência de transformação das células preparadas nos diferentes protocolos foi testada através de experimentos de eletroporação com o vetor pNG 8048e em concentrações variando de 100 ng a 500 ng. As condições de eletroporação levaram em consideração as variáveis de resistência (de 100 Ω a 400 Ω) e corrente (de 1000 a 2000 V), mas com manutenção da capacitância em 25 µF. Depois de cada procedimento de eletroporação, as células foram incubadas por 3 h a 37°C em meio de recuperação (MRS; 2 mM CaCl₂; 20 mM MgCl₂; 0,3M sacarose). A viabilidade das células em cada protocolo foi aferida submetendo uma amostra das células preparadas em cada protocolo a eletroporação sem a adição de DNA plasmidial. Em seguida, essas células foram diluídas 1/10⁵ ou 1/10⁶ e semeadas em meio MRS sem adição de antibiótico. O experimento foi realizado em duplicata técnica e biológica.

Construção do cassete de interrupção

Os plasmídeos foram extraídos com o kit QIAGEN Plasmid Midi seguindo as orientações do fabricante. O DNA genômico foi extraído com o kit AxyPrep™ Bacterial Genomic DNA Purification Miniprep seguindo as orientações do fabricante. O cassete de inativação foi construído a partir do vetor pRV300. Este vetor não possui o gene *repA* necessário para sua replicação, forçando-o a se manter em baixo número de cópia no citoplasma, e sendo perdido durante a divisão celular. A linhagem D11 de *E. coli* possui o gene *repA* integrado ao seu genoma,

permitindo assim a replicação do vetor pRV300. Em *E. coli*, o vetor é mantido no citoplasma e o gene de resistência *ampR* é expresso por um promotor específico de *E. coli*. As bactérias lácticas transformadas com esse vetor podem ser selecionadas pela marca de resistência a eritromicina conferida pelo gene *ermB*. Como este gene não tem promotor próprio, a única forma de ser expresso nos transformantes é pela integração do vetor numa região transcricionalmente ativa do genoma da célula receptora. Deste modo, o promotor dessa região poderá dirigir a transcrição do gene *ermB* tornando o transformante resistente a eritromicina.

Fragmentos da ORF identificada no genoma da linhagem JP 789 como homólogo ao gene *relA* foi amplificado por PCR com primers específicos. Nas extremidades 5' do primer foi adicionado um sítio de restrição para a enzima *xhoI* no primer forward (TTT TAC TCG AGA GGG CGA TGT CTT GGA GTT G) e da enzima *speI* no reverse (TTT TAC TAG TTT GAT GAT CCC CAA GGG TGC). Os respectivos sítios de restrição das enzimas estão sublinhados nas sequencias dos primers. As reações de PCR foram realizadas em 1X do tampão da enzima, 0,25 mM de cada dextronucleotídeo, 1,2 µM do mix dos primer, 1U da enzima Taq polimerase da Thermoscientific. A ciclagem das reações foi composta por 5 minutos a 90°C seguido de 30 ciclos de 45 segundo a 90°C, 45 segundo a 60°C e 1 minuto a 72°C. Ao término dos ciclos as reações foram mantidas a 72°C por 7 minutos. Para confirmação da linhagem, foi desenhado um par de primer específico para o gene *dltB* da linhagem JP 789 de *L. vini*, forward (AAA ACTC GAG ACT GCC GTC ACG TCA AGA AT) e reverse (AAAACT AGT ACC AGG TTA AAC CGT GCC AA). O fragmento amplificado do gene *relA* de *L. vini*, e o vetor foram digeridos em reação de digestão dupla com as enzimas *xhoI* e *speI* nas seguintes condições de reação buffer G 1X, 20U de cada enzima, 500 ng de DNA do vetor ou do amplicon do gene

relA, por fim o volume foi completado para 25µL com água miliQ estéril. A reação para enzima *BamHI* foi realizada nas seguintes condições buffer G 1X, 10U da enzima, 500 ng de DNA plasmidial, por fim o volume foi completado para 25µL com água miliQ estéril. Todas as reações de digestão foram incubadas a 37°C por 1h e foram interrompidas por incubação a 80°C por 10 minutos. O resultado da digestão foi aferido através de separação eletroferética em gel de agarose 1% com os seguintes parâmetros ajustados 100 V, 50 mA e tempo de corrida de 45 minutos e o resultado. O DNA foi corado com Sybr-Safe SYBR™ Safe DNA Gel Stain, Invitrogen™, seguindo as orientações do fabricante. O vetor e o inserto foram submetido a reação de ligação nos seguintes parâmetro 180 ng da purificação vetor digerido, 60 ng do inserto digerido, 1x tampão da ligase e 1U da ligase do fago T4 e o volume foi completado para 20 µL com água miliQ. A reação foi mantida a 16°C por 24h. O inserto e o plasmídeo digerido foram purificados antes de serem utilizados na reação de ligação com o QIAquick PCR Purification Kit, seguindo as orientações do fabricante.

A construção foi introduzida nas células de *E. coli* D11 eletrocompetentes por eletroporação com os seguintes parâmetros ajustados: resistência de 200 Ω, voltagem de 2500 V e capacitância de 25 µF. Depois da eletroporação, as células foram mantidos por 1h em meio LB em agitação constante e posteriormente semeadas em placas de meio sólido LB contendo ampicilina, IPG e X-gal, como descrito acima. As colônias brancas foram repicadas para novo meio seletivo e após 24h de cultivo foram submetidas a PCR de colônia para identificação da presença do inserto. As células das colônias que apresentaram resultados positivos foram mantidas em estoque congelado.

Aliquotas do cassete de integração portando o inserto foram utilizadas para os experimentos de eletroporação com célula de *L. vini* JP 789 eletrocompetentes preparadas segundo o protocolo I. Foram utilizados 300 ng do vetor de integração e as células foram eletroporadas nas seguintes condições 200 Ω , 1250 V e 25 μ F. Após a eletroporação as células passaram por um período de recuperação em meio de recuperação como descrito anteriormente. Após a fase de recuperação, as células foram distribuídas em meio MRS seletivo com 5 μ g/mL de eritromicina. As placas foram mantidas em jarras de anaerobiose, cultivadas a 37°C. Para visualização das colônias, os cultivos tiveram duração de 5 dias. As colônias obtidas desse cultivo foram mantidas em meio MRS seletivo, caldo ou placa, e estocada a -80°C em mesmo meio de cultivo, acrescido de 15% de glicerol. A confirmação da espécie foi realizada através da amplificação parcial do gene *dltC* com primers específicos desenhados a partir do genoma da linhagem JP 789. Embora a expressão do fenótipo de resistência a eritromicina seja um indicativo do correto posicionamento no vetor na região interna do gene *relA* uma etapa adicional foi realizada para confirmação da integração. Uma nova PCR foi realizada com os transformantes para amplificação do gene *relA*. Devido a integração do vetor a amplificação deste gene não deveria ser possível visto o distanciamento dos sítios de anelamento dos primers por mais de 4.5 Kbs.

Testes fenotípicos nos transformantes

Os transformantes de *L. vini* para o vetor pvR 300-*relA* foram testados quanto ao nível de tolerância a agentes estressores comparados com a linhagem isogênica JP 789. As culturas foram cultivadas por 24 h nas mesmas condições descritas acima. No momento do experimento, toda as culturas foram re-inoculadas em novo meio MRS e mantidas em cultivo por 3 h. Nos cultivos dos transformantes foi

adicionado eritromicina na concentração final de 5 µg/mL. Após os pré-cultivo as células da linhagem parental JP 789 e do transformante R1 foram coletas por centrifugação e inoculadas em meio MRS contendo diferentes concentrações de ácido láctico (100, 150 e 200 mM), ácido acético (400, 450 e 500 mM), ácido clorídrico (pH de 3,0, 2,5 e 2,0), etanol (7,5, 10 e 12 %), cloreto de sódio (0,8, 1,4 e 1,6 M), peróxido de hidrogênio (1,0, 1,4 e 1,8 mM). Adicionalmente um meio MRS sem adição de agentes estressores foi realizado como controle. Os cultivos foram ajustados para DO₆₀₀ inicial de 0,1 e tiveram a duração de 48h. Uma amostra de 10µL dos cultivos foi coletado no início do experimento a 0h e no fim com 48h. As amostras foram distribuídas em meio MRS sólido. As placas foram mantidas em cultivo por 72h. O crescimento da linhagem transformante e da linhagem parental, em meio MRS foi comparado, através de curva de crescimento. Os cultivos foram realizados em placas de microtitulação onde uma alíquota de 150 µL do cultivo foi aplicada em triplicata em cada poço. O ensaio foi repetido nas mesmas condições de teste e com as mesmas linhagens em dia diferente para determinação da resposta da réplica biológica. As curvas de crescimento foram realizados em multileitor de placas Sinergy HT (Biotek, Suíça) e acompanhadas por 48 horas com pontos coletados a cada 0,5 hora. O cálculo da velocidade específica de crescimento foi feito a partir da região linear da curva logarítmica dos dados de D.O. do crescimento e cada réplica técnica foi analisada individualmente.

Resultados

Determinação do protocolo de preparo de células eletrocompetentes e parâmetros da eletroporação

Dentre os protocolos testados apenas no protocolo I foi possível produzir transformantes. Os transformantes como vetor pNG 8048e tiveram os plasmídeos extraídos e digeridos com a enzima BamHI que possui dois sítios de digestão neste vetor. O resultado da digestão do vetor, da linhagem JP 789 e de seus transformantes demonstra a presença do plasmídeo pNG 8048e nos transformantes (Fig.1).

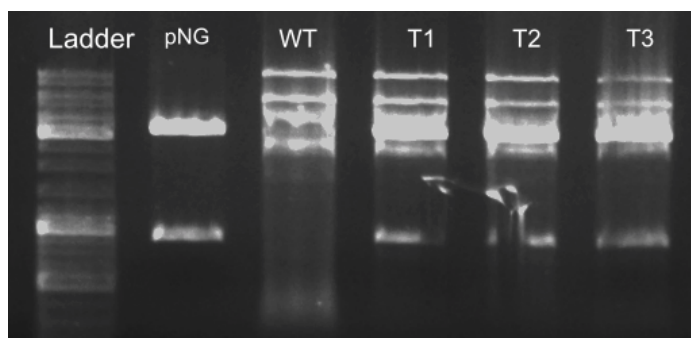


Fig.1- Extração de plasmídeo digerida com enzima de restrição BamHI. Na as colunas da esquerda para direita são, o Ladder, a digestão do plasmídeo pNG 8048e (pNG), como controle positivo da digestão e padrão esperado de digestão, dos plasmídeos nativos da linhagem JP 789 (WT), e dos transformantes obtidos (T1, T2 e T3).

Não foi observada diminuição da viabilidade da população em nenhum protocolo. A eficiência do protocolo I em produzir células eletrocompetentes foi dependente da DO em que as células foram coletadas. O melhor resultado foi obtido com DO de 0,6 e nenhum transformante foi observado quando as células foram coletadas em $DO \leq 0,4$. Concentrações de glicina $\leq 1\%$ ou $\geq 4\%$ aboliram a capacidade de transformação. Na concentração de cultivo de 2% de glicina foi obtido os melhores resultados de transformação ($5,5 \cdot 10^1$ transformantes por μg de DNA). Deste modo, os experimentos de padronização das condições de eletroporação foram realizados com células eletrocompetentes preparadas com o protocolo I, tendo as células sido coletadas na DO de 0,6 em cultivo de meio MRS com 2% de glicina. Dos procedimentos para aumentar a eficiência de

transformação apenas a adição do tratamento com 10 µg/mL de ampicilina por 2 horas resultou numa leve melhora na eficiência de transformação ($6,6 \times 10^1$ transformantes por µg de DNA). Dos parâmetros de eletroporação a maior eficiência de transformação foi observada em 1500V enquanto voltagens menores do que 1250 V e maiores do que 1750 V reduziram a eficiência de transformação em 31% e 50%, respectivamente. Na resistência de 200 Ω em todos os testes de diferentes voltagens foram obtidos os melhores resultados, enquanto com 400 Ω nenhum transformante foi observado. No teste com voltagem de 1250 V, resistência de 100 Ω a eficiência de transformação foi reduzida em 77% em comparação com o teste em 200 Ω. Com 1500 V essa diferença cai para 40%, mas com 1750 V nenhum transformante foi recuperado na condição com 100 Ω e uma eficiência de $1,5 \times 10^1$ transformantes por µg de DNA foi obtido com 200 Ω. Deste modo, a condição onde foi observado maior eficiência de eletroporação foi 1500 V, 200 Ω e 25 µF. Esses parâmetros para eletroporação foram utilizados para transformação de células eletrocompetentes de JP 789 com o vetor pvR 300 com o inserto do gene *relA*. Desta transformação foram obtidas duas colônias resistentes a eritromicina. O DNA dos transformantes foi extraído e usado em PCR para confirmação da espécie com o gene *dltB* e de presença do gene *relA* íntegro. Todos os transformantes foram positivos para o gene *dltB* e negativo para *relA*.

Caractérisitcas fenotípicas do transformane *relA*

O transformante R1 apresentou o mesmo padrão de crescimento da linhagem parental no cultivo em meio MRS sem agente estressor (Figura 2A), embora com velocidade específica de crescimento 30% menos do que a parental. O mesmo comportamento foi observado para o transformante R2 (dado não mostrado). Tanto a linhagem parental quanto os transformantes obtiveram valores de concentração

bactericida mínima (CBM) iguais para ácido láctico (200 mM), peróxido de hidrogênio (2mM) e ácido clorídrico (2.0). Contudo, o mutante R1 foi mais sensível a etanol na concentração de 10% (v/v) e a ácido acético na concentração de 450 mM (Figura 2B). Por outro lado, foi observada maior tolerância do mutante R1 em relação ao parental ao estresse osmótico na presença de NaCl a 1,6 M. Embora a CBM para peróxido de hidrogênio não tenha sido diferente entre as linhagens, o impacto deste agente na viabilidade da população em concentração sub-letal (1.4 mM) foi menor no mutante R1 do que na linhagem parental.

Discussão

A capacidade de transformação em células de bactérias lácticas é amplamente influenciada por diversos fatores, como espessura da parede, presença de plasmídeos nativos e marca de seleção (Kim *et al.* 2005). A principal barreira em gram-positivos para a transformação é a parede celular, por isso diversas técnicas tem como base o enfraquecimento da parede com glicina, antibióticos ou mesmo lisozima (Wei *et al.* 1995). A própria DO em que as células são recuperadas do cultivo é um elemento importante para reduzir o efeito negativo na transformação imposto pela parede. Células em rápido crescimento, em fase final de crescimento exponencial, possuem uma parede celular menos espessa que as células em crescimento lento. Por tanto, os protocolos tem sido padronizados com células em fase final de crescimento exponencial, mas isso pode depender de cada espécie.

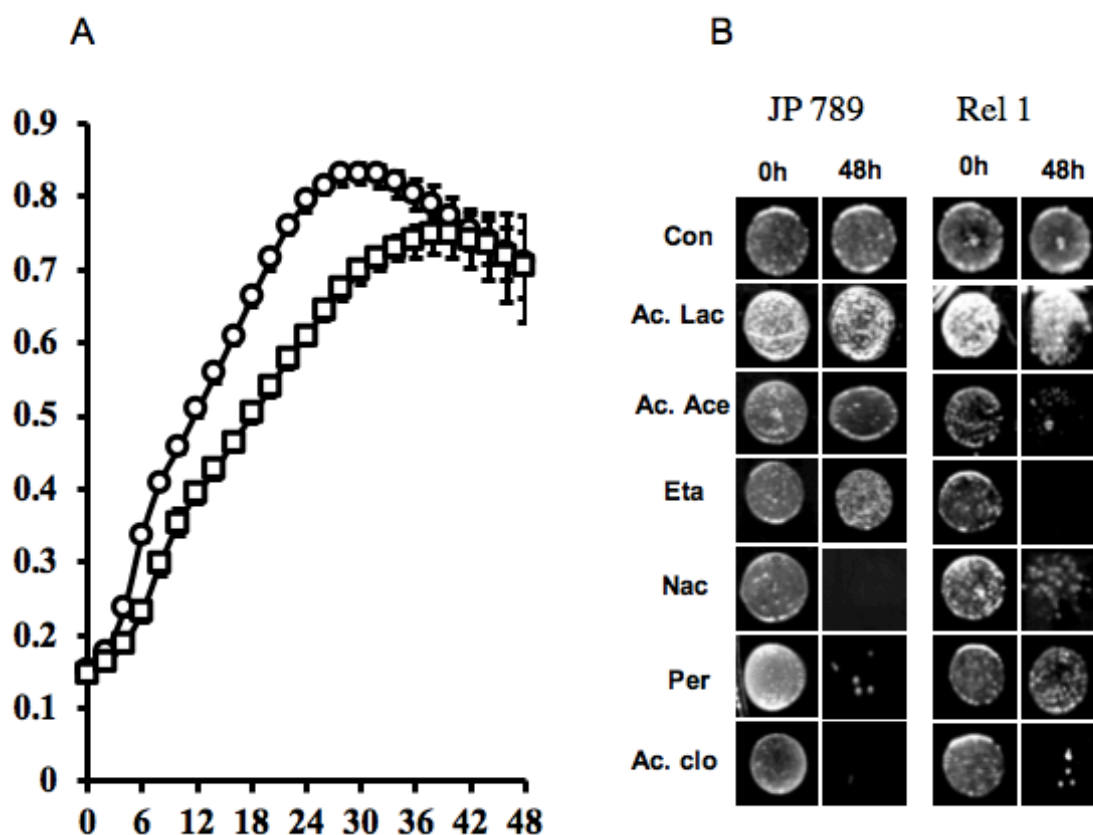


Fig.2-Características fenotípicas da linhagem de *L. vini* com resposta estrigente defectiva. A. Curva de crescimento em meio MRS da linhagem parental JP 789 (○) e da linhagem mutante R1 (◻). B. Efeito da mutação no gene *relA* na viabilidade da população em condições estressantes de ácido láctico 150 mM (Ac. Lac), ácido acético 450 mM (Ac. Ace), etanol 10% (Eta.), cloreto de sódio 1.6 M (Nac), peróxido de hidrogênio 1.8 mM (Per) e ácido clorídrico pH 2.0 (Ac. Clo).

Em *L. sake*, por exemplo, não foi observado diferença na eficiência de transformação independente da OD em que as células fossem coletadas, desde de que estivessem em fase exponencial de crescimento (Berthier *et al.* 1996). No caso de *L. vini* se observa uma relação da DO de coleta das células e a eficiência de transformação. Células em fase inicial de crescimento exponencial (DO 0,3) foram incapazes de serem transformadas. A capacidade de transformação nesta espécie começa a ser observada durante o crescimento exponencial (DO=0,4) e atinge o seu máximo no meio da fase de crescimento linear (DO=0,6). Contudo, o protocolo

de transformação no qual se observou o melhor resultado teve uma eficiência de transformação inferior a observada em outras espécies, como *L. salivarius* (Mason, Collins and Thompson 2005), *L. acidophilus* (Kim *et al.* 2005) ou *L. Sake* (Berthier *et al.* 1996) e *L. plantarum* (Teresa Alegre, Carmen Rodríguez and Mesas 2004) cuja a eficiência de transformação é na ordem de 10^2 , 10^4 e 10^5 transformantes por μg de DNA, respectivamente. Interessantemente, se observa baixa eficiência de transformação em *L. salivarius* representante do grupo filogenético de *L. vini* (Mari *et al.* 2006). Embora a capacidade de transformação de *L. vini* tenha sido baixa nos protocolos testados, foi possível obter transformantes, mostrando pela primeira vez a possibilidade de inserir DNA exógeno nessa espécie. Isso permite a utilização de *L. vini* em diversas técnicas de biologia molecular como inativação genética (Alcántara, Revilla-Guarinos and Zúñiga 2011), síntese de proteína heteróloga (Rodríguez 2003), identificação de localização celular de proteínas (March, Rao and Bentley 2003), interações proteicas (Di Lallo 2003), entre outras. Com base nessa ferramenta será possível aprofundar o entendimento dos processos biológicos nessa espécie, inclusive os envolvidos na sua adaptação ao ambiente industrial.

O primeiro processo biológico para o qual foi aplicado a metodologia de transformação desenvolvida neste trabalho foi no estudo do papel da resposta estrigente na biologia de *L. vini*. Em bactérias lácticas a resposta estrigente é pouco compreendida, mas em algumas espécies foi demonstrado que participa do fenômeno de adaptação ao estresse ácido (Broadbent *et al.* 2010). Em *L. vini*, a ausência do gene *relA* não teve efeito na viabilidade da população quando a população foi submetida ao estresse ácido, com a linhagem mutante e parental apresentaram a mesma CBM. Mesmo em organismos modelos o papel da resposta estrigente não é completamente conservada. Em *E. coli*, esta atua reforçando a

regulação de fatores sigma alternativos, tal como o fator σ^S da resposta geral a estresse (Battesti, Majdalani and Gottesman 2011). Em *B. Subtilis*, a resposta estrigente parece ter menor contribuição na adaptação da célula a condições de estresse abiótico, mas parece estar envolvida no estado de privação nutricional (Hecker, Pané-Farré and Uwe 2007). A linhagem mutante R1 apresentou taxa específica de crescimento reduzida em relação a linhagem parental, indicando que a produção eficiente do alarmônio ppGpp(p), mesmo na ausência de estresse ou limitação nutricional, é necessária para o programa celular de crescimento. Adicionalmente, observou-se que a linhagem parental cessa o seu crescimento com biomassa maior do que a linhagem R1 no início da fase estacionária. Estes dados sugerem que a síntese do alarmônio pode estar relacionada com a utilização dos recursos do meio, como por exemplo para produção de energia. Em *E. coli* foi demonstrado que a produção de ppGpp(p) é necessária durante a fase exponencial de crescimento e sua ausência reduz a taxa específica de crescimento (Magnusson, Farewell and Nyström 2005). Em *B. Subtilis*, a mutação do gene *relA* teve um efeito oposto do observado em *L. vini* quanto ao crescimento, atrasando a entrada na fase estacionária em relação a linhagem parental (NISHINO and WEHR 1979). Estudos têm apontado que em *B. Subtilis* a resposta estrigente está envolvida na utilização eficiente dos recursos do meio e no controle do crescimento da população em sinal de mudanças nas condições do meio (Eymann *et al.* 2002). Deste modo, a resposta estrigente neste organismo atuaria como um mecanismo de controle do crescimento, sem o qual as células tendem a se reproduzir por mais tempo. O oposto é observado no transformante R1 e os motivos implicados nesse perfil do mutante ainda não são completamente conhecidos. No entanto, pode-se postular que isto estaria relacionado ao uso pouco eficiente dos nutrientes do meio.

Adicionalmente, o mutante apresentou maior sensibilidade a ácido acético e a etanol, importantes metabólicos que se acumulam no ambiente industrial. A sensibilidade a etanol na linhagem mutante pode indicar que esta resposta esteja implicada na sobrevivência da população de *L. vini* durante a fermentação. Além disso, o mutante foi mais tolerante a estresse oxidativo e osmótico do que a linhagem parental. Este efeito positivo no perfil de tolerância parece ser uma característica única de *L. vini*, o que indica que sua resposta estrigente tenha um papel biológico diferente do descrito em outros organismos. Deste modo, conclui-se que a resposta estrigente em *L. vini* está implicada no programa celular mesmo em condições permissivas de crescimento e apresenta um padrão difuso de participação na regulação da tolerância a condições adversas ao crescimento.

Referências bibliográficas

- Ababneh QO, Herman JK. RelA Inhibits *Bacillus subtilis* Motility and Chaining. Gourse RL (ed.). *J Bacteriol* 2015;**197**:128–37.
- Alcántara C, Revilla-Guarinos A, Zúñiga M. Influence of two-component signal transduction systems of *Lactobacillus casei* BL23 on tolerance to stress conditions. *Appl Environ Microbiol* 2011;**77**:1516–9.
- Barres P. Identification of thermobacteria and homofermentative, thermophilic, pentose-utilizing lactobacilli from high temperature fermenting grape must. *J Appl Bacteriol* 1978;**44**:125–9.
- Basso LC, Basso TO, Rocha SN. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*. Vol 1530. 2011, 85–100.
- Battesti A, Majdalani N, Gottesman S. The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* 2011;**65**:189–213.
- Beckner M, Ivey ML, Phister TG. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Lett Appl Microbiol* 2011;**53**:387–94.
- Berthier F, Zagorec M, Champomier-Verges M *et al*. Efficient transformation of *Lactobacillus sake* by electroporation. *Microbiology* 1996;**142**:1273–9.

- Boutte CC, Crosson S. Bacterial lifestyle shapes stringent response activation. *Trends Microbiol* 2013;**21**:174–80.
- Broadbent JR, Larsen RL, Deibel V *et al.* Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress. *J Bacteriol* 2010;**192**:2445–58.
- Dalebroux ZD, Swanson MS. ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nat Rev Microbiol* 2012;**10**:203–12.
- Di Lallo G. Use of a two-hybrid assay to study the assembly of a complex multicomponent protein machinery: bacterial septosome differentiation. *Microbiology* 2003;**149**:3353–9.
- Eymann C, Homuth G, Scharf C *et al.* *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. *J Bacteriol* 2002;**184**:2500–20.
- Geiger T, Wolz C. Intersection of the stringent response and the CodY regulon in low GC Gram-positive bacteria. *Int J Med Microbiol* 2014;**304**:150–5.
- Hecker M, Pané-Farré J, Uwe V. SigB-Dependent General Stress Response in *Bacillus subtilis* and Related Gram-Positive Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2007;**61**:215–36.
- Kandler O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria The term "lactic acid bacteria" gradually emerged in the years around the. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1983;**49**:209–24.
- Kim YH, Han KS, Oh S *et al.* Optimization of technical conditions for the transformation of *Lactobacillus acidophilus* strains by electroporation. *J Appl Microbiol* 2005;**99**:167–74.
- Lucena BT, dos Santos BM, Moreira JL *et al.* Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiol* 2010;**10**:298–298.
- de Lucena BTL, Silva GGZ, Manoel Dos Santos B *et al.* Genome sequences of the ethanol-tolerant *Lactobacillus vini* strains LMG 23202T and JP7.8.9. *J Bacteriol* 2012;**194**:3018–3018.
- Magnusson LU, Farewell A, Nyström T. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* 2005;**13**:236–42.
- March JC, Rao G, Bentley WE. Biotechnological applications of green fluorescent protein. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003;**62**:303–15.
- Mari A, Chenoll E, Macia MC *et al.* *Lactobacillus vini* sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. 2006:513–7.
- Mason CK, Collins MA, Thompson K. Modified electroporation protocol for *Lactobacilli* isolated from the chicken crop facilitates transformation and the use of a genetic tool. *J Microbiol Methods* 2005;**60**:353–63.

- Mendonça AA, de Lucena BTL, de Morais MMC *et al.* First identification of Tn916-like element in industrial strains of *Lactobacillus vini* that spread the tet-M resistance gene. Margolles A (ed.). *FEMS Microbiol Lett* 2016;**363**:fnv240–fnv240.
- Muthaiyan A, Limayem A, Ricke SC. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. *Prog Energy Combust Sci* 2011;**37**:351–70.
- NISHINO T, WEHR T. Regulatory Nucleotides Involved in the Rel Function of *Bacillus subtilis*. *J BACTERIOL* 1979;**140**:9.
- Passoth V, Blomqvist J, Schnürer J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. *Appl Environ Microbiol* 2007;**73**:4354–6.
- Ratnayake-Lecamwasam M. *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes Dev* 2001;**15**:1093–103.
- Rodas a M, Ferrer S, Pardo I. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;**55**:197–207.
- Rodríguez J. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 2003;**80**:101–16.
- Skinner K a, Leathers TD. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2004;**31**:401–8.
- Sonenshein AL. CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2005;**8**:203–7.
- Teresa Alegre M, Carmen RodrÃ-guez M, Mesas JM. Transformation of *Lactobacillus plantarum* by electroporation with in vitro modified plasmid DNA. *FEMS Microbiol Lett* 2004;**241**:73–7.
- Traxler MF, Summers SM, Nguyen H-T *et al.* The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2008;**68**:1128–48.
- Wei MQ, Rush CM, Norman JM *et al.* An improved method for the transformation of *Lactobacillus* strains using electroporation. *J Microbiol Methods* 1995;**21**:97–109.
- Zheng J, Ruan L, Sun M *et al.* A Genomic View of *Lactobacilli* and *Pediococci* Demonstrates that Phylogeny Matches Ecology and Physiology. Björkroth J (ed.). *Appl Environ Microbiol* 2015;**81**:7233–43.

7 CONCLUSÕES

Lactobacillus vini é uma espécie que recorrentemente foge aos padrões estabelecidos para organismos modelo. Apresenta tolerância de moderada a alta aos agentes estressores do ambiente industrial, o que deve estar contribuindo para sua manutenção na fermentação. Sua resposta a diferentes formas de estresse apresenta elementos únicos como a indução da resistência lisozima e ao estresse ácido. A tolerância a alguns dos agentes estressores é dependente da eficiente ativação da resposta estrigente e atua de modo estresse específico. Este padrão de funcionalidade da resposta estrigente é incomum e uma característica única reportada em *L. vini*. Além dessa via regulatória, outros genes demonstraram estar implicados na resposta celular a estresse, como genes codificadores de proteínas universais a estresse e fatores de transcrição. Embora não se compreenda em detalhes os mecanismos regulatórios envolvidos no fenótipo de tolerância as condições de estresse, este representa o primeiro estudo da resposta celular e genética de *L. vini* a diversas formas de estresse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arena ME, Manca de Nadra MC and Muñoz R (2002) The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X1B: Structural and functional study of the arcABC genes. *Gene* 301:61–66. doi: 10.1016/S0378-1119(02)01083-1
- Arsköld E, Lohmeier-Vogel E, Cao R, Roos S, Rådström P and van Niel EWJ (2008) Phosphoketolase pathway dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 containing dual pathways for glycolysis. *J Bacteriol* 190:206–12. doi: 10.1128/JB.01227-07
- 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 LC, Basso TO and Rocha SN (2011) Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*. pp 85–100
- Battesti A, Majdalani N and Gottesman S (2011) The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* 65:189–213. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102946
- Bergkessel M and Basta D (2016) Population dynamics. *Nat Rev Microbiol* 14:543–543. doi: 10.1038/nrmicro.2016.123
- Bijlsma R and Loeschcke V (2005) Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *J Evol Biol* 18:744–749. doi: 10.1111/j.1420-9101.2005.00962.x
- Binder SC, Eckweiler D, Schulz S, Bielecka A, Nicolai T, Franke R, Häussler S and Meyer-Hermann M (2016) Functional modules of sigma factor regulons

- guarantee adaptability and evolvability. *Sci Rep* 6:22212. doi: 10.1038/srep22212
- Boor KJ (2006) Bacterial Stress Responses: What Doesn't Kill Them Can Make Them Stronger. *PLoS Biol* 4:e23. doi: 10.1371/journal.pbio.0040023
- Borer B, Tecon R and Or D (2018) Spatial organization of bacterial populations in response to oxygen and carbon counter-gradients in pore networks. *Nat Commun* 9:769. doi: 10.1038/s41467-018-03187-y
- Boutte CC and Crosson S (2013) Bacterial lifestyle shapes stringent response activation. *Trends Microbiol* 21:174–180. doi: 10.1016/j.tim.2013.01.002
- Breed RS, Murray EGD and Smith NR (1957) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed. The Williams and Wilkins Co, Baltimore
- Britton R a, Eichenberger P, Gonzalez-Pastor JE, Fawcett P, Monson R, Losick R and Grossman AD (2002) Genome-Wide Analysis of the Stationary-Phase Sigma Factor (Sigma-H) Regulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 184:4881–4890. doi: 10.1128/JB.184.17.4881-4890.2002
- Broadbent JR, Larsen RL, Deibel V and Steele JL (2010) Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress. *J Bacteriol* 192:2445–2458. doi: 10.1128/JB.01618-09
- Browning DF and Busby SJW (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* 2:57–65. doi: 10.1038/nrmicro787
- Bull M, Plummer S, Marchesi J and Mahenthiralingam E (2013) The life history of *Lactobacillus acidophilus* as a probiotic: A tale of revisionary taxonomy, misidentification and commercial success. *FEMS Microbiol Lett* 349:77–87. doi: 10.1111/1574-6968.12293

- Bury-Moné S, Nomane Y, Reymond N, Barbet R, Jacquet E, Imbeaud S, Jacq A and Bouloc P (2009) Global Analysis of Extracytoplasmic Stress Signaling in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 5:e1000651. doi: 10.1371/journal.pgen.1000651
- Canchaya C, Claesson MJ, Fitzgerald GF, van Sinderen D and O'Toole PW (2006) Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiol Read Engl* 152:3185–96. doi: 10.1099/mic.0.29140-0
- Chen L, Bromberger PD, Nieuwenhuijs G and Hatti-Kaul R (2016) Redox balance in *Lactobacillus reuteri* DSM20016: Roles of iron-dependent alcohol dehydrogenases in glucose/glycerol metabolism. *PLoS ONE* 11:1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0168107
- Claesson MJ, van Sinderen D and O'Toole PW (2008) *Lactobacillus* phylogenomics--towards a reclassification of the genus. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2945–54. doi: 10.1099/ijms.0.65848-0
- Claesson MJ, van Sinderen D and O'Toole PW (2007) The genus *Lactobacillus*--a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol Lett* 269:22–8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00596.x
- Claret L, Miquel S, Vieille N, Ryjenkov DA, Gomelsky M and Darfeuille-Michaud A (2007) The Flagellar Sigma Factor FliA Regulates Adhesion and Invasion of Crohn Disease-associated *Escherichia coli* via a Cyclic Dimeric GMP-dependent Pathway. *J Biol Chem* 282:33275–33283. doi: 10.1074/jbc.M702800200
- Cotter PD and Hill C (2003) Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:429–453. doi: 10.1128/MMBR.67.3.429-453.2003

- Della-Bianca BE, Basso TO, Stambuk BU, Basso LC and Gombert AK (2013) What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Appl Microbiol Biotechnol* 97:979–991. doi: 10.1007/s00253-012-4631-x
- Duar RM, Lin XB, Zheng J, Martino ME, Grenier T, Pérez-Muñoz ME, Leulier F, Gänzle M and Walter J (2017) Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol Rev* 41:S27–S48. doi: 10.1093/femsre/fux030
- Endo A and Salminen S (2013) Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Syst Appl Microbiol* 36:444–448. doi: 10.1016/j.syapm.2013.06.002
- Eymann C, Homuth G, Scharf C and Hecker M (2002) *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. *J Bacteriol* 184:2500–2520. doi: 10.1128/JB.184.9.2500-2520.2002
- Felis GE and Dellaglio F (2005) Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Curr Issues Intest Microbiol* 8:44–61.
- Fierer N, Schimel JP and Holden PA (2003) Influence of Drying-Rewetting Frequency on Soil Bacterial Community Structure. *Microb Ecol* 45:63–71. doi: 10.1007/s00248-002-1007-2
- Filannino P, Bai Y, Di Cagno R, Gobbetti M and Gänzle MG (2015) Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiol* 46:272–279. doi: 10.1016/j.fm.2014.08.018
- Frese SA, Benson AK, Tannock GW, Loach DM, Kim J, Zhang M, Oh PL, Heng NCK, Patil PB, Juge N et al. (2011) The evolution of host specialization in the

vertebrate gut symbiont *Lactobacillus reuteri*. PLoS Genet. doi: 10.1371/journal.pgen.1001314

Frese SA, MacKenzie DA, Peterson DA, Schmaltz R, Fangman T, Zhou Y, Zhang C, Benson AK, Cody LA, Mulholland F et al. (2013) Molecular Characterization of Host-Specific Biofilm Formation in a Vertebrate Gut Symbiont. PLoS Genet 9:e1004057. doi: 10.1371/journal.pgen.1004057

Galperin MY (2006) Structural Classification of Bacterial Response Regulators: Diversity of Output Domains and Domain Combinations. J Bacteriol 188:4169–4182. doi: 10.1128/JB.01887-05

Gänzle MG (2015) Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. Curr Opin Food Sci 2:106–117. doi: 10.1016/j.cofs.2015.03.001

Gänzle MG and Follador R (2012) Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli : a review. 3:1–15. doi: 10.3389/fmicb.2012.00340

Gänzle MG, Vermeulen N and Vogel RF (2007) Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. Food Microbiol 24:128–38. doi: 10.1016/j.fm.2006.07.006

Gao R, Mack TR and Stock AM (2007) Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. Trends Biochem Sci 32:225–234. doi: 10.1016/j.tibs.2007.03.002

Hammons S, Oh PL, Martínez I, Clark K, Schlegel VL, Sitorius E, Scheideler SE and Walter J (2010) A small variation in diet influences the *Lactobacillus* strain composition in the crop of broiler chickens. Syst Appl Microbiol 33:275–281. doi: 10.1016/j.syapm.2010.04.003

- Hastie JL, Williams KB, Bohr LL, Houtman JC, Gakhar L and Ellermeier CD (2016) The Anti-sigma Factor RsiV Is a Bacterial Receptor for Lysozyme: Co-crystal Structure Determination and Demonstration That Binding of Lysozyme to RsiV Is Required for σ^V Activation. *PLoS Genet* 12:1–30. doi: 10.1371/journal.pgen.1006287
- Hecker M, Pané-Farré J and Uwe V (2007) SigB-Dependent General Stress Response in *Bacillus subtilis* and Related Gram-Positive Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 61:215–236. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093445
- Hecker M and Völker U (2001) General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Advances in Microbial Physiology*. pp 35–91
- Herbel SR, Vahjen W, Wieler LH and Guenther S (2013) Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. *Gut Pathog* 5:27. doi: 10.1186/1757-4749-5-27
- Kandler O (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.
- Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, Tarchini R, Peters S a, Sandbrink HM, Fiers MWEJ et al. (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1990–5. doi: 10.1073/pnas.0337704100
- Krämer R (2010) Bacterial stimulus perception and signal transduction: Response to osmotic stress. *Chem Rec* 10:217–229. doi: 10.1002/tcr.201000005
- Lebeer S, Vanderleyden J and De Keersmaecker SCJ (2008) Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 72:728–64, Table of Contents. doi: 10.1128/MMBR.00017-08

- Lo W-S, Huang Y-Y and Kuo C-H (2016) Winding paths to simplicity: genome evolution in facultative insect symbionts. *FEMS Microbiol Rev* 40:855–874. doi: 10.1093/femsre/fuw028
- Lucena BT, dos Santos BM, Moreira JL, Moreira APB, Nunes AC, Azevedo V, Miyoshi A, Thompson FL and de Morais M (2010) Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiol* 10:298. doi: 10.1186/1471-2180-10-298
- Macklaim JM, Gloor GB, Anukam KC, Cribby S and Reid G (2011) At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of *Lactobacillus iners* AB-1. *Proc Natl Acad Sci* 108:4688–4695. doi: 10.1073/pnas.1000086107
- Maeno S, Tanizawa Y, Kanesaki Y, Kubota E, Kumar H, Dicks L, Salminen S, Nakagawa J, Arita M and Endo A (2016) Genomic characterization of a fructophilic bee symbiont *Lactobacillus kunkeei* reveals its niche-specific adaptation. *Syst Appl Microbiol* 39:516–526. doi: 10.1016/j.syapm.2016.09.006
- Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N et al. (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *PNAS* 103:15611–15616.
- Makarova KS and Koonin E V (2007) Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J Bacteriol* 189:1199–208. doi: 10.1128/JB.01351-06
- Marı A, Chenoll E, Macia MC, Ferrer S, Pardo I and Aznar R (2006) *Lactobacillus vini* sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. 513–517. doi: 10.1099/ijs.0.63877-0
- Martín R, Jiménez E, Olivares M, Marín ML, Fernández L, Xaus J and Rodríguez JM (2006) *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain

- isolated from infant feces and breast milk of a mother–child pair. *Int J Food Microbiol* 112:35–43. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.011
- Mendonça AA, de Lucena BTL, de Moraes MMC and de Moraes MA (2016) First identification of Tn916-like element in industrial strains of *Lactobacillus vini* that spread the tet-M resistance gene. *FEMS Microbiol Lett* 363:fnv240. doi: 10.1093/femsle/fnv240
- Mitrophanov AY and Groisman EA (2008) Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev* 22:2601–2611. doi: 10.1101/gad.1700308
- Molin G, Jeppsson B, Johansson M-L, Ahrné S, Nobaek S, Ståhl M and Bengmark S (1993) Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. *J Appl Bacteriol* 74:314–323. doi: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb03031.x
- Mooney RA, Darst SA and Landick R (2005) Sigma and RNA Polymerase: An On-Again, Off-Again Relationship? *Mol Cell* 20:335–345. doi: 10.1016/j.molcel.2005.10.015
- Moran NA (2002) Microbial Minimalism. *Cell* 108:583–586. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00665-7
- Muthaiyan A, Limayem A and Ricke SC (2011) Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. *Prog Energy Combust Sci* 37:351–370. doi: 10.1016/j.pecs.2010.06.005
- Nachin L, Nannmark U, Nyström T and Nystro T (2005) Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance , adhesion , and Motility. *J Bacteriol* 187:6265–6272. doi: 10.1128/JB.187.18.6265

- Nyström T (2004) Stationary-Phase Physiology. *Annu Rev Microbiol* 58:161–181. doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123818
- Okano K, Yoshida S, Yamada R, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H and Kondo A (2009) Improved production of homo-D-lactic acid via xylose fermentation by introduction of xylose assimilation genes and redirection of the phosphoketolase pathway to the pentose phosphate pathway in *L-lactate dehydrogenase gene-deficient lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* 75:7858–7861. doi: 10.1128/AEM.01692-09
- Paget M (2015) Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules* 5:1245–1265. doi: 10.3390/biom5031245
- Papadimitriou K, Alegría Á, Bron PA, Angelis M De, Gobbetti M, Kleerebezem M, Lemos JA, Linares DM, Ross P, Stanton C et al. (2016) Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. 80:837–890. doi: 10.1128/MMBR.00076-15.Address
- Parsons JB and Rock CO (2013) Bacterial lipids: Metabolism and membrane homeostasis. *Prog Lipid Res* 52:249–276. doi: 10.1016/j.plipres.2013.02.002
- Passoth V, Blomqvist J and Schnürer J (2007) *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. *Appl Environ Microbiol* 73:4354–6. doi: 10.1128/AEM.00437-07
- Philippot L, Andersson SGE, Battin TJ, Prosser JI, Schimel JP, Whitman WB and Hallin S (2010) The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. *Nat Rev Microbiol* 8:523–529. doi: 10.1038/nrmicro2367

- Piuri M, Sanchez-Rivas C and Ruzal SM (2005) Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. *J Appl Microbiol* 98:84–95. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02428.x
- Podgornaia AI and Laub MT (2013) Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Curr Opin Microbiol* 16:156–162. doi: 10.1016/j.mib.2013.01.004
- Reitzer L (2003) Nitrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* 57:155–176. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090820
- Rolfe MD, Rice CJ, Lucchini S, Pin C, Thompson A, Cameron ADS, Alston M, Stringer MF, Betts RP, Baranyi J et al. (2012) Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *J Bacteriol* 194:686–701. doi: 10.1128/JB.06112-11
- Ruiz N and Silhavy TJ (2005) Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. *Curr Opin Microbiol* 8:122–126. doi: 10.1016/j.mib.2005.02.013
- Salama RA and Stekel DJ (2010) Inclusion of neighboring base interdependencies substantially improves genome-wide prokaryotic transcription factor binding site prediction. *Nucleic Acids Res* 38:e135–e135. doi: 10.1093/nar/gkq274
- Salveti E, Felis GE, Dellaglio F, Castioni A, Torriani S and Lawson PA (2011) Reclassification of *Lactobacillus cateniformis* (Eggerth 1935) Moore and Holdeman 1970 and *Lactobacillus vitulinus* Sharpe et al. 1973 as *Eggerthia cateniformis* gen. nov., comb. nov. and *Kandleria vitulina* gen. nov., comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:2520–2524. doi: 10.1099/ijs.0.029231-0

- Salveti E, Torriani S and Felis GE (2012) The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics Antimicrob Proteins* 4:217–226. doi: 10.1007/s12602-012-9117-8
- Sánchez-Pascuala A, De Lorenzo V and Nikel PI (2017) Refactoring the Embden-Meyerhof-Parnas Pathway as a Whole of Portable GlucoBricks for Implantation of Glycolytic Modules in Gram-Negative Bacteria. *ACS Synth Biol* 6:793–805. doi: 10.1021/acssynbio.6b00230
- Savijoki K, Ingmer H and Varmanen P (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:394–406. doi: 10.1007/s00253-006-0427-1
- Schimel J, Balser TC and Wallenstein M (2007) MICROBIAL STRESS-RESPONSE PHYSIOLOGY AND ITS IMPLICATIONS FOR ECOSYSTEM FUNCTION. *Ecology* 88:1386–1394. doi: 10.1890/06-0219
- Shpakov a. O and Pertseva MN (2008) Signal transduction systems in prokaryotes. *J Evol Biochem Physiol* 44:129–150. doi: 10.1134/S0022093008020011
- Siegmundfeldt H, Björn Rechinger K and Jakobsen M (2000) \. *Appl Environ Microbiol* 66:2330–2335. doi: 10.1128/AEM.66.6.2330-2335.2000
- Slover CM and Danziger L (2008) *Lactobacillus*: a Review. *Clin Microbiol Newsl* 30:23–27. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2008.01.006
- Stackebrandt E and Teuber M (1988) Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70:317–324. doi: 10.1016/0300-9084(88)90204-0
- Su MS-W, Oh PL, Walter J and Gänzle MG (2012) Intestinal Origin of Sourdough *Lactobacillus reuteri* Isolates as Revealed by Phylogenetic, Genetic, and

Physiological Analysis. Appl Environ Microbiol 78:6777–6780. doi: 10.1128/AEM.01678-12

Tailliez P (2001) Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. Le Lait 81:1–11. doi: 10.1051/lait:2001101

Tanaka K, Komiyama A, Sonomoto K, Ishizaki A, Hall SJ and Stanbury PF (2002a) 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. Appl Microbiol Biotechnol 60:160–7. doi: 10.1007/s00253-002-1078-5

Tanaka K, Komiyama A, Sonomoto K, Ishizaki A, Hall SJ and Stanbury PF (2002b) Phosphoketolase pathway dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 containing dual pathways for glycolysis. Appl Microbiol Biotechnol 60:160–7. doi: 10.1007/s00253-002-1078-5

Tanizawa Y, Kobayashi H, Kaminuma E, Sakamoto M, Ohkuma M, Nakamura Y, Arita M and Tohno M (2017) Genomic characterization reconfirms the taxonomic status of *Lactobacillus parakefiri*. Biosci Microbiota Food Health 36:129–134. doi: 10.12938/bmfh.16-026

Teixeira JS, Seeras A, Sanchez-Maldonado AF, Zhang C, Su MSW and G??nzle MG (2014) Glutamine, glutamate, and arginine-based acid resistance in *Lactobacillus reuteri*. Food Microbiol 42:172–180. doi: 10.1016/j.fm.2014.03.015

Ulrich LE, Koonin E V. and Zhulin IB (2005) One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. Trends Microbiol 13:52–56. doi: 10.1016/j.tim.2004.12.006

- van de Guchte M, Serron P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD and Maguin E (2002) Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:187–216. doi: 10.1023/A:1020631532202
- Walter J (2008) Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: Implications for fundamental and biomedical research. *Appl Environ Microbiol* 74:4985–4996. doi: 10.1128/AEM.00753-08
- Walter J, Britton RA and Roos S (2011) Host-microbial symbiosis in the vertebrate gastrointestinal tract and the *Lactobacillus reuteri* paradigm. *Proc Natl Acad Sci* 108:4645–4652. doi: 10.1073/pnas.1000099107
- Wang Y, Delettre J, Corrieu G and Béal C (2011) Starvation induces physiological changes that act on the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Biotechnol Prog* 27:342–350. doi: 10.1002/btpr.566
- West AH and Stock AM (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* 26:369–376. doi: 10.1016/S0968-0004(01)01852-7
- Yuki N, Shimazaki T, Kushiro A, Watanabe K, Uchida K, Yuyama T and Morotomi M (2000) Colonization of the Stratified Squamous Epithelium of the Nonsecreting Area of Horse Stomach by Lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 66:5030–5034. doi: 10.1128/AEM.66.11.5030-5034.2000
- Zheng J, Ruan L, Sun M and Gänzle M (2015) A Genomic View of Lactobacilli and *Pediococci* Demonstrates that Phylogeny Matches Ecology and Physiology. *Appl Environ Microbiol* 81:7233–43. doi: 10.1128/AEM.02116-15

ANEXO A – INSTRUÇÕES PARA AUTORES DO PERIÓDICO MICROBIOLOGY (ISSN: 1350-0872).

Information for Authors

Contents

- [1. General information](#)
- [2. Editorial processes](#)
- [3. Ethics and research integrity](#)
- [4. How to prepare your article](#)
- [5. Pre-submission checklists](#)
- [6. How to submit a standard research article](#)
- [7. References](#)
- [8. Tables](#)
- [9. Figures](#)
- [10. Supplementary material](#)
- [11. How to submit a revised article](#)
- [12. Author forms](#)
- [13. Post-acceptance](#)

1. General information

All articles must be submitted online using the Editorial Manager manuscript submission system. Please visit the Microbiology Society's [publications list](#) to choose the journal you wish to directly submit to, and follow the 'Submit now' link to access Editorial Manager. Submissions are not accepted in hard copy or by email. When using the Editorial Manager submission system, once the author has provided a title for their submission, they can exit the system and continue submitting it at another time, without needing to 'save' it. The author will find their unfinished submission in the 'Incomplete Submissions' folder on their Main Menu.

All pre-submission or general editorial queries should be directed to each journal's Editorial Office contact at:

micro@microbiologysociety.org

jgv@microbiologysociety.org

jmm@microbiologysociety.org

jmmcr@microbiologysociety.org

mgen@microbiologysociety.org

iisem@microbiologysociety.org

The scope for each journal can be found by following the relevant link below. There you will find information about the types of articles that are considered for publication and the subject categories that are covered by that journal.

[Microbiology](#)

[Journal of General Virology](#)

[Journal of Medical Microbiology](#)

[JMM Case Reports](#)

[Microbial Genomics](#)

[International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology](#)

[Back to contents list](#)

2. Editorial processes

2.1 Editorial quality check

Upon submission, articles are checked by a member of the Editorial Office to ensure language quality, and that they are compliant with the [pre-submission checklists](#) as well as the requirements of the Society's Information for Authors. If any formatting problems are noticed by editorial staff, articles will be returned to the submitting author to amend before it can be assigned to an Editor.

2.2 Peer Review

Once an article has been assigned to an appropriate Editor, the Editor is then responsible for making the decision on the article's suitability for the journal, based on the journal scope. Editors are entitled to pre-screen reject submissions at this stage based on the nature of the study, quantity and quality of data, general conclusions, standard of presentation, language quality and if the article falls outside of the journal's scope.

Articles that pass the pre-screening stage will be sent to typically two independent reviewers. Reviewers will review the paper for originality and significance of the work described, and judge its acceptability for publication. The reviewers may also make critical comments and, where necessary, suggest improvements or additional experiments that could be done in support of the findings.

If the Editor is facing difficulty in obtaining reviewers, then he/she may also act as a reviewer or seek comments from another Editor. Authors may suggest at least three

reviewers upon submitting their paper, ensuring that an institutional email address is provided. The use of reviewers suggested by the authors is at the discretion of the Editor after checks have been made to validate the suggested reviewers' details and authenticity.

2.3 Decisions

After reviewer recommendations have been obtained, it is the Editor who makes the final decision as to the acceptability of the article, based on the reviews and their own assessment of the article.

There are three possible decision types: accept, revise (major or minor) and reject. Revise decisions imply that the article requires modifications that could be carried out within a specified time frame.

Articles are reviewed as quickly as possible, and authors should usually expect to receive a first decision within 4-6 weeks.

3. Ethics and research integrity

The Microbiology Society is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) and its editors operate within the COPE Code of Conduct for Journal Editors. The Society promotes the COPE International Standards for responsible research publication for authors and Editors. Common reasons for investigation include suspected instances of: Redundant (duplicate) publication; Plagiarism; Breach of copyright; Fabricated data; Problems with authorship; Undisclosed conflict of interest; Appropriation of ideas or data by a reviewer.

The Microbiology Society supports the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

For more information on the Society's Ethics Policies please see [6.7.4](#)

3.1 Originality and authorship

3.1.1 Originality

Research papers submitted to the Microbiology Society's journals must report work that has not been published previously and is not under consideration for publication elsewhere. For papers that have been published preliminarily online, please refer to the Society's Preprint policy.

3.1.2 Authorship

All authors must have agreed to the submission and to the order of their names on the title page, and will be asked to confirm this at submission. They must also have agreed that the corresponding author may act on their behalf throughout the editorial review and publication process. Requests for changes in authorship after submission, e.g. to order of the authors or deletion or addition of authors, must be approved by all authors in a signed agreement. Individuals who have contributed to the work but do not meet authorship criteria should be noted in the Acknowledgments section of the manuscript.

3.1.3 Plagiarism

The Society takes plagiarism very seriously and has plagiarism detection software (iThenticate) integrated into our manuscript system. If plagiarism is identified, the COPE guidelines on plagiarism will be followed.

3.2 Permissions

If a table or figure has been published before, the authors must obtain written permission to reproduce the material in both print and electronic formats from the copyright owner. The original source should be cited in the figure caption or table footnote.

4. How to prepare your article

4.1 Preparing files for submission

Articles can be submitted initially either as a single PDF file or as a separate Word file with accompanying figure files, which will be compiled into a single PDF by the submission system. However, authors are advised, where possible, to upload files individually to ensure that Editors and Reviewers can access the high-resolution figure files.

Supplementary material should be submitted as a combined PDF separate file, and this will be incorporated into the system-generated PDF.

For information on submitting a revised article, please click [here](#).

4.1.1 Submission as a single PDF

The submitted PDF should preferably not be much larger than 1 MB.

4.1.2 Submission as a separate Word and/or figure files

Most standard word-processor files (including .docx files produced in Word 2007 or 2010) will convert successfully to PDF. Times, Times New Roman, Courier, Helvetica and Arial, and the Symbol font for special characters, are the

recommended fonts. Other fonts are not guaranteed to convert successfully to PDF. Tables for the main paper must be prepared as part of the word-processor file; they must not be supplied as images or Excel files. Excel files are, however, acceptable for supplementary material. Word-processor files including inserted image files will normally be converted successfully to PDF by the system, but please note that files using OLE (Object Linking and Embedding) technology to display information or embedded files are not supported. If the conversion is not satisfactory, either convert the file to PDF yourself, and submit that, or submit the image files separately.

The file types that are supported for submission as separate figure files for conversion to PDF are PDF, GIF, TIFF, EPS, JPEG and PPT. A resolution of 300 d.p.i. at a reasonable size of reproduction is recommended; in other words, an image intended to fit in a single column of the journal should be around 1000 pixels wide and an image intended to fit across two columns should be around 2000 pixels wide. The following file types are not supported at the initial submission stage as they cannot be converted to PDF by the system: bitmap (.bmp), PICT (.pict), Excel (.xls), Photoshop (.psd), Canvas (.cnv), CorelDRAW (.cdr) and locked or encrypted PDFs. Image files will be converted to PDF and added to the end of the paper PDF produced by the system. If any of the image files are very large, it is advisable to reduce their size before submission if possible.

4.1.3 Cover letter

Journal of Medical Microbiology and International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) both require cover letters. For all other journals it is preferable but not mandatory. Please use the following as an indication as to what you should include:

What is the current knowledge of the subject?

What are the new findings being reported here?

What impact will your findings have on scientific/clinical practice or policy in the foreseeable future

Any citations of personal communications or unpublished results should be confirmed in the cover letter

For further information for the IJSEM cover letter requirements, please see the [IJSEM pre-submission checklist](#).

4.1.4 Nomenclature, style and units

For uniformity of our published research it is important for submissions to adhere to our agreed nomenclature guidelines. Details on nomenclature, style and units to use in your submitted article are available [here](#).

Articles that do not meet these set requirements may encounter problems during peer review and will need to be amended before publication.

4.2 Data depositories

For articles containing new sequence data, the sequence(s) will need to be available through a database upon publication. Authors must include on the title page, the footnote 'The GenBank/ EMBL/ DDBJ/ PIR] accession number for the XXXXXX sequence of XXXXX is XX00000. If the sequence(s) is not yet available, the database flat file (GenBank *.gbk; or, EMBL *.embl) or the NCBI Sequin file (*.sqn) should be made available for review. These files will not be published, but they are essential for reviewing the paper.

All journals welcome the deposition of supporting data.

Microbial Genomics has a mandatory open data policy. Authors are required to provide access to all supporting data, which have either led to the conclusions drawn in their paper, or to allow the procedure described in the paper to be repeated. When submitting to Microbial Genomics authors are also required to provide a Data Bibliography

Microbial Genomics has partnered with [Microreact](#), a free data visualisation and sharing platform that allows scientists and health professionals worldwide to better collaborate to understand disease outbreaks. The journal is encouraging authors to upload their data files to Microreact, which can then provide interactive querying of the data via trees, maps, timelines and tables, and published in Microbial Genomics via a permanent web link.

Microreact has been developed in the David Aanensen Research Group at Imperial College London and The Centre for Genomic Pathogen Surveillance. It is a [React.js application](#) taking full advantage of the [Phyloanvas API](#) (trees), the [Google Maps API](#) (maps) and [vis.js](#) library (timeline).

4.3 Pre-submission language editing

Prior to submitting your article, authors may wish to have it edited for correct use of English, particularly if English is not your first language. This step is not compulsory but it may assist the editorial staff, Editors and reviewers to fully understand the content of your article. However, language editing does not guarantee that your

article will be sent out for peer review or accepted for publication. For the Journal of Medical Microbiology, articles with poor use of English will be rejected and authors invited to resubmit only once the language has been improved. Authors are advised to ensure the correct use of English in their articles before submitting to the journal. A large number of language-editing services are available. While you may use any professional scientific editing service of your choice, the Microbiology Society has partnered with Editage to provide publication-focused editing services to Society authors at a 15% discount. If the editorial team finds any language issues in text that Editage has edited, then Editage will re-edit the text for free. To take advantage of this offer click [here](#). If you're an existing Editage customer, you may get the discount by using the code MICSOC10 while making a submission.

5. Pre-submission checklists

This information is intended to aid authors prior to submitting their article to the Editorial Manager submission system, in order to avoid delays upon submission and ensure that the article can be assigned to an Editor as quickly as possible.

Please find below journal pre-submission checklists:

[Microbiology](#)

[Journal of General Virology](#)

[International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology](#)

Microbial Genomics requires authors to adhere to article templates. Click [here](#) for Microbial Genomics article templates.

JMM Case Reports requires authors to adhere to article templates. Click [here](#) for JMM Case Reports article templates.

For all journals, authors must also include in their paper:

Permission for reuse of published content not published by the authors must be uploaded during initial submission. We accept emails, letters and RightsLink confirmation that must be from the copyright holder. Any citations of personal communications or unpublished results must be confirmed in a cover letter

A title page

Ensure that citations of references in the text and references list conform to journal style, e.g. standard Vancouver reference style

Use continuous line numbering throughout the paper in order to facilitate online reviewing

Via the Editorial Manager submission system, authors must:

Agree to the submission and agree that the corresponding author may act on their behalf throughout the review and publication process. Authors are asked to confirm their co-authorship once the paper has been submitted to the relevant Editorial Manager site

Recommend one Editor from the Editorial Board who would be suitable to act as Handling Editor

Suggest at least three potential reviewers (with institutional email addresses only) to peer review their article

Indicate the word count of the main text (including in-text citations and any appendices, but not including the title page, figure and table legends, acknowledgements, table bodies and footnotes, or reference list)

Upload any supplementary material associated with the article as a supplementary file(s) and refer to the supplementary material within their article. Please note for Microbial Genomics, it is preferred that supplementary material are deposited to external repositories, unless they are text-only files. Please review the journal's [open data policy](#) for further information.

Upload any figures associated with the article as figure files and refer to the figures within their article. Figure legends should be included the end of the article and not in the figure

Upload any cited articles that have been accepted for publication but are not yet published as a supplementary file(s)

Upload a cover letter (if requested by the journal)

Specify, if any, the funding received for the paper

6. How to submit a standard research article

For standard research articles, please follow the section order given below. Note that for Journal of General Virology only, Methods should follow Discussion.

For guidance on style and layout of articles submitted to Microbial Genomics, please refer to the relevant submission templates on the journal's [submission requirements page](#).

For guidance on style and layout of articles submitted to JMM Case Reports, please refer to the relevant [submission templates](#).

6.1 Title page (All articles)

6.1.1 Title

The title of the article; this should provide a concise statement of the contents of the article. A good title is very important as it will attract readers and facilitate retrieval by online searches, thereby helping to maximise citations. The title should include topical keywords and allude to the interesting conclusions of the article. A title that emphasises the main conclusions, or poses a question, has more impact than one that just describes the nature of the study.

6.1.2 Authors and affiliations

Author names should be given in upper- and lower-case, not in all capitals, to avoid ambiguities such as 'van' and 'Van'. The author for correspondence must be clearly indicated. It is permissible to include the names of more than one author as corresponding author, but a single author must act as the point of communication during the peer review process.

The name and address of the laboratory or laboratories where the work was done, and present addresses of authors who have since moved.

6.1.3 Corresponding author details

An email address and telephone number for the corresponding author.

6.1.4 Keywords

Select keywords that will make your article easily searchable.

6.1.5 Subject category

Each submitted article should be assigned a subject category through the Editorial Manager submission system, in addition to an article type. This enhances discoverability and allows filtering of published content on the website.

Subject categories are limited for scope, are journal- specific, and are particularly important for submissions to IJSEM. For a list of available categories per journal please visit the 'About' page for the relevant publication here:

[Microbiology](#)

[Journal of General Virology](#)

[Journal of Medical Microbiology](#)

[JMM Case Reports](#)

[Microbial Genomics](#)

[International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology](#)

6.1.6 Word count

The word count of the article is made up of the abstract and main text, excluding table and figure legends and references

6.1.7 Depositories (where applicable).

When reporting new sequence data, the accession number must be given, e.g. 'The GenBank[EMBL/DDBJ] accession number for the [16S rRNA gene/gyrA, etc.] sequence of XXXXX is XX00000'.

6.1.8 Abbreviations (where applicable)

A footnote defining any non-standard abbreviations. Guidance on abbreviations not requiring definition can be found [here](#).

6.2 Abstract

This section is likely to be read by more people than the full article, and many abstracting services use authors' summaries without modification. It is therefore important that this section is clear and comprehensible in its own right. The abstract should, if possible, introduce the subject in the first sentence and present the main conclusion in the last sentence. References should not be cited, and any non-standard abbreviations used must be defined. Abstracts are unstructured for all journals, except JMM Case Reports and Journal of Medical Microbiology.

6.3 Introduction

This should state the objectives of the work, but should not contain a detailed summary of the results. Authors should not assume that all readers will know why an area is worth studying; they should briefly make this clear. Previous relevant work should be sufficiently cited but this should not constitute a full review.

6.4 Methods

Sufficient detail should be provided to allow the work to be repeated. The suppliers of chemicals and equipment should be indicated if this may affect the results. If the name of suppliers or equipment changes between your work and submission, please ensure this is clearly indicated. Suppliers' addresses should not be given unless this is considered essential for a particular reason.

6.5 Results

There should be sufficient subheadings to make clear how the work was organised, what the key questions being addressed were, how one experiment led to another, and perhaps what conclusions were reached. A reader should gain a clear picture of the work from the subheadings.

Reproducibility of results should be indicated. It should be stated how many times an experiment was repeated and whether means or representative results are shown. Variability should be indicated statistically wherever possible; when error terms are given, the measure of dispersion and the number of observations should be stated. Statistical techniques used must be specified, and where necessary they should be described fully or a reference given. If results are expressed as percentages, the absolute value corresponding to 100% should be stated.

6.6 Discussion

This should not recapitulate the results, and should not be too long. Excessive discussion of few facts often gives an impression of poor science. Subheadings should be used where appropriate, to highlight the points under discussion. It may be helpful to list the main conclusions at the end. A combined Results and Discussion section is encouraged where appropriate.

6.7 Author statements

The following author declaration statements must be included at the end of the article in the order of Funding information, Acknowledgments, Conflicts of interest and Ethical statement. The sections below provide information of regarding what is required for each author statement.

6.7.1 Funding information

Authors should describe the sources of funding that supported this work and ensure that this information is detailed and accurate. Authors must state the names of funding bodies and grant numbers. Authors associated with specific funding sources should be named. Authors must also state whether any persons employed by the funders (other than the authors) played any role in the study or in the preparation of the article or decision to publish. These persons need to be named and their role must be described. If no funding was received, please state that this work received no specific grant from any funding agency.

6.7.2 Acknowledgements

An Acknowledgements section is not compulsory but may be included. Authors may also wish to acknowledge individuals who have contributed materials, expertise or time to the study who are not named as authors. Personal acknowledgements should precede those of institutions or agencies. Please do not refer to the Editor who handled your submission in this section.

If materials and results were obtained from outside the authors' laboratories (e.g. production of antibodies, properties of strains), this must be explicitly stated, and an acknowledgement must be included where appropriate.

6.7.3 Conflicts of interest

Authors must declare any potential conflicts of interest in the manuscript. A conflict of interest may exist when your interpretation of the results or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organisations. If no conflict exists, authors need to declare that there is no conflict of interest.

Examples of potential financial conflicts of interest include:

Receipt of funding or salary from an organisation that might gain or lose financially from publication of your paper. E.g. Dr Jones' work has been funded by XXXX; Dr Smith has consulted for XXXX Company and received a salary for this employment. If you hold stocks or shares in such an organisation. E.g. Dr Brown has received compensation as a member of the scientific advisory board of XXXX and owns shares in the company.

If you hold or are applying for a patent relating to the content of this manuscript. Examples of non-financial conflicts of interest might include political, religious or intellectual conflicts.

6.7.4 Ethical statement

Articles describing any experimental work with humans should include a statement that the Ethical Committee of the institution in which the work was done has approved it, and that the subjects gave informed consent to the work. The Editors of the Society's journals will accept papers describing experiments conducted using animals. However, such experiments must be carried out in accordance with the legal requirements of the relevant local or national authority and authors must provide a statement affirming the approval of these experiments by the relevant Ethical Committee. Details of the procedures followed must be provided, and must be such that experimental animals do not suffer unnecessarily. The Editors will not accept papers in which, in their opinion, the ethical aspects are open to doubt. Authors are encouraged to consult the ARRIVE guidelines for reporting experiments involving animals.

6.7.5 Consent for publication

For all articles that include details, images, or videos relating to an individual person, written informed consent for the publication of these details must be obtained from that person, or their parent or legal guardian in the case of children under 18. If the person has died, consent for publication must be obtained from their next of kin. The consent must be for publication of their details such that they will be published in a scholarly journal and made freely available on the internet or in print. The article must include a statement that written informed consent for publication was obtained. You can use our [consent form](#) to obtain consent for publication, or a consent form from your own institution or region if appropriate. The consent form must state that the details/images/videos will be freely available on the internet or in print and may be seen by the general public. The consent form must be submitted with the article and will be treated confidentially.

In cases where images are entirely unidentifiable and there are no details on individuals reported within the article, consent for publication of images may not be required. The final decision on whether consent to publish is required lies with the Editor.

6.8 Abbreviations

Please include any non-standard abbreviations referred to within your paper. A list of standard abbreviations can be found [here](#).

7. References

References in the text should be cited using the Vancouver referencing system (citation-sequence reference system).

References are listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. All listed references must be cited in the text. In the text, cite the reference number in square brackets, e.g. Studies have shown that RegB/RegA controls many energy generating and energy utilising systems such as photosynthesis [1].

Author names must be in bold. Abbreviate journal names according to MEDLINE and journal titles should be properly abbreviated and italicized. Page numbers should not be truncated.

For users of the referencing manager Endnote, you can download our reference styles here:

[Microbiology](#)

[Journal of General Virology](#)

[Journal of Medical Microbiology](#)

[JMM Case Reports](#)

[Microbial Genomics](#)

[International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology](#)

7.1 Bibliography

For references with five or fewer authors, give the names of all authors in the form 'Surname Initials' and separate each with a comma. For references with more than five authors, list the first five followed by et al.

7.2 In-text examples:

7.2.1 Sample journal:

Cerdà-Cuellar M, Rosselló-Mora RA, Lalucat J, Jofre J, Blanch A. *Vibrio scophthalmi* sp. nov., a new species from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:58–61.

Pasta F, Sicard MA. Exclusion of long heterologous insertions and deletions from the pairing synopsis in pneumococcal transformation. *Microbiology* 1996;142:695–705.

7.2.2 Sample journal reference for more than five authors:

Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1996;388:539–547.

7.2.3 Sample reference to a whole book:

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.

7.2.4 Sample reference to a book chapter or section:

Romano AH, Saier MH Jr. Evolution of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. I. Physiological and organismic considerations. In: Mortlock RP (editor). *The Evolution of Metabolic Function*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1992. pp. 171–204.

7.2.5 References to websites

Essential items that must be provided are:

an author(s) (which may be a company name or organisation).

a year of 'publication' (which may be the year that the site was last updated).

the URL (web address) of the page;

a page title (which will hopefully allow the page to be found using a search engine if the URL subsequently changes).

For a website that is frequently updated, it may be useful to provide the date that the site was accessed, particularly if specific information is quoted that may have changed when the article is read.

7.3 Bibliography style points:

Only articles accepted for publication but not yet published may be cited as 'in press' in the reference list and the reference must include the name of the journal. Relevant articles cited as 'in press' should be included as supplementary material with the online submission. References to articles not yet accepted should be cited in the text as unpublished results, giving the surname(s) and initials of all the author(s). Such articles should not appear in the list of references.

Permission must be obtained for any personal communications or citations of other workers' unpublished results. Permission from the copyright holder must be included at initial submission.

8. Tables

These should be broadly comprehensible without reference to the text, but it is not necessary to repeat detailed descriptions of methods, etc. The symbols [markup] * † ‡ § || # should be used for footnotes, rather than superscript letters or numbers. When results are expressed as percentages, the absolute value(s) corresponding to 100% must be stated. Statements of reproducibility should be included (see above). Tables should not be used to present results that can be described by a brief statement in the text.

9. Figures

9.1 Permissions

If using figures or tables that have been previously published elsewhere, it is the responsibility of the authors to obtain permission from the original copyright holder prior to submission. Permission must be included at initial submission.

9.2 Colour figures

For Microbiology, Journal of General Virology, Journal of Medical Microbiology, and International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology, figures are

published in colour free of charge in print if the use of colour is judged to be necessary for scientific reasons. There are no charges for supplementary material. There are no colour charges for publishing in JMM Case Reports and Microbial Genomics as they are online-only journals.

9.3 Format

Figures should not be used to present results that can be described by a brief statement in the text. The points outlined above for tables regarding comprehensibility, relative values and reproducibility also apply to figures and their legends. The inclusion of large amounts of tabular data in figures is discouraged and authors may be asked to move such data to the text or a separate table. Authors should be aware that after publication, tabulated data within figures are not accessible via online text searching. Where possible, please also supply line drawings, bar diagrams and sequence data in the original file format in which they were generated and/or as EPS (Encapsulated PostScript), PowerPoint or CorelDraw files. Do not supply as PostScript files as these cannot be used.

Figures must be referred to in the text as Fig. 1(a) not Fig. 1A or Figure 1(A) or as (Fig. 1a) not (Figure 1A). Multipart figures should be labelled (a), (b), etc., not (A), (B), etc.

All figure files should not include a figure legend. The figure legends should be included in the Word document of the main text file.

9.3.1 Line drawings.

These should be of a quality suitable for direct reproduction. The maximum printed size, including lettering and legends, is 176 x 235 mm. Line thicknesses and symbol sizes should be sufficient to allow for reduction. The preferred symbols for graphs are filled and open circles, squares, triangles or diamonds. Where possible, the same symbol should be used for the same quantity in different figures.

9.3.2 Bar diagrams.

Simple bar diagrams reporting only a few values are usually unnecessary; the data can normally be given in a few lines of text. It is editorial policy not to publish bar diagrams with 3-D bars unless there is a specific justification for their use.

9.3.3 Sequence data.

Figures showing full gene sequences are not published, but selected sequence data, with appropriate annotation, may be published where there is justification. The layout of sequence figures should be designed to fit either the full width of the page

(176 mm) or a single column (84 mm). For adequate legibility, the height of the characters should be not less than 1.5-2 mm (or 6-8 point). For printing at full page width with this size of type, a layout with 80-100 nucleotides per line is appropriate (or 60-70 if there are spaces between the codons). For a single-column layout, 50-60 nucleotides per line is about right. The spacing between the lines of sequence should be as close as is consistent with clarity. Note that sequence data must be submitted to GenBank, EMBL or DDBJ.

The Microbiology Society does not publish figures whose principal function is to present primary sequence data, since the data can be accessed through the databases. To merit publication, sequence figures must be justified by the additional annotation they present; they should normally be limited to regions of particular interest. Limited sequence alignments of nucleic acids and proteins are acceptable provided they make a significant point. See above for guidance on presentation of sequence figures. Sequence data that are not suitable for print publication can, where appropriate, be published as online-only supplementary material.

9.3.4 Photographs (halftones).

The preferred format for halftones (i.e. photographic images) is TIFF, but PDF, EPS and JPG/JPEG are also accepted. If image files are pasted into Word, PowerPoint, Photoshop etc., in order to add lettering or other annotation or to combine line and halftone images, the original unlabelled halftone images should also be supplied. A final print resolution of 300 d.p.i. or more is recommended. Colour images should use CMYK colour (which can be reproduced in print) rather than RGB (which cannot be reproduced faithfully using four-colour printing) (this setting can be accessed in Adobe Photoshop via Image:Mode:CMYK Color, for example). For some colour images, such as fluorescence micrographs, it may be useful to submit an RGB version of the image to be mounted online as supplementary material. For photomicrographs, the scale should be shown by a scale bar.

9.3.5 Matrices and trees.

Similarity or distance matrices should not be presented unless specific features of the entire table are discussed. However, representative similarity values should be presented in the text. In taxonomic papers, trees should only be included for showing the importance of a phylogenetic analysis to a taxonomic description; the size of trees should be reduced - only nearest neighbours should be included, but the authors should, in the legend or Methods, list the other taxa (including strain and

sequence accession numbers) used to generate the tree. Strain names should be those provided by the original depositor of the sequence.

Trees must include the names of organisms, their strain name or number (as stated by the depositor of the sequence, with type strains indicated where appropriate by a superscript capital T) and sequence accession number (space permitting). The size and style of font and width of lines should be such that the figure can be reduced as much as possible, in order make economical use of space in the journal. It is important to ensure the accuracy of names (check them in the List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature when making the final revision of the paper) and accession numbers in trees, as correction is time-consuming and expensive and may lead to the introduction of further errors.

[Microreact](#) has been developed in the David Aanensen Research Group at Imperial College London and The Centre for Genomic Pathogen Surveillance. It is a [React.js application](#) taking full advantage of the [PhyloCanvas API](#) (trees), the [Google Maps API](#) (maps) and [vis.js](#) library (timeline). Microbial Genomics has partnered with Microreact, a free data visualisation and sharing platform that allows scientists and health professionals worldwide to better collaborate to understand disease outbreaks. The journal is encouraging authors to upload their data files to Microreact, which can then provide interactive querying of the data via trees, maps, timelines and tables, and published in Microbial Genomics via a permanent web link.

[Back to contents list](#)

10. Supplementary Material

Supplementary material is associated material that does not directly pertain to the main research findings. It is material that is relevant to the article and is not only data but could be Methods etc. This should be included at initial submission for review purposes and will be published alongside the article's version of record.

Supporting data refers to Microbial Genomics only. It refers to data that needs to be deposited in Figshare or the author's chosen data repository; this is a submission requirement and authors should obtain a data doi and cite this in the published article.

10.1 All journals

All of our journals welcome the submission of supplementary material. Material associated with an article but not suitable for publication as part of the article (e.g.

large datasets, sequence alignments, 3D structures or movie files) can be included as online-only supplementary material. Data that are essential for interpretation of the results of the main article should be included in the main article. All supplementary material files will be reviewed along with the main article; these will not be published unless they significantly enhance the article. The Editors may suggest that figures or tables included within a paper should be converted into supplementary material.

Supplementary material must not include methods for results that are included in the main article, nor should they introduce different results or new discussion points. All supplementary material is made freely available upon publication of the final version of the article.

10.2 Microbial Genomics

Microbial Genomics has a mandatory [open data policy](#) that requires authors to submit supporting data, protocols, and/or bioinformatics programmes and software to relevant depositories.

Authors are encouraged to submit supporting data such as large datasets, sequence alignments, 3D structures or movie files, to relevant subject-specific or general depositories. Large supplementary figures or tables these can be transferred to the Journal's [figshare portal](#) via the Editorial Office once your paper has been submitted. Text-based supplementary material more suited to PDF publication, may be submitted with your article. This will be published alongside the main paper exactly as supplied by the author.

10.3 JMM Case Reports translated abstracts

JMM Case Reports authors can now publish a translated version of their article's abstract in their native language. The native language abstract is free to publish and authors can choose to write the abstract in the language of their choice. However, only a single translated abstract may be published per article.

To submit a translated abstract, authors need to complete the [Translated Abstract template](#) and submit it as part of their revised submission. Please note that the translated abstract will not be peer reviewed or typeset and authors need to ensure their accuracy. The translated abstract will be published as supplementary material and will only appear with the final version of the published article.

10.4 Submission

Supplementary material should be uploaded at the time of submission; please upload as file type Supplementary Material on the Editorial Manager submission system.

Supply all supplementary material in the file formats given below.

Very large files or those requiring specialist software are not suitable as they will be difficult for the reader to download or view.

10.5 Presentation

Supplementary figures and tables should be named Fig. S1, Table S1, etc., and must be cited accordingly in the main paper. Figure and table legends should also be present in the main paper.

Provide a heading and, if appropriate, a short text description with each supplementary material item.

10.6 File types

Material should be submitted in PDF format; Please note that .doc(x) or .ppt(x) files are not suitable.

Multiple figures, tables or text items should be supplied as a single PDF.

Large datasets can be supplied in Excel format if you wish readers to be able to manipulate the data. If not, please convert to PDF or upload to the Journal's [figshare portal](#) via the Editorial Office once your paper has been submitted.

Audio, video and animations can be supplied as .mov, .avi or .mpeg files.

10.7 Processing of supplementary material

Supplementary material will be published alongside the main article exactly as supplied by the author. They do not undergo typesetting or copyediting. It is the authors' responsibility to ensure that all files are presented clearly.

11. How to submit a revised article

Revised articles should be submitted by the date indicated in the decision letter. If more time is required, the author should contact the Editorial Office or Editor to discuss a new deadline. If the revision is delayed by the author without prior agreement, the revised manuscript may be treated as a resubmission.

11.1 Revision checklist

As well as following the standard [pre-submission checklist](#), authors are also asked to include the below when submitting a revised manuscript:

11.1.1 Rebuttal letter

If the paper was peer reviewed, authors must provide a detailed rebuttal letter, detailing their response to each point raised by the reviewers.

11.1.2 Main text file

Please upload a Word document, containing references, table and figure legends, and tables. Please do not include any highlighted text. Microsoft Word files are preferred; .docx files produced in Word 2007 or 2010 can be used as source files. TeX and LaTeX formats can not be used.

Authors may upload a highlighted marked-up version of their revised article as a supplementary file in order to aid the Editors and reviewers. This is mandatory in Journal of General Virology.

11.1.3 Tables

Tables must not be supplied as image files (TIFF, PDF, PowerPoint); files containing tables prepared as images (whether provided separately or pasted into a Word file) will be returned to the author and this may delay publication. Tables should be prepared using your software's table functions, with individual entries in individual table cells.

Tables must not be supplied as tab- or space-separated text or as multiple entries separated by line breaks in single table cells.

Tables prepared in Microsoft Excel can be accepted but are not desirable.

Tables must be in an editable format.

11.1.4 Line figures

Line figures should be produced as vector rather than bitmap (raster) images. Acceptable formats are PDF, EPS, CorelDRAW (.cdr; version 15 or earlier), Adobe Illustrator (.ai), Microsoft Excel (.xls), Microsoft Word and Microsoft PowerPoint. Fonts must be embedded for figures supplied as PDF or EPS. TIFF and other bitmap formats are not recommended for line figures; if their use cannot be avoided, the resolution should be at least 600 d.p.i.

Charts prepared in Microsoft Excel should be supplied in Excel format where possible. If they are copied and pasted into another Microsoft application, use Paste Special and select 'Picture (Enhanced Metafile)'.

11.1.5 Halftone figures (photographs)

Authors are advised to supply halftones intended for publication as TIFF or EPS files. The resolution should be at least 300 d.p.i. at final size (approximately 1000

pixels wide for a single-column figure and 2000 pixels wide for a double-column figure). For photomicrographs, the scale should be shown by a scale bar.

11.1.6 Scanning images

If images must be scanned, a resolution of 300 d.p.i. is usually sufficient for same-size reproduction of halftone (photographic) images without text, whereas 600 or 1200 d.p.i. should be used for figures containing lines and/or text. The scanned image should be cropped to remove as much white space as possible and supplied in TIFF format.

11.1.7 Equations

Equations that cannot be represented using the keyboard can be prepared using the Word equation editor (in versions up to Word 2003) or MathType. Word 2007/2010 users should not use the default equation editor to prepare equations as it is not compatible with any other current software; equations in Word 2007/2010 should be prepared using the MathType equation editor or the 'legacy' equation editor included as part of Word (i.e. a Microsoft Equation 3.0 object, accessible from 'Insert Object' on the 'Insert' ribbon).

11.1.8 Supplementary material

A combined PDF of all supplementary material.

12. Author forms

For Microbiology, Journal of General Virology, Journal of Medical Microbiology, and JMM Case Reports a licence to publish form must be completed by authors. This means the copyright does not transfer to the publisher but should instead be categorised under one of the three following options:

Copyright Type A: This is to be used when the article is already in the public domain. One or more of the authors are employees of the US Federal government and they are acting in the course of their employment. Copyright is not assigned to anybody and thus nothing is noted on the article.

Copyright Type B: this is to be used when copyright is to be retained by the employer. One or more of the authors are employees of the copyright holder and acting in the course of their employment. It is displayed with an editable statement provided by the author/their company. (E.g. for UK government employees a '© 2015 Crown Copyright' statement is used)

Copyright Type C: This is the standard copyright to be used when copyright belongs to the author. It will be displayed in the articles as: '©The Authors'.

For International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology a separate copyright form must be completed in all cases and the copyright is transferred to the IJSEM. The IJSEM copyright assignment form can be found [here](#).

For Microbial Genomics we offer both the CC-BY 4.0 license to publish form and also the CC-BY-NC 4.0. The CC-BY OpenMicrobiology licence to publish form can be found [here](#). The CC-BY-NC license to publish form can be found [here](#).

Authors are unable to complete the submission of their revised article until the relevant forms have been uploaded. All forms can be found [here](#).

12.1 Licence to Publish form/Copyright form

All revised papers must be accompanied by a signed Licence to Publish or Copyright form. Please visit the [Editorial policies page](#) for information on the specific form required for your paper.

12.2 Change of Authorship form

If the order of authors has changed since submission, or if any authors have been removed or added, all authors will need to sign a Change of Authorship form, which must be uploaded with the revised article.

[Back to contents list](#)

13. Post-acceptance

13.1 Continuous publication

Articles are published online in their final form (i.e. the typeset, copyedited, proofed and corrected copy) in the 'Latest Articles' section of the website in an 'open' issue. Once a month these issues will be 'closed' and moved to the 'Current Issue' section of the website and contain the final Version of Record of each article with pagination. For further information on post-acceptance articles, please see our [Post-print policy](#).

13.2 Proof corrections

Proofs are checked using our online author proofing system. A link to the proof of your article is sent to the email address supplied for the corresponding author. It is the authors' responsibility to inform the Editorial Office of any changes to this email address.

Only typographical and absolutely essential factual changes may be made at this stage.

13.3 Reprints

After publication authors can order reprints of their articles. For articles published on and before July 2015, please go to the [CPrint+ platform](#). For articles published after this date, please contact journalsales@microbiologysociety.org.

Commercial reprints must be ordered directly through the Society. Please email our Journal Sales team.

For information on our reprints policy, please click [here](#).

APÊNDICE A – TRABALHO PUBLICADO EM PARCERIA COM DISCENTE.

1 **First aspects on acetate metabolism in the yeast *Dekkera bruxellensis*: a**
2 **few keys for improving ethanol fermentation**

3

4 **Running head:** Acetate metabolism in *Dekkera bruxellensis*

5

6 Gilberto Henrique Teles¹, Jackeline Maria da Silva¹, Allyson Andrade
7 Mendonça¹, Marcos Antonio de Moraes Junior^{1,3} and Will de Barros Pita^{1,2}

8

9

10 ¹Interdepartmental Research Group in Metabolic Engineering, ²Department of
11 Antibiotics, ³Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife,
12 PE 50760-901, Brazil.

13

14 **Keywords:** *Dekkera bruxellensis*; acetaldehyde dehydrogenase; acetyl-CoA;
15 carbon distribution; disulfiram; ethanol fermentation.

16

17

18 *Correspondence to:

19 Will de Barros Pita

20 Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco

21 Avenida Professor Artur de Sá, Departamento de Antibióticos, Cidade

22 Universitária

23 50740520 - Recife, PE - Brasil

APÊNDICE B – TRABALHO SUBMETIDO AO PERIÓDICO YEAST EM PARCERIA COM DISCENTE.

1 Nitrate boosts anaerobic ethanol production in an acetate-dependent manner in
2 the yeast *Dekkera bruxellensis*

3

4 Irina Charlot Peña-Moreno¹, Denise Castro Parente¹, Jackeline Maria da Silva¹, Allyson
5 Andrade Mendonça¹, Marcos Antonio de Moraes Junior¹ and Will de Barros Pita^{2*}

6

7 ¹Department of Genetics and ²Department of Antibiotics, Federal University of
8 Pernambuco, Recife, PE 50760-901, Brazil.

9

10

11

12 **Running head:** Nitrate induces ethanol production by *D. bruxellensis* in anaerobiosis.

13

14 *Correspondence to:

15 Will de Barros Pita

16 Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco

17 Avenida Professor Artur de Sá, Departamento de Antibióticos, Cidade Universitária

18 50740520 - Recife, PE - Brasil

19 E-mail: will.barros.pita@gmail.com

20 Phone: 55-81-21268347

**APÊNDICE C – TRABALHO A SER SUBMETIDO EM PARCERIA
COM O DISCENTE.**

**Influence of nutritional composition of the medium and the metabolism of citrate
on the growth of *Lactobacillus vini***

Paula Katharina Nogueira da Silva¹, Allyson Andrade Mendonça¹, Rafael Barros de
Souza^{1,3}, Tiago Luiz Santana Calazans¹, Will de Barros Pita^{1,3}, Marcos Antonio de
Morais Junior^{1,*}

¹Department of Genetics and ²Department of Antibiotics, Federal University of
Pernambuco. Avenida Moraes Rego, No. 1235, Recife, PE 50760-901, Brazil.

³Institute for Biological Sciences, University of Pernambuco. Rua Arnóbio Marques,
No. 310, Recife, PE 50100-130, Brazil

*Correspondence should be addressed to:

Marcos Antônio de Moraes Jr

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco

Av. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária, Recife PE, 50.670-901, Brasil.

**APÊNDICE D – TRABALHO SUBMETIDO AO PERIÓDICO
INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AND
CHEMOTHERAPY PELO DISCENTE.**

1 **Cysteine induces resistance of lactobacilli to erytromycin and azytromycin**

2

3 Allyson Andrade Mendonça^a, Marcos Antonio de Moraes Jr^{a*} and Manuel Zúñiga Cabrera^b

4

5

6 ^aLaboratory of Microbial Genetics, Department of Genetics, Federal University of

7 Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil.

8 ^bLaboratory of Lactic Acid Bacteria and Prebiotics, Department of Food Biotechnology,

9 Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Paterna, Spain

10

11

12

13

14

15

16

17 ***Corresponding author**

18 UFPE- Departamento de Genética,

19 Av. Prof. Moraes Rego, 1235,

20 Cidade Universitária,

21 50670-901,

22 Recife, Pernambuco,

23 Brasil

APÊNDICE E – ANOTAÇÃO DAS ORFS UTILIZADAS NO TRABALHO UTILIZANDO A FERRAMENTA RAST E BLASTP

Identificador da ORF	contig	Rast		Organismo	Blastp	
		Subsystem	Anotação		Anotação	Identidade
PBP1A α	gi 380744365 gb AHZA01000269.1		Multimodular transpeptidase-		multimodular	85%
		Peptidoglycan	transglycosylase (EC 2.4.1.129)	<i>Lactobacillus</i>	transpeptidase-	
		Biosynthesis	(EC 3.4.-.-) / Penicillin-binding protein 1A/1B (PBP1)	<i>nagelii</i>	transglycosylase	
PBP1A β	gi 380744365 gb AHZA01000269.1		Multimodular transpeptidase-		multimodular	74%
		Peptidoglycan	transglycosylase (EC 2.4.1.129)	<i>Lactobacillus</i>	transpeptidase-	
		Biosynthesis	(EC 3.4.-.-) / Penicillin-binding protein 1A/1B (PBP1)	<i>nagelii</i>	transglycosylase	
MTT	gi 380744456 gb AHZA01000178.1		Multimodular transpeptidase-			66%
		Peptidoglycan	transglycosylase (EC 2.4.1.129)	<i>Lactobacillus</i>	PBP 1A	
		Biosynthesis	(EC 3.4.-.-)	<i>murinus</i>		

NagA	gi 380744431 gb AHZA01000203.1	Sialic acid metabolism	N-acetylglucosamine-6- phosphate deacetylase (EC 3.5.1.25)	<i>Lactobacillus</i> <i>ghanensis</i>	N- acetylglucosamine-6- phosphate deacetylase	86%
glmS	gi 380744187 gb AHZA01000447.1	Sialic acid metabolism	Glucosamine--fructose-6- phosphate aminotransferase [isomerizing] (EC 2.6.1.16)	<i>Lactobacillus</i> <i>nagelii</i>	glutamine-fructose-6- phosphate transaminase (isomerizing)	83%
glmU	gi 380744094 gb AHZA01000540.1	Sialic acid metabolism	N-acetylglucosamine-1- phosphate uridyltransferase (EC 2.7.7.23) / Glucosamine-1- phosphate N-acetyltransferase (EC 2.3.1.157)	<i>Lactobacillus</i> <i>ruminis</i>	bifunctional N- acetylglucosamine-1- bifunctional protein GlmU	72%
murB	gi 380744476 gb AHZA01000158.1	Peptidoglycan Biosynthesis	UDP-N- acetylenolpyruvoylglucosamine reductase (EC 1.1.1.158)	<i>Lactobacillus</i> <i>aquaticus</i>	murB protein	64%
dltA	gi 380744435 gb AHZA01000199.1	D-Alanyl Lipoteichoic Acid Biosynthesis	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1 (EC 6.1.1.13)	<i>Lactobacillus</i> <i>nagelii</i>	D-alanine-- poly(phosphoribitol) ligase	65%

dltB	gi 380744435 gb AHZA01000199.1	D-Alanyl Lipoteichoic Acid Biosynthesis	D-alanyl transfer protein DltB	<i>Lactobacillus</i> <i>ghanensis</i>	D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis protein DltB	78%
dltC	gi 380744435 gb AHZA01000199.1	D-Alanyl Lipoteichoic Acid Biosynthesis	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 2 (EC 6.1.1.13)	<i>Lactobacillus</i> <i>fermentum</i>	D-alanyl carrier protein	53%
dltD	gi 380744435 gb AHZA01000199.1	D-Alanyl Lipoteichoic Acid Biosynthesis	Poly(glycerophosphate chain) D-alanine transfer protein DltD	<i>Lactobacillus</i> <i>ghanensis</i>	D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis protein DltD	68%
ampC	gi 380744435 gb AHZA01000199.1	Beta-lactamase	Beta-lactamase class C and other penicillin binding proteins	<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> AY01	serine-type D-Ala-D- Ala carboxypeptidase	37%
rpoB	gi 380744432 gb AHZA01000202.1	ND	DNA-directed RNA polymerase beta subunit (EC 2.7.7.6)	<i>Lactobacillus</i> <i>nagelii</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	93%
pcrA	gi 380744487 gb AHZA01000147.1	DNA repair, bacterial UvrD and related helicases	ATP-dependent DNA helicase UvrD/PcrA	<i>Lactobacillus</i> <i>ghanensis</i>	ATP-dependent DNA helicase PcrA	78%

recA	gi 380744443 gb AHZA01000191.1	DNA repair, bacterial	RecA protein	<i>Lactobacillus nagelii</i>	DNA recombination/repair protein RecA	95%
groES	gi 380744427 gb AHZA01000207.1	GroEL GroES	Heat shock protein 60 family co- chaperone GroES	<i>Lactobacillus ghanensis</i>	co-chaperone GroES	89%
fusA	gi 380744355 gb AHZA01000279.1	Translation elongation factors bacterial	Translation elongation factor G	<i>Lactobacillus nagelii</i>	elongation factor G	95%
σ 24-like	gi 380744416 gb AHZA01000218.1	ND	DNA-directed RNA polymerase specialized sigma subunit, sigma24-like	<i>Lactobacillus animalis</i>	DNA-directed RNA polymerase sigma factor	45%
σ 54	gi 380744488 gb AHZA01000146.1	Transcription initiation, bacterial factors	RNA polymerase sigma-54 factor RpoN	<i>Lactobacillus nagelii</i>	RNA polymerase sigma-54 factor	60%
σ 70	gi 380744061 gb AHZA01000573.1	Transcription initiation, bacterial factors	RNA polymerase sigma factor RpoD	<i>Lactobacillus mali</i>	NA polymerase sigma factor RpoD	98%

		Transcription						
σ^V	gi 380744493 gb AHZA01000141.1	initiation, bacterial factors	sigma	RNA polymerase sigma factor SigV	<i>Enterococcus faecalis</i>	putative polymerase factor SigV	RNA sigma	51%
ANTI- σ^V	gi 380744493 gb AHZA01000141.1	ND		anti-sigma factor homolog yrhM	<i>Enterococcus faecalis</i>	ECF factor, partial	anti-sigma	44%
mutL	gi 380744052 gb AHZA01000582.1	DNA repair, bacterial MutS system	MutL-	DNA mismatch repair protein MutL	<i>Lactobacillus ghanensis</i>	DNA mismatch repair protein MutL		61%
ALL	gi 380744465 gb AHZA01000169.1	Peptidoglycan Biosynthesis		D-alanine--D-alanine ligase	<i>Lactobacillus ghanensis</i>	D-alanyl-alanine synthetase A		86%
ALT	gi 380744219 gb AHZA01000415.1	Pyruvate Alanine Serine Interconversions		D-alanine aminotransferase (EC 2.6.1.21)	<i>Lactobacillus uvarum</i>	D-alanine aminotransferase		66%
ALR	gi 380744079 gb AHZA01000555.1	Pyruvate Alanine Serine Interconversions		Alanine racemase	<i>Lactobacillus ghanensis</i>	alanine racemase		70%

USP I	gi 380744077 gb AHZA01000557.1	Universal stress protein family	Lactobacillus nagelii	universal protein	stress	75%
USP II	gi 380744233 gb AHZA01000401.1	Universal stress protein family	Lactobacillus nagelii	universal protein	stress	74%
USP III	gi 380744407 gb AHZA01000227.1	Universal stress protein family	<i>Lactobacillus murinus</i>	universal protein	stress	69%
USP IV	gi 380744448 gb AHZA01000186.1	Universal stress protein family	Lactobacillus vini	universal protein	stress	66%
USP V	gi 380744474 gb AHZA01000160.1	Universal stress protein family	Lactobacillus nagelii	universal protein	stress	87%
pspC	gi 380744257 gb AHZA01000377.1)	stress-responsive transcription regulator (putative)	Lactobacillus brevis	PspC containing protein	domain-	66%

furR	gi 380744303 gb AHZA01000331.1	Peroxide stress regulator PerR, Lactobacillus				transcriptional
		Oxidative_stress	FUR family	ghanensis	repressor	86%

CURRICULO VITAE (LATTES)

Allyson Andrade Mendonça

Curriculum Vitae

Agosto/2018 **Allyson Andrade Mendonça**

Curriculum Vitae

Nome civil

Nome Allyson Andrade Mendonça

Dados pessoais

Nome em citações bibliográficas MENDONÇA, A. A.; MENDONÇA, ALLYSON
ANDRADE; ANDRADE MENDONÇA, ALLYSON

Sexo Masculino

Cor ou Raça Branca

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

E-mail alternativo allysonbiol@hotmail.com

Formação acadêmica/titulação

2014 Doutorado em Pós graduação em genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Papel do operon do de *Lactobacillus vini* na tolerância celular a condições de estresse na parede celular durante a fermentação Alcoólica industrial
Orientador: Marcos Morais Junior
Co-orientador: Carolina Elsztein
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
Palavras-chave: Lactobacillus vini , operon dlt, Fermentação Alcoólica
Áreas do conhecimento : Microbiologia Industrial e de Fermentação, Genética Molecular e de Microorganismos

- 2012 - 2014** 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.*, Ano de obtenção: 2014
Orientador: Marcos Antonio de Moraes Junior
Co-orientador: Márcio Maria Camacho de Moraes
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 Camacho de Moraes
- 2005 - 2007** Ensino Médio (2o grau) .
Escola Custódio Pessoa, ECP, Brasil
- 1997 - 2004** Ensino Fundamental (1o grau) .
Escola Custódio Pessoa, ECP, Brasil

Formação complementar

- 2013** Curso de curta duração em Epigenetic Control of Gene Expression.
The University of Melbourne, UNIMELB, Melbourne, Austrália
- 2013 - 2013** Comunicação Escrita. . (Carga horária: 91h).

Escola Virtual Bradesco, EVB, Brasil

- 2010 - 2010** Biossegurança- Unidades Hemoterápicas/ Laboratório. . (Carga horária: 30h).
Sistema de Educação a Distância para Profissionais de Laboratório de Saúde,
TELELAB, Brasil
- 2010 - 2010** Parasitos e AIDS. . (Carga horária: 25h).
Sistema de Educação a Distância para Profissionais de Laboratório de Saúde,
TELELAB, Brasil
- 2010 - 2010** Técnicas para Coleta de Sangue. . (Carga horária: 25h).
Sistema de Educação a Distância para Profissionais de Laboratório de Saúde,
TELELAB, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Citogenética molecular animal. (Carga horária: 16h).
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil
- 2010 - 2010** Técnicas para Coleta de Secreções. . (Carga horária: 30h).
Sistema de Educação a Distância para Profissionais de Laboratório de Saúde,
TELELAB, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em biossegurança. (Carga horária: 20h).
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, HEMOPE, Recife,
Brasil
- 2009 - 2009** Extensão universitária em Histotécnica. (Carga horária: 90h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Diferenciação longitudinal cromossômica. (Carga horária: 3h).

Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil

2009 - 2009 Extensão universitária em Genética Molecular Humana. (Carga horária: 60h).
Instituto de Ciências Biológicas, ICB, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de Pernambuco - UPE

Vínculo institucional

2008 - 2009 Vínculo: Outro (aluno) , Enquadramento funcional: Aluno , Carga horária: 20

2. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: ESTÁGIO , Enquadramento funcional: ESTAGIARIO , Carga horária:
20, Regime: Dedicação exclusiva

Projetos

Projetos de pesquisaProjetos de pesquisa**2015 - Atual** Caracterização de profago do genoma de *Lactobacillus vini*

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Doutorado (1);

Integrantes: Allyson Andrade Mendonça; Marcos Antônio Morais Júnior (Responsável); Tiago Calazans

2014 - Atual Papel do operon dlt de *Lactobacillus vini* na tolerância celular a condições de estresse na parede celular durante a fermentação alcoólica industrial.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Doutorado (1);

Integrantes: Allyson Andrade Mendonça; Marcos Antônio Morais Júnior (Responsável); carolina elztein

2012 - 2014 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 usinas 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: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

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

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

2010 - 2011 **PRESENÇA DO GENE BLAKPC EM ISOLADOS CLÍNICOS DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE PROVENIENTES DE HOSPITAIS PRIVADOS DO RECIFE, BRASIL**

Descrição: Cepas de *Klebsiella pneumoniae* oriundas de quatro hospitais da rede pública de saúde de Recife foram investigadas quanto a presença do gene bla kpc. As cepas foram selecionadas a partir de seu perfil de resistência frente aos antibióticos beta lactâmicos, penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactams. Em seguida foram feitos testes moleculares por PCR e a caracterização plasmidial.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (3); Mestrado profissionalizante (1); Doutorado (2);

Integrantes: Allyson Andrade Mendonça; Amanda Cristina da Costa Guimarães (Responsável); Bárbara de Oliveira Silva; Ticianny Maria Lima e Silva; Ana Carolina Soares Almeida; Marinalda Anselmo Vilela; Márcia Maria Camargo de Moraes

2010 - 2011 **Investigação de mecanismos de disseminação do gene blaKPC em isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos**

Descrição: O projeto visou caracterizar o mecanismo molecular associado a dispersão do gene blaKPC, entre *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos. Foi investigada a participação de plasmídios, integrons e transposons como veículos exclusivos ou associados a sua disseminação.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (1);

Integrantes: Allyson Andrade Mendonça (Responsável); ; Ana Carolina Soares Almeida; Márcia Maria Camargo de Moraes

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2008 - 2008 **FUNGOS ENDOFÍTICOS DA PLANTA MEDICINAL SENNA OCIDENTALIS (L.) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Situação: Desativado Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Allyson Andrade Mendonça; Rui Milton Patrício da Silva Junior; Saul Alonso Chuchon Martinez; Ivana Gláucia Barroso da Cunha; Janete Magali de Araujo (Responsável)

Projeto de extensãoProjeto de extensão**2009 - 2010** Genética, Mídia e Cidadania: Videos na formação de conceitos

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Allyson Andrade Mendonça; Marília França Rocha (Responsável); Heytor Victor Neco; Fernanda Muniz Brayner Lopes

Financiador(es): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE

2008 - 2009 A GENÉTICA NA INTERAÇÃO ESCOLA E UNIVERSIDADE-Bolsa de Incentivo Acadêmico(BIA) 2008-2009

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Allyson Andrade Mendonça; Marília França Rocha (Responsável)

Financiador(es): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE

Áreas de atuação

1. Genética Molecular e de Microorganismos
-

Idiomas

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

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. TELES, GILBERTO HENRIQUE; DA SILVA, JACKELINE MARIA; **ANDRADE MENDONÇA, ALLYSON**; DE MORAIS, MARCOS ANTONIO; DE BARROS PITA, WILL

First aspects on acetate metabolism in the yeast *Dekkera bruxellensis* : a few keys for improving ethanol fermentation. YEAST. , v.3348, p.1 - , 2018.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1002/yea.3348]

2. **MENDONÇA, ALLYSON ANDRADE**; DE LUCENA, BRIGIDA THAIS LUCKWU; DE MORAIS, MÁRCIA MARIA CAMARGO; DE MORAIS, MARCOS ANTONIO

First identification of Tn916-like element in industrial strains of that spread the resistance gene. FEMS Microbiology Letters. , v.363, p.fnv240 - , 2015.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1093/femsle/fnv240]

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. ALMEIDA, A.C.S.; GUIMARÃES, A.C.C.; SILVA, B.O.; MENDONÇA, A. A.; MARTINS, W. M. B. S.; SILVA, T.M.L.; VILELA, M.A.; MORAIS, M.M.C.; MORAIS JÚNIOR, M.A.

Clonal spread of KPC producing *Serratia marcescens* isolates from Recife, Brazil In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA, 2010, Florianópolis.

2º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA. , 2010.

Áreas do conhecimento : Microbiologia Clínica Humana

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Marcos Antônio de Moraes Jr. **Análise das celobioases da bactéria industrial *Lactobacillus vini***. 2016. Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco

Referências adicionais : Brasil/Português.

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Avaliador no(a) **I Curso de Verão em Biologia Celular e Molecular da Fiocruz Pernambuc**, 2016. (Outra)

Não se aplica.

2. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **V- Jornada de pós graduação em genética**, 2015. (Congresso)

Determinação do perfil de tolerância da bactéria *Lactobacillus vini* a diferentes condições de estresse.

3. Avaliador no(a) **Encontro de pós-graduação e pesquisa, seminário de iniciação científica e seminário de inovação tecnológica**, 2014. (Encontro)

Não se aplica.

4. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **xx Encontro de Genética do Nordeste-ENGINE**, 2014. (Encontro)

IDENTIFICAÇÃO DO TN 916 DISSEMINANDO O GENE DE RESISTÊNCIA TET-M EM LINHAGENS INDUSTRIAIS DE *LACTOBACILLUS VINI*..

5. **IV- Jornada de pós-graduação em genética**, 2013. (Congresso)

Estudo in silico de ORF com domínio lactamase em *Lactobacillus vini*.

6. Avaliador no(a) **XIX Ciência jovem**, 2013. (Feira)

avaliação.

7. **Anais do III Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica**, 2012. (Simpósio)

IDENTIFICATION OF BLAKPC-2 GENE IN CLINICAL ISOLATES OF *MORGANELLA MORGANII* IN RECIFE - PE, BRAZIL.

8. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **II Jornada de pós-graduação em genética**, 2012. (Outra)

Análise in silicone de genes codificadores de beta-lactamases na bactéria lactobacillus vini.

9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **57º Congresso Brasileiro de Genética**, 2011. (Congresso)

Vídeos na contextualização e formação de conceitual em genética.

10. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Seminário de Iniciação Científica**, 2011. (Seminário)
INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DE DISSEMINAÇÃO DO GENE blaKPC EM ISOLADOS DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE RESISTENTES A CARBAPENÊMICOS.

11. Apresentação Oral no(a) **14º Jornada de Iniciação Científica CNPq/FACEPE**, 2010. (Outra)
Genética, mídia e cidadania: Vídeos na formação de conceitos..

12. Apresentação de Poster / Painel no(a) **2º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA**, 2010. (Simpósio)

Clonal spread of KPC producing Serratia marcescens isolates from Recife, Brazil.

13. **2º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica**, 2010. (Simpósio)

PRESENCE OF BLAKPC GENE IN CLINICAL ISOLATES OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE FROM FOUR HOSPITALS IN RECIFE, BRAZIL.

14. Apresentação de Poster / Painel no(a) **55º congresso brasileiro de genética**, 2009. (Congresso)

Integrando escola e universidade através da genética.

15. Apresentação de Poster / Painel no(a) **9ª Semana Universitária do Instituto de Ciências Biológicas**, 2009. (Outra)

Genética na interação escola e universidade.

16. Apresentação (Outras Formas) no(a) **59º Congresso Nacional de botânica**, 2008. (Congresso)

Fungos endofíticos da planta medicinal *Senna occidentalis* (L.) link e avaliação da atividade antimicrobiana.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos	completos	publicados	em
periódico.....			2
Trabalhos	publicados	em	anais
eventos.....			1

Orientações

Orientação	concluída	(trabalho	de	conclusão	de	curso	de
graduação).....							1

Eventos

Participações	em	eventos
(congresso).....		5
Participações	em	eventos
(seminário).....		1
Participações	em	eventos
(simpósio).....		3
Participações	em	eventos
(encontro).....		2
Participações	em	eventos
(outra).....		4