

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
TESE DE DOUTORADO**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PRESENTES EM
DESTILARIAS DE ÁLCOOL COMBUSTÍVEL NOS ESTADOS DA PARAÍBA E
PERNAMBUCO**

Brígida Thaís Luckwu de Lucena

VIRTUS IMPAVIDA

**RECIFE
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
TESE DE DOUTORADO**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PRESENTES EM
DESTILARIAS DE ÁLCOOL COMBUSTÍVEL NOS ESTADOS DA PARAÍBA E
PERNAMBUCO**

Brígida Thaís Luckwu de Lucena

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Genética
da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para
obtenção do grau de doutor em
Genética pela UFPE.

Orientador: Marcos Antônio de Moraes Júnior

**RECIFE
2010**

Lucena, Brígida Thaís Luckwu de Lucena

Diversidade genética de bactérias lácticas presentes em destilarias de álcool combustível nos Estados da Paraíba e Pernambuco / Brígida Thaís Luckwu de Lucena. – Recife: O Autor, 2010.

116 folhas : fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-Graduação em Genética, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Bactérias anaeróbicas 2. Fermentação – Pernambuco – Brasil 3. Fermentação – Paraíba – Brasil 4. Destilação – Indústria 5. Álcool – Combustível - Indústria 6. Genética - Pesquisa I. Título.

579.3

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010- 075

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GENÉTICA**

Parecer da comissão examinadora da dissertação/tese de:

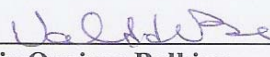
Brígida Thaís Luckwu de Lucena

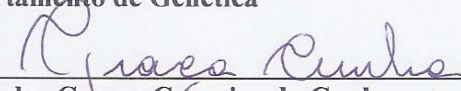
**DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PRESENTES EM
DESTILARIAS DE ÁLCOOL COMBUSTÍVEL NOS ESTADOS DA PARAÍBA E
PERNAMBUCO**

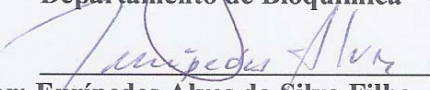
**A comissão examinadora considera o presente trabalho
[APROVADO]**

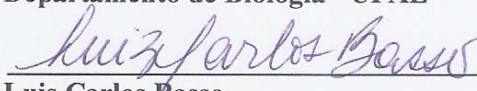
**Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, Brígida Thaís Luckwu de Lucena
faz jus ao grau de Doutora em Genética pela UFPE.**

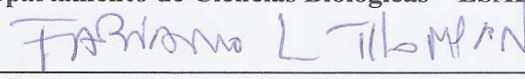
Recife, 22 de março de 2010

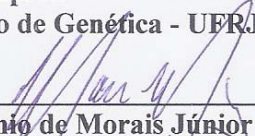
1º Examinador: 
Valdir Queiroz Balbino
Departamento de Genética

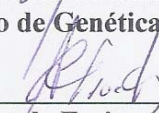
2º Examinador: 
Maria das Graças Carneiro da Cunha
Departamento de Bioquímica - UFPE

3º Examinador: 
Eurípedes Alves da Silva Filho
Departamento de Biologia - UFAL

4º Examinador: 
Luis Carlos Basso
Departamento de Ciências Biológicas – ESALQ/USP

5º Examinador: 
Fabiano Thompson
Departamento de Genética - UFRJ

Orientador: 
Marcos Antônio de Moraes Júnior
Departamento de Genética - UFPE

Coordenador: 
Antônio Carlos de Freitas
Departamento de Genética - UFPE

Agradecimentos

Aos órgãos de fomento CAPES e FACEPE.

À Genetech Bioproductivity S/A e demais financiadores desse projeto.

Aos Prof. Dr. Vasco Azevedo, Dr. Álvaro Nunes da Universidade Federal de Minas Gerais e a João Luiz Silva Moreira, pela colaboração neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fabiano Thompson da Universidade Federal do Rio de Janeiro e seus alunos, em especial à Ana Paula Moreira, por ter me acolhido em seu laboratório, e pela colaboração firmada, que foi imprescindível para finalização deste trabalho.

Ao meu orientador Dr Marcos Antônio de Moraes Júnior, pela confiança em mim depositada nestes quase 10 anos de trabalho conjunto.

A Billy Manoel dos Santos, meu co-orientado de iniciação científica e monografia, cuja participação neste trabalho foi essencial para finalização do mesmo.

A todos do os colegas e amigos de laboratório, pois cada um a sua maneira colaboraram para realização deste trabalho. Em especial a Theresa Liberal, que sempre esteve disposta a ajudar e escutar, e Rochane Torres, que de colega de bancada passou a ser uma grande amiga, obrigada por tudo.

Ao meu esposo, que acompanha minha vida acadêmica desde a graduação, estando presente em todos os momentos. Obrigado por sempre me apoiar e estar sempre ao meu lado.

A minha família por estarem sempre ao meu lado, me apoiando sempre. Em especial aos meus pais, pois sempre me direcionaram nos caminhos certos da vida. Eles são à base de tudo em nossa família, principalmente pelo exemplo que são em nossas vidas. Agradeço por tudo que hoje sou, inclusive mais essa conquista, que também é de vocês!

A Deus, minha fonte inesgotável de inspição, por me fortalecer sempre nas dificuldades e por tudo o que Ele tem propiciado na minha vida.

SUMÁRIO

Item	Página
Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	ii
Lista de Tabelas	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Introdução	viii
1. Revisão da Literatura	15
1.1. Microbiologia da Fermentação Alcoólica	15
1.2. Bactérias Lácticas (Lactic Acid Bactéria – LAB)	18
1.3. Identificação e Tipagem Genética	19
1.3.1. Perfil Plasmidial	20
1.3.2. Análise de Enzimas de Restrição (REA)	21
1.3.3. Eletroforese em campo pulsátil (PFGE)	21
1.3.4. Amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD)	21
1.3.5. REP-PCR (Amplificação de elementos de DNA repetitivos bacteriano)	22
1.3.6. t DNA PCR	23
1.3.7. Ribotipagem	23
1.3.8. Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)	24
1.3.9. Sequenciamento de DNA	25
1.3.10. Considerações	28
2. Objetivos	31
3. Materiais e Métodos	32
3.1. Linhagens de <i>Lactobacillus</i> comerciais e de coleção	32
3.2. Isolamento, manutenção e identificação bacteriana	32
3.2.1. Coleta e Plaqueamento do Mosto de Cana de Açúcar	32
3.2.2. Contagem, Isolamento e Purificação das Culturas	33
3.3. Tipagem Genética	33
3.3.1. Extração de DNA	33
3.3.2. ARDRA	33
3.3.3. REP-PCR	34

3.3.4. Seqüenciamento	34
4. Resultados	54
4.1. Análise molecular das Linhagens de Coleção	54
4.2. Safra2005/2006	57
4.3. Safra 2006/2007	59
4.4. Safra 2007/2008	60
4.4.1. Destilaria Miriri	60
4.4.2. Destilaria Trapiche	62
4.4.3. Destilaria Japungu	63
4.4.4. Destilaria Giasa	65
4.5. Análise Intra-específica dos isolados	70
4.5.1. <i>Lactobacillus fermentum</i>	70
4.5.2. <i>Lactobacillus vini</i>	71
5. Discussão	72
6. Conclusões	86
7. Referências Bibliográficas	87
8. Anexos	100
Anexo 8.1: Quadro comparativo dos perfis de digestão das bactérias, do gênero <i>Lactobacillus</i> , representativas, isoladas nos processos estudados.	100
Anexo 8.2: Dados do acompanhamento da população de leveduras dos processos industriais	101
Anexo 8.3: Resumos de trabalhos apresentados e publicados em anais de Congresso	105
Anexo 8.4: Utilização da técnica de ARDRA para identificação de bactérias lácticas de fermentos comerciais utilizados na produção de iogurtes	108
9. Memorial do(a) aluno(a)	116

Lista de abreviaturas

ARDRA - Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

ITS – Regiões Espaçadoras Intergênicas

ISR – Regiões Espaçadoras Intergênicas

LAB – Lactic Acid Bactéria (Bactéria ácido láctica)

LiCl – Cloreto de Lítio

NaCl – Cloreto de Sódio

pH – Potencial Hidrogeniônico

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PFGE – Eletroforese em Campo Pulsátil

RAPD – Amplificação Aleatória do DNA Polimórfico

REA – Análise de Enzimas de Restrição

REP-PCR - Amplificação de elementos de DNA repetitivos bacteriano

rRNA – Ácido Ribonucleico ribossomal

tRNA - Ácido Ribonucleico transportador

Lista de Figuras

Texto principal

Figura 1: Fotomicrografia de três importantes representantes das bactérias lácticas.	19
Figura 2: Mapa físico do operon de RNA ribossomal bacteriano mostrando os genes codificadores dos rRNAs 5S, 16 e 23S, separados pelas regiões internas transcritas (ITS).	25
Figura 3: Exemplo representativo do uso da sequencia do gene 16S para a filogenia de <i>Lactobacillus</i> .	27
Figura 4. Amplificação da região espaçadora 16S-23S do agrupamento de genes de rDNA das amostras de bactérias lácticas da Fermentec Ltda.	54
Figura 5: Perfil de digestão dos isolados FT388B (A), FT400B (B), FT025B (C), FT337B (D) e FT008B (E) identificados com <i>L. plantarum</i> .	55
Figura 6: Perfil de digestão do isolado FT124B identificado como <i>L. fermentum</i> .	56
Figura 7: Perfil de digestão do isolado FT054B identificado como <i>A. tropicalis</i> .	56
Figura 8: Perfil de amplificação da região espaçadora 16S-23S do gene rRNA dos isolados das destilarias.	58
Figura 9: Distribuição dos isolados identificados durante a safra 2006/2007 na destilaria Japungu (%/por tempo de safra)	60
Figura 10: Distribuição dos isolados identificados durante a safra 2007/2008 na destilaria Miriri (%/por tempo de safra)	62
Figura 11: Distribuição dos isolados identificados durante a safra 2007/2008 na destilaria Trapiche (%/por tempo de safra)	63
Figura 12: Distribuição dos isolados identificados durante a safra 2007/2008 na destilaria Japungu (%/por tempo de safra)	64
Figura 13: Distribuição dos isolados identificados durante a safra 2007/2008 na destilaria Giasa (%/por tempo de safra)	66
Figura 14: Árvore filogenética construída a partir das seqüências do gene <i>pheS</i> usando o agrupamento do tipo Neighbor Joining	67
Figura 15: Árvore filogenética construída a partir das seqüências do gene	68

16S usando o agrupamento do tipo Neighbor Joining

Figura 16: Perfis de Rep-PCR obtidos dos isolados de <i>Lactobacillus fermentum</i> das destilarias Miriri e Japungu durante as safras 2005/2006 e 2006/2007	70
Figura 17: Perfis representativos de Rep-PCR obtidos dos isolados de <i>Lactobacillus vini</i> das destilarias Miriri, Trapiche, Japungu e Giasa durante a safras 2007/2008	71
Figura 18: Perfil de digestão dos isolados de <i>L. manihotivorans</i> (A) e <i>L. amylovorus</i> (B).	79
Figura 19: Perfil de digestão dos isolados de <i>L. vini</i> .	80
Figura 20: Perfil de digestão dos isolados de <i>L. “diolivorans like”</i> .	80
Figura 21: Perfil de digestão dos isolados de <i>W. paramesenteroides</i> (A) e <i>O. “kitaharae like”</i> (B).	81
Figura 22: Blast N com a sequência do isolado identificado como <i>L. manihotivorans</i> .	83
Figura 23: Blast N com a sequência do isolado identificado como <i>L. vini</i> .	84
Figura 24: Blast N com a sequência do isolado identificado como <i>L. amylovorus</i> .	85

Anexo

Figura A1: Distribuição das leveduras ao longo do processo fermentativo na destilaria Japungu na safra 2006-2007.	101
Figura A2: Distribuição das leveduras no início do processo fermentativo na destilaria Miriri na safra 2006-2007.	101
Figura A3: Distribuição das leveduras ao longo do processo fermentativo na destilaria Japungu na safra 2007-2008.	102
Figura A4: Distribuição das leveduras ao longo do processo fermentativo na destilaria Miriri na safra 2007-2008.	103
Figura A5: Distribuição das leveduras ao longo do processo fermentativo na destilaria GIASA na safra 2007-2008	104
Figura A6: Amplificação da região espaçadora 16S-23S do agrupamento de genes de rDNA das amostras de bactérias lácticas do Fermento 1.	109
Figura A7: Perfil de digestão dos isolados identificados como <i>Streptococcus thermophilus</i> .	109

Figura A8: Amplificação da região espaçadora 16S-23S do agrupamento de genes de rDNA das amostras de bactérias lácticas do Fermento 2.	109
Figura A9: Perfil de digestão dos isolados identificados como <i>Streptococcus thermophilus</i> .	110
Figura A10: Amplificação da região espaçadora 16S-23S do agrupamento de genes de rDNA das amostras de bactérias lácticas do Fermento 3.	110
Figura A11: (i) Perfil de digestão dos isolados identificados como <i>Staphylococcus epidermidis</i> . (ii) Perfil de digestão dos isolados identificados como <i>Lactobacillus delbruckii</i> .	111
Figura A12: Amplificação da região espaçadora 16S-23S do agrupamento de genes de rDNA das amostras de bactérias lácticas do Fermento 4.	112
Figura A13: Perfil de digestão dos isolados identificados como <i>Lactococcus lactis</i> .	112
Figura A14: Amplificação da região espaçadora 16S-23S do agrupamento de genes de rDNA das amostras de bactérias lácticas do Fermento 5.	113
Figura A15: (i) Perfil de digestão dos isolados identificados como <i>Lactococcus lactis</i> . (ii, iii) Perfil de digestão dos isolados não identificados.	113
Figura A16: Amplificação da região espaçadora 16S-23S do agrupamento de genes de rDNA das amostras de bactérias lácticas do Fermento 6.	114
Figura A17: Perfil de digestão dos isolados do fermento 6.	114

Lista de Tabelas

Texto principal

Tabela 1: Listagem de isolados, originados das destilarias de álcool combustível, estudados neste trabalho.	36
Tabela 2: Padrão de restrição do menor espaçador da região intergênica 16S-23S de amostras de <i>Lactobacillus</i> constante no banco de dados de Moreira <i>et al.</i> , 2005.	53
Tabela 3: Quadro comparativo da identificação dos isolados industriais de bactérias lácticas da fermentec Ltda.	57
Tabela 4: Espécies bacterianas identificadas pela técnica de ARDRA-PCR reunidas durante a safra 2005-2006.	58
Tabela 5: Espécies bacterianas identificadas pela técnica de ARDRA-PCR durante a safra 2006-2007.	59
Tabela 6: Perfis de digestão da região intergênica 16S-23S de amostras de <i>Lactobacillus</i> isolados neste trabalho que não constavam no banco de dados de Moreira <i>et al.</i> , 2005.	69
Tabela 7: Relação entre a população de leveduras, população das principais espécies bacterianas e os dados industriais em três destilarias de álcool no Nordeste.	82

Anexo

Tabela A1: Perfil de digestão das espécies de <i>Lactobacillus</i> analisadas no presente estudo.	100
Tabela A2. Quadro resumo das análises de identificação bacteriana de fermentos lácteos.	115

Resumo

Embora os episódios de contaminação bacteriana possam causar prejuízos econômicos de milhares de reais às destilarias de álcool combustível no país, até o momento não há ainda um catálogo completo de informações sobre todas as possíveis espécies bacterianas envolvidas na contaminação industrial, e poucos são os dados encontrados na literatura científica sobre contaminantes bacterianos do processo de fermentação alcoólica. O presente trabalho teve como objetivo principal estabelecer o padrão populacional de bactérias lácticas envolvidas em episódios de contaminação bacteriana do processo industrial de produção de álcool combustível no Nordeste do Brasil. Para isso foram coletadas amostras de mosto fermento durante as safras 2005-2006, 2006-2007 e 2007-2008, em destilarias nos Estados da Paraíba e de Pernambuco. A identificação dos isolados foi realizada através da técnica ARDRA e pela análise do sequenciamento de DNA dos genes *pheS* e 16S. Em termos gerais, os resultados mostraram que os principais contaminantes bacterianos do processo são os lactobacilos. A análise da dinâmica da população bacteriana nestas destilarias, principalmente a safra 2007/2008, sugere que algumas bactérias surgem no processo, contudo não conseguem se manter, como por exemplo, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentoshensis* e *Lactobacillus brevis*. Outras, contudo, surgem e se mantêm, ainda que modificando a sua frequência, como *Lactobacillus vini* e *Lactobacillus fermentum*. A detecção da presença da bactéria *L. vini* em alta proporção no processo representa um dado muito relevante, já que este é o primeiro trabalho que relata essa bactéria em processos fermentativos para produção de álcool combustível no Brasil. Alguns autores sugerem que o *Lactobacillus vini* em associação com a levedura *Dekkera bruxellensis* pode constituir um bom consórcio para produção de álcool combustível. A comparação da identificação bacteriana deste trabalho com os dados de dinâmica das diferentes espécies de leveduras mostraram uma tendência a essa associação também nas destilarias locais. Além da identificação, os isolados bacterianos de *L. fermentum* e *L. vini* foram tipados pelo REP-PCR com o “primer” (GTG)₅. Os resultados mostraram que, além da diversidade de espécies bacterianas detectadas, existe uma diversidade de linhagens dessas duas principais espécies no processo. A espécie *L. fermentum* tem sido apontada como principal contaminante em processo de fermentação alcoólica industrial, sendo algumas linhagens capazes de causar floculação em leveduras, podendo causar danos ao processo fermentativo. Trabalhos futuros visam correlacionar os diferentes perfis intra-específicos dessas espécies com algum dano do processo, visando assim traçar uma melhor estratégia de controle microbiano.

Abstract

Despite the fact that episodes of bacterial contamination can cause economic losses of up to several thousands of dollars to fuel alcohol distilleries in the country, a complete catalog on all possible bacterial species involved in industrial contamination still far from completion and there are few data in the scientific literature about bacterial contaminants in the process of alcoholic fermentation. This study aimed to establish the standard population of lactic acid bacteria involved in episodes of bacterial contamination of the industrial production of ethanol in fuel alcohol distilleries in Northeastern of Brazil. For this purpose, samples were collected from fermented must during the harvest 2005-2006, 2006-2007 and 2007-2008, in distilleries in the state of Paraíba and Pernambuco. The identification of the isolates was performed using a technique ARDRA and by sequencing the genes *pheS* and 16S. Overall, the results show that the major bacterial contaminant species in the process belong to *Lactobacillus*. Analysis of bacterial population dynamics in these distilleries, mainly the 2007/2008 harvest, suggests that some bacteria appear in the proceedings, but can not keep, such as *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus ferintoshensis*. Others, however, arising and remains, even changing its frequency, as *Lactobacillus vini* and *Lactobacillus fermentum*. The presence of the bacterium *Lactobacillus vini*, as well as its high proportion of the process is highly relevant data, since this is the first study reporting this bacterium in fermentation processes for ethanol production in Brazil. Some authors suggest that *Lactobacillus vini* in association with the yeast *Dekkera bruxellensis* can be a good consortium to produce ethanol. The comparison of both bacterial and yeast population dynamics support such interaction in the local destilleries. In addition to identifying, the bacterial isolates of *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus vini* were typed by REP-PCR with the primer (GTG)₅. The results showed that, in addition to the diversity of bacterial species detected, there is a diversity of strains of these two main species in the process. The species *Lactobacillus fermentum* has been reported as the main contaminant in the process of alcoholic industrial fermentation, and some strains can cause flocculation in yeast, which can cause some problems in the process. Future work aimed to correlate the different intra-specific profiles with some of the damage process, and therefore seeks to draw a better strategy for microbial control.

Introdução

O álcool combustível é produzido no Brasil a partir da fermentação industrial do caldo de cana e/ou melaço que ocorre a partir da metabolização da sacarose a etanol por células da levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Este processo ocorre em ambiente séptico, propenso à entrada de bactérias e outras leveduras, os chamados microrganismos selvagens. Estes microrganismos podem se instalar e promover episódios de contaminação que levam à queda no rendimento industrial. As contaminações bacterianas são normalmente controladas pelo uso de antibióticos industriais e por meio do controle do pH pela adição de ácido sulfúrico diluído durante o reciclo da biomassa nos pré-fermentadores industriais.

Nesses processos, as contaminações bacterianas têm sido apontadas como uma das principais causas da redução no crescimento e na viabilidade das leveduras, que tem como consequência a queda no rendimento de etanol. Esta queda pode ocorrer de forma direta, pelo consumo do açúcar do mosto pelas células contaminantes para a produção de ácidos e outros metabólitos, e, portanto, esta parte do substrato deixaria de ser utilizado para a produção de etanol. Ou de forma indireta, os metabólitos produzidos poderiam afetar a viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae*, interferindo na capacidade fermentativa da biomassa e ocasionando redução na produção de etanol.

Dentre os contaminantes bacterianos, as bactérias lácticas se destacam devido a sua tolerância a altas temperaturas, baixo pH, etanol e pela habilidade de crescimento rápido. Estes microrganismos fermentam o carboidrato a ácido láctico e uma pequena quantidade de ácido acético, reduzindo o rendimento de etanol e inibindo a fermentação da levedura pelo ácido láctico. Além disso, o estresse celular a que são submetidas às leveduras, faz com que suas células liberem nutrientes, particularmente aminoácidos e peptídeos, que podem estimular o crescimento bacteriano, retroalimentando os episódios de contaminação.

Portanto, importantes perdas econômicas têm sido observadas devido a episódios de contaminação bacteriana do processo, tanto com custos para controle desses episódios, quanto pela queda de rendimento e produtividade do processo.

Nesse contexto, a produção de um banco de dados genético e fisiológico sobre estas bactérias contaminantes, a exemplo do que já vem sendo feito com leveduras contaminantes em nosso laboratório, assim como, o entendimento dos efeitos das diferentes espécies bacterianas no processo de fermentação alcoólica serviria de base para o melhor controle biológico do processo, além de permitir futuros trabalhos que visem o entendimento das interações microbianas em um ambiente tão complexo como a fermentação alcoólica.

1. Revisão da Literatura

1.1. Microbiologia da Fermentação Alcoólica

O processo de fermentação industrial para produção de álcool combustível ocorre através de dois processos: a) o processo em batelada no qual toda fermentação se processa em dornas individuais com recuperação do fermento e sua reutilização em fermentações posteriores; b) o processo contínuo que consiste na fermentação através de dornas interligadas nas quais a fermentação ocorre gradualmente em vários estágios. Nesse processo também ocorre a reutilização do fermento, pois o mesmo retorna a dorna inicial depois de centrifugado juntamente com o mosto para realimentação do processo (Wheals *et al.*, 1999). Até pouco tempo as destilarias utilizavam linhagens de panificação para o início da fermentação (Silva-Filho *et al.*, 2005a; Basso *et al.*, 2008). Entretanto, dados recentes do acompanhamento da dinâmica da população de leveduras ao longo do período de safra têm mostrado que essas células não apresentam capacidade de dominância do processo e logo são substituídas por células de linhagens que são introduzidas no processo pelo substrato não-estéril (Silva-Filho *et al.*, 2005a; Basso *et al.*, 2008). Esta instabilidade causada pela constante substituição da população de leveduras pouco adaptadas ao processo pode contribuir para a instalação dos episódios de contaminação bacteriana. Entretanto, pode-se admitir também que a instalação de uma determinada espécie bacteriana ou mesmo de uma determinada linhagem bacteriana seja responsável pela instabilidade da população de levedura. Neste sentido, esforços recentes têm sido direcionados para a busca de linhagens de *S. cerevisiae* cada vez mais adaptadas aos processos industriais, que sejam resistentes aos diversos fatores físicos, químicos e biológicos ali presentes, e que apresentem alta capacidade fermentativa (Basso *et al.*, 1993; Basso e Amorim, 1996; Silva-Filho *et al.*, 2005b; Basso *et al.*, 2008).

Apesar dos esforços contínuos, episódios de contaminação bacteriana e fúngica ainda são visualizados nestes processos. O antagonismo entre leveduras e bactérias é largamente conhecido. Os produtos do metabolismo bacteriano são desvantajosos para o crescimento das leveduras, afetando o rendimento e a produtividade alcoólica (Oliva-Neto *et al.*, 2004). É possível que a presença de certas espécies bacterianas sejam responsáveis pela instalação de eventos de contaminação por várias espécies de leveduras que já foram detectadas no ambiente industrial (Basílio *et al.*, 2008), com especial atenção para *Dekkera bruxellensis* que foi identificada como a principal levedura contaminante das destilarias de álcool do Nordeste do Brasil (de Souza-Liberal *et al.*, 2007). Também há relatos de contaminações severas por leveduras *D. bruxellensis* em destilarias de álcool dos EUA e Canadá, onde se utiliza amido de milho como matéria-prima (Abbott *et al.*, 2005), ou ainda na Europa, onde o substrato é

beterraba açucareira (de Miniac, 1989; Ciani *et al.*, 2003). Linhagens de *D. bruxellensis* são utilizadas por séculos para a fabricação da cerveja *Lambic* tradicional da Bélgica (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003), embora seu sabor muito forte seja pouco apreciado fora daquele país. Além do mais, da mesma forma que relatamos sua presença como episódios de contaminação das destilarias, as análises de laboratório nos mostraram que essa levedura também produz etanol em rendimentos comparáveis àqueles de *S. cerevisiae*, sendo seu maior problema a baixa produtividade que causa problemas operacionais na indústria (de Souza-Liberal *et al.*, 2007). Passoth e colaboradores (2007) mostrou a capacidade de *D. bruxellensis* de se estabelecer e produzir etanol em uma destilaria na Suécia que utiliza mosto de cereais, isto em associação com a bactéria *Lactobacillus vini*. Este é um exemplo do que foi apontado acima como possibilidade de que a presença de uma determinada bactéria possa facilitar e estimular o desenvolvimento de uma levedura contaminante no processo.

A contaminação bacteriana é a principal causa para redução do crescimento e da viabilidade da levedura, sendo o grupo das bactérias lácticas o mais persistente em processo de contaminação devido à tolerância a alta concentração de etanol, baixo pH, altas temperaturas e por fim por sua habilidade de sobreviver no ambiente de fermentação alcoólica (Narendranath *et al.*, 1997, 2000). Dentre as bactérias lácticas, destacam-se os *Lactobacillus* como o gênero predominante dentre os contaminantes isolados do processo de industrial de fermentação alcoólica, pois muitas espécies *Lactobacillus* são capazes de crescer em concentrações de etanol acima de 10% (vol/vol) (Narendranath *et al.*, 1997, 2000). Os contaminantes podem originar-se da dorna de fermentação, linhas de transporte, trocadores de calor, do caldo de cana não tratado ou melaço e até mesmo do caldo de cana tratado, e até do próprio fermento (Narendranath *et al.*, 1997). Contudo, o número desses contaminantes pode ser significativamente reduzido através da limpeza e higienização dos equipamentos, temperaturas acima de 70°C, pasteurização e esterilização química do substrato (Narendranath *et al.*, 1997). Alguns processos foram desenvolvidos para o controle de contaminações bacterianas durante o processo de fermentação alcoólica. Um dos processos mais conhecido é a lavagem das células coletadas do processo fermentativo com ácido sulfúrico diluído. Contudo, apesar de obter bons resultados em processos descontínuos, essa metodologia não apresenta a mesma eficiência em processos contínuos (Chang *et al.*, 1997).

Outro método é a utilização de antibióticos de formulação industrial como a penicilina, estreptomicina, tetraciclina, virginiamicina ou mistura deste. Esta, entretanto, se constitui numa metodologia dispendiosa. Além disso, a utilização de antibióticos em escala industrial está relacionada com a questão de que estes não podem deixar resíduos no processo. E ainda, o mau uso destes produtos pode contribuir para a construção de um reservatório de

resistência bacteriana, promovendo assim uma busca por métodos alternativos para o controle de contaminação bacteriana nestes processos (Narendranath *et al.*, 2000). É neste contexto que surgem alternativas, embora que ainda sejam pouco conhecidos os mecanismos de ação, como a utilização de peróxido de hidrogênio e sulfito no controle destas contaminações (Chang *et al.*, 1997; Narendranath *et al.*, 2000).

A maioria dos estudos recentes tem empregado simulações em laboratório que utilizam culturas puras de leveduras e bactérias específicas ou seus produtos inibidores. Culturas puras de *S. cerevisiae* são claramente estressadas pela adição de ácido acético e láctico, resultando em diminuição no crescimento e viabilidade celular e na produção de etanol (Narendranath *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2002). Simulações de infecções bacteriana em fermentação de malte por *L. brevis*, *L. plantarum*, ou *Leuconostoc sp.* resultaram em um aumento da acidez devido ao ácido láctico, e reduziu a produção de etanol e o crescimento da levedura. *Lactobacillus casei var. pseudoplantarum* proliferou em um modelo de fermentação de melaço de beterraba, produzindo ácido láctico e ácido acético, inibindo a produção de etanol (Skinner e Leathers, 2004). Em um modelo de batelada alimentada de fermentação do melaço, *L. fermentum* produziu ácido láctico em níveis capazes de inibir fortemente a fermentação de leveduras após alguns ciclos de célula (Oliva-Neto e Yokoya, 1994). Quando 10^5 a 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) de *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, ou *L. fermentum* foram introduzidos em fermentações do trigo, foram observadas reduções na produção de etanol de até 7,6%, dependendo da espécie bacteriana e do tamanho do inóculo (Narendranath *et al.*, 1997). Por outro lado, dados contraditórios mostram que a fermentação do trigo não foi seriamente prejudicada na produtividade em etanol quando infectada artificialmente com *L. fermentum* ou *L. delbruekii* na concentração de 10^8 UFC/ml (Skinner e Leathers, 2004). Thomas *et al.* (2001) constataram que suspensões de células de *L. collinoides*, *L. fermentum*, *L. plantarum* e *L. paracasei subsp. paracasei* na concentração de 10^7 células/ml não afetaram a viabilidade celular e a capacidade fermentativa das células de *S. cerevisiae* em fermentação de milho. No entanto, foi observada uma redução de até 22% na produção de etanol quando as bactérias foram pré-cultivadas no mosto por 24 h para concentrações maiores do que 10^9 células/ml (Thomas *et al.*, 2001).

Recentemente, um modelo simples para simular a contaminação bacteriana e infecção foi desenvolvido usando células de *S. cerevisiae* cultivadas em mosto de milho sacarificado e cepas de bactérias lácticas isoladas da fermentação de etanol a partir de grãos secos (Brischoff *et al.*, 2009). Desafiando o modelo com 10^8 células/mL de *Lactobacillus fermentum* foram detectadas a diminuição de 27% na produção de etanol e aumento de 6,2 a 45,5 g/L da glicose residual. A magnitude do efeito foi proporcional a carga bacteriana inicial, com 10^5

células/mL de *L. fermentum* ainda produzindo uma diminuição de 8% em etanol e um aumento de 3,2 vezes da glicose residual. A infecção foi também dependente das espécies de bactérias utilizadas, já que nem *L. delbrueckii* ATCC 4797 nem *L. amylovorus* 0315-7B produziu uma redução significativa em etanol quando inoculados a uma densidade de 10^8 células/mL (Brischoff *et al.*, 2009). Portanto, o efeito da contaminação pode depender do contaminante específico e das condições de cultura.

1.2. Bactérias Lácticas (“Lactic Acid Bacteria” – LAB)

As bactérias lácticas são bactérias gram-positivas, catalase-negativa, que crescem em condições de microaerofilia a condições estritamente anaeróbicas, não formam esporos, são desprovidas de citocromo e apresentam baixo conteúdo de guanina e citosina no DNA (menor do que 50%). Esse grupo inclui um grande número de gênero, tais como: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (Klein *et al.*, 1998; Holzapfel *et al.*, 2001).

As bactérias lácticas são encontradas em diferentes habitats como laticínios, vegetais, carnes, no solo, água, adubo, água de esgoto, em fermentações lácticas (produção de queijo, iogurtes, manteiga) e alcoólicas (produção de álcool combustível, vinho, uísque). Essas bactérias são encontradas ainda no trato digestivo humano, na cavidade oral, na vagina. (Morea *et al.*, 1998, Holzapfel *et al.*, 2001 ; Simpson *et al.*, 2001 ; Du Plessis *et al.*, 2004). São tipicamente quimiotróficas e fermentam carboidratos produzindo principalmente ácido láctico como produto final. Algumas de suas características são de interesse para sua função como probiótico, cuja pré-condição é sobreviver no trato intestinal (Klein *et al.*, 1998).

Entre as espécies úteis ao homem podem se destacar as do gênero *Lactobacillus*. Estas bactérias contribuem para a fermentação de diversos produtos vegetais (pickles, azeitonas, chucrute), a acidificação e fermentação da farinha do pão e outros produtos de pastelaria, a fermentação da forragem ensilada, a produção de iogurte, kefir e queijos, estando igualmente presente no vinho, cidra, cerveja, uísque de malte e outras bebidas fermentadas. As espécies de *Lactococcus* estão envolvidas na fabricação da manteiga e de muitas variedades de queijo, enquanto as espécies de *Oenococcus* predominam na fermentação do vinho e da cidra (Figura 1). Já as espécies de *Leuconostoc* (Figura 1) e *Weissella* contaminam e degradam produtos animais (carne) e vegetais. O esverdeamento da carne estragada é uma consequência da produção de peróxido de hidrogênio por estas bactérias. Algumas espécies são, no entanto, utilizadas na preparação de manteiga, queijos, pickles, chucrute e bebidas fermentadas tropicais. Também *Pediococcus*, presente na fermentação de diversos produtos vegetais

(azeitonas, pepinos, feijão) ou animais (carne, queijo, peixe), pode ser usado na preparação e conservação de alimentos vegetais ou derivados de carne (Slonczewski e Foster, 2008).



Figura 1: Fotomicrografia de três importantes representantes das bactérias lácticas. *Lactococcus lactis* (painel A), a bactéria mais comum na fermentação do leite e na produção de queijos; *Oenococcus oeni* (painel B), a principal bactéria implicada na fermentação do vinho; *Leuconostoc mesenteroides* (painel C), usados na produção do chucrute e outros produtos vegetais fermentados (www.almargem.org/images/articles/113/Lactobacilos).

A taxonomia LAB foi por muito tempo baseada principalmente em apenas critérios fisiológicos, contudo desde a descrição dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em 1986, muitos desses grupos taxonômicos tem passado por grandes mudanças (Klein *et al.*, 1998; Holzapfel *et al.*, 2001). Atualmente a taxonomia das bactérias não utiliza apenas características fisiológicas, ela é baseada em características fenotípicas e genômicas reveladas em nível molecular. Quando combinadas, essas técnicas têm se mostrado capazes de diferenciar espécies que são fenotipicamente muito semelhantes, mas que são um pouco diferentes ao nível de genótipo (Klein *et al.*, 1998; Holzapfel *et al.*, 2001). Portanto, a taxonomia então chamada de polifásica, por associar diversas técnicas tanto a nível intra como interespecífico, tem se mostrado capaz de resolver problemas antigos da taxonomia e tem se mostrado confiável, uma vez que essas bactérias são muito utilizadas como probiótico, sendo de extrema importância uma classificação mais acurada desse grupo (Klein *et al.*, 1998; Holzapfel *et al.*, 2001).

1.3. Identificação e Tipagem Genética

Diferentes técnicas têm sido aplicadas a bactérias lácticas como ferramentas para a identificação e diferenciação inter e intra-específica. A maior vantagem dessas técnicas de tipagem está baseada no polimorfismo de DNA e no seu alto poder discriminatório, cuja aplicabilidade é universal. Essas metodologias vêm permitindo a diferenciação de linhagens muito próximas e com características fenotípicas similares.

Entre as técnicas moleculares as que são mais aplicadas para diferenciação de bactérias lácticas, principalmente aquelas que são utilizadas como probióticos, são: perfil plasmidial, análise de enzimas de restrição, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD), REP-PCR, sequenciamento, entre outras (Klein *et al.*, 1998; Holzapfel *et al.*, 2001; Gevers *et al.*, 2001).

1.3.1. Perfil Plasmidial

Para bactérias lácticas, o perfil plasmidial era considerado útil para a tipagem de linhagens dentro de uma espécie. A presença de plasmídeos nas espécies de lactobacilos tem sido demonstrada desde que estes foram descobertos pela primeira vez (Chassy *et al.*, 1976). A existência de plasmídeos em linhagens da espécie *Lactobacillus plantarum* isolados de carne, queijo e silage tem sido demonstrada (Nes, 1984; West e Warner, 1985; Hill e Hill, 1986; Mayo *et al.*, 1989), mas a maioria desses plasmídeos são, no entanto, ainda crípticos (Ruiz-Barba *et al.*, 1991).

Ruiz-Barba e colaboradores (1991) estudaram perfis plasmidiais de 35 isolados de *Lactobacillus plantarum* obtidos de diferentes fermentadores de azeitona verde com uma grande variabilidade tanto no número (5 a 16) como no tamanho (2 a 68 kb), mas em geral plasmídeos com baixo peso molecular predominaram sobre os plasmídeos com alto peso molecular. Posteriormente, Duffner e O'Connell (1995) estudaram 72 isolados de *Lactobacillus plantarum*, sendo detectado plasmídeos em 56 deles. Nenhum plasmídeo foi detectado em 16 isolados após inúmeras tentativas, sendo que 15 deles depois foram confirmados como sendo pertencentes à mesma linhagem pela técnica de ribotipagem. Dos isolados que continham plasmídeos, 25 diferentes perfis foram identificados e os isolados foram agrupados de acordo com esses perfis. Apesar de o perfil plasmidial ser altamente discriminatório (23 dos isolados puderam ser diferenciados por esta técnica), a ausência de plasmídeos nos 16 isolados (um subgrupo que demonstrou depois conter duas diferentes linhagens), compromete seu uso para tipagem de linhagens. Isso é corroborado para alta instabilidade comprovada para alguns plasmídeos de *Lactobacillus plantarum* (Hill e Hill, 1986). Portanto, como resultado da instabilidade do DNA extracromossomal, métodos que utilizam o DNA cromossomal, têm sido mais utilizados por demonstrar melhores resultados.

1.3.2. Análise de Enzimas de Restrição (REA)

Essa metodologia envolve a digestão do DNA cromossomal com endonucleases de restrição. Os fragmentos obtidos são geralmente separados em gel de agarose em uma eletroforese convencional. Isto resulta em um complexo padrão de bandas onde os fragmentos variam entre 1000 e 20000 bp. A complexidade no padrão de bandas gerado dificulta a análise visual, sendo necessário a utilização de programas computacionais de análise multivariante (Charteris *et al.*, 1997). O método de REA tem sido aplicado com sucesso para diferenciação de linhagens de *L. acidophilus* (Roussel *et al.*, 1993), *L. cassei* e *L. rhamnosus* (Ahrné e Molin, 1997) e *L. reuteri* (Stahl e Molin, 1994; Ahrné e Molin, 1997).

1.3.3. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Esse tipo de eletroforese envolve mudanças periódicas na orientação do campo elétrico, o que permite a separação de fragmentos de DNA com alto peso molecular. A técnica de PFGE permite o uso de enzimas de restrição que reconhecem sítios de baixa proporção no genoma, as quais geram um pequeno número de fragmentos (5 a 20 fragmentos grandes e de boa resolução que variam entre 10 a 800 kb), resultando em um padrão de bandas de fácil interpretação. Esta consiste em um método com alto poder discriminatório e reprodutível, e tem sido usado para diferenciar linhagens de importantes bactérias probióticas, como *bifidobacteria*, *L. casei*, *L. acidophilus* (Roussel *et al.*, 1993; Ferrero *et al.*, 1996; Roy *et al.*, 1996; Holzapfel *et al.*, 2001). Em muitos estudos com *Lactobacillus*, o PFGE tem se mostrado como um método poderoso para tipagem de linhagens, sendo também utilizado em estudos epidemiológicos. Contudo consiste em uma técnica laboriosa e cara, e apenas um limitado número de amostras pode ser analisado ao mesmo tempo (Ventura e Zink, 2002).

1.3.4. Amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD)

Essa técnica consiste na amplificação de seqüências do genoma através de “primers” pequenos com seqüências arbitrárias que a baixas temperaturas hibridizam em locais distribuídos aleatoriamente no genoma do organismo-alvo. Tem como vantagem o fato de que não se necessita de conhecimento específico do genoma a ser estudado, contudo seu aspecto negativo consiste na sua baixa reprodutibilidade, necessitando de condições cuidadosamente controladas. A RAPD vem sendo utilizada na caracterização de bactérias lácticas de processos fermentativos tais como para produção de pickles (Seseña *et al.*, 2004) e produção de uísque

(Simpson *et al.*, 2001). Van Reenen e Dicks (1996) utilizaram esta metodologia para diferenciar *L. plantarum* e *L. pentosus* que apresentavam padrões similares para assimilação de açúcares, contudo apresentaram padrões distintos para o RAPD.

1.3.5. REP-PCR (Amplificação de elementos de DNA repetitivos bacteriano)

Seqüências de DNA repetitivo altamente conservadas, como elementos repetitivos extragênicos palindrômicos (REP), elementos repetitivos intragênicos consensus em enterobactérias (ERIC) e elementos BOX, parecem ser amplamente distribuídos nos genomas de vários grupos de bactérias. A amplificação das seqüências entre cada um destes elementos repetitivos tem sido utilizada para gerar perfis de DNA de várias espécies bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas (De Vuyst *et al.*, 2008). Além disso, as seqüências com unidades de repetição (GTG)₅ parecem ser amplamente distribuídos nos genomas de diversos grupos de bactérias, como a amplificação das seqüências entre estes elementos repetitivos gerou padrões de impressões genéticas (DNA *fingerprints*) específicos para diversas espécies de lactobacilos (Gevers *et al.*, 2001) e enterococos (Švec *et al.*, 2005), permitindo uma especiação e tipagem rápida e confiável.

Segundo Gevers *et al.* (2001), a REP-PCR consiste em uma técnica com alto poder discriminatório, baixo custo, adequada para discriminação de linhagens e pode ser considerada como uma ferramenta confiável para a classificação e tipagem de uma grande variedade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. A técnica REP-PCR usando o iniciador (GTG)₅ é uma ferramenta rápida, de fácil performance, e reprodutível para a diferenciação de uma grande variedade de *Lactobacillus* associados a alimentos nos níveis de espécie, subespécie e, potencialmente, até de linhagem, com um protocolo de desempenho simples. Esta técnica consiste em uma ferramenta genotípica promissora para detecção de especiação e tipagem rápida e confiável de lactobacilos e outras LAB em indústrias de fermentação.

Segundo De Vuyst *et al.* (2008), o iniciador (GTG)₅ permitiu a identificação da impressão genética das bactérias do ácido acético (AAB – “Acetic Acid Bacteria”) em um dia de trabalho e pode ser usado para a classificação e identificação de AABs no nível de espécies, bem como para caracterização de isolados AABs em nível intraespecífico. O uso do iniciador (GTG)₅ pode rapidamente aumentar o nosso conhecimento a cerca da ecologia e biodiversidade tanto das LABs como das AABs e nos ajudar a determinar com mais precisão o seu comportamento de crescimento e benéficos ou indesejáveis papel durante as várias etapas da fermentação dos alimentos.

1.3.6. tDNA-PCR

A técnica da tDNA-PCR consiste na amplificação de regiões espaçadoras intergênicas dos genes que codificam tRNA, os quais ocorrem em múltiplas cópias dispersas por todo genoma (Welsh e McClelland, 1991). A realização de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando um “primer” simples que contém seqüências consenso do tRNA, ou mesmo um par de “primers” externos aos genes de tRNA, amplifica um conjunto de fragmentos de DNA cujo padrão é geralmente espécie-específico, embora espécies próximas possam, por vezes, produzir padrões de amplificação semelhantes. A impressão genômica gerada é bastante conservada dentro de uma espécie, e em bactérias, muitos dos produtos dessa impressão estão conservados em espécies intimamente relacionadas. Sendo assim, a tDNA-PCR, utilizando “primers” consensos do gene tRNA, pode auxiliar na identificação de espécies e gêneros (Welsh e McClelland, 1991). Esta técnica tem sido aplicada para *Staphylococci* (Maes *et al.*, 1997), *Streptococci* (De Gheldre *et al.*, 1999) e *Legionella* (De Gheldre *et al.*, 2001). Associada com a eletroforese por capilaridade, a tDNA-PCR tem sido aplicada para espécies de *Listeria* (Vanechoutte *et al.*, 1998), *Enterococci* (Baele *et al.*, 2000) e *streptococci* (Baele *et al.*, 2001). Baele *et al.* (2002) avaliaram a aplicabilidade desta técnica associada à eletroforese de capilaridade para uma identificação rápida de *lactobacillus*, conseguindo distinguir 22 isolados de *Lactobacillus* ao nível de espécie, baseando-se apenas em um único padrão de impressão do tDNA.

1.3.7. Ribotipagem

A técnica da ribotipagem se baseia na hibridização do tipo Southern Blot de fragmentos de restrição do DNA cromossômico com sondas para os genes 23S e 16S rRNA. Em geral, o padrão obtido é mais estável e de melhor interpretação que o padrão gerado pelo REA (Charteris *et al.*, 1997). Outra vantagem estar na alta reprodutibilidade desta técnica e na possibilidade de se utilizar uma sonda universal para todas as espécies, devido à similaridade dos genes ribossomais (Grimont e Grimont, 1986; Pot *et al.*, 1993; Holzapfel *et al.*, 2001). O acúmulo de informações relacionado com as seqüências dos genes que codifica o 16S rRNA e o conhecimento obtido a cerca da região espaçadora intergênica dos genes 16S-23S rRNA tem permitido a identificação de LABs utilizando oligonucleotídios como sondas ou através de PCR (Chagnaud *et al.*, 2001). A ribotipagem vem sendo utilizada para estudar e caracterizar linhagens e diferentes espécies de bactérias lácticas encontradas na mucosa

vaginal, no processo de fabricação do queijo mussarela, na produção de uísque, processo de fermentação do vinho, dentre outros (Morea *et al.*, 1998, Simpson *et al.*, 2001, Pavlova *et al.*, 2002, Du Plessis *et al.*, 2004). Contudo, a escolha de uma enzima de restrição adequada é de extrema importância e diferentes padrões de ribotipagem podem ser obtidos pelo uso de diferentes enzimas. Björkroth e Korkeala (1996) identificaram *EcoRI*, *HindIII* e *ClaI* como as que melhores resultados foram obtidos entre 11 testadas para diferenciação de linhagens de *Lactobacillus sake*. Contudo, a técnica de ribotipagem é mais apropriada para a discriminação em nível interespecífico do que a nível intra-específico (Holzapfel *et al.*, 2001).

1.3.8. Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)

A técnica de ARDRA consiste na análise do perfil de digestão do produto da PCR da região ITS do loco de rDNA (Figura 2). O perfil gerado por ARDRA é distinto entre os grupos, podendo se diferenciar dentro de um mesmo grupo. Essa técnica tem se mostrado uma ferramenta importante na identificação de bactérias, e de linhagens dentro das espécies, pois nem sempre os métodos clássicos baseados nas características bioquímicas e/ou morfofisiológicas geram resultados claros e confiáveis (Dubernet *et al.*, 2002; Collado e Hernández, 2007). Assim como a ribotipagem, a ARDRA faz uso da análise dos genes ribossomais que carregam consigo informações úteis sobre a relação evolutiva e de parentesco entre as bactérias (Miteva *et al.*, 2001). Esta metodologia combina facilidade, rapidez, especificidade e sensibilidade, sendo mais acurada do que as metodologias comumente utilizadas nos laboratórios para a identificação de bactérias e se mostra bastante eficiente na diferenciação das espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* (Miteva *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2005; Collado e Hernández, 2007).

A técnica de ARDRA foi utilizada com sucesso na diferenciação das espécies de bactérias produtoras de ácido acético destituídas de variações intraespecíficas indicando que a alta variabilidade da sequência 16S-23S ITS nestas bactérias pode ser utilizadas para fazer a identificação e classificação taxonômica de linhagens ou de grupos relatados dentro das próprias linhagens de bactérias (Ruiz *et al.*, 2000; Shang *et al.*, 2003). Nesse sentido, a utilização de sondas espécie-específicas têm proporcionado a diferenciação intraespecífica de *L. delbrueckii* pela análise do perfil de restrição do 16S gerado com a enzima *EcoRI*. Assim, foi possível diferenciar linhagens de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaris* de linhagens do complexo *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*/*L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Miteva *et al.*, 2001).

A metodologia da ARDRA constitui uma técnica específica e reprodutível para a identificação de LABs ao nível de espécie (Moreira *et al.*, 2005). Em geral, espécies do

gênero *Lactobacillus* apresentam três bandas de amplificação, correspondendo às três regiões espaçadoras (pequena, média e grande regiões espaçadoras) do loco 16S-26S, similar as encontradas nas espécies dos gêneros *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc* e *Weissella*. Estas diferenças nos tamanhos são devido a inserção do gene do tRNA-Ala dentro do espaçador médio ou dos genes de tRNA-Ala e tRNA-Ile dentro do espaçador maior. *Bifidobacteria*, *Enterococci*, *Streptococci* e *Staphylococci* apresentam padrões de amplificação com uma banda ou duas com tamanhos diferentes, também devido a inserção dos genes dos tRNA (Moreira *et al.*, 2005). Com isso, a técnica de ARDRA poderá ser utilizada na análise da população bacteriana associada a produção de etanol para a identificação dos contaminantes bacterianos presentes no processo de fermentação alcoólica. Por se tratar de uma técnica rápida, com alta sensibilidade e precisa para a identificação de LABs.

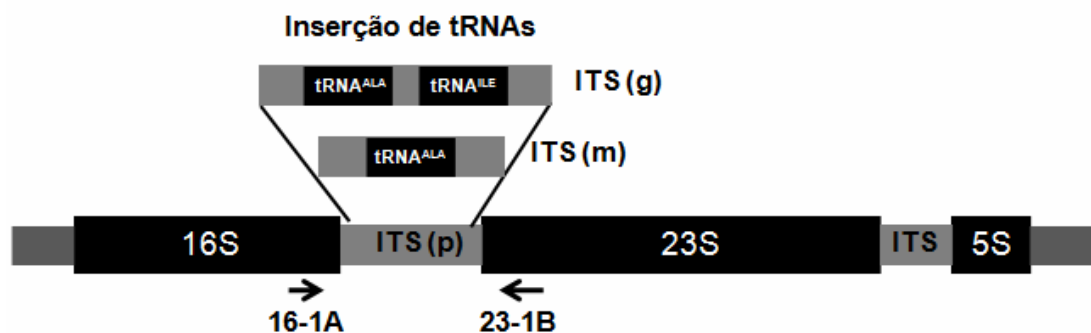


Figura 2. Mapa físico do operon de RNA ribossomal bacteriano mostrando os genes codificadores dos rRNAs 5S, 16 e 23S, separados pelas regiões internas transcritas (ITS). A região ITS entre os genes 16S e 23S é classificada como pequena (ITS_p) quando não possui inserções, ITS média (ITS_m) quando apresenta a inserção de uma cópia do gene de tRNA^{ALA} e ITS grande (ITS_g) quando apresenta uma cópia de cada um dos genes tRNA^{ALA} e tRNA^{Ile}. Essa região é amplificada com o uso dos primers 16-1A e 23-1B.

1.3.9. Sequenciamento de DNA

Macromoléculas têm sido descritas como documentos de história evolutiva e ao longo de décadas têm sido utilizadas para explorar a diversidade filogenética e a relação evolutiva dos organismos. RecA é uma pequena proteína (352 aminoácidos em *Escherichia coli*) envolvida no processo de recombinação homóloga do DNA, na indução do sistema SOS, e indução dos mecanismos de reparação de lesões no DNA (Eisen, 1995; Torriani *et al.*, 2001). Devido a sua importância o gene *recA* é amplamente distribuído entre as espécies bacterianas, e o produto desse gene tem sido proposto como um marcador filogenético para espécies (Lloyd e Sharp, 1993; Eisen, 1995; Torriani *et al.*, 2001). Torriani *et al.* (2001) aplicaram esta

metodologia com sucesso para diferenciação de três espécies do grupo *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*, *L. pentosus* e *L. paraplantarum*) e também mostraram o alto poder discriminatório desse gene para separar espécies de difícil diferenciação, tais com *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium infantis*. Isto valida a utilização desse gene como um marcador filogenético-taxonômico para espécies relacionadas e abre uma nova possibilidade para uma rápida e segura identificação das bactérias lácticas de importância para alimentação.

Entretanto, o gene 16S rRNA ainda é o alvo mais comum nos estudos de diversidade bacteriana. Trata-se de um marcador bem-conservado, universal com função bem definida que era estabelecida na fase inicial da sua evolução e é relativamente pouco afetado por pressões ambientais. Estes fatos, junto com o tamanho do gene, o torna um bom relógio evolutivo (Kimura *et al.*, 1997; Mohania *et al.*, 2008). Embora o gene 16S rRNA seja considerado um marcador universal e bem-conservado, existem algumas deficiências associadas à sua utilização. Primeiro, os genes 16S rRNA são tão bem conservados que resulta em um poder de resolução limitado (Achenbach *et al.*, 2001; Mohania *et al.*, 2008). Em segundo lugar, embora o gene 16S rRNA seja um marcador universal, diferentes espécies de bactérias têm diferentes números de cópias do gene. Isto leva a uma sobre- ou sub-representação de algumas espécies bacterianas quando se usa os genes 16S rRNA como alvos. Além disso, muitos genes diferentes do gene 16S rRNA foram também explorado em estudos de diversidade bacteriana. Alguns destes são genes universais que cada bactéria possui, mas com a única diferença genética sequencial. A maioria destes genes universais são bem conservados na medida em que desempenham funções semelhantes em todas as bactérias. Alguns destes genes são táxons específicos, o que revela uma maior diversidade genética entre espécies estreitamente relacionadas, isto é, tais genes fornecem uma melhor visão da relação filogenética (Chang *et al.*, 2001; Mohania *et al.*, 2008).

Genes informativos como o gene 16S RNAr são comumente considerados confiáveis marcadores filogenéticos para atribuir relações evolutivas entre as espécies do gênero *Lactobacillus* (Schleifer e Ludwig, 1995; Naser *et al.*, 2007) (Figura 3), embora por vezes não permitam a identificação de espécies estreitamente relacionadas. O uso de genes classificados como *housekeeping* está emergindo como uma alternativa para superar esses problemas (Stackebrandt *et al.*, 2002; Santos e Ochman, 2004; Naser *et al.*, 2007). Recentes estudos *in silico* baseados em genomas completos têm fornecido a base para o estabelecimento de conjuntos de genes *housekeeping* que pode prever com exatidão o parentesco gênico e melhorar a precisão das identificações das espécies. A necessidade de marcadores genômicos alternativos que proporcionam maiores níveis de discriminação que o

gene 16S rRNA tem levado a um seqüenciamento mais sistemático de genes *housekeeping* (Coenye *et al.*, 2005; Gevers *et al.*, 2005; Konstantinidis e Tiedje, 2005; Naser *et al.*, 2005a, 2005b, 2007; Thompson *et al.*, 2005; Zeigler, 2003).

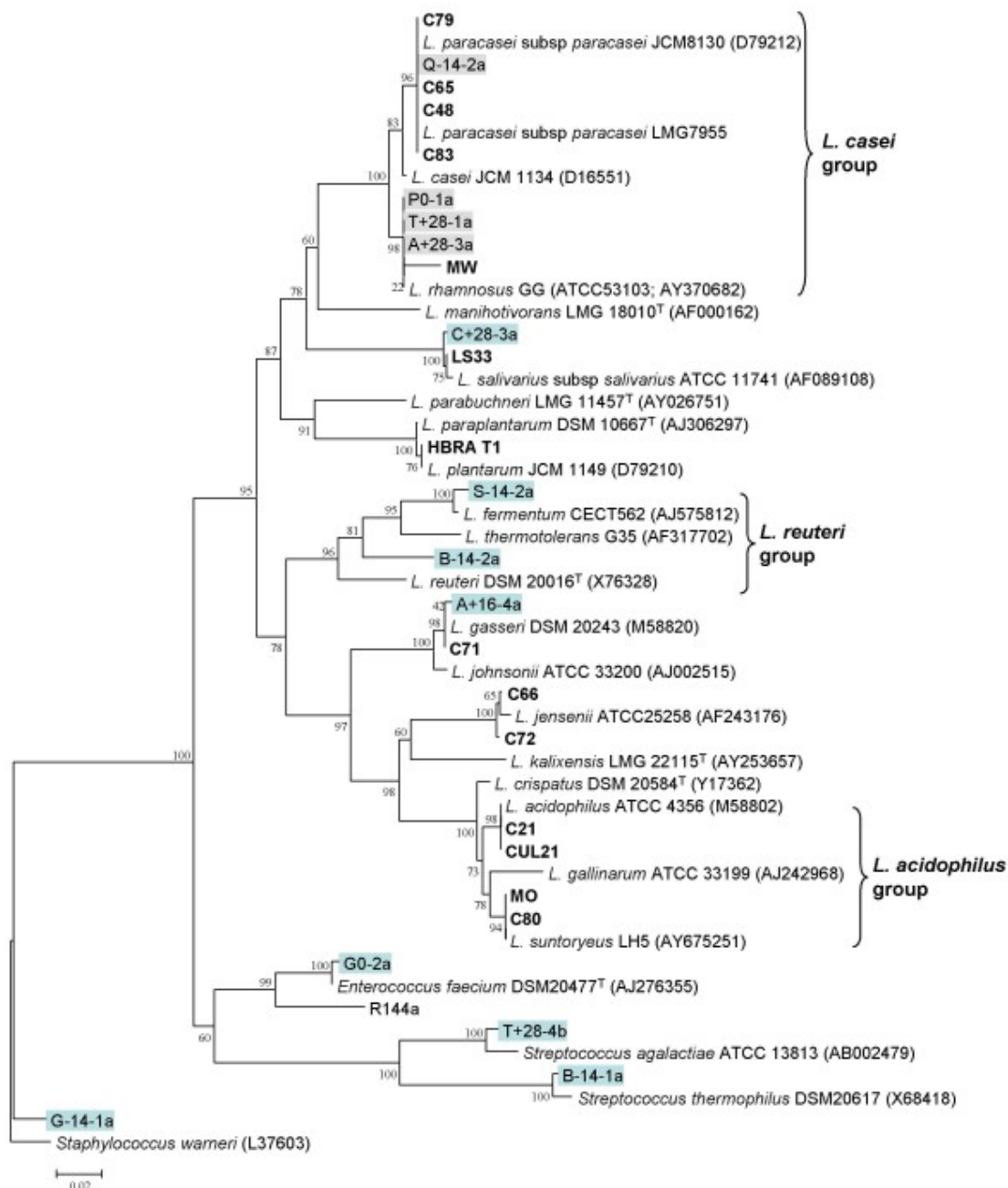


Figura 3. Exemplo da discriminação filogenética de lactobacilos isolados de preparações comerciais de probióticos utilizando o seqüenciamento do gene rDNA 16S (Reproduzido de Mehanthiralingam *et al.* BMC Microbiology 2009, 9: 251).

Para ser utilizado para a discriminação de espécies, os genes devem estar presentes em uma única cópia, evoluir mais rapidamente do que o gene do RNA ribossomal (rRNA) e ser amplamente distribuído entre os genomas bacterianos. Aqueles genes em que a recombinação

poderá conferir uma vantagem seletiva, ou genes estreitamente ligados, devem ser evitados. Além disso, esses genes devem ser informativos com um grau adequado de resolução e fornecerem variabilidade suficiente para diferenciar espécies de um determinado gênero (Zeigler, 2003; Naser *et al.*, 2007). O uso de genes *housekeeping* como o gene que codifica a enzima fenilalanina-tRNA sintetase bacteriana (gene *pheS*) e a subunidade α da RNA polimerase (*rpoA*) provou ser um sistema robusto para a identificação de todas as espécies reconhecidas do gênero *Lactobacillus* (Naser *et al.*, 2007). A análise dos gene *pheS* e *rpoA* permite efetivamente que as espécies de *Lactobacillus* intimamente relacionados sejam diferenciados em um alto nível de discriminação do que o possível comparando seqüências do gene 16S rRNA.

1.3.10. Considerações

Tradicionalmente, as bactérias lácticas eram classificadas com base em características fenotípicas, tais como: morfologia, fermentação em glicose, fermentação em diferentes carboidratos, crescimento em diferentes temperaturas. Mais recentemente, as técnicas de biologia molecular têm obtido espaço e importância neste contexto. Contudo, as técnicas disponíveis apresentam vantagens e limitações, necessitando, por isso, de se buscar novos marcadores que apresentem nível elevado de discriminação, e que ao mesmo tempo sejam empregados como ferramentas seguras e viáveis no acompanhamento destas em processos industriais e na alimentação. Nesse contexto, a taxonomia polifásica, que combina as características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas com as técnicas de biologia molecular, parece a melhor opção para a identificação das bactérias lácticas. Com isso, os microbiologistas buscam chegar a um consenso de classificação integrando diferentes tipos de dados e informações dentro de uma entidade de classificação biológica que contém um mínimo de contradições (Vandamme *et al.*, 1996). Isso inclui dados fenotípicos (por exemplo, os resultados dos testes bioquímicos, composição de ácidos graxos), os dados genotípicos (por exemplo, o DNA fingerprinting) e informações filogenéticas (por exemplo, seqüências de genes rRNA) (Gevers *et al.*, 2005).

Atualmente, uma espécie procariótica é definida como uma categoria que circunscreve, preferencialmente, um grupo genomicamente coerente de isolados/linhagens individuais que partilha de um elevado grau de semelhança em muitas características independentes, testadas comparativamente sob condições altamente normalizada (Stackebrandt *et al.*, 2002; Gevers *et al.*, 2005). Praticamente, uma espécie procariótica é considerada como um grupo de amostras (incluindo a cepa tipo) que se caracterizam por certo grau de consistência fenotípica,

mostrando 70% de hibridização DNA-DNA (DDH, DNA–DNA hybridization) e mais de 97% de identidade da sequência do gene ribossomal 16S RNA (rRNA) (Vandamme *et al.*, 1996; Gevers *et al.*, 2005).

Desde a década de 1970, espécies procarióticas foram descritas com base em dados produzidos em experimentos de hibridização DNA-DNA. Nesta abordagem, a similaridade genética entre isolados é avaliada pelo grau em que seus genomas hibridizam sob condições padronizadas. Isolados que demonstram mais de 70% DDH e valores menores que 5% de diferença em sua temperatura de desnaturação (ΔT_m) são considerados como pertencentes à mesma espécie (embora este valor limite pode ser ajustado pelos especialistas que estão familiarizados com a excentricidade de cada um dos grupos taxonômicos). Com isso, os isolados que compartilham menos que 50% de DDH devem pertencer a espécies diferentes. Para facilitar a identificação são necessárias consistência fenotípica dentro da espécie e as diferenças entre as espécies. A análise comparativa da sequência do gene 16S rRNA é amplamente utilizado para determinar a posição filogenética do isolados. Estirpes que mostram menos do que 97% de similaridade com sequências de 16S rRNA de todas as espécies conhecidas são consideradas como pertencentes a uma nova espécie, já que os dados experimentais se correlacionam com o critério de corte adotado para a técnica de DDH (Gevers *et al.*, 2005).

Na prática, a caracterização taxonômica de uma coleção de isolados começa com uma seleção que permite que os isolados mais estreitamente relacionados sejam agrupados e sejam distinguidos dos isolados não relacionados. Muitas vezes os métodos utilizados incluem análise de ácidos graxos (um método quimiotaxonômico em que os lipídios presentes nas células bacterianas são analisados e utilizados para delinear o agrupamento (Welch, 1991; Gevers *et al.*, 2005) e uma variedade de métodos de tipagem baseadas em análise de DNA. Esses métodos têm a vantagem de serem relativamente rápidos e fáceis de realizar e podem ser automatizados, tornando-os particularmente útil para a seleção padronizada de um grande número de isolados. Posteriormente, a análise da sequência genética do gene ribossomal 16S rRNA é realizada com representantes dos diferentes grupos, e estas sequências são comparadas com as de espécies conhecidas. Desta forma, a posição filogenética é determinada. Com base nos resultados desta análise, os organismos são selecionados, e devem ser incluídos em experimentos de hibridização DNA-DNA (Gevers *et al.*, 2005).

Enfim, a taxonomia de procariotos tem sido muito influenciada pelos avanços na genética de populações de microrganismos, ecologia e genômica, e pela facilidade com que os dados de sequenciamento têm sido obtidos. Esses avanços têm forçado os microbiologistas a revisarem um dos mais antigos ramos dessa disciplina, a sistemática. É nítido que o futuro da

taxonomia e sistemática microbiana basear-se-á numa abordagem fundamentada no sequenciamento de DNA (Gevers *et al.*, 2005). Esses métodos podem ser aplicados na análise de populações microbianas complexas, como parece ser o caso da população de bactérias do processo de fermentação alcoólica industrial. O entendimento dessa população deverá contribuir para o maior controle do processo industrial, com repercussões econômicas importantes para o setor industrial.

2. Objetivos

2.1. Geral

O presente trabalho teve como objetivo principal estabelecer a diversidade de bactérias lácticas (*Lactic Acid Bactéria*- LAB) envolvidas em episódios de contaminação bacteriana do processo industrial de produção de álcool combustível em destilarias de álcool combustível

2.1. Específicos

- a) Padronizar o uso das técnicas de ARDRA e de sequenciamento de DNA para a análise das bactérias provenientes do processo de fermentação alcoólica industrial;
- b) Identificar os principais grupos de isolados bacterianos coletados ao longo da safra em diferentes destilarias e quantificá-los;
- c) Avaliar a variação intra-específica das principais espécies bacterianas identificadas.

3. Material e Métodos

3.1. Linhagens de *Lactobacillus* comerciais e de coleção

A padronização da técnica de ARDRA foi realizada com o uso de linhagens provenientes da empresa Fermentec Ltda (Piracicaba, SP) que foram isoladas de processos fermentativos em destilarias do Estado de São Paulo, e identificadas pelos métodos de taxonomia bioquímica convencional. As linhagens industriais utilizadas foram FT388B, FT400B, FT025B, FT337B, FT008B, FT124B, FT054B.

3.2. Isolamento, manutenção e identificação bacteriana

3.2.1. Coleta e Plaqueamento do Mosto de Cana de Açúcar

As amostras foram obtidas através de coletas de 100 ml do mosto fermentado na dorna de fermentação de último estágio do processo fermentação contínua de diferentes destilarias localizadas nos estados da Paraíba e Pernambuco, região Nordeste do Brasil em diferentes safras. Na safra 2005-2006 foi realizada uma coletada no final do período de Safra das destilarias Miriri e Japungu no município de Santa Rita no estado da Paraíba, e da destilaria Trapiche localizada município de Sirinhaém no estado de Pernambuco. Na safra 2006-2007 foi realizada uma única coleta no início da safra na destilaria Miriri e quatro coletas com 30 (C1), 90 (C2) e 180(C3) dias de safra na destilaria Japungu, e ainda uma última coleta (C4) quando da mudança do substrato de fermentação do caldo de cana para melaço após o término da colheita da cana. Na safra 2007-2008 o material foi coletado durante todo o período de safra com intervalos de 30 dias a partir do primeiro dia, nas destilarias Miriri, Japungu e Trapiche, além de uma quarta destilaria, a Giasa localizada no município de Pedras de Fogo no Estado da Paraíba.

O material coletado foi diluído em solução salina 0,85% estéril até 3×10^{-4} , e alíquotas de 0,1 ml das diluições 3×10^{-3} e 3×10^{-4} foram semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura MRS (Agar *Lactobacillus* MRS, Himédia) acrescido de cicloheximida ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$). As placas foram incubadas a 37°C em jarras anaeróbicas com geradores de anaerobiose Anaerocult A (Merk) por um período de 4 a 5 dias (Skinner e Leathers, 2004).

3.2.2. Contagem, Isolamento e Purificação das Culturas

Após incubação, foram selecionadas placas com aproximadamente 100 colônias que apresentassem boa distribuição com relação ao crescimento. As colônias foram caracterizadas quanto à morfologia, e o isolamento das bactérias foi realizado através de amostragem dos representantes de cada morfotipo. Os isolados foram mantidos em caldo MRS com glicerol 30% a -20 °C. As colônias foram semeadas em meio MRS líquido, a 37 °C por aproximadamente dois dias, para o crescimento e posterior extração do DNA total.

3.3. Tipagem Genética

3.3.1. Extração de DNA

As células de bactérias foram cultivadas em tubos plásticos de 15 ml contendo 10 ml de meio MRS a 37°C e utilizadas para extração de DNA segundo metodologia descrita por Moreira *et al.* (2005). Resumidamente, as células foram coletadas por centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos e o sedimento celular foi ressuspensionado com 1 ml de solução de LiCl a 5 M e incubado por 1 h sob agitação constante. Após incubação, as células foram centrifugadas e o sedimento ressuspensionado em 1 ml de tampão TE₁₀ (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0) acrescido de lisozima (10 mg/ml). Depois da incubação por 1 h e posterior centrifugação a 3000 rpm por 5 min, o sedimento foi ressuspensionado em TE₁₀ acrescido de SDS a 1% para lise celular e de RNase (100 µg/ml). A mistura foi extraída com um volume de clorofane (mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 25:24:1) com agitação manual, seguido de centrifugação a 14000 rpm. A fase aquosa da mistura foi transferida para novo tubo a fim de se proceder com a extração com clorofil (mistura de clorofórmio: álcool isoamílico na proporção de 24:1) como descrito acima. Por último, o DNA contido na fase aquosa da extração foi precipitado com um volume de isopropanol absoluto gelado. O material precipitado foi sedimentado por centrifugação a 14000 rpm e o sedimento foi ressuspensionado em 100 µl de água deionizada estéril.

3.3.2. ARDRA

A amplificação da região espaçadora 16S-23S do gene do rRNA seguiu o protocolo descrito por Moreira *et al.* (2005), utilizando o “primer” 16-1A (5'-GAATCGCTAGTAATCG- 3') correspondendo aos nucleotídeos 1361 ao 1380 do gene

rRNA 16S de acordo com a numeração do genoma de *Lactobacillus casei*, e o “primer” 23-1B (5'-GGGTTCCCCCATTCGGA-3') correspondendo aos nucleotídeos 123 ao 113 do rRNA 23S de *L. casei* (Tilsala-Timisjarvi e Alatossava, 1997). A reação de amplificação foi realizada em 50 µl de volume final contendo 10 pmol de cada iniciador, 0.2 mM de cada dNTP, tampão de reação (1X) com 1.5 mM MgCl₂ e 5 U de Taq DNA polimerase. A amplificação foi programada para 1 ciclo de desnaturação de 2 minutos à 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento à 55°C por 1 minuto, extensão à 72°C por 1 minuto, e extensão final à 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1.4% submetidos a 5 V/cm por 1 hora em tampão TBE 0,5X, corados em brometo de etídeo, visualizados em transiluminador ultravioleta.

Os produtos de amplificação foram digeridos com 12 enzimas de restrição (*SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *SfiI*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII* e *AvrII*) e os fragmentos de digestão foram separados em gel de agarose 1.4% submetidos a 5 V/cm por 1 hora em tampão TBE 0,5X, corados em brometo de etídeo, visualizados em transiluminador ultravioleta. Os produtos de digestão foram comparados com o banco de dados genéticos descrito por Moreira *et al.* (2005) (Tabela 1).

3.3.3. REP-PCR

A reação de amplificação de elementos repetitivos do DNA bacteriano com o “primer” (GTG)₅ foi realizada a partir de modificações de Berthier (2001), em volume final de 25 µl contendo 0,2 pmol de cada iniciador, 0.2 mM de cada dntp, tampão de reação (1X) com 3 mM MgCl₂, 0,025 µg/µl BSA e 1U de Taq DNA polimerase. A amplificação foi programada para 1 ciclo de desnaturação de 7 minutos à 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação à 95°C por 1 minuto, anelamento à 40°C por 1 minuto, extensão à 65°C por 8 minutos, e extensão final à 65°C por 16 minutos (Versalovic *et al.*, 1994). Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1.5% submetidos a 5 V/cm por 4 hora e 30 minutos em tampão TBE 0,5X, corados em brometo de etídeo, visualizados em transiluminador ultravioleta.

3.3.4. Seqüenciamento

A região interna (do nucleotídeo 27 ao nucleotídeo 1496) do gene 16S foi amplificado utilizando os “primers” 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') (Lane, 1991) e o gene *pheS* foi amplificado por PCR utilizando os “primers” 21-F (5'-CAYCCNGCHCGYGAYATGC-3') e 22-R (5'-

CCWARVCCRAARGCAAARCC-3') e 23-R (5'-GGRTGRACCATVCCNGCHCC-3') (Naser *et al.*, 2005). As reações de amplificação foram preparadas para o volume final de 50 µl contendo 0,5 µM de cada iniciador, 0.2 mM de cada dNTP, tampão de reação (1X) com 1,5 mM MgCl₂ e 1 U de Taq DNA polimerase. As amplificações foram programadas para 1 ciclo de desnaturação de 5 minutos à 95°C, seguido de 3 ciclos de desnaturação à 95°C por 1 minuto, anelamento à 46°C por 2 minutos e 15 segundos, extensão à 72°C por 1 minuto e 15 segundos e 30 ciclos de desnaturação à 95°C por 35 segundos, anelamento à 46°C por 1 minuto e 15 segundos, extensão à 72°C por 1 minuto e 15 segundos, e extensão final à 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Cerca de 50 a 100 ng do produto purificado foi misturado com a reação de marcação do kit ABI Prism™ Big Dye Terminator™ Ready Reaction Mix version 3.1 (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante, na presença de apenas um dos iniciadores acima na concentração final 1,2 µM. O Seqüenciamento foi realizado no ABI Prism Sequencer (Applied Biosystems, USA). As seqüências resultantes foram analisados em BioEdit v7.0 software e submetidos à busca de similaridade no banco de dados NCBI, utilizando a ferramenta Blast N (Altschul *et al.*, 1997). A identificação bacteriana foi assumida se a seqüência de consulta mostrou similaridade $\geq 90\%$ com a seqüência de nucleotídeos da linhagem tipo para o gene *pheS* (Naser *et al.*, 2007) e similaridade $\geq 97\%$ para o gene 16S (Gevers *et al.*, 2005).

As seqüências que não apresentaram os níveis de similaridades assumidos acima foram submetidas à análise filogenéticas com as seqüências das linhagens tipo obtidas no NCBI. O alinhamento múltiplo dessas seqüências foi realizado utilizando o programa CLUSTALw (Thompson *et al.*, 1994) e visualizado através do programa BIOEDIT 7.0.

O programa MEGA 4 foi utilizado para a construção e visualização das árvores filogenéticas geradas (Tamura *et al.*, 2007). Os agrupamentos baseados nas inferências filogenéticas foram construídos aplicando o algoritmo Neighbour-Joining (Saitou e Nei, 1987) com testes estatísticos bootstrap com 1000 replicações.

Tabela 1: Listagem de isolados, originados das destilarias de álcool combustível, estudados neste trabalho

Isolados	Identificação	Local de Coleta	Safra	Substrato	Metodologia para identificação
UM 1.2	<i>L.fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM 1.3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Destilaria Miriri - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM 1.6	<i>L.fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM 1.8	<i>L. rhamnosus</i>	Destilaria Miriri - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM 1.9	<i>L.fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM 1.10	<i>L. rhamnosus</i>	Destilaria Miriri - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM 1.11	<i>L.ferintoshensis</i>	Destilaria Miriri - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM 1.12	<i>L.ferintoshensis</i>	Destilaria Miriri - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM 1.13	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Miriri - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
UM 1.14	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Destilaria Miriri - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM 1.18	<i>L.fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM 1.19	<i>L.fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM 1.20	<i>L.fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM 1.22	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Destilaria Miriri - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UT 1.1	<i>Acetobacter tropicalis</i>	Destilaria Trapiche - PE	2005/2006	Melaço	Sequenciamento
UT 1.2	<i>Bacillus cereus</i>	Destilaria Trapiche - PE	2005/2006	Melaço	Sequenciamento
UT 2.2	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche - PE	2005/2006	Melaço	ARDRA
UT 3.1	<i>L. cameliae</i>	Destilaria Trapiche - PE	2005/2006	Melaço	Sequenciamento
UT 3.2	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche - PE	2005/2006	Melaço	Sequenciamento
UT 3.3	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche - PE	2005/2006	Melaço	ARDRA
UT 3.4	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche - PE	2005/2006	Melaço	ARDRA
UT 3.5	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche - PE	2005/2006	Melaço	ARDRA
JP 1.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Destilaria Japungu - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
JP 1.2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Destilaria Japungu - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
JP 1.3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Destilaria Japungu - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
JP 1.4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Destilaria Japungu - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
JP 1.5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Destilaria Japungu - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
JP 1.6	<i>Bacillus subtilis</i>	Destilaria Japungu - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
JP 2.1	<i>Bacillus subtilis</i>	Destilaria Japungu - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
JP 2.2	<i>Bacillus subtilis</i>	Destilaria Japungu - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
JP 3.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Destilaria Japungu - PB	2005/2006	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
UJP6. 1.2	<i>Strep.thermophilus</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA

UJP6. 1.3	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
UJP6. 1.5	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6. 1.9	<i>L. plantarum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6. 1.11	<i>Lactococcus lactis</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6. 1.12	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6. 1.16	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
UJP6. 1.17	<i>Lactobacillus casei</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6. 1.18	<i>Lactobacillus casei</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6. 1.19	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
UJP6. 1.21	<i>Lactobacillus casei</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6. 2.1(90.1)	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6. 2.4	<i>L. ferintoshensis</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6. 2.7	<i>Lactococcus lactis</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6. 2.10	<i>Lactococcus lactis</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6. 3.8	<i>Staph. aureus</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
UJP6.4.1	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6.4.2	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6.4.3	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6.4.4	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6.4.12	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
UJP6.4.16	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6.4.17	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6.4.21	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6.4.27	<i>Staph. epidermidis</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UJP6M1.6	<i>L. hilgardi</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Melaço	ARDRA
UJP6M1.8	<i>L. hilgardi</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Melaço	ARDRA
UJP6M2.3(10-4)	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Melaço	ARDRA
UJP6M2.4	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Melaço	ARDRA
UJP6M2.5	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Melaço	Sequenciamento
UJP6M2.7	<i>L. hilgardi</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Melaço	ARDRA
UJP6M2.1(10-3)	<i>L. agilis</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Melaço	ARDRA
UJP6M2.2	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Melaço	ARDRA
UJP6M2.3	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Melaço	ARDRA
UJP6M2.4	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Melaço	ARDRA
UJP6M2.6	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Melaço	ARDRA

UJP6M2.7	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Melaço	ARDRA
UJP6M2.8	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Melaço	ARDRA
UJP6M2.9	<i>L. agilis</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Melaço	ARDRA
UJP6M2.11	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2006/2007	Melaço	Sequenciamento
UM6. 1.1	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM6. 1.4	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM6. 1.9	<i>L. acidophilus</i>	Destilaria Miriri - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM6. 1.10	<i>L. acidophilus</i>	Destilaria Miriri - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM6. 1.11	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
UM6. 1.12	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
UM6. 1.13	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM6. 1.14	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
UM6. 1.16	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
UM6. 1.17	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
UM6. 1.18	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
UM6. 1.22	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Destilaria Miriri - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
UM6. 1.23	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM6. 1.24	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
UM6. 1.25	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2006/2007	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
JP7.1.2	<i>L. plantarum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.1.3	<i>L. plantarum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.1.4	<i>L. plantarum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.1.5	<i>L. plantarum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.1.6	<i>L. plantarum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.1.7	<i>L. plantarum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.1.8	<i>L. plantarum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.1.9	<i>L. plantarum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.1.11	<i>Lactobacillus sp</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.1.12	<i>L. plantarum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.1.13	<i>L. plantarum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.1.14	<i>L. plantarum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.1.15	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.1.16	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.1.17	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.1.18	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento

JP7.1.19	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.1.20	<i>Não identificado</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.2.1	<i>Lactobacillus ferintoshensis</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.2.2	<i>Lactobacillus ferintoshensis</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.2.3	<i>Lactobacillus ferintoshensis</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.2.4	<i>Lactobacillus ferintoshensis</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.2.5	<i>Lactobacillus ferintoshensis</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.2.6	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.2.7	<i>Lactobacillus ferintoshensis</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.2.8	<i>Lactobacillus ferintoshensis</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.2.9	<i>L.fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.2.10	<i>L.fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.2.11	<i>L.fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.2.12	<i>Lactobacillus brevis</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.2.13	<i>Não identificado</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.2.14	<i>Lactobacillus brevis</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.2.15	<i>Não identificado</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.2.20	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.3.1	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.3.2	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.3.3	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.3.4	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.3.5	<i>Não identificado</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.3.6	<i>Não identificado</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.3.7	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.3.8	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.3.9	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.3.10	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.3.11	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.3.12	<i>L.fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	<i>L. vini</i>
JP7.3.13	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.3.14	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.3.15	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.3.16	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.3.17	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento

JP7.3.18	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.3.19	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.3.20	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	ARDRA
JP7.4.2	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.4.3	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.4.4	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.4.5	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.4.7	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.4.8	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.4.9	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.4.10	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.4.11	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	ARDRA
JP7.4.12	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.4.13	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	ARDRA
JP7.4.14	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	ARDRA
JP7.4.15	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	ARDRA
JP7.4.16	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	ARDRA
JP7.4.17	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	ARDRA
JP7.4.18	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	ARDRA
JP7.4.19	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	ARDRA
JP7.4.20	<i>Lactobacillus sp</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	ARDRA
JP7.5.1	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	ARDRA
JP7.5.3	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.5.4	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.5.5	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.5.6	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.5.7	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.5.8	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.5.9	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	ARDRA
JP7.5.10	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.5.11	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.5.12	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	ARDRA
JP7.5.13	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	ARDRA
JP7.5.14	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento
JP7.5.15	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar e Melaço	Sequenciamento

[illegible]

JP7.8.2	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.3	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.4	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.5	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.6	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.7	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.8	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.9	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.10	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.11	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.12	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.13	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.14	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.15	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.16	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.17	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.18	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.19	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	Sequenciamento
JP7.8.20	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar e Melaço	ARDRA
JP7.9.1	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
JP7.9.2	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
JP7.9.3	Não identificado	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.9.4	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
JP7.9.5	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
JP7.9.6	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
JP7.9.7	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.9.8	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.9.9	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
JP7.9.10	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
JP7.9.11	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
JP7.9.12	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
JP7.9.13	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.9.14	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.9.15	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.9.16	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento

JP7.9.17	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
JP7.9.18	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.9.19	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
JP7.9.20	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.1	<i>L. vini</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
JP7.10.2	Não identificado	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.3	Não identificado	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.4	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.5	Não identificado	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.6	Não identificado	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.7	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.8	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.9	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.10	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.11	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.12	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.13	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.14	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.15	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.16	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.17	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.18	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.19	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
JP7.10.20	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Japungu - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
M7.1.1	<i>L. plantarum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
M7.1.2	<i>L. plantarum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
M7.1.3	<i>L. plantarum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
M7.1.4	<i>L. manihotivorans</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
M7.1.5	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
M7.1.6	<i>L. manihotivorans</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
M7.1.7	<i>L. manihotivorans</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
M7.1.8	<i>L. manihotivorans</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
M7.1.9	<i>L. manihotivorans</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
M7.1.10	<i>L. manihotivorans</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
M7.1.11	<i>L. manihotivorans</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento

M7.1.12	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
M7.1.13	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
M7.1.14	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	ARDRA
M7.1.15	<i>L. manihotivorans</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
M7.1.16	<i>L. manihotivorans</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
M7.1.17	<i>L. manihotivorans</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
M7.1.18	<i>L. manihotivorans</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
M7.1.19	<i>L. manihotivorans</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
M7.1.20	<i>L. manihotivorans</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
M7.2.1	<i>L. amylovorus</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA/Sequenciamento
M7.2.2	<i>L. amylovorus</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA/Sequenciamento
M7.2.3	<i>L. amylovorus</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA/Sequenciamento
M7.2.4	<i>L. amylovorus</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA/Sequenciamento
M7.2.5	<i>L. amylovorus</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA/Sequenciamento
M7.2.6	<i>L. amylovorus</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA/Sequenciamento
M7.2.7	<i>L. amylovorus</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA/Sequenciamento
M7.2.8	<i>L. amylovorus</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA/Sequenciamento
M7.2.9	<i>L. amylovorus</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA/Sequenciamento
M7.2.10	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.2.11	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.2.12	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.2.13	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.2.14	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.2.15	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.2.16	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.2.17	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.2.18	Não identificado	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.2.20	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.3.1	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.3.2	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.3.3	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.3.4	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.3.5	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.3.6	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.3.7	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA

M7.3.8	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.3.9	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.3.10	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.3.11	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.3.12	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.3.13	<i>L. manihotivorans</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.3.14	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.3.15	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.3.16	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.3.17	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.3.18	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.3.19	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.3.20	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.4.1	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.4.2	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.4.3	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.4.5	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.4.6	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.4.8	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.4.9	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.4.10	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.4.11	Não identificado	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.4.12	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.4.13	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.4.14	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.4.15	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.4.16	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.4.18	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.4.19	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.4.20	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.6.1	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.6.2	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.6.3	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.6.4	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.6.5	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA

M7.6.6	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.6.7	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.6.8	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.6.10	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.6.11	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.6.14	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.6.16	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.6.17	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.6.18	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.6.19	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.6.20	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M.7.7.1	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M.7.7.2	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M.7.7.3	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M.7.7.4	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M.7.7.5	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M.7.7.6	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M.7.7.7	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M.7.7.8	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M.7.7.9	<i>L. ferintoshensis</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M.7.7.10	<i>L. ferintoshensis</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M.7.7.11	<i>L. ferintoshensis</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M.7.7.12	<i>L. ferintoshensis</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M.7.7.13	<i>L. ferintoshensis</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M.7.7.14	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M.7.7.15	<i>L. ferintoshensis</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M.7.7.16	<i>L. ferintoshensis</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M.7.7.17	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
M7.7.19	<i>L. vini</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	Sequenciamento
M7.7.20	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Miriri - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
G.7.1.1	<i>L. ferintoshensis</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
G.7.1.2	<i>L. ferintoshensis</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
G.7.1.3	Não identificado	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
G.7.1.4	Não identificado	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA
G.7.1.5	<i>L. brevis</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de –Açúcar	ARDRA

G.7.1.6	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	ARDRA
G.7.1.7	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	ARDRA
G.7.1.8	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	ARDRA
G.7.1.9	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	ARDRA
G.7.1.10	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	ARDRA
G.7.1.11	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	ARDRA
G.7.1.12	Não identificado	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	ARDRA
G.7.1.13	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	ARDRA
G.7.1.14	<i>L. brevis</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	ARDRA
G.7.1.15	<i>L. brevis</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	ARDRA
G.7.1.16	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	ARDRA
G.7.1.17	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	ARDRA
G.7.1.18	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	ARDRA
G.7.1.19	<i>L. brevis</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	ARDRA
G.7.1.20	<i>L. brevis</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	ARDRA
G7.2.1	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento
G7.2.2	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento
G7.2.3	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	ARDRA
G7.2.4	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento
G7.2.5	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento
G7.2.6	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento
G7.2.7	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento
G7.2.8	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento
G7.2.9	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento
G7.2.10	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento
G7.2.11	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	ARDRA
G7.2.12	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento
G7.2.13	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento
G7.2.14	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento
G7.2.15	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento
G7.2.16	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento
G7.2.17	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento
G7.2.18	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento
G7.2.19	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento
G7.2.20	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açúcar	Sequenciamento

G7.3.1	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.2	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.3	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.4	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.5	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.6	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.7	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.8	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.9	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.10	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.11	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.12	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.13	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.14	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.15	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.16	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.17	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.18	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.19	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.3.20	<i>Lactobacillus</i> sp.	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
G7.4.1	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.4.2	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.4.3	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.4.4	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.4.5	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.4.6	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.4.7	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.4.8	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.4.9	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.4.10	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
G7.4.11	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
G7.5.1	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.5.2	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.5.3	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.5.4	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento

G7.5.5	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.6.1	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.6.2	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.6.3	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.6.4	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.6.5	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.6.6	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.6.7	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.6.8	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.6.9	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.6.10	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.6.11	<i>L. vini</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	Sequenciamento
G7.6.12	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
G7.6.13	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
G7.6.14	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
G7.6.15	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
G7.6.16	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
G7.6.17	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
G7.6.18	<i>L. fermentum</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
G7.6.19	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
G7.6.20	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
G7.7.1	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
G7.7.2	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Giasa - PB	2007/2008	Caldo de Cana-de -Açucar	ARDRA
TR7.1.1	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.1.2	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.1.3	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.1.4	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.1.5	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.1.6	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.1.7	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.1.8	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.1.9	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.1.10	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.1.11	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.1.12	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento

TR7.1.13	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.1.14	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.1.15	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.1.16	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.1.17	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.1.18	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.1.19	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.1.20	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.2.1	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.2.2	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.2.3	<i>L. mucosae</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.2.4	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.2.5	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.2.6	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.2.7	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.2.8	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.2.9	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.2.10	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.2.11	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.2.12	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.2.13	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.2.14	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.2.15	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.2.16	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.2.17	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.2.18	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.2.19	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.2.20	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.3.1	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.3.2	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.3.3	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.3.4	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.3.5	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.3.6	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.3.7	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA

TR7.3.8	<i>Lactobacillus</i> sp.	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.3.9	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.3.10	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.3.11	<i>L. nagelli</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.3.12	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.3.13	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.3.14	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.3.15	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.3.16	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.3.17	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.3.18	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.3.19	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.3.20	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.4.1	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.4.2	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.4.3	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.4.4	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.4.5	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.4.6	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.4.7	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.4.8	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.4.9	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.4.10	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.4.11	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.4.12	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.4.13	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.4.14	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.4.15	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.4.16	<i>Lactobacillus</i> sp.	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.4.17	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.4.18	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.4.19	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.4.20	<i>L. hilgardii</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.5.1	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.5.2	<i>L. vini</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento

TR7.5.3	<i>L.vini</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.5.4	<i>L.vini</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.5.5	<i>L.vini</i>	Destilaria Trapiche – PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.5.6	<i>L.vini</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.5.7	<i>L.vini</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.5.8	<i>L.vini</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.5.9	<i>Lactobacillus "diolivorans like"</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.5.10	<i>L.vini</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.5.11	<i>L.vini</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.5.12	<i>L.vini</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.5.13	<i>L.vini</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.5.14	<i>L.vini</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.5.15	<i>L.vini</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.5.16	<i>L.vini</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.5.17	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.5.18	<i>L.vini</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	Sequenciamento
TR7.5.19	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA
TR7.5.20	<i>Lactobacillus sp.</i>	Destilaria Trapiche - PE	2007/2008	Melaço	ARDRA

Tabela 2: Padrão de restrição do menor espaçador da região intergênica 16S-23S de amostras de *Lactobacillus* constante no banco de dados de Moreira *et al.*, 2005.

	<i>Sph</i> I	<i>Nco</i> I	<i>Nhe</i> I	<i>Ssp</i> I	<i>Sfu</i> I	<i>Eco</i> RV	<i>Dra</i> I	<i>Vsp</i> I	<i>Hinc</i> II	<i>Eco</i> RI	<i>Hind</i> III	<i>Avr</i> II
<i>Lactobacillus</i>												
<i>L. acidophilus</i>	- ^a	+	-	-	- ^c	-	-	-	-	+	+	+
<i>L. animalis</i>	+ ^b	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
<i>L. agilis</i>	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>L. brevis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>L. casei</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>L. ferintoshensis</i>	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-
<i>L. fermentum</i>	-	-	+ -	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i>	+	-	-	+	- ^d	-	-	+	+	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>L. salivarius</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. sakei</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-

a. O sinal negativo indica que não houve digestão do espaçador menor

b. O sinal positivo indica a digestão do espaçador menor

c. Digere o espaçador maior

d. Pode ou não digerir o espaçador maior

4. Resultados

4.1. Análise molecular das Linhagens de Coleção

Os isolados FT388B, FT400B, FT025B, FT337B, FT008B, FT124B apresentaram um perfil de amplificação típico de *Lactobacillus*, com bandas de amplificação correspondentes às três regiões espaçadoras. Por outro lado, o perfil de amplificação do isolado FT054B sugeriu que este deve pertencer a uma espécie bacteriana distinta dos demais isolados, por apresentar uma única banda de DNA espaçador com tamanho maior do que aquelas dos lactobacilos (Figura 4).

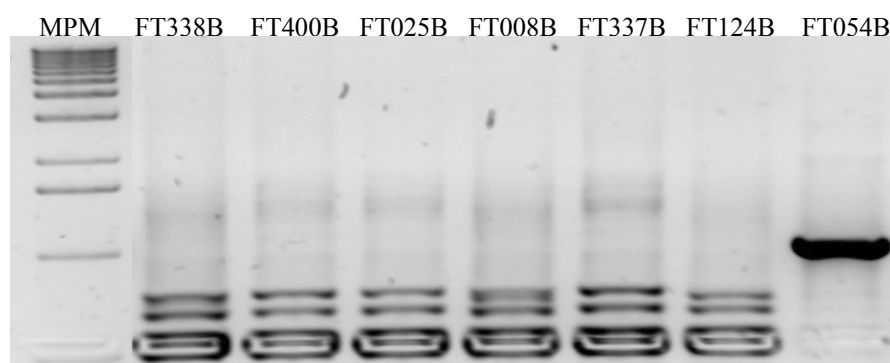


Figura 4. Amplificação da região espaçadora 16S-23S do agrupamento de genes de rDNA das amostras de bactérias lácticas da Fermentec Ltda. As amostras estão representadas na parte superior do gel. MPM: marcador de peso molecular de 1Kb.

A partir dos perfis de digestões obtidos e comparando com o banco de dados de Moreira et al (2005) (Tabela 2), os isolados FT388B, FT400B, FT025B, FT337B, FT008B foram identificados como *Lactobacillus plantarum* (Figura 5). Esta identificação foi confirmada pelo seqüenciamento do gene 16S da amostra FT008B (dado não mostrado), que foi originalmente identificada como *L. fermentum*. Os perfis de digestão dos isolados FT388B, FT025B, FT337B (Figura 5A, C, D) sugerem que estes pertenceriam a um grupo de *L. plantarum* diferente do grupo dos isolados FT400B e FT008B (Figura 5B, E). Isto sugere que devem existir pelo menos duas subespécies de *L. plantarum* no processo fermentativo industrial. Este resultado deverá ser confirmado com um marcador intra-específico. Já a amostra FT124B foi identificada como *Lactobacillus fermentum* (Figura 6).

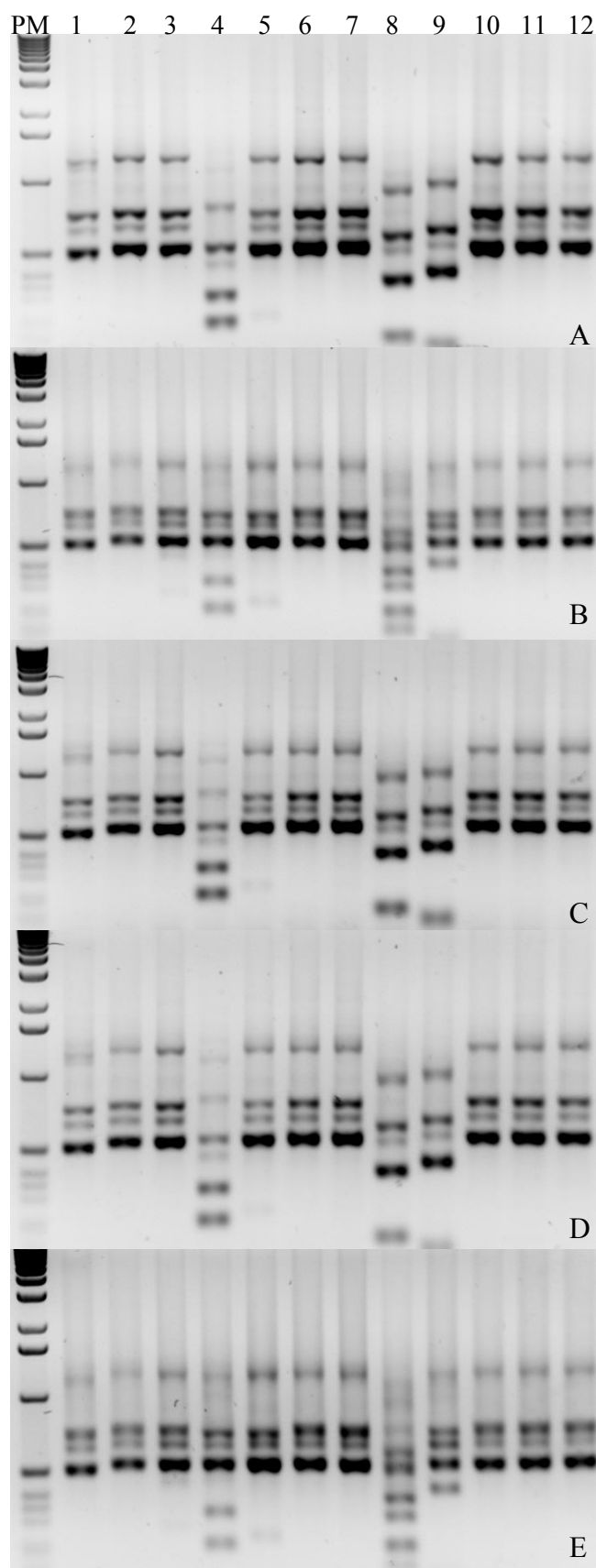


Figura 5. Perfil de digestão dos isolados FT388B (A), FT400B (B), FT025B (C), FT337B (D) e FT008B (E) identificados como *L. plantarum*. Os produtos de amplificação da região espaçadora 16S-23S foram digeridos com as enzimas *Sph*I (linha 1), *Nco*I (linha 2), *Nhe*I (linha 3), *Ssp*I (linha 4), *Sfu*I (linha 5), *Eco*RV (linha 6), *Dra*I (linha 7), *Vsp*I (linha 8), *Hinc*II (linha 9), *Eco*RI (linha 10), *Hind*III (linha 11) e *Avr*II (linha 12). PM representa o marcador de peso molecular de 1Kb.

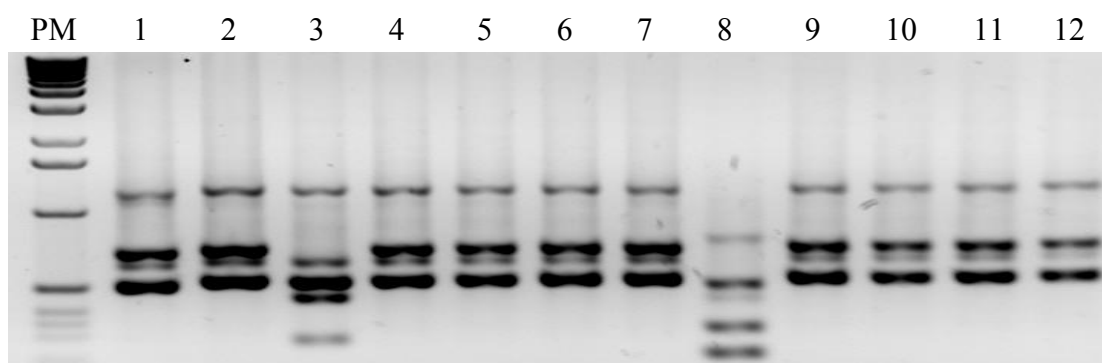


Figura 6. Perfil de digestão do isolado FT124B identificado como *L. fermentum*. Os produtos de amplificação da região espaçadora 16S-23S foram digeridos com as enzimas *SphI* (linha 1), *NcoI* (linha 2), *NheI* (linha 3), *SspI* (linha 4), *SfuI* (linha 5), *EcoRV* (linha 6), *DraI* (linha 7), *VspI* (linha 8), *HincII* (linha 9), *EcoRI* (linha 10), *HindIII* (linha 11) e *AvrII* (linha 12). PM representa o marcador de peso molecular de 1Kb.

O perfil de digestão obtido pela amostra FT054B não constava no referido banco de dados, sendo por isso submetido ao sequenciamento do gene 16S do rRNA. Os resultados apontam para a identificação deste isolado como pertencente à espécie *Acetobacter tropicalis* (Figura 7), diferente da identificação original como *Bacillus pumilis*. Entretanto, o nível de similaridade de 96% as seqüências depositadas no NCBI levanta a possibilidade deste isolado representar uma nova espécie de bactéria ainda não identificada nos nossos bancos de dados.

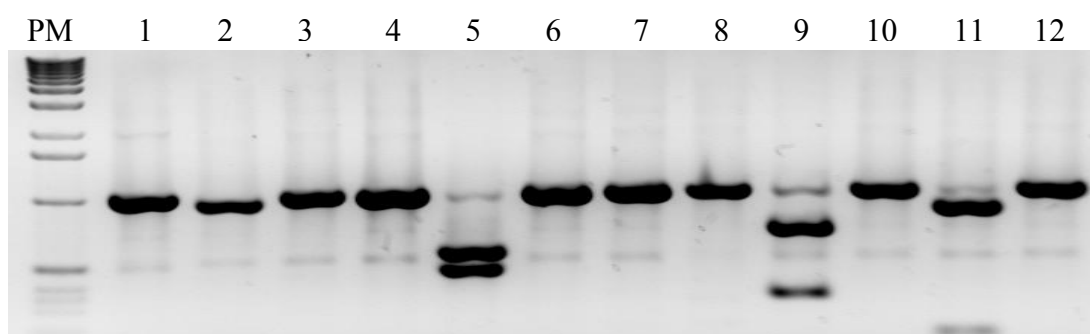


Figura 7. Perfil de digestão do isolado FT054B identificado como *A. tropicalis*. Os produtos de amplificação da região espaçadora 16S-23S foram digeridos com as enzimas *SphI* (linha 1), *NcoI* (linha 2), *NheI* (linha 3), *SspI* (linha 4), *SfuI* (linha 5), *EcoRV* (linha 6), *DraI* (linha 7), *VspI* (linha 8), *HincII* (linha 9), *EcoRI* (linha 10), *HindIII* (linha 11) e *AvrII* (linha 12). PM representa o marcador de peso molecular de 1Kb.

As análises moleculares mostraram que dois (FT008B e FT054B) dos sete isolados testados apresentaram divergências de identificação (Tabela 3). A origem desta divergência não pode ser avaliada no momento. Além disso, a tipagem genética mostra a possibilidade da existência de dois subgrupos genéticos de *L. plantarum* nas amostras industriais, cuja relevância para o processo também não pode ser avaliada no momento, e de uma espécie ainda não identificada filogeneticamente próxima a *Acetobacter tropicalis*.

Tabela 3: Quadro comparativo da identificação dos isolados industriais de bactérias lácticas da fermentec Ltda.

Linhagem	Identificação original	Neste estudo
FT388B	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
FT400B	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
FT025B	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
FT337B	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
FT008B	<i>L. fermentum</i>	<i>L. plantarum</i>
FT124B	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>
FT054B	<i>B. pumilis</i>	<i>A. tropicalis</i>

4.2. Análise das bactérias isoladas da Safra2005/2006

Trinta e um isolados bacterianos foram analisados de três destilarias durante a safra de 2005/2006, dos quais 14 foram obtidos a partir do mosto fermentado da destilaria Miriri, 8 da destilaria Trapiche e 9 da destilaria Japungu.

A maioria dos isolados apresentou um perfil de amplificação típico de *Lactobacillus*, com bandas correspondendo a amplificação das três regiões espaçadoras, a menor delas correspondendo a 503 pb (Figura 8). Por outro lado, o perfil de amplificação de outros isolados encontrados, apresentando uma única banda, mostrou que estes pertencem a espécies bacterianas distintas. Mesmo aqueles isolados que apresentaram as três bandas, a diferença no tamanho os distinguiu dos *Lactobacillus*, revelando a possibilidade de distinção de gênero pelo marcador utilizado (Figura 8, amostras 22, 23 e 25).

A partir da análise dos perfis de digestão dos fragmentos de amplificação da região espaçadora, onze espécies entre estes isolados foram identificados, dos quais seis pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, correspondendo a 54,5% dos isolados (Tabela 4). Setenta e nove por cento dos isolados da destilaria Miriri pertencem ao gênero *Lactobacillus*, sendo 42,9% identificadas com *L. fermentum*, 14,3% *L. rhamnosus*, 14,3% *L. ferintoshensis* e 7,1% *L. nagelli*, o perfil de digestão desta última espécie está descritos na tabela 6, enquanto os demais isolados foram identificados como *Leuconostoc mesenteroides* (21,4%). Na destilaria Trapiche foram identificados *L. hilgardii* (62,5%), *L. cameliae* (12,5%), cujos perfis de digestão estão descritos na tabela 6, *Bacillus cereus* (12,5%) e *Acetobacter tropicalis* (12,5%). E, curiosamente, nenhum *Lactobacillus* foi identificado na destilaria Japungu neste período, mas foram encontrados *Leuconostoc mesenteroides* (55,6%), *Bacillus subtilis* (33,3%) e *Staphylococcus epidermidis* (11,1%).

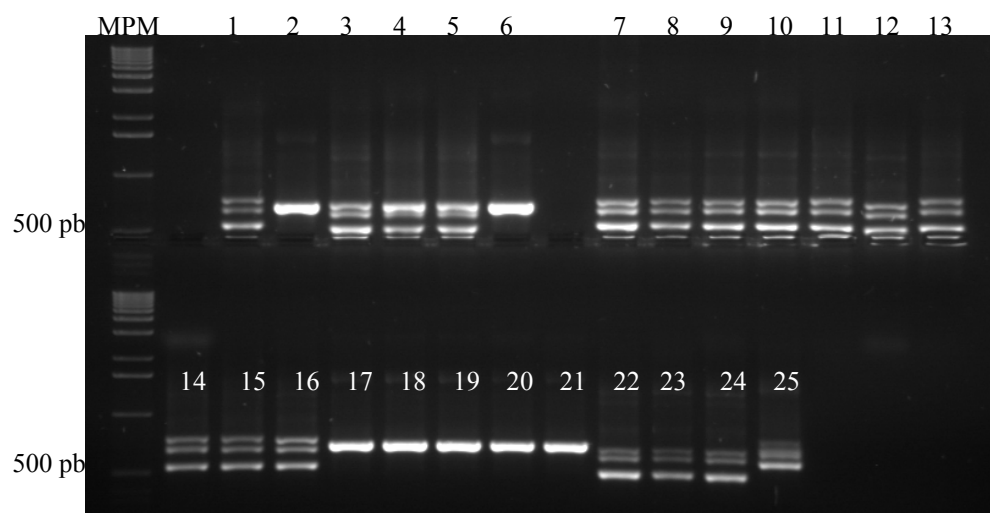


Figura 8: Perfil de amplificação da região espaçadora 16S-23S do gene rRNA dos isolados das destilarias. A amostra 15 mostra o perfil típico de amplificação do gênero *Lactobacillus* com três espaçadores, o menor deles com 503 pb (MPM = Marcador de Peso Molecular de 1 kb).

Tabela 4: Espécies bacterianas identificadas pela técnica de ARDRA a partir das amostras coletadas na safra 2005-2006.

Espécies bacterianas	No. de isolados		
	Miriri	Trapiche	Japungu
<i>Lactobacillus fermentum</i>	6		
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2		
<i>Lactobacillus ferintoshensis</i>	2		
<i>Lactobacillus hilgardii</i>		5	
<i>Lactobacillus cameliae</i>		1	
<i>Lactobacillus nagelli</i>	1		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>			1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	3		5
<i>Bacillus subtilis</i>			3
<i>Bacillus cereus</i>		1	
<i>Acetobacter tropicalis</i>		1	
Total	14	8	9

4.3. Safra 2006/2007

A mesma análise foi realizada para os isolados bacterianos coletados na safra 2006/2007. Todos os isolados da destilaria Miriri foram identificados como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* divididos em *L. fermentum* (40%), *L. vini* (40%), *L. acidophilus* (13,3%) e *L. paracasei* (6,7%) (Tabela 5). Por outro lado, 85% dos isolados coletados na destilaria Japungu fazem parte do gênero *Lactobacillus* (42,5% of *L.fermentum*, 10% of *L. vini*, 7,5% of *L. casei*, 7,5% of *L. hilgardii*, 5% of *L. agilis*, 5% of *L. satsumensis*, 2,5% of *L. ferintoshensis*, 2,5% of *L. nagelli* e 2,5% of *L. plantarum*). O restante dos isolados foram identificados com *Lactococcus lactis* (7,5%), *Staph. aureus* (2,5%), *Staph. epidermidis* (2,5%) e *Strep. thermophilus* (2,5%) (Tabela 5).

Na destilaria Japungu, após 30 dias de safra, verificou-se uma maior diversidade bacteriana com o total de sete espécies, das quais cinco pertenciam ao gênero *Lactobacillus* (81,1%). Após 90 dias de safra toda população bacteriana foi modificada. E decorridos 170 dias de safra percebe-se o predomínio do *Lactobacillus fermentum* (70%). Após a adição do melaço como substrato de fermentação, todas as bactérias isoladas faziam parte do gênero *Lactobacillus*, dos quais 53,3% *L. fermentum*, seguido por 20% de *L. plantarum*, 13,3% de *L. vini* e 13,3% *L. agilis* (Figura 9).

Tabela 5: Espécies bacterianas identificadas pela técnica de ARDRA a partir das amostras coletadas na safra 2006-2007.

Espécies bacterianas	No. de isolados	
	Miriri	Japungu
<i>Lactobacillus agilis</i>		2
<i>Lactobacillus fermentum</i>	6	17
<i>Lactobacillus plantarum</i>		1
<i>Lactobacillus satsumensis</i>		2
<i>Lactobacillus casei</i>		3
<i>Lactobacillus nagelli</i>		1
<i>Lactobacillus ferintoshensis</i>		1
<i>Lactobacillus hilgardii</i>		3
<i>Lactobacillus vini</i>	6	4
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2	
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	
<i>Lactococcus lactis</i>		3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		1
<i>Staphylococcus aureus</i>		1
<i>Streptococcus thermophilus</i>		1
Total	15	40

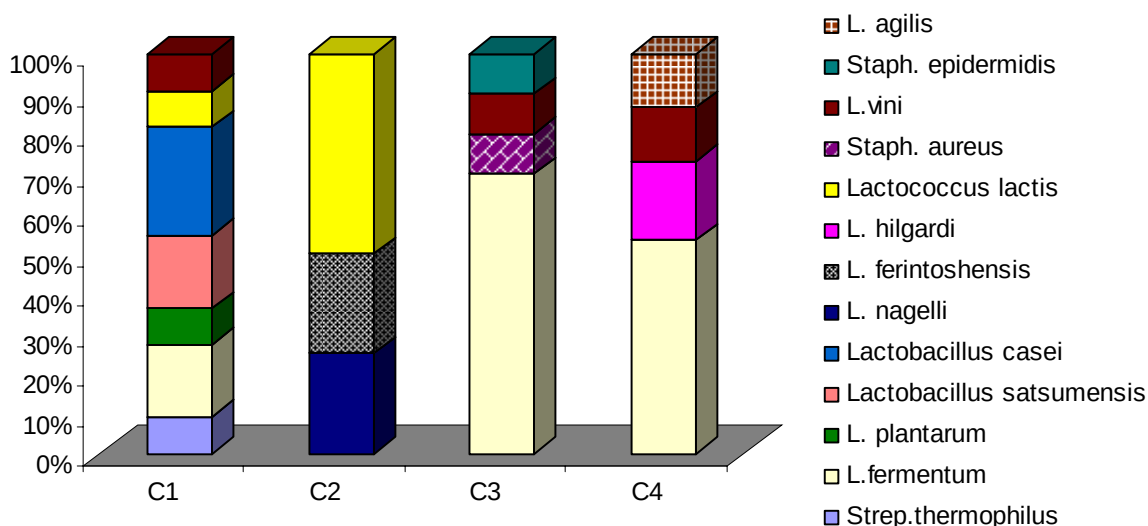


Figura 9: Distribuição dos isolados bacterianos identificados durante a safra 2006/2007 na destilaria Japungu.

4.4. Safra 2007/2008

A safra 2007/2008 foi acompanhada mais detalhadamente por isso os resultados serão mostrados separadamente por destilaria.

4.4.1. Destilaria Miriri

Na destilaria Miriri, a safra foi iniciada utilizando melaço como substrato, mas já no segundo dia utilizou-se caldo misto (Caldo de cana de açúcar acrescido com melaço) e já a partir do quarto dia de safra passou-se ao uso de caldo cru (Caldo de cana de açúcar). O teor alcoólico apresentou os seguintes valores no momento das amostragens (dias de safra): 5,2% (1), 6,9% (30), 6,7% (60), 7,5% (90), 7,6% (150) e 7,1% (180), segundo dados fornecidos pela destilaria.

Quanto a análise microbiológica, observou-se que, como nas safras anteriores, o gênero *Lactobacillus* constituiu o principal contaminante bacteriano do processo, correspondendo a cerca de 98,1% dos isolados, seguido por 0,95% de isolados correspondentes ao gênero *Oenococcus*. O restante dos isolados (0,95%) compreende um grupo de bactérias que não puderam ser identificadas, mas certamente não correspondem a espécies de *Lactobacillus*, pois apresentaram quatro bandas de espaçadores na PCR.

A maior diversidade bacteriana foi observada nas duas primeiras coletas (1º dia e 30 dias de safra) (Figura 10). No primeiro dia de safra foram identificados *L. plantarum* (15,20%), *L. manihotivorans* (64,40%) e um grupo de bactérias identificadas apenas como *Lactobacillus sp.* Dentre essas bactérias foram observados 3 perfis distintos de restrição dos

espaçadores de tDNA, o que pode ser um indício da presença de espécies diferentes. A espécie *L. manihotivorans* apresentou-se com perfil de digestão diferente daqueles constantes no banco de dados de Moreira et al (2005), digerindo com as enzimas *SphI*, *NheI*, *SfuI*, *EcoRV* e *HindIII* (Figura 18, Tabela 6), sendo identificado apenas posteriormente a partir do sequenciamento dos genes *pheS* e 16S (Figura 22).

Com 30 dias de safra, identificou-se uma mudança na microbiota bacteriana do processo, que pode ter ocorrido devido à mudança do substrato, onde se observou a presença das espécies *L. amylovorus* (54,42%), *L. vini* (23,72%), *L. hilgardii* (15,02%), *L. fermentum* (2,42%) e *Oenococcus* “*kitaharae like*” (4,42%). A identificação do epíteto *Oenococcus* “*kitaharae like*” só foi possível a partir da análise filogenética das sequências de nucleotídeos dos *pheS* e 16S desses isolados com as sequências de linhagens tipos obtidas no Genbank (Figura 14 e 15). Como será visto mais adiante, esses isolados também foram encontrados na destilaria Japungu, e representam uma nova espécie bacteriana, já confirmada pela fenotipagem com o sistema Biolog (F. Thompson, UFRJ, comunicação pessoal).

Já a partir de 60 dias de safra percebe-se uma seleção da microbiota, sendo 60% dos isolados pertencentes à espécie *L. fermentum*, 35% à espécie *L. vini* e 5% à espécie *L. manihotivorans*. É importante ressaltar que com 44 dias ocorreu troca de fermento no processo fermentativo, além disso, neste processo ocorreu o uso de antibiótico, o que pode ter favorecido a seleção dessas bactérias. A partir desse ponto as espécies *L. fermentum* e *L. vini* dominaram o processo, alternado apenas as frequências ao longo das coletas em 44,19% e 50,66% (90 dias) e em 67,92% e 32,08% (150 dias). Também houve troca do fermento com 66 dias de safra, o que pode ter influenciado na alteração das frequências das bactérias. E aos 180 dias de safra, além de *L. vini* (39,07%) e *L. fermentum* (23,63%), identificou-se também a presença de *L. ferintoshensis* (Figura 10).

O *Lactobacillus amylovorus* apresentou perfil de digestão que não continha em nosso banco de dados, digerindo com as enzimas *NcoI*, *SfuI*, *EcoRI*, *HindIII* e *AvrII* (Tabela 6). Esse perfil é bastante parecido com o *L. acidophilus*. Contudo, nessa última espécie a enzima *SfuI* digere apenas o primeiro espaçador, enquanto que o *L. amylovorus* digeriu os dois primeiros espaçadores (Figura 18). A espécie *L. amylovorus* foi posteriormente confirmada a partir do sequenciamento dos genes *pheS* e 16S, com nível de similaridade de 99% para os dois genes com as sequências depositadas no Genbank (Figura 24).

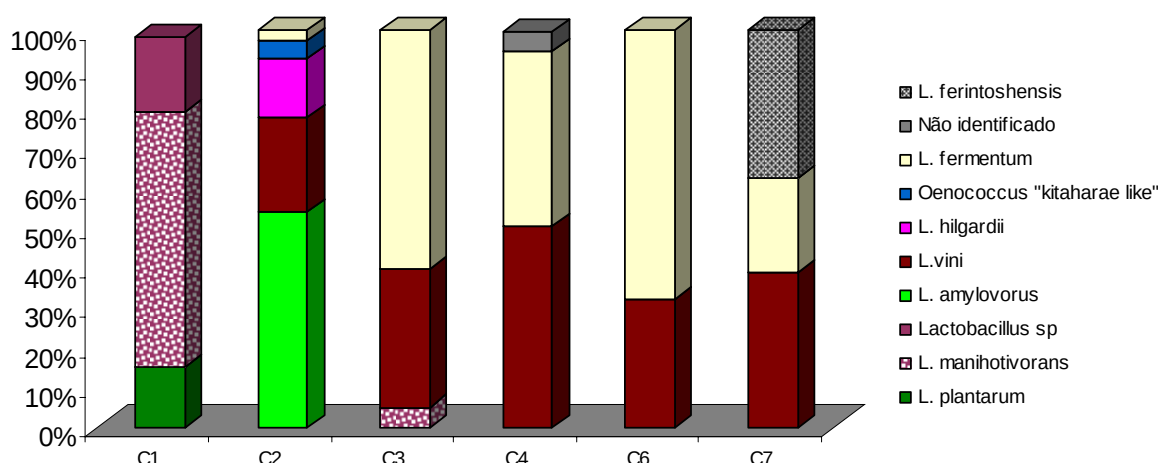


Figura 10: Distribuição dos isolados bacterianos identificados durante a safra 2007/2008 na destilaria Miriri.

4.4.2. Destilaria Trapiche

A microbiota bacteriana identificada nesta destilaria foi distinta das demais destilarias (figura 11). Isto muito provavelmente se deve ao fato de que o substrato utilizado nesta destilaria é o melaço proveniente da produção do açúcar. Além disso, esta destilaria está localizada no estado de Pernambuco e, portanto, a procedência da Cana de Açúcar é diferente. Já no início da safra (C1) observa-se o predomínio da bactéria *Weissella paramenseteroides* (66%), seguido de *Lactobacillus* (34%). Desse grupo, 7% corresponderam à espécie *L. hilgardii* e 27% não puderam ser identificados ao nível de espécie. Porém, foram observados quatro perfis distintos de restrição, o que pode ser um indício da presença de quatro espécies diferentes. Os isolados identificados como *W. paramenseteroides* apresentaram quatro espaçadores na reação de PCR e perfil de restrição distinto daqueles do nosso banco de dados (Figura 21). Com isso, só puderam ser identificados a partir da análise filogenética, através da construção de árvores filogenéticas baseadas nas seqüências de nucleotídeos obtidas do sequenciamento dos genes *pheS* e 16S, usando o agrupamento do tipo Neighbor Joining (Figura 14 e 15).

Após 30 dias de safra já não foi mais possível se observar a bactéria *W. paramenseteroides*, sendo as amostras dominadas pela espécie *L. hilgardii* (30,50%), e *L. "diolivorans like"* (64,40%), 5,10% dos isolados foram identificados como *L. mucosae*. A bactéria *L. "diolivorans like"* esteve presente em todas as outras coletas seguinte variando apenas a sua frequência (35,6%, 71,8% e 6,3%, respectivamente).

Aos 60 dias de safra, além do *L. "diolivorans like"*, foram identificadas as espécies *L. hilgardii* (35%) e *L. nagelli* (14,60%), além de isolados identificados como *Lactobacillus* sp apresentando três perfis distintos de restrição, o que pode ser um indício de espécies

diferentes. Já na amostra de 90 dias de fermentação, o processo foi dominado pela bactéria *L. "diolivorans like"* seguido pela bactéria *L. hilgardii* (23%). O percentual de 5,20% foi representado por um perfil típico de *Lactobacillus*, porém diferente dos outros *Lactobacillus sp* das amostras anteriores, mas que não foi possível identificar ao nível específico. O *Lactobacillus vini*, que nas outras destilarias esteve presente em praticamente todas as coletas, foi identificado nesta destilaria apenas com 120 dias de safra na frequência de 78,5%.

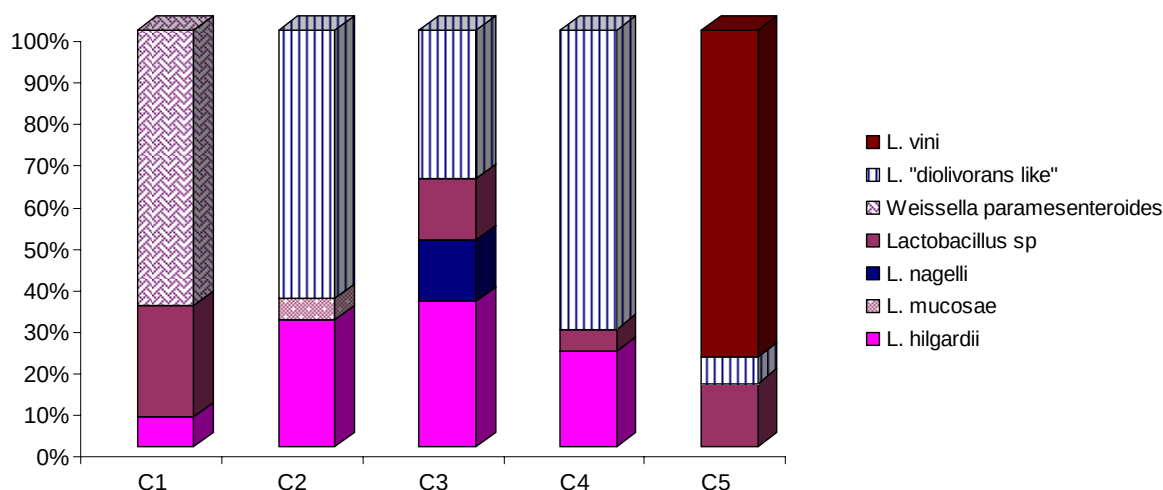


Figura 11: Distribuição dos isolados bacterianos identificados durante a safra 2007/2008 na destilaria Trapiche.

Na destilaria Trapiche percebe-se que as bactérias *Lactobacillus hilgardii* e *L. "diolivorans like"*, provável espécie nova, mostraram-se melhor adaptadas ao processo. Esses isolados identificados como *Lactobacillus "diolivorans like"* apresentaram perfis diferentes do banco de dados (Figura 20), sendo identificados por intermédio da análise filogenética, através da construção de árvores filogenéticas baseadas nas seqüências de nucleotídeos obtidas do sequenciamento do gene *pheS*, usando o agrupamento do tipo Neighbor Joining (Figura 14). Estudos futuros, tais como sequenciamento completo do gene 16S e análise de fenotipagem, serão realizados para confirmar se se trata de uma espécie nova.

4.4.3. Destilaria Japungu

Nessa destilaria, o substrato utilizado para fermentação foi o caldo misto (caldo de cana de açúcar com melaço) desde as amostras C1 até a C8. Depois desse período, que corresponde já ao fim da safra, a destilaria passou a usar melaço diluído como substrato, representada na amostragem pelas coletas M1 e M2. Os maiores teores alcoólicos foram detectados com 90 (7,35%), 150 (7,8%), 180 (7,98%) e 210 (7,09%) dias de safra, segundo

dados fornecidos pela destilaria. Entretanto, não foi possível obter esses valores depois do início do melaço como substrato. Assim como ocorreu na destilaria Miriri, os principais contaminantes bacterianos do processo nesta destilaria foram os *Lactobacilos* (96,59%). Dos 3,41 % restantes, cerca de 0,57% compreendeu o gênero *Oenococcus* e 2,84% não puderam ser identificados, mas certamente não devem se tratar de *Lactobacillus* devido a presença de quatro espaçadores na PCR (Figura 12).

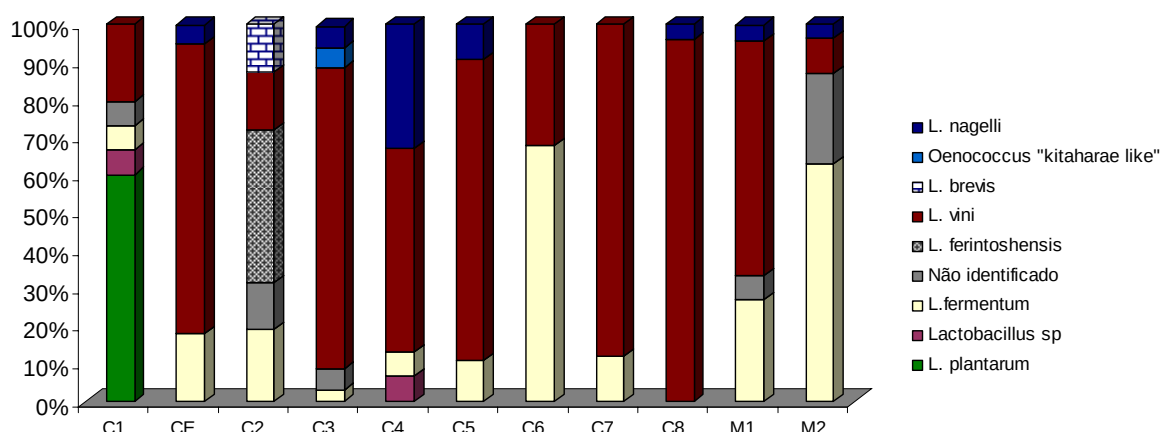


Figura 12: Distribuição dos isolados bacterianos identificados durante a safra 2007/2008 na destilaria Japungu.

Na primeira coleta, que compreende o início da safra, foram identificados entre os isolados bacterianos as espécies *L. plantarum* (60,15%), *L. fermentum* (6,48%), *L. vini* (20,41%). Os isolados de *Lactobacillus* sp compreenderam 6,48%, todos com o mesmo perfil de digestão, e os 6,48% restantes não puderam ser identificados.

Uma coleta extra foi realizada (CE, aproximadamente 25 dias de safra) antes dos 30 dias de safra, pois neste dia houve uma troca de fermento. Nesta coleta, observou-se uma mudança da microbiota, quando os isolados identificados como *L. vini* representaram 77,10% da população, seguido por *L. fermentum* com 17,72% e ainda ocorreu o aparecimento de *L. nagelli* com 5,14%. Com trinta dias de safra as bactérias já se mostravam diferentes daquelas da coleta extra, com *L. vini* diminuído sua frequência para 15,37%, enquanto *L. ferintoshensis* surgindo com a frequência de 40,46%. Nessa coleta foram observados também *L. fermentum* (18,93%), *L. brevis* (12,62%) e 12,62% dos isolados não foram identificados.

Aos 60 dias de safra, a bactéria *L. vini* voltou a dominar o processo com uma frequência de 79,90% e a bactéria *L. fermentum* diminuiu sua frequência para apenas 3%. É importante salientar que entre a coleta 2 (30 dias) e a coleta 3 (60 dias) ocorreram 3 trocas de fermento, o que pode ter influenciado nesses números. Outro fator importante nesse período foi a utilização de antibióticos diferentes daquele que vinha sendo utilizado, cujo principio

ativo é monensina. Isto pode ter selecionado a bactéria *Lactobacillus vini*. Nesta coleta ainda foram isolados *L. nagelli* (6%), *Oenococcus "kitaharae like"* (5,50%), e os demais 5,50% dos isolados não foram identificados.

Na amostra de 90 dias de safra, a bactéria *L. vini* se mantinha no processo, ainda que numa frequência menor (54%), mas também observou-se *L.nagelli* (33%), *L. fermentum* (6,50%) e 6,50% dos isolados eram *Lactobacillus* sp, porém com um perfil de digestão diferente dos isolados da primeira coleta. Neste período, ocorreu apenas uma troca do fermento (ocorrida 10 dias antes da coleta) e o antibiótico utilizado foi a monensina.

Com 120 dias de safra, foram identificados isolados de *L. vini* (79,85%), *L.nagelli* (9,40%), *L. fermentum* (10,75%). Neste período, ocorreu apenas uma troca do fermento (ocorrida 20 dias antes da coleta) e além da monensina outros antibióticos foram utilizados. Já no dia da coleta que correspondia a 150 dias de safra foi realizada uma troca de fermento, e apenas *L. vini* (32%) e *L. fermentum* (68%) foram detectados.

Aos 180 dias de safra observaram-se apenas as presenças de *L. vini* (88%) e *L. fermentum* (12%). Nos dez dias que antecederam essa coleta a monensina não foi utilizada, e sim outros antibióticos. E após 210 dias de safra, 95,90% dos isolados correspondiam a *L. vini* e 4,10% a *L. nagelli*. Assim como na coleta 7, nos dez dias que antecederam a coleta 8, a monensina não foi utilizada, sendo utilizada outros antibióticos. Isso parece sugerir que a bactéria *L. vini* apresenta sensibilidade a monesina e resistência aos outros antibióticos industriais, ao contrário do que se pode sugerir para *L. fermentum*.

Na primeira coleta após o início da utilização do melaço como substrato de fermentação (M1) observou-se a presença de *L. vini* (62%), *L.nagelli* (4,50%) e *L. fermentum* (26,95%), e os outros 6,20% dos isolados não foram identificados e apresentaram perfis de digestão distintos daqueles isolado das coletas 1 a 3. Dezesesseis dias após a primeira coleta (M2) a microbiota observada apresentou modificações, com a bactéria *L. fermentum* dominando o processo com 63% da população bacteriana. Esses resultados podem ser um indicativo de que o *Lactobacillus vini* não é bem adaptado às condições do processo com melaço.

4.4.4. Destilaria Giasa

Nesta destilaria o caldo de cana normalmente é tratado a partir de um processo de “pasteurização”. Nas duas primeiras coletas as placas apresentaram cerca de 354 e 236 colônias, respectivamente. Mas, a partir da terceira coleta (60 dias de safra) observou-se um decréscimo nesse número para 56, 11, 5, 86, e duas colônias na última coleta. Assim como nas demais destilarias, os lactobacilos constituíram os principais contaminantes deste

processo (96,1%). A primeira coleta (início da safra) apresentou a maior diversidade bacteriana, sendo constituída de *L. nagelli* (25,40%), *L. brevis* (25,60%), *L. fermentum* (16%), *Lactobacillus* sp (10,20%), *L. ferintoshensis* (7,40%) e 15,40 % dos isolados não foram identificados. (Figura 13).

Nas coletas seguintes ocorreu o predomínio do *L. vini*, com exceção da coleta 7 (180 dias de safra) na qual as duas colônias isoladas foram identificadas apenas ao nível de gênero como *Lactobacillus* sp, cujo perfil de digestão foi diferente de todos os outros isolados. A bactéria *L. fermentum* ainda foi detectada nas coletas 4 (90 dias de safra) e coleta 6 (150 dias de safra) na frequência de 18,20% e 35% respectivamente. Já a bactéria *L. nagelli*, apesar de ter aparecido já na primeira coleta, não conseguiu manter-se no processo, sendo identificado até a segunda coleta (30 dias de safra) com uma frequência de apenas 7%. Esse fato pode ter ocorrido por essa bactéria não ter se adaptado às condições do processo fermentativo.

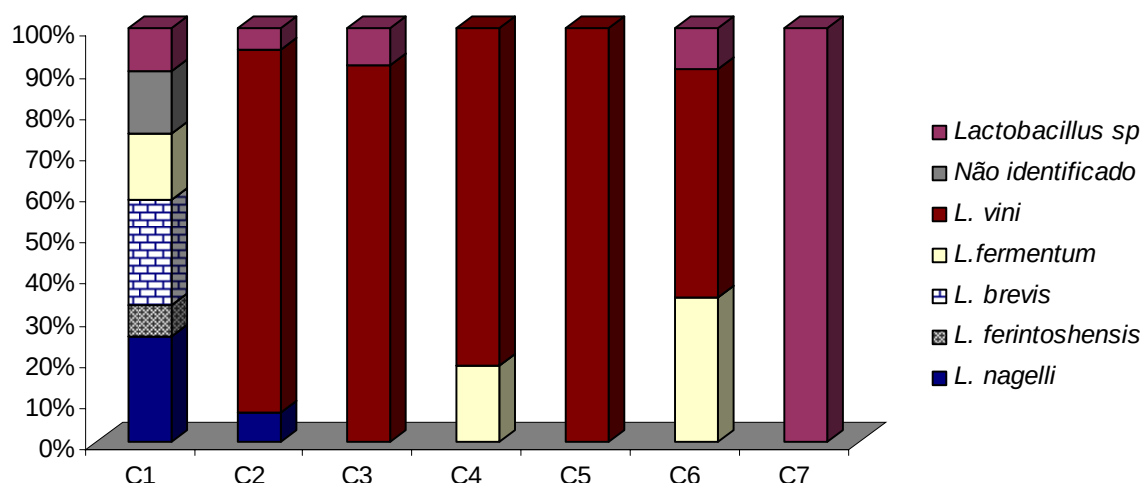


Figura 13: Distribuição dos isolados bacterianos identificados durante a safra 2007/2008 na destilaria Giasa.

Os isolados identificados como *L. vini* apresentaram na PCR perfil típico de *Lactobacillus*, porém apresentaram dois perfis de restrição: o perfil I apresentou digestão com as enzimas *SphI*, *DraI* e *EcoRI* e perfil II apresentou digestão com as enzimas *SphI* e *EcoRI* (Figura 19). Nenhum desses perfis constava em nosso banco de dados. A identificação desses isolados se deu primeiramente com o sequenciamento do gene 16S, com as seqüências dos isolados de ambos os perfis de restrição apresentando 99% de similaridade com seqüências depositadas no Genbank (Figura 23). Não havia seqüência depositada de *pheS* para essa bactéria. Posteriormente, com o sequenciamento do gene *pheS* da linhagem tipo (seqüência ainda não depositada no NCBI), foi possível confirmar essa identificação por intermédio da análise filogenética, através da construção de árvores filogenéticas baseadas nas seqüências de

nucleotídeos obtidas do sequenciamento do gene *pheS*, usando o agrupamento do tipo Neighbor Joining (Figura 14).

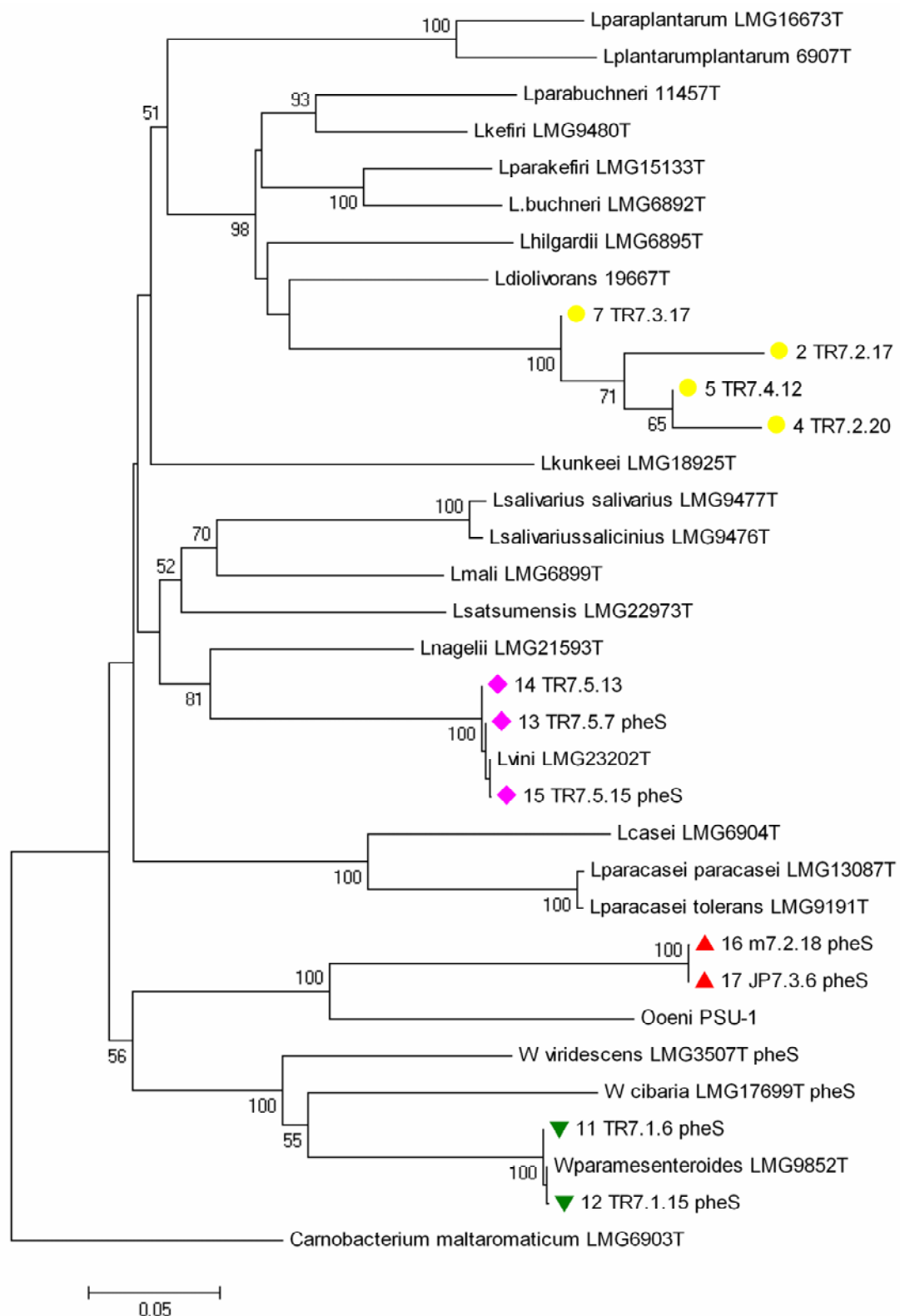


Figura 14. Árvore filogenética construída a partir das seqüências do gene *pheS* usando o método de Neighbor Joining (Círculo = isolados do grupo “*L. diolivorans* like”, Losango = isolados do grupo *L.vini*, Triângulo vermelho = isolados do grupo *O.“kitaharae* like”, Triângulo verde = isolados do grupo *W.paramesenteroides*).

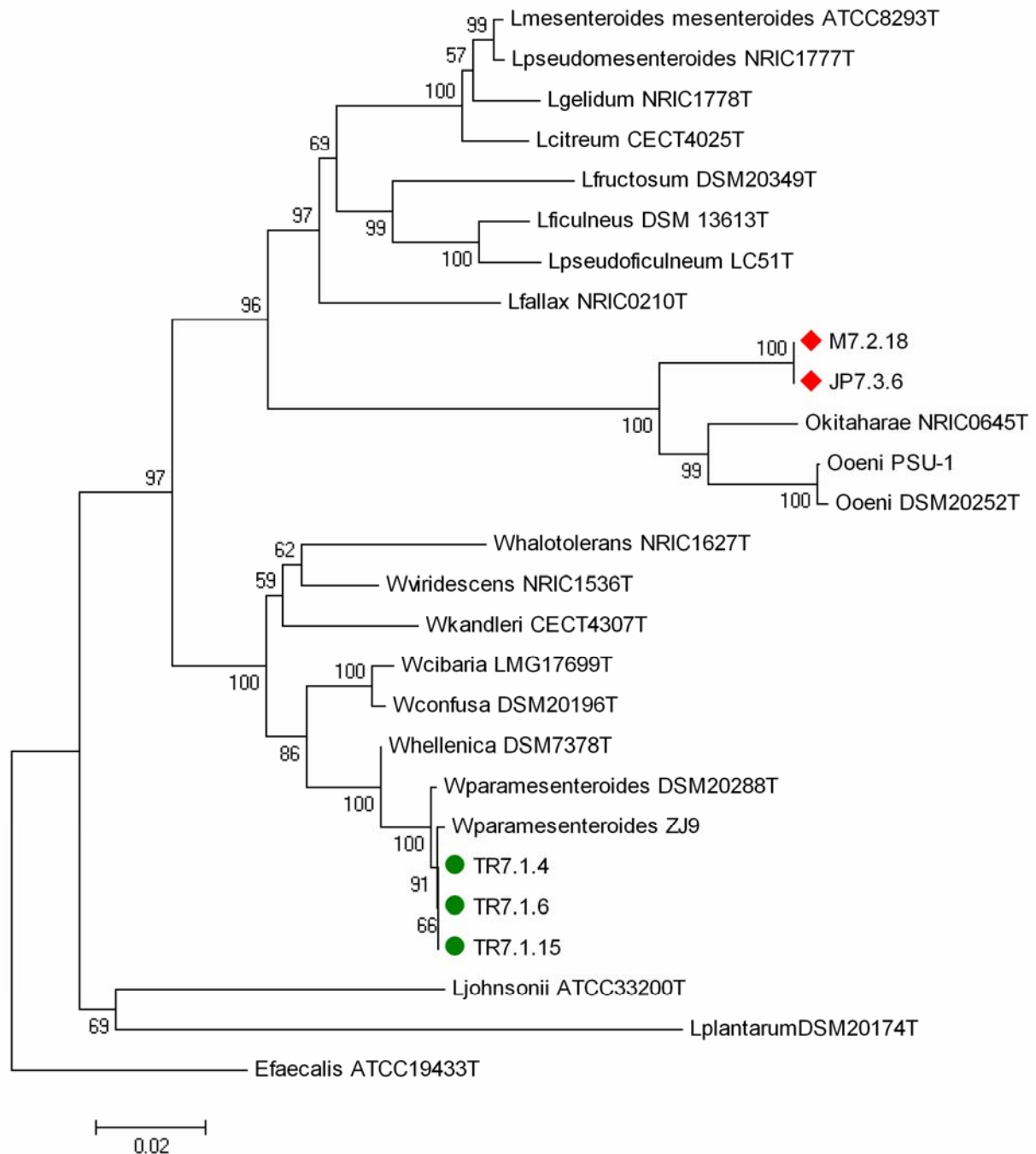


Figura 15: Árvore filogenética construída a partir das seqüências do gene 16S usando o método de Neighbor Joining (Círculo = isolados do grupo *W.paramesenteroides*, Losango = isolados do grupo *O. "kitaharae like"*).

Tabela 6: Perfis de digestão da região intergênica 16S-23S de amostras de *Lactobacillus* isolados neste trabalho que não constavam no banco de dados de Moreira *et al.*, 2005.

	<i>Sph</i> I	<i>Nco</i> I	<i>Nhe</i> I	<i>Ssp</i> I	<i>Sfu</i> I	<i>Eco</i> RV	<i>Dra</i> I	<i>Vsp</i> I	<i>Hinc</i> II	<i>Eco</i> RI	<i>Hind</i> III	<i>Avr</i> II
<i>Lactobacillus</i>												
	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>L. amylovorus</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>L. camelliae</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>L. hilgardii</i>	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>L. manihotivorans</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. nagelli</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>L. paracasei</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>L. satsumensis</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
	+	-	-	-	-	-	+/-	-	-	+	-	-
<i>L. vini</i>	+	-	-	-	-	-	+/-	-	-	+	-	-
	+	-	-	-	-	-	+/-	-	-	+	-	-

4.5. Análise Intra-específica dos isolados

4.5.1. *Lactobacillus fermentum*

A técnica rep-PCR com o primer GTG5 foi utilizada com o objetivo de diferenciar a nível intra-específico os isolados identificados como *Lactobacillus fermentum* nas safras 2005/2006 e 2006/2007 em duas destilarias de álcool combustível: seis obtidos na destilaria Miriri durante a safra 2005/2006, cinco obtidos na destilaria Miriri durante a safra 2006/2007 e 18 na destilaria Japungu durante a safra 2006/2007.

Na destilaria Miriri foram identificados seis tipos diferentes de *L. fermentum*, já na destilaria Japungu foram identificados oito tipos. Dentre esses tipos, o tipo I mostrou-se presente em ambas as destilarias nas diferentes safras. Na destilaria Japungu, o final da safra foi caracterizado pela mudança do substrato de fermentação, de caldo de cana para melaço. Neste caso observou-se um tipo específico de *Lactobacillus fermentum* para esse substrato o qual foi denominado de tipo II (Figura 16).

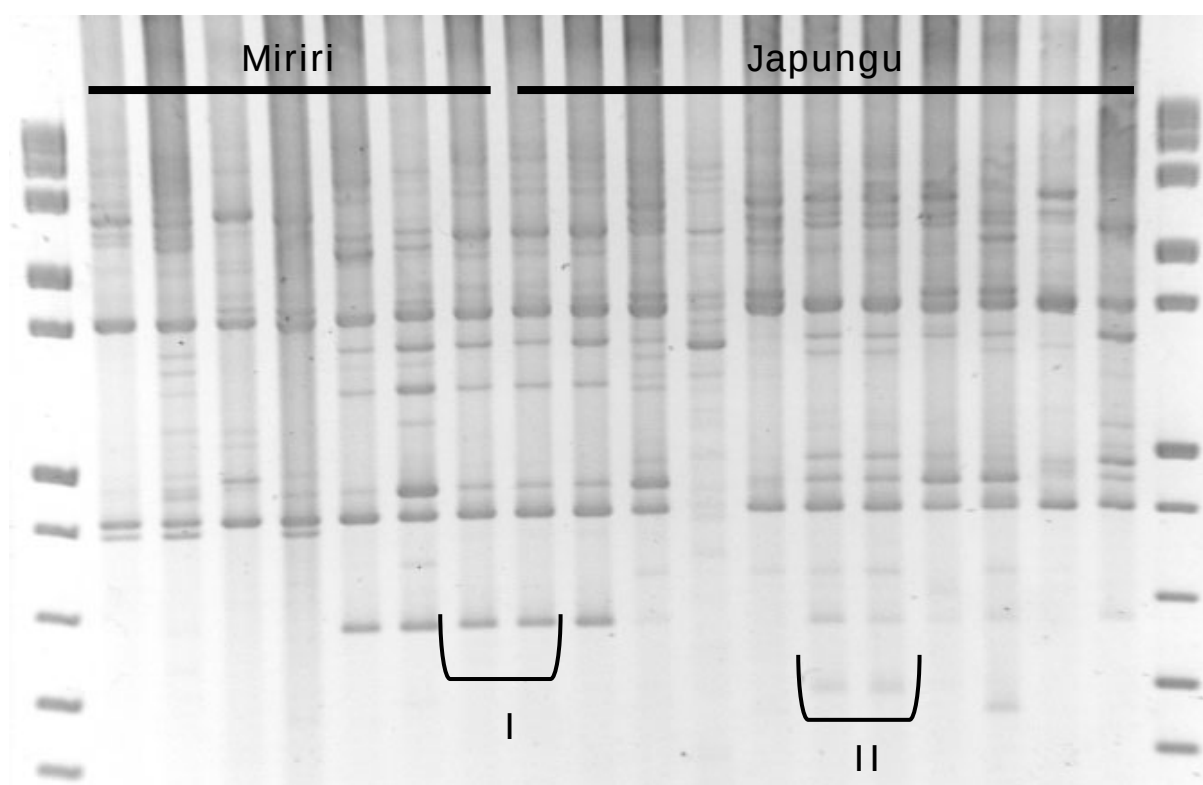


Figura 16: Perfis de Rep-PCR obtidos dos isolados de *Lactobacillus fermentum* das destilarias Miriri e Japungu durante as safras 2005/2006 e 2006/2007. O perfil I foi identificado em ambas as destilarias e o perfil II foi específico para a fermentação de melaço.

4.5.2. *Lactobacillus vini*

Assim como aconteceu com *L. fermentum*, foram obtidos diferentes perfis de amplificação (fingerprinting) dentre os isolados de *L. vini* isolados nas destilarias estudadas na safra 2007/2008. Na destilaria Japungu foram detectados 8 diferentes perfis de amplificação (nomeados perfil 1 a 8). Na destilaria Giasa, foram detectados 7 perfis de amplificação, sendo observados perfis de amplificação iguais aos visualizados na destilaria Japungu, como por exemplo os perfis 2, 3, 5 e 6, já o perfil de amplificação nomeado como perfil 9 é distinto daqueles identificados na destilaria Japungu. Já na destilaria Miriri foram encontradas 5 perfis de amplificação, sendo encontrados os perfis 1, 2, 5 da destilaria Japungu, o perfil 9 da Giasa e um novo perfil denominado de perfil 10. Na destilaria Trapiche todos os isolados apresentaram mesmo perfil de amplificação, porém diferente dos perfis apresentados pelas demais destilarias (Figura 17). Percebe-se que perfis de amplificação diferentes ocorrem na mesma destilaria, assim como estes perfis podem estar presentes em outras destilarias. Os perfis 2 e 5 foi observado em todas destilarias, exceto na Trapiche que possui seu próprio perfil e coincidentemente essa destilaria utiliza o melaço como substrato de fermentação.

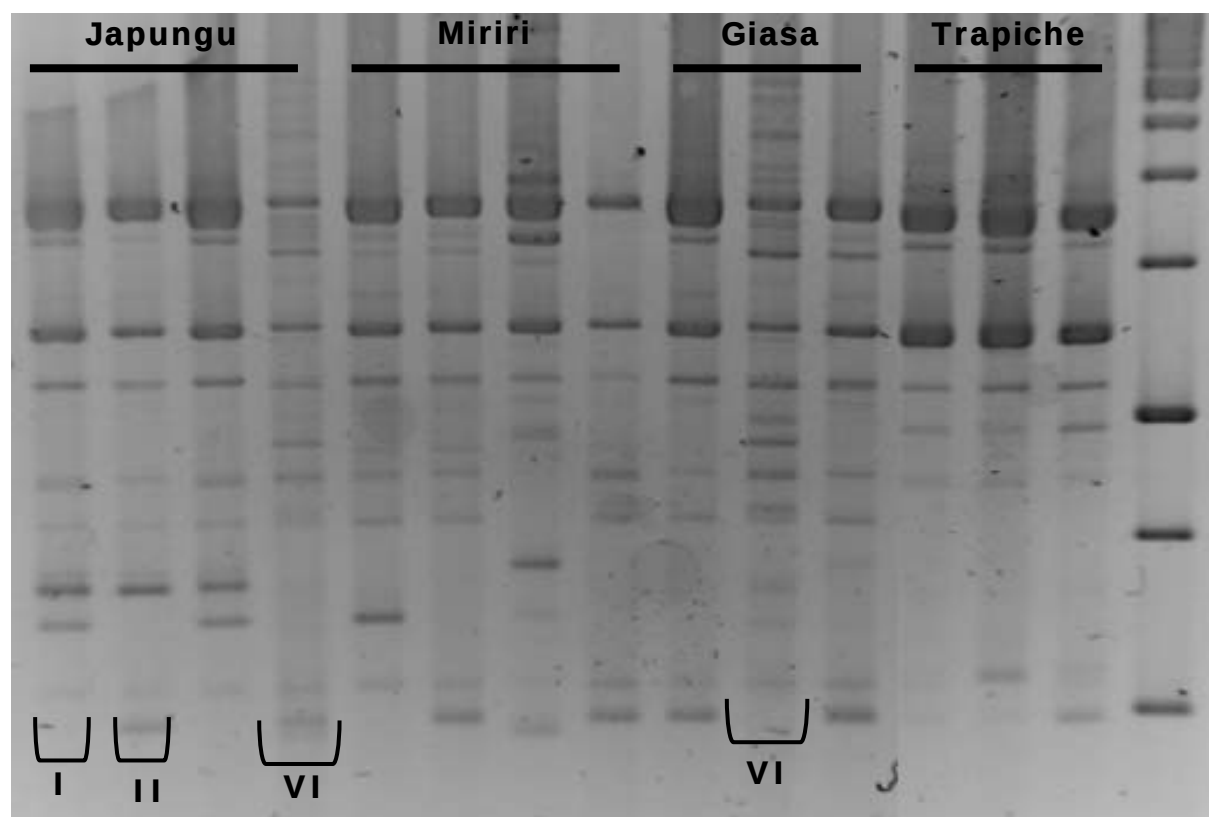


Figura 17: Perfis representativos de Rep-PCR obtidos dos isolados de *Lactobacillus vini* das destilarias Miriri, Trapiche, Japungu e Giasa durante a safra 2007/2008.

5. Discussão

Nossos resultados apontam o gênero *Lactobacillus* como o grupo de bactérias mais abundante na produção do álcool combustível, corroborando os dados da literatura mostrados por Skinner e Leathers (2004) e Schell *et al.* (2007) a partir dos estudos com produção de álcool combustível a partir do milho. Algumas espécies citadas em trabalhos anteriores foram encontradas em nossos estudos, tais como: *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. agilis* (Gallo, 1990), *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. hildardii*, *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. casei*, *W. paramesenteroides* (Skinner e Leathers, 2004). A divergência de algumas espécies encontradas neste trabalho, tanto no que se refere às espécies encontradas quanto à diversidade encontrada, podem ser explicadas devido às diferenças dos processos.

Nossos estudos foram realizados em destilarias dos estados da Paraíba e Pernambuco, região Nordeste do Brasil, onde as condições climáticas são diferentes das condições da região Sudeste do Brasil, desta forma favorecendo o aparecimento de diferentes espécies na cultura de cana-de-açúcar. Skinner e Leathers (2004) realizaram um estudo com fermentação de milho para produção de etanol em dois tipos de processos. No tipo “wet mill” os grãos de milho são triturados e fracionados antes da fermentação num meio aquoso em amido, proteína, fibra e germe e os produtos primários da via úmida incluem amido e produtos derivados. Já no tipo “dry grind”, mais comum na produção de etanol nos Estados Unidos, o grão de milho é triturado em farinha e o amido da farinha é hidrolisado e convertido a etanol. Apesar da grande diferença nos processos, a correspondência de algumas bactérias entre os processos utilizando milho e cana de açúcar mostra que essas espécies são muito adaptadas a processos fermentativos.

A microbiota bacteriana foi recentemente descrita para o processo de fermentação alcoólica tradicional no Vietnã, também dominada por bactérias lácticas (LAB), dentre as quais se destacam *Pediococcus pentosaceus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *Weissella confusa* e *W. paramesenteroides* (Thanh *et al.*, 2008). Espécies produtoras de amilase (*Bacillus subtilis*, *B. circulans*, *B. amyloliquefaciens* e *B. sporothermodurans*), bactérias do ácido acético (*Acetobacter orientalis* e *A. pasteurianus*) e patógenos de plantas (*Burkholderia ubonensis*, *Ralstonia solanacearum* e *Pelomonas puraquae*) foram também detectados (Thanh *et al.*, 2008). Novamente, *L. plantarum*, *L. brevis* e *B. subtilis* se destacam no processo fermentativo.

No nosso estudo foi verificada a existência de uma dinâmica populacional ao longo do processo, percebendo-se que as bactérias que predominam na primeira coleta no processo não conseguem permanecer. Observou-se também que nas destilarias da Paraíba, apesar de *L.vini* e *L.fermentum* estarem presentes nos três processos, estas bactérias se comportam de forma

diferente em cada um deles, no que se refere à frequência de aparecimento. Já na destilaria de Pernambuco, a Trapiche, percebe-se uma microbiota bem distinta, e predominando o *L. hilgardii* assim como *L. "diolivorans like"*, surgindo que o *L. vini* pode não estar bem adaptado ao processo cujo substrato é o melaço. Além disso, percebe-se que uma mesma bactéria se comporta diferentemente nos processos e no mesmo processo estas apresentam certa variação no que se refere à presença no processo ao longo da safra.

Ainda são poucos os dados encontrados na literatura sobre contaminantes bacterianos da fermentação alcoólica de caldo de cana no Brasil. No Brasil, segundo Gallo (1990) e Oliva-Neto (1990), o primeiro relato sobre assunto foi apresentado por Neves em 1938 que mencionou as fermentações lácticas, butíricas e de dextrana como os principais acidentes na fermentação alcoólica de caldo de cana de açúcar e de melaço. Esses problemas certamente estão relacionados com a presença de bactérias que devem ser provenientes do solo, acompanhando a cana até a indústria, sendo causadores de vários distúrbios em diferentes etapas da produção do álcool (Alquati, 1990). Deve-se levar em consideração também a presença de bactérias que induzem a fermentação acética que pertencem principalmente ao gênero *Acetobacter*. Essas bactérias se reproduzem ainda no campo quando da demora no transporte da cana após o corte, e podem se alojar nas peneiras, nos tanques de coleta de caldo e no separador (Maeda, 1997).

No nosso trabalho, segundo os dados das destilarias (Tabela 7), não foi verificado prejuízos quanto ao rendimento em etanol, devido à presença de *L. vini* e *L. fermentum*, pois tanto na destilarias Miriri e Japungu foi observado não haver diferenças no rendimento em etanol, quando essas bactérias estavam em maior frequência. Nas outras destilarias não tivemos acesso aos dados do processo. As diversas trocas de fermento observada na destilaria Japungu não parecem ter ocorrido por aumento no número de bactéria ou até queda no rendimento etanólico, mas sim devido ao aparecimento de leveduras contaminantes no processo, como por exemplo, *Dekkera bruxelensis* e *Zygosaccharomyces sp.* (Tabela 7).

Em geral, a carga bacteriana que entra no processo pode ser diminuída com um tratamento térmico, aquecendo-se o caldo de cana até 111°C. Embora eficaz na eliminação da maioria das bactérias, principalmente dos lactobacilos, esse processo acaba selecionando as bactérias que esporulam tais como o *Bacillus brevis* (Duque, 1991). Quando já instalada no processo, a população bacteriana é controlada a partir do uso de antibióticos e pelo tratamento com ácido sulfúrico diluído para baixar o pH para valores de 2,2 a 2,5. Essa diminuição do pH pode, em sinergia com a concentração de ácidos orgânicos no meio, potencializar os efeitos de certas linhagens bacterianas (Nobre, 2005). Em relação aos antibióticos, aqueles a base de monesina parecem ser os mais eficazes no controle da população bacteriana (Stroppa, 1998).

Bischoff *et al.* (2007), testou a suscetibilidade a antibióticos de 37 isolados de lactobacilos provenientes do processo “wet mill” sem histórico de uso de antibióticos e 42 isolados do processo “dry grind” que dosava periodicamente o antibiótico virginamicina. Em geral, os lactobacilos isolados do processo “dry grind” apresentaram maior resistência aos antibióticos testados ampicilina, cloranfenicol, penicilina, tetraciclina, virginamicina e Synercid (quinupristina/dalfopristina) do que os isolados da instalação “wet mill”. Isto mostra a indução da resistência bacteriana com o uso contínuo de um único antibiótico, como normalmente é evidenciado nos isolados bacterianos clínicos. Esta seleção bacteriana poderá influenciar na população de leveduras, produtividade do processo e na própria estabilidade da fermentação.

Se compararmos os dados do processo quanto ao uso de antibióticos na destilaria Japungu e Miriri com os dados da dinâmica populacional, parece que o *L. vini* apresenta resistência a monensina, antibiótico usado na destilaria Japungu, onde esta bactéria dominou a safra. Já na destilaria Miriri, onde a monensina não foi utilizada e sim outros antibióticos, a frequência de *L. fermentum* se mostrou maior.

Ao serem introduzidas no processo, essas bactérias sofrem uma sucessão seletiva desde a cana colhida até o mosto fermentado (Oliva-Neto, 1990). Em estudo realizado em uma destilaria da região Sudeste, Gallo (1990) mostrou que os *Lactobacillus* constituíram 59,75% de todos os contaminantes do processo, seguidos por *Bacillus* (26,58%), *Staphylococcus* (8,76%), *Streptococcus* (0,70%) e outros. As espécies mais frequentes naqueles estudos foram: *Bacillus coagularis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Bacillus stearothermophilus* e *Lactobacillus plantarum*, outras espécies também foram encontradas, como *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus delbrueckii* e outros. Já o trabalho desenvolvido por Oliva-Neto (1990), analisando o leite de levedura sem tratamento ácido de duas destilarias, observou que a bactéria predominante foi *L. fermentum* (62%), seguida de *L. murinus* (9%), *L. plantarum* (2%) e *Leuconostoc* (2%). Todos os isolados apresentaram resistência a 7% (v/v) de etanol e 64% desses apresentaram resistência a 10% de etanol, demonstrando adaptação ao ambiente alcoólico. A característica de floculação do fermento foi manifestada em 67% das cepas testadas. Com isso foi possível mostrar que as usinas que já apresentavam problemas microbiológicos também foram aquelas que apresentavam o maior índice de contaminação, de cepas resistentes ao etanol e de floculação do fermento comercial (Oliva-Neto, 1990). A indução da floculação vem sendo apontada como um problema relevante na fermentação alcoólica e parece ser induzido pela ação sinérgica entre a presença de cálcio e de bactérias da espécie *L. fermentum* (Bromberg, 1994). A floculação induzida por diferentes linhagens de

L. fermentum provoca, dentre outras coisas, queda na viabilidade da população de leveduras que pode atingir até o impressionante valor de 96% (Freguglia, 1998). A viabilidade da população de *S. cerevisiae* foi diminuída para 60% em curto tempo de incubação mesmo com células inativadas de *L. fermentum*, mostrando que os metabólitos produzidos por essa bactéria parecem influenciar negativamente no processo (Freguglia, 1998; Iemma, 2005). Esse tipo de resultado encontra contradição na literatura. Nobre (2005) mostrou que culturas de *S. cerevisiae* Y-904 apresentam queda na viabilidade induzido por *L. fermentum* e *B. subtilis* apenas quando a acidez volátil e total apresentou valores altos e o pH valores baixos. Adicionalmente, apenas as células inativadas de *B. subtilis* promoveram inativação das leveduras. Novamente isso reflete a especificidade da relação entre a linhagem de *S. cerevisiae* e a linhagem bacteriana na interação microbiana no processo.

Mas, mesmo que algumas linhagens floculadoras de *L. fermentum* não interfiram na viabilidade das leveduras, a indução dos flocos já causa mudanças no coeficiente de sedimentação da população de leveduras que leva a perda celular durante a centrifugação para reaproveitamento da biomassa (Castro e Souza, 2000). Essa progressiva diminuição na biomassa ao longo dos ciclos leva a diminuição na produção de etanol. Além da espécie *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. fructivorans*, *L. fructosus* e *L. buchneri* também são capazes de induzir floculação nas leveduras em condições que dependem tanto da linhagem quanto da densidade bacteriana no processo (Garcia, 2000; Alcarde, 2001). Além disso, o aumento tanto na temperatura como no teor alcoólico do processo parecem estimular o mecanismo de floculação induzido por bactérias (Alcarde, 2001).

Experimentos de competição foram realizados em um sistema piloto de bancada utilizando culturas mistas de *S. cerevisiae* e alguns isolados de *L. fermentum*, simulando a infecção bacteriana das dornas de fermentação nas usinas, com o objetivo de estudar a influência da contaminação por bactéria láctica na fermentação alcoólica. Os resultados mostraram que na relação levedura/bactéria em torno de 0,9 as características vitais e de crescimento da levedura foram seriamente comprometidos quando a acidez do meio foi elevada para valores acima de 4,8 g/l, expressa em gramas de ácido láctico. A produtividade de etanol e a taxa de consumo de açúcar sofreram queda semelhante (em torno de 54%) nos ciclos onde a acidez e a contaminação foram máximas (Oliva-Neto, 1990). Na indústria, essas quedas devem ser provocadas também pela produção de ácido acético por *Acetobacter* (Maeda, 1997). Entretanto, essa queda na produção de etanol parece ser muito dependente da combinação entre determinadas linhagens de levedura e determinadas linhagens bacterianas (Kaji, 1989). Isto mostra que a presença de alguns isolados bacterianos em proporções elevadas na dorna poderia afetar significativamente a capacidade fermentativa da biomassa de

leveduras. Esse trabalho foi posteriormente repetido em substratos de fermentação suplementado com extrato de levedura e aminoácidos (Oliva-Neto, 1995). Os resultados mostraram que após 4 a 7 ciclos de fermentação de 20 horas ocorreu o rápido crescimento da população bacteriana, culminando com a inibição da população de leveduras após 8 a 12 ciclos provocada pelo aumento da acidez do meio. O maior crescimento bacteriano foi observado quando houve complementação do meio com aminoácidos, mas não com sais, vitaminas ou açúcares (Oliva-Neto, 1995). Os aminoácidos devem ser os principais componentes presentes no extrato de levedura que estimulam o crescimento das bactérias lácticas durante a fermentação, e a quantidade do extrato de levedura parece ser crítica no estímulo do crescimento. Pode-se imaginar que a lise celular que ocorre na população de leveduras ao longo dos ciclos fermentativos possa liberar para o mosto os aminoácidos e peptídeos que estimulariam o crescimento bacteriano no processo. Outros fatores que influenciaram o crescimento da população bacteriana na fermentação alcoólica foram os seguintes: 1) a duração dos ciclos de fermentação, já que ciclos com 20 horas foram mais estimuladores do crescimento bacteriano do que os de 12 horas e 2) e a velocidade de centrifugação do processo, visto que baixas velocidades de centrifugação do fermento em cerca de 870 x g favorecem mais o desenvolvimento das bactérias contaminantes quando comparadas com altas velocidades em torno de 5000 x g.

Além disso, diferenças próprias do processo fermentativo podem favorecer ao aparecimento de diferentes espécies, como por exemplo, as destilarias do nordeste usam o caldo de cana não tratado, introduzindo no processo fermentativo cerca de 10^7 células de bactérias por ml de substrato; já as destilarias do sudeste usam o caldo tratado, introduzindo menos bactérias (10^3 - 10^5 células por ml), contudo, contaminações bacterianas mais severas têm sido observadas nas destilarias da Região Sudeste do Brasil. Isto sugere que mais do que a carga bacteriana, o tipo bacteriano envolvido no processo de contaminação deve definir a severidade do episódio. Portanto, linhagens diferentes de uma mesma espécie bacteriana devem se comportar diferencialmente em diferentes processos industriais. O genótipo bacteriano e o tipo do processo industrial devem formar o conjunto que definirão a intensidade de contaminação da fermentação. Corroborando com esta idéia, Yokota e Oliva-Neto (1991) verificaram que algumas linhagens de *Lactobacillus fermentum* têm causado a floculação das células de leveduras quando presentes em determinada proporção no meio, enquanto que outras linhagens desta mesma espécie não provocam esse efeito. Esse efeito espécie-dependente também foi verificado em relação à manutenção da viabilidade celular das leveduras, pois os dados obtidos por Cherubim (2003) em culturas mistas mostraram que a levedura de panificação Fleishmann foi mais sensível à presença da linhagem *L. fermentum*.

CCT 1407 do que as linhagens industriais PE-2 e M-26. Dados da análise da dinâmica da população de leveduras em processos industriais na região Nordeste mostraram que essa linhagem de panificação, muito utilizada no passado recente no início da fermentação na maioria das destilarias do Brasil, não é capaz de se fixar no processo e é rapidamente suplantada por outras linhagens de *S. cerevisiae* (Silva-Filho *et al.*, 2005). Suger-se que a provável explicação para esse achado deve se basear na composição da população de bactérias no processo. Portanto, a dinâmica da população de bactérias deve influenciar na dinâmica da população de leveduras e, assim, interferir no rendimento industrial como já fora preconizado em trabalhos anteriores (Kaji, 1989; Nobre, 2005). Conseqüentemente, os dados mostram a importância da discriminação das diferentes linhagens bacterianas que podem interferir no processo fermentativo. Esses estudos foram iniciados com o uso da técnica de RAPD no estudo dos isolados de *L. fermentum* provenientes de usinas de São Paulo. Os resultados mostram a grande diversidade de tipos celulares a partir do polimorfismo nos padrões de amplificação (Variane, 1996), tal como já apontavam os dados fisiológicos de indução de floculação, indução de queda da viabilidade celular de leveduras e resistência a antibióticos descritos acima. No presente trabalho avaliamos a variabilidade intra-específica de isolados de *L. fermentum* e *L. vini* com a técnica REP-PCR usando o iniciador (GTG)₅. Esta técnica se mostrou viável para a análise intra-específica dos isolados do processo, e portanto importante para o acompanhamento da dinâmica populacional bacteriana. Dentro do contexto industrial e pelo que tem sido citado na literatura, torna-se uma técnica extremamente importante, uma vez que não importa apenas saber qual a bactéria que está no processo, mas sim o tipo específico, e principalmente identificar aquele que são prejudiciais ao processo. Este trabalho indicou que os nossos isolados não causaram prejuízos aos processos, logo já é possível identificar alguns perfis que não devem causar preocupação quando presentes nos referidos processos de fermentação industrial de álcool combustível.

Os nossos resultados quanto à bactéria *Lactobacillus vini*, onde esta bactéria predomina na safra das destilarias da Paraíba, corroboram com os resultados de Passoth *et al.* (2007). Segundo esses autores, no processo de produção de etanol, a partir de amido de trigo, na Suíça há a predominância de *Dekkera bruxellensis* e *Lactobacillus vini*, com elevado número de bactérias lácticas, e a qualidade do etanol, a produtividade e estabilidade do processo é alta; de onde eles concluem que *D. bruxellensis* e *L. vini* podem ser consideradas como organismos de produção de etanol comercial. Contudo ainda, não é possível definir se isto também se aplica para o processo industrial de álcool combustível quando o substrato é a cana de açúcar. Apesar de que em algumas coletas foi observado que presença de *D. bruxellensis* quando também foi detectado *L.vini*, mas este fato não foi observado em todas as

coletas nas destilarias Japungu e n Miriri. Já na destilaria Giasa quase em todas as coletas havia a presença de *D. bruxellensis* com proporção variando entre 20 e 40%, contudo não temos os dados de rendimento etanólico. No entanto, nossos resultados indicam para o fato de *D. bruxellensis* e *L. vini* podem ser consideradas como organismos de produção de etanol comercial nos procesos que utilizam cana de açúcar, porém estudos mais detalhados devem ser realizados para chegarmos a uma conclusão.

Pouco se sabe sobre a bactéria *L. vini*, essa bactéria foi isolada do processo de fermentação do vinho (Rodas *et al.*, 2005), sendo descrita como nova espécie por Rodas *et al.* (2006). Os dados disponíveis sobre a fisiologia desta bactéria ainda é limitado, e segundo Passoth *et al.* (2007), só é possível especular sobre a função do *L. vini* no processo fermentativo para produção de álcool. No entanto, segundo estes autores, como aparentemente, *L. vini* e *D. bruxellensis* formam uma comunidade estável no processo, um consócio destes microorganismos podem funcionar para estabilizar a população e a produção de etanol.

Esses dados são extremamente importantes para produção de etanol no nordeste brasileiro, pois De Souza Liberal (2007) demonstrou que a *D. bruxellensis* é uma das leveduras contaminantes mais importante em destilaria produtoras de álcool combustível a partir o caldo da cana de açúcar, especialmente em sistemas de fermentação contínua no nordeste. O presente trabalho apresenta pela primeira vez, que a bactéria *L. vini* é o principal contaminante bacteriano destes processos no nordeste. Logo, trabalhos futuros já estão sendo planejados para se conhecer o genoma desta bactéria e assim podermos inferir algo sobre a sua fisiologia e metabolismo, a exemplo do que já está sendo feito em nosso laboratório com *D. bruxellensis*. Assim como simulações do processo serão realizadas no laboratório com as leveduras *D. bruxellensis*, *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *L. vini*, pois a partir desses resultados sabermos se este fato também ocorre para processos a partir da cana de açúcar e só assim será possível prever um mecanismo que ofereça a indústria sucroalcoleira uma estratégia que vise estabilizar a população do processo e melhorar a produção de etanol.

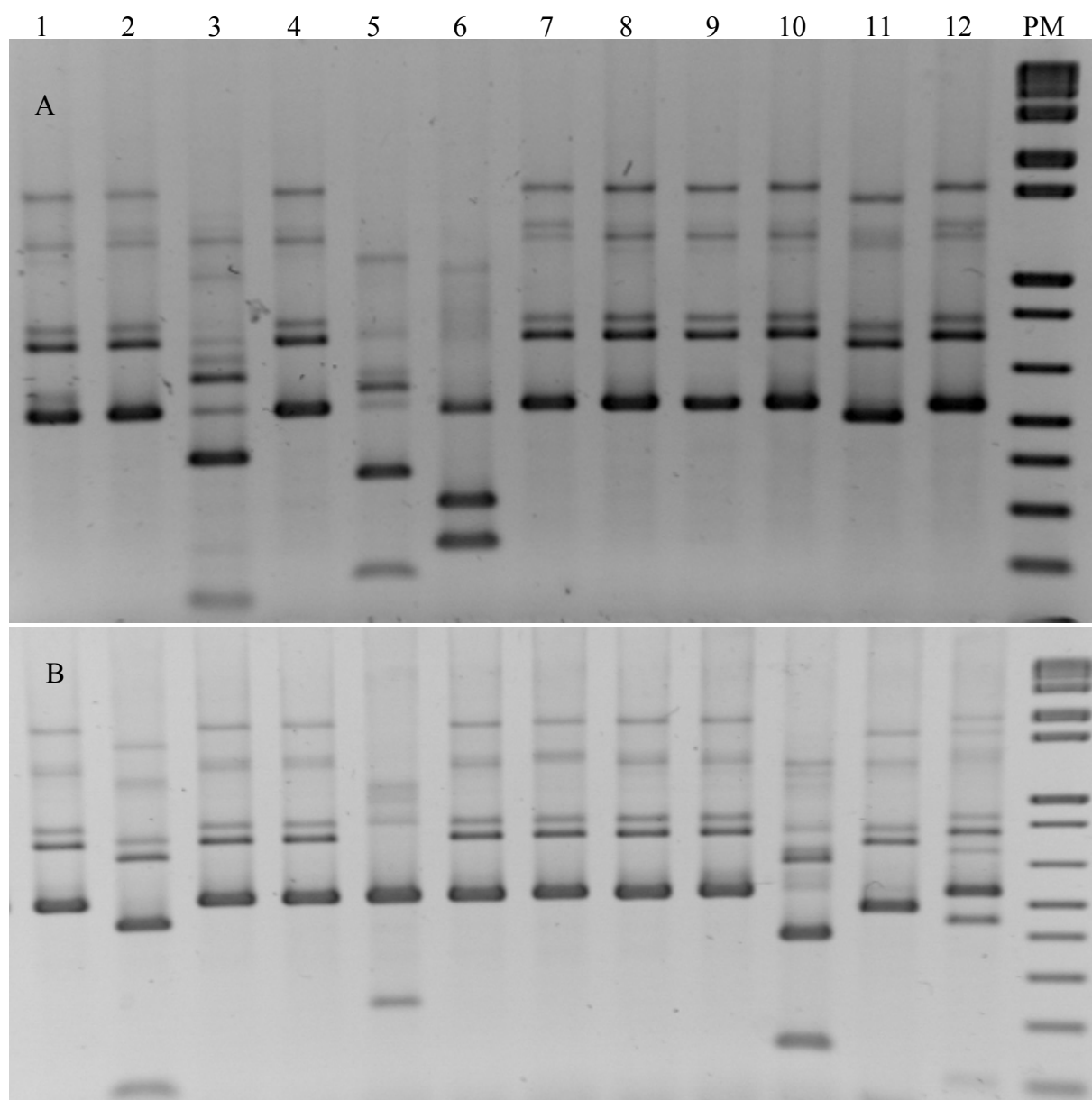


Figura 18: Perfil de digestão dos isolados de *L. manihotivorans* (A) e *L. amylovorus* (B). *Sph*I (linha 1), *Nco*I (linha 2), *Nhe*I (linha 3), *Ssp*I (linha 4), *Sfu*I (linha 5), *Eco*RV (linha 6), *Dra*I (linha 7), *Vsp*I (linha 8), *Hinc*II (linha 9), *Eco*RI (linha 10), *Hind*III (linha 11) e *Avr*II (linha 12). PM representa o marcador de peso molecular de 1Kb.

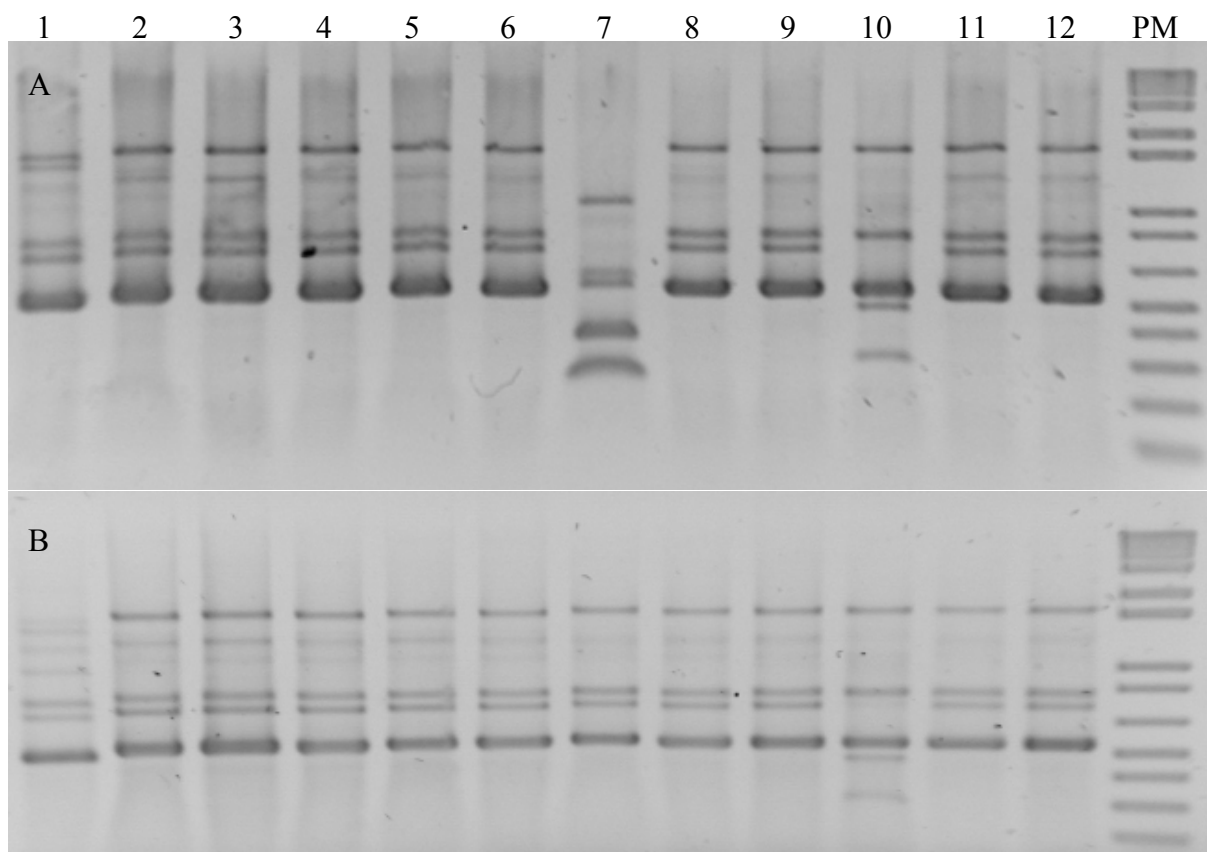


Figura 19: Perfil de digestão dos isolados de *L. vini*. (A = tipo I e B = tipo II) *SphI* (linha 1), *NcoI* (linha 2), *NheI* (linha 3), *SspI* (linha 4), *SfuI* (linha 5), *EcoRV* (linha 6), *DraI* (linha 7), *VspI* (linha 8), *HincII* (linha 9), *EcoRI* (linha 10), *HindIII* (linha 11) e *AvrII* (linha 12). PM representa o marcador de peso molecular de 1Kb.

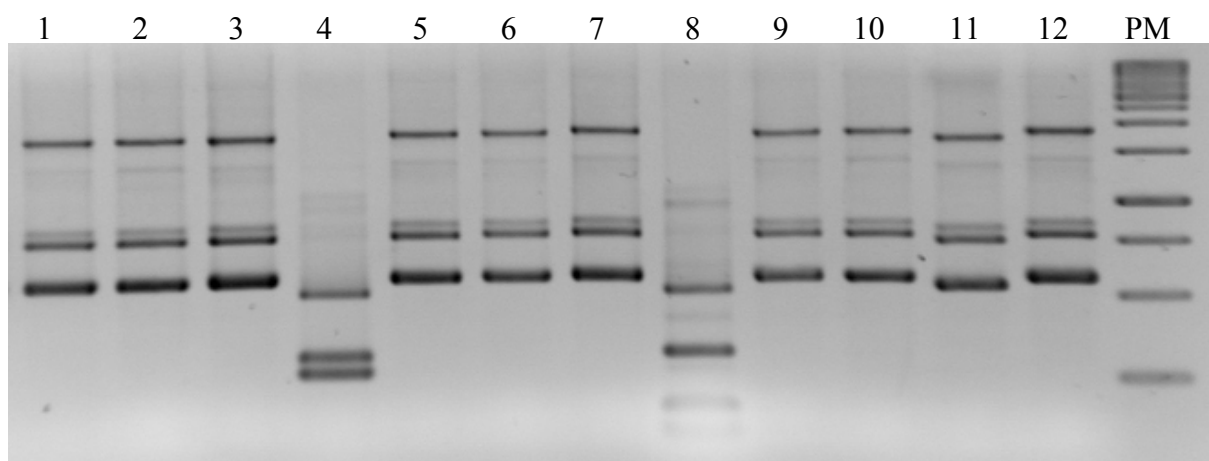


Figura 20: Perfil de digestão dos isolados de *L. "diolivorans like"*. *SphI* (linha 1), *NcoI* (linha 2), *NheI* (linha 3), *SspI* (linha 4), *SfuI* (linha 5), *EcoRV* (linha 6), *DraI* (linha 7), *VspI* (linha 8), *HincII* (linha 9), *EcoRI* (linha 10), *HindIII* (linha 11) e *AvrII* (linha 12). PM representa o marcador de peso molecular de 1Kb.

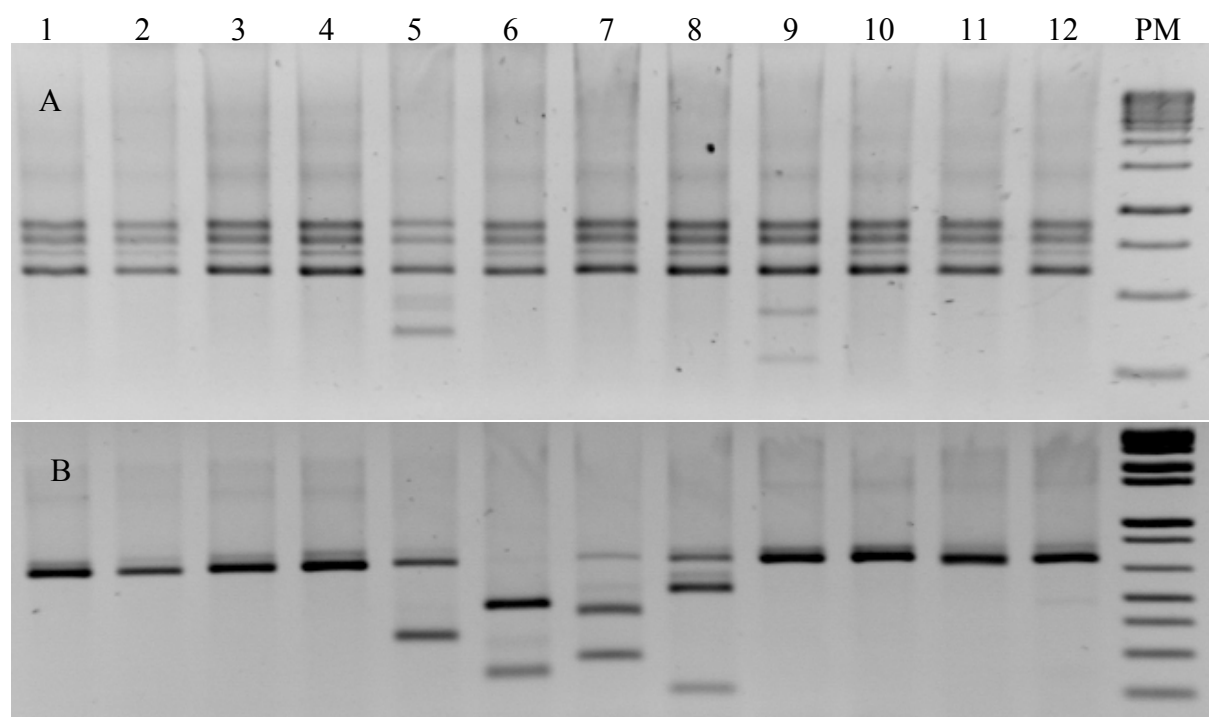


Figura 21: Perfil de digestão dos isolados de *W. paramesenteroides* (A) e *O. kitaharae like* (B). *Sph*I (linha 1), *Nco*I (linha 2), *Nhe*I (linha 3), *Ssp*I (linha 4), *Sfu*I (linha 5), *Eco*RV (linha 6), *Dra*I (linha 7), *Vsp*I (linha 8), *Hinc*II (linha 9), *Eco*RI (linha 10), *Hind*III (linha 11) e *Avr*II (linha 12). PM representa o marcador de peso molecular de 1Kb.

Tabela 7: Relação entre a população de leveduras, população das principais espécies bacterianas e os dados industriais em três destilarias de álcool no Nordeste.

Data	Leveduras contaminantes	Troca de fermento	<i>L. vini</i>	Outras bactérias relevantes	Etanol
JAPUNGU 2007-2008					
03/jul	Não		20%	60% <i>L. plantarum</i>	5,90%
25/jul	40% de não-Saccharomyces				
26/jul		sim	77%	17% <i>L. fermentum</i>	6,15%
01/ago	20% de <i>D. bruxellensis</i>		15%	40% <i>L. ferintoshensis</i>	6,26%
05/set	30% <i>D. bruxellensis</i> 30% <i>Zygosaccharomyces</i> sp.	sim	80%		6,01%
26/set	20% <i>Zygosaccharomyces</i> sp.	sim			
03/out	20% <i>D. bruxellensis</i>		54%		6,96%
10/out	20% <i>D. bruxellensis</i>				
16/out		sim			
31/out	20% não-S. <i>cerevisiae</i>				
07/nov	Não		80%		6,66%
12/dez	Não	sim	32%	68% <i>L. fermentum</i>	7,08%
24/dez	Não	sim			
16/jan	Não		88%	12% <i>L. fermentum</i>	7,98%
23/jan	60% não-S. <i>cerevisiae</i>				
06/fev	Não	sim			
13/fev	Não		96%		7,16%
20/fev	90% <i>D. bruxellensis</i>				
MIRIRI 2007-2008					
08/ago	Não		0%		5,20%
29/ago	20% <i>D. bruxellensis</i>				
05/set	80% <i>Zygosaccharomyces</i> sp.		24%	54% <i>L. amylovorus</i>	6,90%
21/set		sim			
26/set	20% <i>D. bruxellensis</i> 50% <i>Zygosaccharomyces</i> sp.				
03/out	Não	sim	35%	60% <i>L. fermentum</i>	7,10%
07/nov	Não		51%	44% <i>L. fermentum</i>	7,30%
16/jan	Não		32%	68% <i>L. fermentum</i>	7,60%
13/fev	Não		39%	24% <i>L. fermentum</i> , 37% <i>L. ferintoshensis</i>	7%
GIASA 2007-2008					
08/ago	Não		0%		
05/set	50% <i>Zygosaccharomyces</i> sp.		88%		
03/out	Não		91%		
31/out	30% <i>D. bruxellensis</i> 40% não-S. <i>cerevisiae</i>		81%	18% <i>L. fermentum</i>	
28/nov	20% <i>D. bruxellensis</i>		100%		
09/jan	20% não-S. <i>cerevisiae</i>		55%	35% <i>L. fermentum</i>	
23/jan	40% <i>D. bruxellensis</i>				
06/fev	Não		0%	100% <i>Lactobacillus</i> sp.	

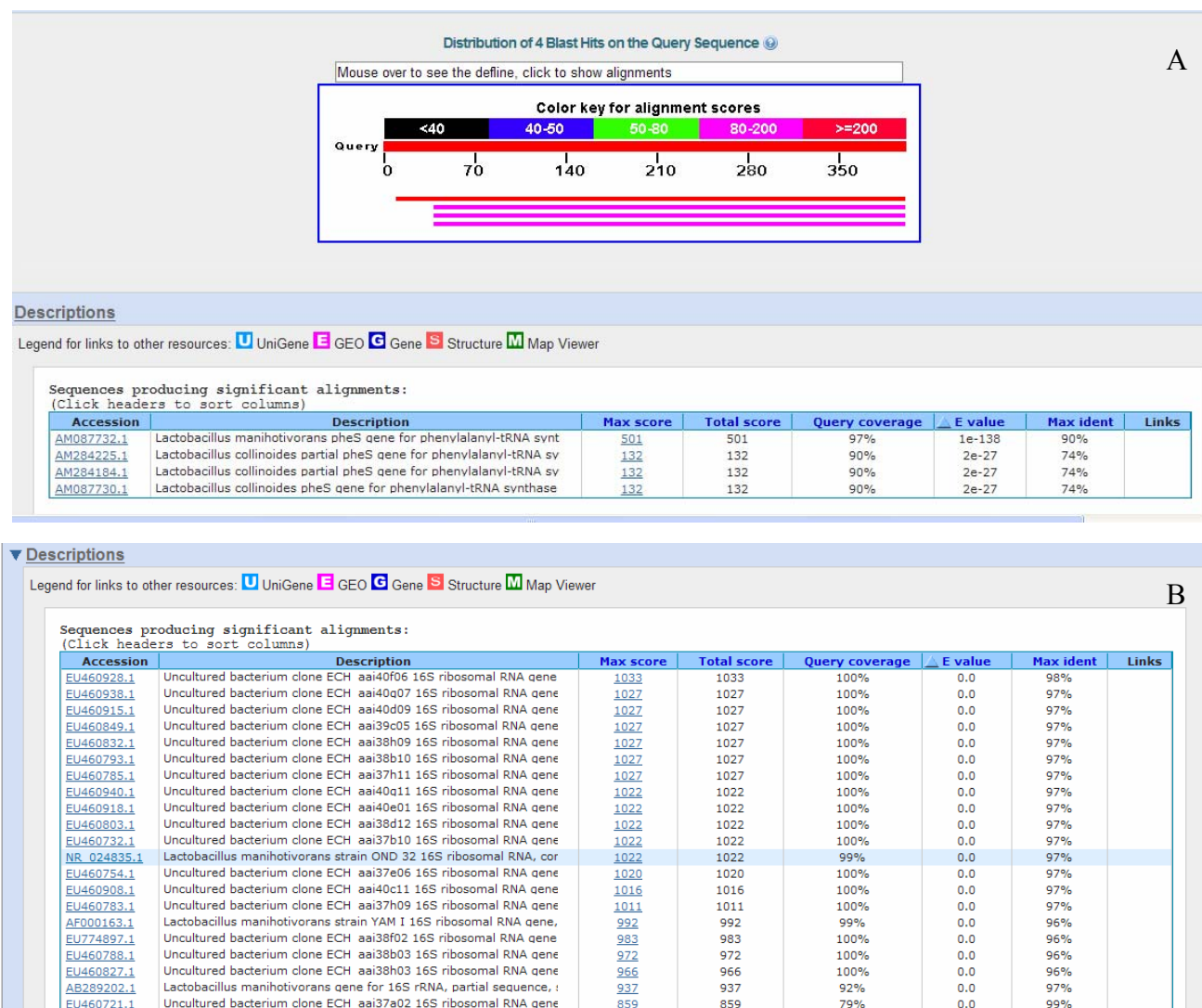


Figura 22: Blast N com a sequência do isolado identificado como *L. manihotivorans* (A = sequenciamento do gene *pheS*, B = sequenciamento do gene 16S)

▼ Descriptions								A	
Legend for links to other resources: U UniGene E GEO G Gene S Structure M Map Viewer									
Sequences producing significant alignments: (Click headers to sort columns)									
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links		
AB242320.1	Lactobacillus mobilis gene for 16S rRNA, partial sequence	904	904	100%	0.0	99%			
AY681135.1	Lactobacillus sp. 459 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	904	904	100%	0.0	99%			
AY681132.1	Lactobacillus vini strain 154 16S ribosomal RNA gene, complete seq	900	900	99%	0.0	99%			
AY681131.1	Lactobacillus vini strain 116 16S ribosomal RNA gene, complete seq	900	900	99%	0.0	99%			
AY628417.1	Lactobacillus sp. MONT4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	893	893	100%	0.0	99%			
AJ576009.1	Lactobacillus vini 16S rRNA gene, type strain CECT 5924T	893	893	98%	0.0	99%			
AY681133.1	Lactobacillus sp. 166 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	869	869	96%	0.0	99%			
AB289306.1	Lactobacillus sp. JCM 8633 gene for 16S rRNA, partial sequence, str	819	819	90%	0.0	99%			
AB016864.1	Lactobacillus sp. gene for 16S rRNA, partial sequence	712	712	100%	0.0	92%			
AB365978.1	Lactobacillus capillatus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:	706	706	100%	0.0	92%			
AB365977.1	Lactobacillus capillatus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:	706	706	100%	0.0	92%			
AB365976.1	Lactobacillus capillatus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:	706	706	100%	0.0	92%			
Y17500.1	Lactobacillus sp. LuE10 16S rRNA gene	704	704	98%	0.0	92%			
AY681127.2	Lactobacillus oeni strain 59b 16S ribosomal RNA gene, complete seq	701	701	100%	0.0	92%			
EU821345.1	Lactobacillus oeni strain 54 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	695	695	100%	0.0	92%			
NR_028658.1	Lactobacillus satsumensis strain NRIC 0604 16S ribosomal RNA, par	695	695	100%	0.0	92%			
AB162131.1	Lactobacillus naqelii gene for 16S rRNA, partial sequence	695	695	98%	0.0	92%			
EU821353.1	Lactobacillus oeni strain 420 16S ribosomal RNA gene, partial seque	689	689	98%	0.0	92%			
EU821352.1	Lactobacillus oeni strain 376 16S ribosomal RNA gene, partial seque	689	689	98%	0.0	92%			
EU821351.1	Lactobacillus oeni strain 209q 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	689	689	98%	0.0	92%			

▼ Descriptions								B	
Legend for links to other resources: U UniGene E GEO G Gene S Structure M Map Viewer									
Sequences producing significant alignments: (Click headers to sort columns)									
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links		
AY681131.1	Lactobacillus vini strain 116 16S ribosomal RNA gene, complete seq	990	990	100%	0.0	99%			
AB242320.1	Lactobacillus mobilis gene for 16S rRNA, partial sequence	985	985	100%	0.0	99%			
AY681135.1	Lactobacillus sp. 459 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	985	985	100%	0.0	99%			
AY681132.1	Lactobacillus vini strain 154 16S ribosomal RNA gene, complete seq	985	985	100%	0.0	99%			
AJ576009.1	Lactobacillus vini 16S rRNA gene, type strain CECT 5924T	979	979	99%	0.0	99%			
AY628417.1	Lactobacillus sp. MONT4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	961	961	98%	0.0	99%			
AY681133.1	Lactobacillus sp. 166 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	957	957	97%	0.0	99%			
AB289306.1	Lactobacillus sp. JCM 8633 gene for 16S rRNA, partial sequence, str	905	905	92%	0.0	99%			
Y17500.1	Lactobacillus sp. LuE10 16S rRNA gene	797	797	99%	0.0	93%			
AB016864.1	Lactobacillus sp. gene for 16S rRNA, partial sequence	793	793	100%	0.0	93%			
AB162131.1	Lactobacillus naqelii gene for 16S rRNA, partial sequence	787	787	99%	0.0	93%			
AB365978.1	Lactobacillus capillatus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:	782	782	100%	0.0	92%			
AB365977.1	Lactobacillus capillatus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:	782	782	100%	0.0	92%			
AB365976.1	Lactobacillus capillatus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:	782	782	100%	0.0	92%			
AB370876.1	Lactobacillus naqelii gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence,	773	773	97%	0.0	93%			
AY681127.2	Lactobacillus oeni strain 59b 16S ribosomal RNA gene, complete seq	771	771	100%	0.0	92%			
EU821345.1	Lactobacillus oeni strain 54 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	769	769	99%	0.0	92%			
AY681129.1	Lactobacillus sp. 71 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	767	767	100%	0.0	92%			
EU821353.1	Lactobacillus oeni strain 420 16S ribosomal RNA gene, partial seque	765	765	99%	0.0	92%			
EU821352.1	Lactobacillus oeni strain 376 16S ribosomal RNA gene, partial seque	765	765	99%	0.0	92%			

Figura 23: Blast N com a sequência do isolado identificado como *L. vini* (A = sequenciamento do gene 16S do tipo I, B = sequenciamento do gene 16S do tipo II)

Descriptions							A
Legend for links to other resources: U UniGene E GEO G Gene S Structure M Map Viewer							
Sequences producing significant alignments: (Click headers to sort columns)							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AM284180.1	Lactobacillus amylovorus partial pheS gene for phenylalanyl-tRNA s	819	819	96%	0.0	99%	
AM284179.1	Lactobacillus amylovorus partial pheS gene for phenylalanyl-tRNA s	819	819	96%	0.0	99%	
AM087678.1	Lactobacillus amylovorus pheS gene for phenylalanyl-tRNA synthase	809	809	95%	0.0	98%	
EU000478.1	Lactobacillus amylovorus strain LAB7 phenylalanyl-tRNA synthase a	713	713	84%	0.0	98%	
EU000477.1	Lactobacillus sobrius strain AD5 phenylalanyl-tRNA synthase alpha :	713	713	84%	0.0	98%	
EU000475.1	Lactobacillus amylovorus strain DSM 20532 phenylalanyl-tRNA syntl	713	713	84%	0.0	98%	
EU000480.1	Lactobacillus amylovorus strain LAB13 phenylalanyl-tRNA synthase	708	708	84%	0.0	98%	
EU000474.1	Lactobacillus amylovorus strain DSM 20531 phenylalanyl-tRNA syntl	708	708	84%	0.0	98%	
EU000479.1	Lactobacillus amylovorus strain LAB8 phenylalanyl-tRNA synthase a	699	699	84%	0.0	97%	
EU000481.1	Lactobacillus amylovorus strain LAB52 phenylalanyl-tRNA synthase	697	697	84%	0.0	98%	
EU000476.1	Lactobacillus sobrius strain DSM 16698 phenylalanyl-tRNA synthase	697	697	85%	0.0	97%	
AM263506.1	Lactobacillus kitasatonis pheS gene for phenylalanyl-tRNA synthase	693	693	83%	0.0	98%	
CP000517.1	Lactobacillus helveticus DPC 4571, complete genome	597	597	98%	2e-167	89%	
FJ983977.1	Lactobacillus helveticus strain IMAU20074(mqh6-1-1) PheS gene, pr	590	590	99%	3e-165	89%	
FJ983922.1	Lactobacillus helveticus strain IMAU30131(F4301) PheS gene, partia	588	588	98%	1e-164	89%	
FJ983914.1	Lactobacillus helveticus strain IMAU30059(C8401) PheS gene, partia	584	584	98%	1e-163	89%	
FJ983912.1	Lactobacillus helveticus strain IMAU30045(C4402) PheS gene, partia	584	584	98%	1e-163	89%	
FJ983903.1	Lactobacillus helveticus strain IMAU30003(A1303) PheS gene, partia	584	584	98%	1e-163	89%	
FJ983979.1	Lactobacillus helveticus strain IMAU20062(mqh17-1-1) PheS gene, i	582	582	98%	5e-163	89%	
FJ983978.1	Lactobacillus helveticus strain IMAU20067(mqh2-3-1) PheS gene, pi	582	582	98%	5e-163	89%	
AB382028.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: k	976	976	100%	0.0	99%	
AB382023.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: k	976	976	100%	0.0	99%	
AB382033.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: k	976	976	100%	0.0	99%	
EF120375.1	Lactobacillus amylovorus strain LAB52 16S ribosomal RNA gene, pa	976	976	100%	0.0	99%	
EF120373.1	Lactobacillus amylovorus strain LAB31 16S ribosomal RNA gene, pa	976	976	100%	0.0	99%	
EF120372.1	Lactobacillus amylovorus strain LAB16 16S ribosomal RNA gene, pa	976	976	100%	0.0	99%	
EF120371.1	Lactobacillus amylovorus strain LAB13 16S ribosomal RNA gene, pa	976	976	100%	0.0	99%	
EF120370.1	Lactobacillus amylovorus strain LAB8 16S ribosomal RNA gene, part	976	976	100%	0.0	99%	
EF120369.1	Lactobacillus amylovorus strain LAB7 16S ribosomal RNA gene, part	976	976	100%	0.0	99%	
EF120368.1	Lactobacillus amylovorus strain LAB2 16S ribosomal RNA gene, part	976	976	100%	0.0	99%	
AY700063.2	Lactobacillus sobrius strain OTU171-001 16S ribosomal RNA gene, p	976	976	100%	0.0	99%	
AF371471.1	Uncultured bacterium clone p-2501-18B5 16S ribosomal RNA gene,	976	976	100%	0.0	99%	
AB186319.1	Lactobacillus kitasatonis gene for 16S rRNA, partial sequence, strair	976	976	100%	0.0	99%	
EU474895.1	Uncultured bacterium clone RRH aaa04e12 16S ribosomal RNA qen	972	972	99%	0.0	99%	
GQ505042.1	Uncultured bacterium clone TKW-HPB-3-2 16S ribosomal RNA gene,	970	970	100%	0.0	99%	
GQ448350.1	Uncultured bacterium clone calf783 2wks qrp2 A09 16S ribosomal	970	970	99%	0.0	99%	
EU728799.1	Lactobacillus sp. DJF WC57 16S ribosomal RNA gene, partial seque	970	970	99%	0.0	99%	
EU475025.1	Uncultured bacterium clone RRH aaa01a02 16S ribosomal RNA qen	970	970	100%	0.0	99%	
EU475024.1	Uncultured bacterium clone RRH aaa03f08 16S ribosomal RNA gene	970	970	100%	0.0	99%	
EU475008.1	Uncultured bacterium clone RRH aaa02a04 16S ribosomal RNA qen	970	970	100%	0.0	99%	
EU474977.1	Uncultured bacterium clone RRH aaa01f02 16S ribosomal RNA gene	970	970	100%	0.0	99%	
EU474959.1	Uncultured bacterium clone RRH aaa02d08 16S ribosomal RNA qen	970	970	100%	0.0	99%	
EU474957.1	Uncultured bacterium clone RRH aaa02h03 16S ribosomal RNA qen	970	970	100%	0.0	99%	
EU474945.1	Uncultured bacterium clone RRH aaa03q01.Contiq2 16S ribosomal l	970	970	100%	0.0	99%	
EU474920.1	Uncultured bacterium clone RRH aaa03d12 16S ribosomal RNA qen	970	970	100%	0.0	99%	
EU474918.1	Uncultured bacterium clone RRH aaa04c11 16S ribosomal RNA qen	970	970	100%	0.0	99%	
EU474892.1	Uncultured bacterium clone RRH aaa04e08 16S ribosomal RNA qen	970	970	100%	0.0	99%	
EU474889.1	Uncultured bacterium clone RRH aaa02a09 16S ribosomal RNA qen	970	970	100%	0.0	99%	
EU474885.1	Uncultured bacterium clone RRH aaa03d07 16S ribosomal RNA qen	970	970	100%	0.0	99%	
EU474872.1	Uncultured bacterium clone RRH aaa01a08 16S ribosomal RNA qen	970	970	100%	0.0	99%	

Figura 24: Blast N com a sequência do isolado identificado como *L. amylovorus* (A = sequenciamento do gene *pheS*, B = sequenciamento do gene 16S)

6. Conclusões

- a) Uma grande diversidade de bactérias constituiu a microbiota presente no processo de fermentação do álcool combustível, sendo o gênero *Lactobacillus* um dos principais contaminantes encontrados. Contudo, sugere-se que a dinâmica populacional bacteriana oscila durante o período da safra, pois algumas bactérias puderam apenas ser encontradas no início do processo, não permanecendo até o final do mesmo, enquanto outras surgem e mantêm sua frequência durante toda safra, mostrando melhor adaptação ao processo.
- b) A metodologia da ARDRA, baseada na análise do perfil de digestão da amplificação da região espaçadora 16S-23S, mostrou-se em geral rápida e precisa para a distinção das espécies bacterianas. Esta pode ser utilizada como ferramenta para diagnóstico das contaminações do processo.
- c) Os isolados de *Lactobacillus vini* parecem apresentar resistência aos antibióticos usados na indústria, pois suas frequências são mantidas mesmo quando há tratamento com antimicrobianos, estes podem estar envolvidos com a seleção de algumas espécies no processo. Sabendo-se disso, estudos posteriores fazem-se necessário para testar a susceptibilidade de tais organismos aos antibióticos utilizados nas indústrias.
- d) Sugere-se que diferentes linhagens de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus vini* podem estar presentes nos episódios de contaminação nas destilarias estudadas. Trabalhos futuros visam correlacionar os isolados com diferentes perfis intra-específico com algum dano do processo, visando assim traçar uma melhor estratégia de controle microbiano.
- e) Em nossos estudos, foram obtidos diferentes perfis de genotípicos dos isolados caracterizados, demonstrando que a técnica de rep-PCR pode ser utilizada como marcador intra-específico. Posteriormente podendo ser usada para o acompanhamento da dinâmica populacional do processo de produção de álcool combustível.

7. Referências Bibliográficas

Abbott DA, Hynes SH and Ingledew WM (2005) Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 641-647.

Achenbach LA, Carey AJ and Madigan MT (2001) Photosynthesis and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments. *Appl Environ Microbiol* 67: 2922–2926.

Ahrné S and Molin G (1997) Restriction endonuclease analysis of total chromosomal DNA of *Lactobacillus*. *Microecol Ther* 26: 27-30.

Alcarde VE (2001) Avaliação de parâmetros que afetam a floculação de leveduras e bactérias isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica. Universidade Estadual de Campinas - Ciências de Alimentos. 91p. Tese (Doutorado).

Alquati PH (1990) Caracterização e controle de microorganismos contaminantes na microdestilaria DOCPATB/EMBRAPA. Universidade Federal de Pelotas - Ciência e Tecnologia Agroindustrial. 69p. Dissertação (Mestrado).

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.

Baele M, Baele P, Vaneechoutte M, Storms V, Butaye P, Devriese LA, Verschraegen G, Gillis M and Haesebrouck F (2000) Application of tDNA-PCR for the identification of enterococci. *J Clin Microbiol* 38: 4201-4207.

Baele M, Storms V, Haesebrouck F, Devriese LA, Gillis M, Verschraegen G, De Baere T and Vaneechoutte M (2001) Application and evaluation of the interlaboratory reproducibility of tRNA intergenic length (tDNA-PCR) for identification of species of the genus *Streptococcus*. *J Clin Microbiol* 39: 1436-1442.

Baele M, Vaneechoutte M, Verhelst R, Vancanneyt M, Devriese LA and Haesebrouck F (2002) Identification of *Lactobacillus* species using tDNA-PCR. J Microbiol Methods 50: 263-271.

Basílio ACM, Araújo PRL, Morais JOF, Silva Filho EA, Morais Jr MA and Simões DA (2008) Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. Curr Microbiol 56: 322-326.

Basso LC, Oliveira A J, Orelli V D, Campos AD, Gallo CR and Amorim HV (1993) Dominance of wild yeast over industrial yeast strains evaluated by karyotyping technique. Yeast Newsletter 52: 50-53.

Basso LC and Amorim HV (1996) Habilidade fermentativa de leveduras isoladas do processo industrial. Relatório Anual de Pesquisa em Fermentação Alcoólica. Vol 1, Fermentec, Piracicaba, São Paulo, Brasil, pp 52-76.

Basso LC, Amorim HV, de Oliveira AJ and Lopes ML (2008) Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. FEMS Yeast Res 8: 1155-1163.

Berthier F, Beuvier E, Dasen A and Grappin R (2001) Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. Int Dairy J 11: 293-305.

Bischoff KM, Skinner-Nemec KA and Leathers TD (2007) Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. J Ind Microbiol Biotechnol 34: 739–744.

Bischoff KM, Liu S, Leathers T D, Worthington R E and Rich J O (2009) Modeling Bacterial Contamination of Fuel Ethanol Fermentation. Biotechnol Bioeng 103:117-122.

Björkroth J and Korkeala H (1996) rRNA gene restriction patterns as a characterization tool for *Lactobacillus sake* producing ropy slime. Int J Food Microbiol 30: 293-302.

Bromberg R. (1994) Estudo do mecanismo de floculação de leveduras causado por *Lactobacillus fermentum*. Universidade Estadual de Campinas - Ciência de Alimentos. 100p. Dissertação (Mestrado).

Castro e Souza MA (2000) Aspectos industriais da floculação por *Lactobacillus fermentum* e seus efeitos na fermentação etanólica. Universidade Est. Paulista Júlio de Mesquita Filho/Jaboticab – Microbiologia. 88p. Dissertação (Mestrado).

Chang LS, Kim BH and Shin PK (1997) Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. *Appl Environ Microbiol* 63: 1-6.

Chang YJ, Peacock AD, Long PE, Stephen JR, McKinley JP, Macnaughton SJ, Hussain AK, Saxton AM and White DC (2001) Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site. *Appl Environ Microbiol* 67: 3149–60.

Chagnaud P, Machinis K, Coutte LA, Marecat A and Mercenier A (2001) Rapid PCR – based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *J Microbiol Methods* 44: 139-148.

Charteris WP, Kelly P M, Morelli L and Collins JK (1997) Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial population. *Int J Food Microbiol* 35: 1-27.

Chassy BM, Gidsone E and Giuffrida A (1976) Evidence for extrachromosomal elements in *Lactobacillus*. *J Bacteriol* 127: 1576-1578.

Cherubin RA (2003) Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica. Univ.de São Paulo/Escola Sup. de Agricultura Luiz De Queiroz – Agronomia. 102p. (Tese) Doutorado.

Ciani M, Maccarelli F and Fatichenti F (2003) Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. *World J Microbiol Biotechnol*. 19: 419–422.

Coenye T, Gevers D, Van de Peer Y, Vandamme P and Swings J (2005) Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol Rev* 29: 147–167.

Collado MC and Hernández M (2007) Identification and Differentiation of *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* species in fermented milk products with bifidobacteria. *Microbiol Res.* 162: 86-92.

De Gheldre Y, Vandamme P, Goosseens H and Struelens M (1999) Identification of clinically relevant viridans streptococci by analysis of transfer DNA intergenic spacer length polymorphism. *Int J Syst Evol Microbiol* 49: 1591-1598

De Gheldre Y, Maes N, Presti FL, Etienne J and Struelens M (2001) Rapid identification of clinically relevant *Legionella* ssp. by analysis of transfer DNA intergenic spacer length polymorphism. *J Clin Microbiol* 39: 162-169.

De Miniac M (1989) Contamination des fermentations alcooliques industrielles par les levures du genre: *Brettanomyces*. *Ind Agric Aliment* 1989:559–563

De Souza-Liberal AT, Basílio ACM, Brasileiro BTRV, Silva FilhoEA, Simões DA and Morais Jr MA (2007) Identification of the yeast *Dekkera bruxellensis* as major contaminant in continuous fuel ethanol fermentation. *J Appl Microbiol* 102: 538-547

De Vuyst L, Camu N, De Winter T, Vandemeulebroecke K, Van de Perre V, Vancanneyt M, De Vos P and Cleenwerck I (2008) Validation of the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *Int J Food Microbiol* 125: 79-90.

Du Plessis HW, Dicks LMT, Pretorius IS, Lambrechts MG and du Toit M (2004) Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. *Int J Food Microbiol* 91: 19-29.

Dubernet S, Desmaures N and Guéguem M (2002) A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett* 214: 271-275.

Duffner F and O'Connell M (1995) Comparative evaluation of plasmid profile and ribotyping in the analysis of *Lactobacillus plantarum* strain heterogeneity in silage. J Appl Bacteriol 78: 20-27.

Duque CRBG (1991) Efeito da temperatura de ativação, pH e tempo de incubação na germinação de esporos de bactérias isoladas de processos de fermentação alcoólica. Univ.de São Paulo/Escola Sup. de Agricultura Luiz de Queiroz - Agronomia.71p. Dissertação (Mestrado).

Eisen J A (1995) The RecA protein as a model molecule for the molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecA and 16S RNA from the same species. J Mol Evol 41: 1105–1123.

Ferrero M, Cesena C, Morelli L, Scolari G and Vescovo M (1996) Molecular characterization of *Lactobacillus casei* strains. FEMS Microbiol Lett 140:215–219.

Freguglia RMO (1998) Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*. Univ.de São Paulo/Escola Sup. de Agricultura Luiz de Queiroz - Ciência e Tecnologia de Alimentos. 104p. Dissertação (Mestrado).

Garcia CE (2000) Efeito do nível de contaminação de bactérias isoladas de processo industrial de fermentação alcoólica, na floculação de levedura. Univ.De São Paulo/Escola Sup. de Agricultura Luiz de Queiroz - Ciência e Tecnologia de Alimentos. 80p. Dissertação (Mestrado).

Gallo, CR (1990) Determinação da microbiota bacteriana de mosto e dornas de fermentação alcoólica. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 388p. Tese (doutorado)

Gevers D, Huys G and Swings J (2001) Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. FEMS Microbiol Lett 205: 31-36.

Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil E J, Stackebrandt E, Van de Peer Y, Vandamme P, Thompson FL and Swings J (2005). Opinion: re-evaluating prokaryotic species. Nat Rev Microbiol 3: 733–739.

Grimont F and Grimont PDA (1986) Ribosomal ribonucleic acid gene restriction as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 137B:165–175.

Hill HA and Hill, JE (1986) The value of plasmid profiling in monitoring *Lactobacillus plantarum* in silage fermentations. *Curr Microbiol* 13: 91-94.

Holzapel WH, Haberes P, Guisen R, Björkroth J and Schillinger U (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganism in food and nutrition. *Am J Clin Nutr* 73: 365-373.

Iemma J (2005) Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Univ. de São Paulo/Centro de Energ. Nucl. Agricultura –Ciências. 78p. Tese (Doutorado).

Kaji DA (1989) Influência da temperatura e infecção láctica na fermentação alcoólica. Universidade Estadual de Campinas - Ciência de Alimentos. 145p. Dissertação (Mestrado).

Kimura K, McCartney AL, McConnell MA and Tannock GW (1997) Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli, and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. *Appl Environ Microbiol* 63: 3394–3398.

Klein G, Pack A, Bonaparte C and Reuter G (1998) Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 41: 103-125.

Konstantinidis KT and Tiedje JM (2005) Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *J Bacteriol* 187: 6258–6264.

Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115-175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley.

Lloyd AT and Sharp PM (1993) Evolution of the *recA* gene and the molecular phylogeny of bacteria. *J Mol Evol* 37:399–407.

Loureiro V and Malfeito-Ferreira M (2003) Spoilage yeasts in the wine industry. *Int J Food Microbiol* 86:23-50.

Maeda AH (1997) Estudo de bactérias acéticas de usina de açúcar e álcool. Universidade Estadual de Campinas - Ciência e Alimentos. 100p. Dissertação (Mestrado).

Maes N, De Gheldre Y, De Ryck R, Vaneechoutte M, Meugnier H, Etienne J and Struelens M J (1997) Rapid and accurate identification of *Staphylococcus* species by tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 35: 2477-2481.

Mayo B, Hardisson C and Braña AF (1989) Selected characteristic of several strains of *Lactobacillus plantarum*. *Microbiologia SEM* 5: 105-122.

Miteva V, Boudakov I, Ivanova-Stoyancheva G, Marinova B, Mitev V and Mengaud, J (2001) Differentiation of *Lactobacillus deubruueckii* subspecies by ribotyping and amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *J Appl Microbiol* 90: 909-918.

Mohania D, Nagpal R, Kumar M, Bhardwaj A, Yadav M, Jain S, Marotta F, Singh V, Parkash O and Yadav H (2008) Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *J Dig Dis* 9: 190–198.

Morea M, Barizzi F, Cappa F and Coconcelli PS (1998) Molecular characterization of *Lactobacillus* community in tradicional processing of mozzarella cheese. *Int J Food Microbiol* 43: 53-60.

Moreira JLS, Mota RM, Horta MF, Teixeira SMR, Neumann E, Nicoli JR and Nunes AC (2005) Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiol* 5: 15-23.

Naser SM, Thompson FL, Hoste B, Gevers D, Vandemeulebroecke K, Cleenwerck I, Thompson CC, Vancanneyt M and Swings J (2005a) Phylogeny and identification of enterococci using *atpA* gene sequence analysis. *J Clin Microbiol* 43: 2224–2230.

Naser SM, Thompson FL, Hoste B, Gevers D, Dawyndt P, Vancanneyt M and Swings J (2005b) Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology* 151: 2141–2150.

Naser SM, Dawyndt P, Hoste B, Gevers D, Vandemeulebroecke K, Cleenwerck I, Vancanneyt M and Swings J (2007) Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 2777–2789.

Narendranath NV, Hynes SH, Thomas KC and Ingledew WM (1997) Effects of Lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. *Appl Environ Microbiol* 63: 4158-4163.

Narendranath, N.V., Thomas, K.C. and Ingledew, W.M. (2000) Urea Hydrogen Peroxide Reduces the Numbers of *Lactobacilli*, Nourishes Yeast, and Leaves No Residues in the Ethanol Fermentation. *Appl Environ Microbiol* 66(10): 4187-4192.

Narendranath NV, Thomas KC and Ingledew WM (2001) Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. *J Am Soc Brew Chem* 59:187–194.

Nes, I F (1984) Plasmid profiles of ten strains of *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiol Lett* 21: 359-361.

Nobre TP (2005) Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Univ.de São Paulo/Escola Sup. de Agricultura Luiz de Queiroz - Ciência e Tecnologia de Alimentos. 79p. Dissertação (Mestrado).

Oliva-Neto P and Yokoya F (1994) Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. *World J. Microbiol. Biotechnol* 10: 697-699.

Oliva-Neto, P (1990) Influência da contaminação por Bactéria Láctica na Fermentação Alcoólica pelo Processo de Batelada Alimentada. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 207p. Dissertação (Mestrado).

Oliva-Neto, P (1995) Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por levedura. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 183p. Tese (doutorado).

Passoth, V, Blomqvist, J and Schnu"rer, J (2007) *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* Form a Stable Ethanol-Producing Consortium in a Commercial Alcohol Production Process. *Appl Environ Microbiol* 73: 4354–4356.

Pavlova SI, Kilic AO, So JS, Nader-Macias ME, Simões JA and Tao L (2002) Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Microbiol* 92: 451-459.

Pot B, Hertel C, Ludwig W, Descheemaker P, Kersters K and Schleifer KH (1993) Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. *J Gen Microbiol* 139:513–517.

Rodas AM, Ferrer S and Pardo I (2005) Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:197–207.

Rodas AM, Chenoll E, Macia'n MC, Ferrer S, Pardo I and Aznar R (2006). *Lactobacillus vini* sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:513–517.

Roussel Y, Colmin C, Simonet JM and Decaris B (1993) Strain characterization, genome size and plasmid content in the *Lactobacillus acidophilus* group (Hansen and Mocquot). *J Appl Bacteriol* 74: 549–556.

Roy D, Ward P and Champagne G (1996) Differentiation of bifidobacteria by use of pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol* 29:11–29.

Ruiz-Barba JL, Piard JC and JimCnez-Diaz R (1991) Plasmid profiles and curing of plasmids in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. *J Appl Bacteriol* 71: 417-421.

Ruiz A, Poblet M, Mas A and Guillamón J M (2000) Identification of acetic acid bacteria by RFLP PF PCR-amplified 16S rDNA intergenic spacer. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 1981-1987

Saitou N and Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

Santos SR and Ochman H (2004) Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environ Microbiol* 6: 754–759.

Schell DJ, Dowe N, Ibsen KN, Riley CJ, Ruth MF and Lumpkin RE (2007) Contaminant occurrence, identification and control in a pilot-scale corn fiber to ethanol conversion process. *Bioresour Technol* 98: 2942-2948.

Schleifer KH and Ludwig W (1995) Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst Appl Microbiol* 18: 461–467.

Seseña S, Sánchez I and Palop L (2004) Genetic diversity (RAPD-PCR) of lactobacilli isolated from “Almagro” eggplant fermentations from two seasons. *FEMS Microbiol Lett* 238: 159-165.

Shang S, Fu J, Dong G, Hong W, Du L and Yu X (2003) Establishment and analysis of specific DNA patterns in 16S-23S rRNA gene spacer regions for differentiating different bacteria. *Chin Med J* 116: 129-133.

Silva-Filho EA, Melo HF, Antunes DF, Santos SKB, Resende AM, Simões DA and Morais Jr MA (2005a) Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32: 481-486.

Silva-Filho EA, Santos SKB, Resende AM, Morais JOF, Morais Jr MA and Simões DA (2005b) Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie Van Leeuwenhoek* 88:13-23.

Simpson KL, Pettersson B and Priest FG (2001) Characterization of lactobacilli from Scotch malt whisky distilleries and description of new *Lactobacillus ferintoshensis* sp. Nov., a new species isolated from malt whisky fermentation. *Microbiology* 147: 1007-1016.

Slonczewski JL and Foster JW (2008) *Microbiology - An Evolving Science*. Hardcover. 1280p.

Skinner KA and Leathers TD (2004) Bacterial Contaminants of fuel ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31: 401-408.

Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kämpfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rosselló-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC and Whitman WB (2002). Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1043–1047.

Stahl M and Molin G (1994) Classification of *Lactobacillus reuteri* by restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA. *Int J Syst Bacteriol* 44: 9–14.

Stroppa CT (1998) Avaliação da ação de antibióticos utilizados na fermentação alcoólica através do consumo de açúcar por bactérias contaminantes. Universidade Estadual de Campinas - Tecnologia de Alimentos. 71p. Dissertação (Mestrado).

Svec P, Vancanneyt M, Seman M, Snauwaert C, Lefebvre K, Sedláček I and Swings J (2005) Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol Lett* 247: 59-63.

Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S (2007) Mega4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.

Thanh VN, Mai LT and Tuan DA (2008) Microbial diversity of traditional Vietnamese alcohol fermentation starters (banh men) as determined by PCR-mediated DGGE. *Int J Food Microbiol* 128: 268–273.

Thomas KC, Hynes SH and Ingledew WM (2001) Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. *J Appl Microbiol* 90:819–828.

Thomas KC, Hynes SH and Ingledew WM (2002) Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. *Appl Environ Microbiol* 68:1616–1623.

Thompson FL, Gevers D, Thompson CC, Dawyndt P, Naser S, Hoste B, Munn CB and Swings J (2005). Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 71: 5107–5115.

Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.

Tilsala-Timisjarvi A and Alatossava T (1997) Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int J Food Microbiol* 35: 49-56.

Torriani S, Felis GE and Dellaglio F (2001) Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, e *L. paraplantarum* by recA gene sequence análisis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Appl Environ Microbiol* 67:3450-3454.

Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K and Swings J (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60: 407–438.

Vaneechoutte M, Boerlin P, Tichy HV, Bannerman E, Jäger B and Bille J (1998) Comparison of PCR-based DNA fingerprinting techniques for the identification of *Listeria* species and their use for atypical *Listeria* isolates. *Int J Syst Bacteriol* 48: 127-139.

Van Reenen CA and Dicks LMT (1996) Evaluation of numerical analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus*. *Curr Microbiol* 32:183-187.

Variane SF (1996) Caracterização molecular de linhagens de *Lactobacillus fermentum*. Universidade Estadual e Campinas - Ciência de Alimentos. 54p. Dissertação (Mestrado).

Ventura M and Zink R (2002) Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR – based methods and pulsed-field gel electrophoresis. FEMS Microbiol Lett 217: 141-154.

Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ and Lupski JR (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods Mol Cell Biol 5: 25-40.

Welch DF (1991) Applications of cellular fatty acid analysis. Clin Microbiol Rev 4: 422–438.

Welsh J and McClelland M (1991) Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers. Nucleic Acids Res 19:861-866.

West CA and Warnerp J (1985) Plasmid profiles and transfer of plasmid-encoded antibiotic resistance in *Lactobacillus plantarum*. Appl Environ Microbiol 50: 13 19-1 321.

Wheals E A, Basso LC, Alves DMG and Amorim HV (1999) Fuel ethanol after 25 years. Trends Biotechnol 17: 482-487

Yokota F and Oliva-Neto P (1991) Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. Rev. Microbiol 22, 12-16.

Zeigler, DR (2003) Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. Int J Syst Evol Microbiol 53: 1893–1900.

8. Anexos

8.1. Quadro comparativo dos perfis de digestão das bactérias, do gênero *Lactobacillus*, representativas, isoladas nos processos estudados.

Tabela A1: Perfil de digestão das espécies de *Lactobacillus* analisadas no presente estudo.

	<i>SphI</i>	<i>NcoI</i>	<i>NheI</i>	<i>SspI</i>	<i>SfuI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>DraI</i>	<i>VspI</i>	<i>HincII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>AvrII</i>
<i>L. amylovorus</i>	- - -	+ + +	- - -	- - -	+ + -	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +	+ + +
<i>L. brevis</i>	+ + +	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -	- - -	+ + +	- - -
<i>L. hilgardii</i>	+ + +	- - -	- - -	+ + +	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -	- - -	+ + +	- - -
<i>L. casei</i>	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +	+ + +	- - -	- - -	+ + +	- - -
<i>L. "diolivorans like"</i>	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -	- - -	- - -	- - -
<i>L. ferintoshensis</i>	+ + +	- - -	- - -	+ + +	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +	- - -	+ + +	- - -
<i>L. fermentum</i>	+ + +	- - -	+/- +/- +/-	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -	- - -	- - -	- - -
<i>L. plantarum</i>	+ + +	- - -	- - -	+ + +	+/- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +	- - -	- - -	- - -
<i>L. nagelli</i>	+ + +	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
<i>L. vini</i>	+ + +	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	+/- +/- +/-	- - -	- - -	+ + +	- - -	- - -

8.2. Dados do acompanhamento da população de leveduras dos processos industriais.

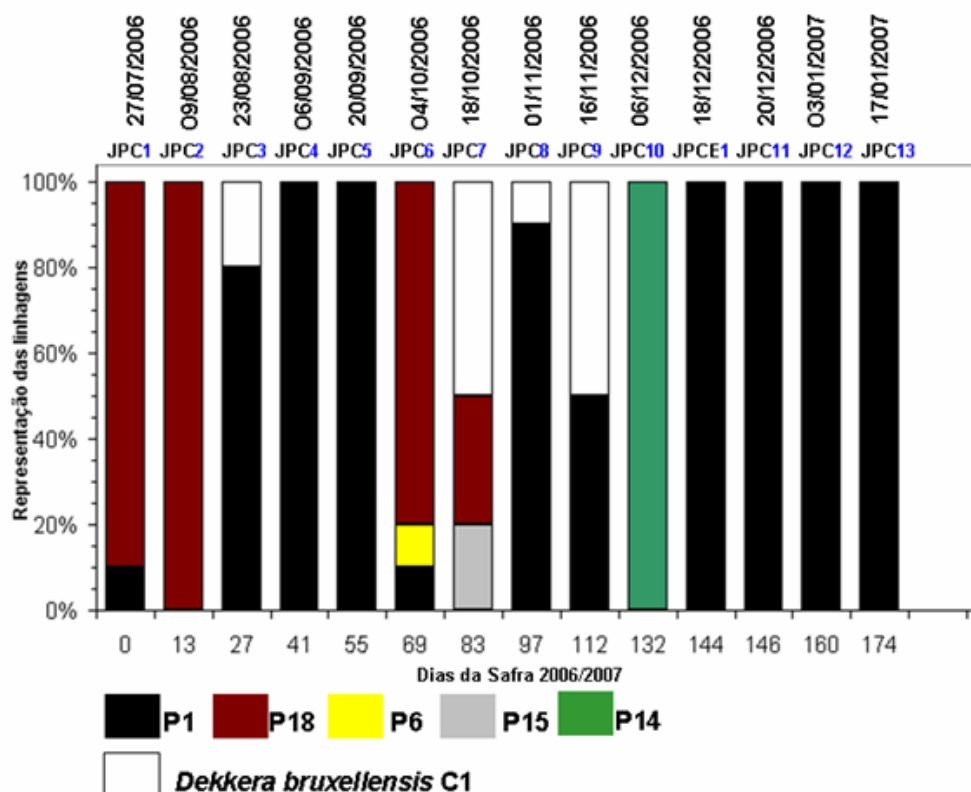


Figura A1. Distribuição das leveduras ao longo do processo fermentativo na destilaria Japungu na safra 2006-2007 (dados fornecidos para empresa Genetech Bioprodutividade). As amostras foram coletadas e processadas segundo a metodologia descrita por Silva-Filho (2003) [E.A. Silva-Filho. **Tipagem genética e modificação genética de leveduras do processo de fermentação alcoólica.** 2003. Tese (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco].

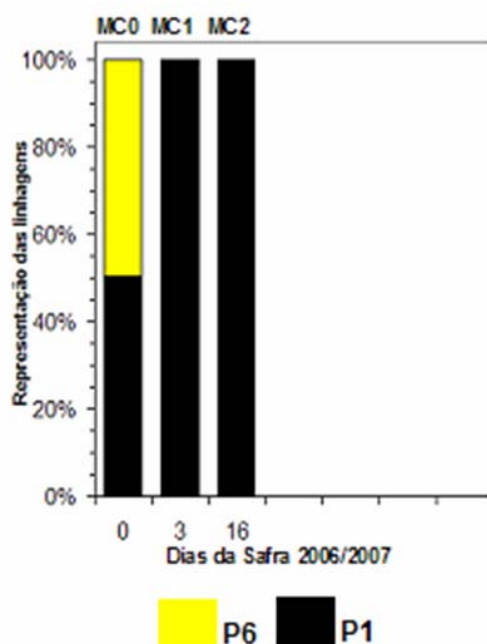


Figura A2. Distribuição das leveduras no início do processo fermentativo na destilaria Miriri na safra 2006-2007 (dados fornecidos para empresa Genetech Bioprodutividade). As amostras foram coletadas e processadas segundo a metodologia descrita por Silva-Filho (2003) [E.A. Silva-Filho. **Tipagem genética e modificação genética de leveduras do processo de fermentação alcoólica.** 2003. Tese (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco].

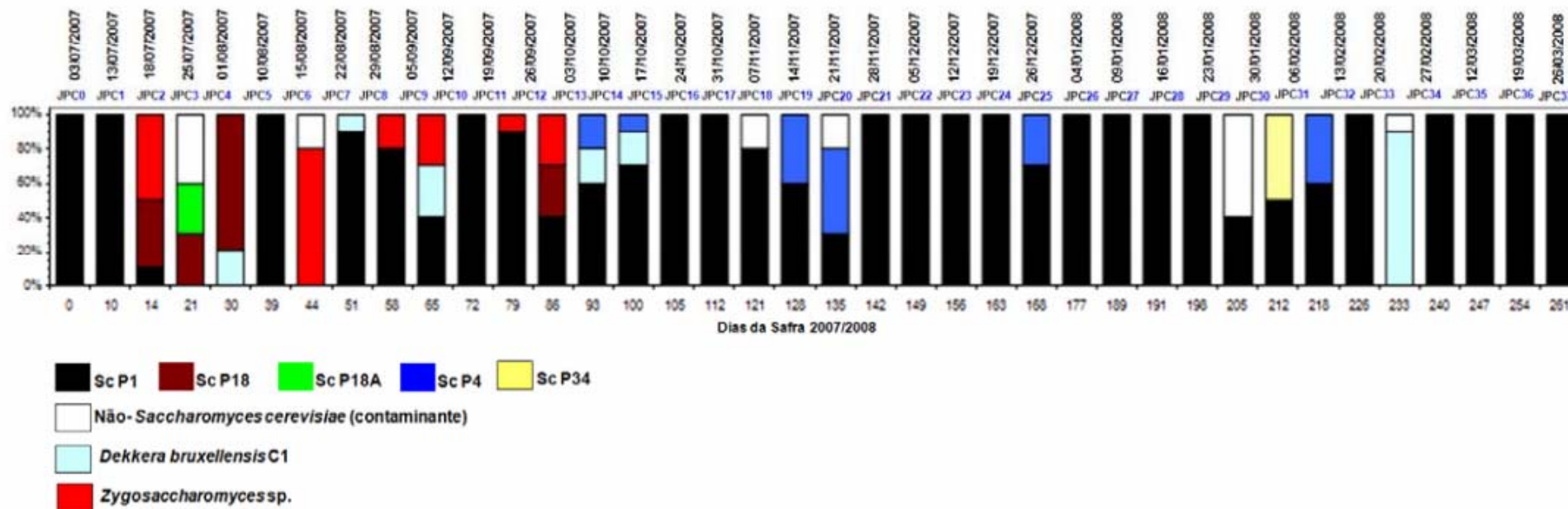


Figura A3. Distribuição das leveduras ao longo do processo fermentativo na destilateria Japungu na safra 2007-2008 (dados fornecidos para empresa Genetech Bioprodutividade). As amostras foram coletadas e processadas segundo a metodologia descrita por Silva-Filho (2003) [E.A. Silva-Filho. **Tipagem genética e modificação genética de leveduras do processo de fermentação alcoólica**. 2003. Tese (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco].

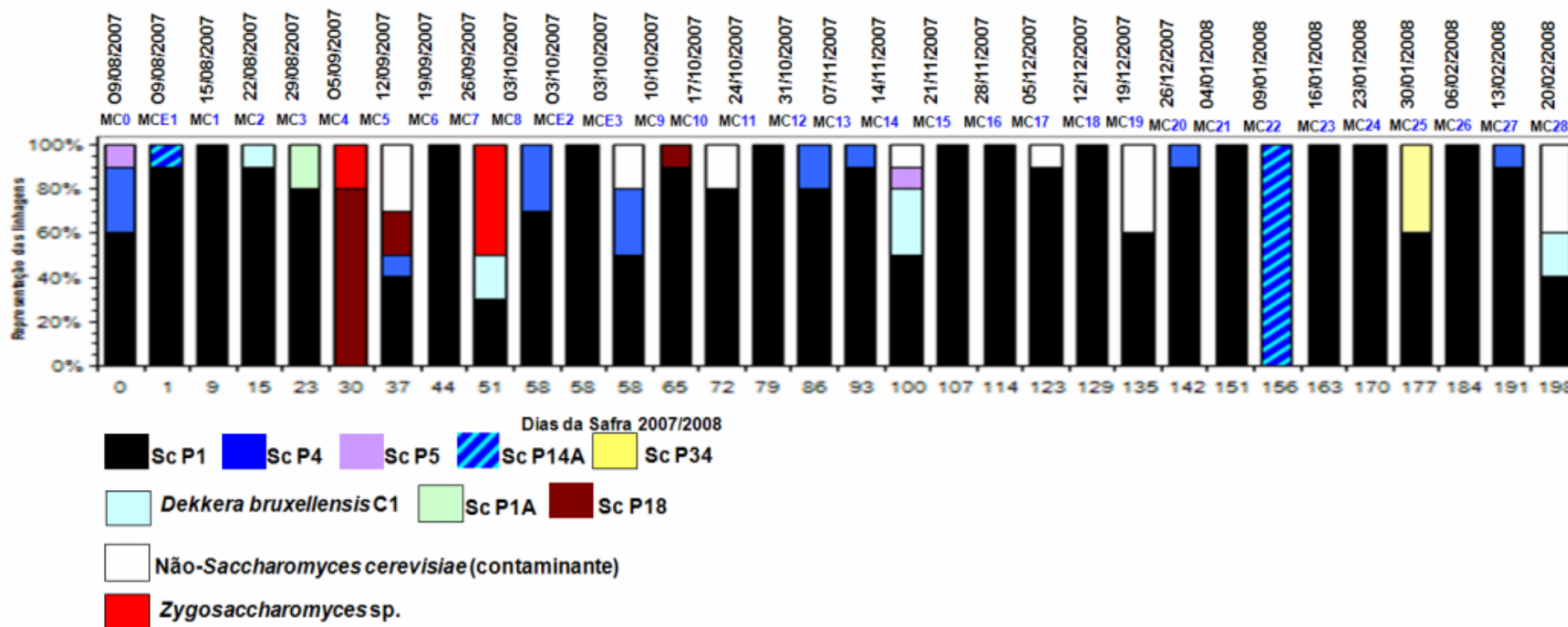


Figura A4. Distribuição das leveduras ao longo do processo fermentativo na destilaria Miriri na safra 2007-2008 (dados fornecidos para empresa Genetech Bioprodutividade). As amostras foram coletadas e processadas segundo a metodologia descrita por Silva-Filho (2003) [E.A. Silva-Filho. **Tipagem genética e modificação genética de leveduras do processo de fermentação alcoólica.** 2003. Tese (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco].

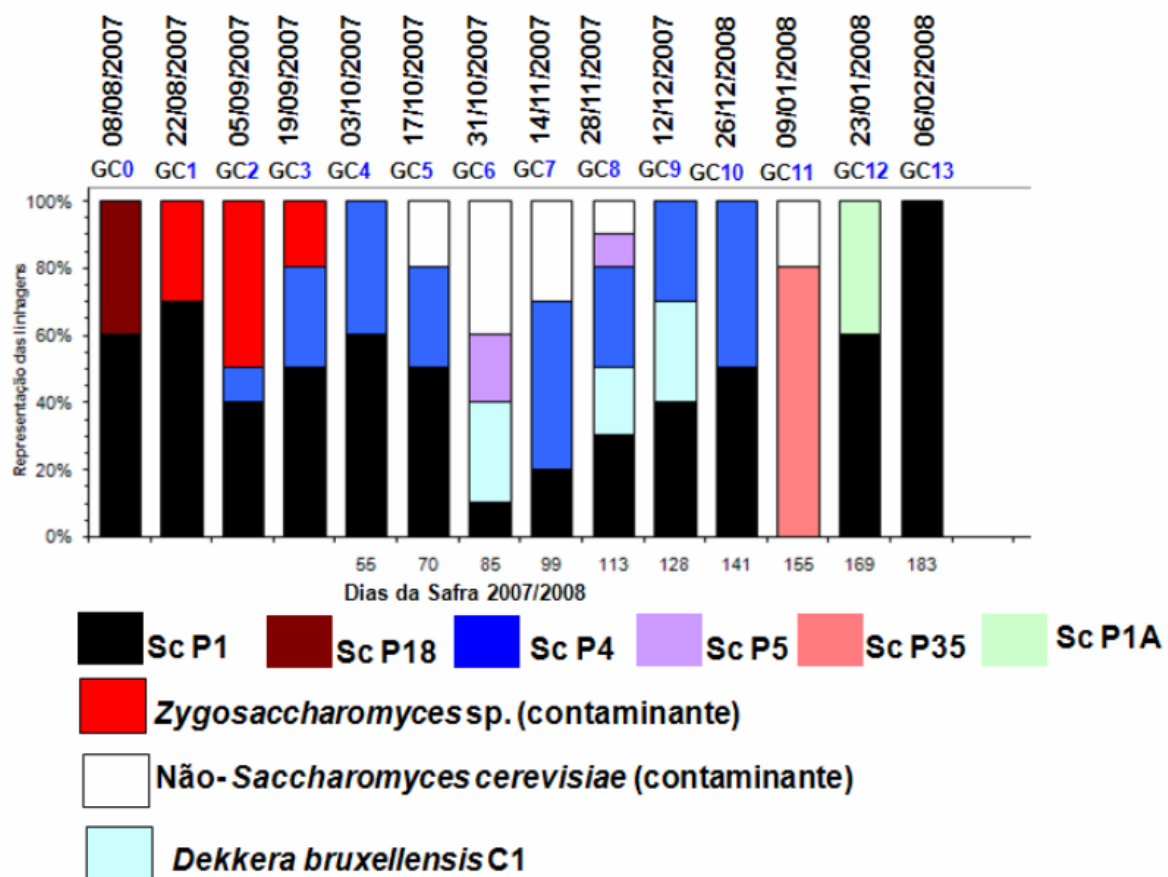


Figura A5. Distribuição das leveduras ao longo do processo fermentativo na destilaria GIASA na safra 2007-2008 (dados fornecidos para empresa Genetech Bioprodutividade). As amostras foram coletadas e processadas segundo a metodologia descrita por Silva-Filho (2003) [E.A. Silva-Filho. **Tipagem genética e modificação genética de leveduras do processo de fermentação alcoólica.** 2003. Tese (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco].

8.3. Resumos de trabalhos apresentados e publicados em anais de Congresso



Tipagem intra-específica de *Lactobacillus fermentum* isolados do processo de fermentação alcoólica através do REP-PCR

Lucena, BTL; Santos, BM; Morais Jr, MA

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco
btluckwu@yahoo.com.br; marcos.morais@pesquisador.cnpq.br

Palavras-chave: *Lactobacillus fermentum*, rep-PCR, Fermentação alcoólica, GTG.

Episódios de contaminação bacteriana podem causar prejuízos econômicos de até vários milhares de reais às destilarias de álcool combustível no país, tanto diretamente pela diminuição do rendimento etanólico da fermentação como indiretamente pelos gastos com o uso de antibióticos industriais para a contenção dessas contaminações. Até o momento não há ainda um catálogo completo de informações sobre todas as possíveis espécies bacterianas envolvidas na contaminação industrial, e poucos são os dados encontrados na literatura científica sobre contaminantes bacterianos do processo de fermentação alcoólica. Acredita-se que mais do que a carga bacteriana, o tipo bacteriano envolvido no processo de contaminação deve definir a severidade do episódio. Portanto, linhagens diferentes de uma mesma espécie bacteriana devem se comportar diferencialmente em diferentes processos industriais. Este trabalho teve como objetivo diferenciar a nível intra-específico exemplares de *Lactobacillus fermentum* isolados do processo de fermentação industrial durante as safras 2005/2006 e 2006/2007 em duas destilarias de álcool combustível utilizando a técnica rep-PCR com o primer GTG₁. A fim de se identificar isolados diferentes a nível intra-específico de *Lactobacillus fermentum* nas diferentes destilarias, e numa mesma destilaria em períodos de safras diferentes, foram tipificados cerca de 29 isolados, sendo seis obtidos na destilaria A durante a safra 2005/2006, cinco obtidos na destilaria A durante a safra 2006/2007 e 18 na destilaria B durante a safra 2006/2007. Foram obtidos diferentes perfis de fingerprinting dos isolados caracterizados demonstrando que a técnica de rep-PCR pode ser utilizada como marcador intra-específico. Na destilaria A foram identificados seis diferentes tipos de *Lactobacillus fermentum*, já na destilaria B foram identificados oito tipos. Dentre esses tipos, o tipo I mostrou-se presente em ambas as destilarias nas diferentes safras. Na destilaria B, o final da safra foi caracterizado pela mudança do substrato de fermentação, de caldo de cana para melaço. Neste caso observou-se um tipo específico de *Lactobacillus fermentum* para esse substrato o qual foi denominado de tipo II. A espécie *Lactobacillus fermentum* tem sido apontado como principal contaminante em processo de fermentação alcoólica industrial, sendo algumas linhagens capazes de causar floculação em leveduras, o que pode acarretar alguns problemas no processo. Trabalhos futuros visam correlacionar os isolados com diferentes perfis intra-específico com algum dano do processo, visando assim traçar uma melhor estratégia de controle microbiano.

Apoio Financeiro: AEB Bioquímica Latino Americana S.A, CAPES e Genetech.



Identificação molecular de bactérias isoladas da fermentação alcoólica industrial pela técnica de ARDRA-PCR

Santos, BM¹; Lucena, BTL¹; Moreira, JLS²; Nunes, AC²; Azevedo, V²; Morais Jr, MA¹

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco

²Universidade Federal de Minas Gerais

blysantos@yahoo.com.br; btluckwu@yahoo.com.br; arcos.morais@pesquisador.cnpq.br

Palavras-chave: ARDRA-PCR, Bactérias lácticas, Contaminantes Bacterianos, Fermentação alcoólica, *Lactobacillus*

A indústria alcooleira no Brasil perde anualmente vários milhares de reais devido a episódios de contaminação produzidos por bactérias. Além disso, outros milhares são gastos com o uso de antibióticos industriais para a contenção dessas contaminações. Infelizmente, não há ainda um catálogo completo de informações sobre todas as possíveis espécies bacterianas envolvidas na contaminação industrial, seus efeitos no processo e os fatores que levam a essas contaminações. No presente trabalho, propomos a utilização da técnica de ARDRA-PCR para a identificação bacteriana e monitoramento das bactérias presentes em processos industriais de produção de álcool combustível. Para isso foram coletadas amostras de mosto fermento em uma destilaria no estado da Paraíba, no início (partida) do processo fermentativo e a cada 30 dias durante a safra 2007-2008. Após diluição do mosto, as células foram semeadas em meio MRS e incubadas em jarras anaeróbias a 37°C. Foram escolhidas para identificação cerca de 20 colônias com base no percentual de cada morfotipo nas placas. A identificação dos isolados foi realizada através da análise do perfil de restrição da amplificação da região espaçadora 16S-23S do DNA ribossomal amplificada por PCR. Observando a dinâmica da população bacteriana nas primeiras coletas pode-se sugerir que algumas bactérias surgem no processo, contudo não conseguem se manter: como por exemplo, *Lactobacillus planiarum* na primeira coleta, *Lactobacillus fermentosus* e *Lactobacillus brevis* na segunda coleta. Outras surgem e se mantêm no processo, ainda que modificando a sua frequência, como *Lactobacillus sp 2* e *Lactobacillus fermentum*. Um isolado que nos chamou atenção é o L6, que surge e logo aumenta sua frequência no processo. Os isolados L6 apresentam perfil de amplificação típico de *Lactobacillus*, porém o perfil de restrição apresentado não consta no nosso banco de dados. Estes isolados L6 parecem apresentar resistência aos antibióticos usados na indústria, pois suas frequências são mantidas mesmo quando há tratamento com antimicrobianos levando a seleção de algumas espécies no processo. Este isolado L6 foi submetido a sequenciamento de DNA e identificado como *Lactobacillus vini* a partir da similaridade de 99-100% com as sequências desta espécie depositadas no GenBank. Esta bactéria foi recentemente isolada de processo fermentativo em associação com a levedura *Dekkera bruxellensis* (Passoth et al, 2007), e os autores sugerem que este pode constituir um bom consócio para produção de álcool combustível.

Apoio Financeiro: AEB Bioquímica Latino Americana S.A, CAPES e Genetech.



FERMENTAÇÃO E BIOTECNOLOGIA / M07 MICRORGANISMOS: INDÚSTRIAS DE BASE E BIOREFINARIAS.

4619

Identificação de contaminantes bacterianos em processos de fermentação alcoólica através da ardra-pcr

LUCENA, B. T. L.¹; MOREIRA, J. L. S.²; SANTOS B. M.¹; LIRA, K. M.¹; NUNES, Á. C.²; AZEVEDO, V.²; MORAIS JR., M. A. M.¹

1.UFPE/Genetech

2.Ufmg

Resumo:

A indústria alcooleira no Brasil perde anualmente milhares de Reais devido a episódios de contaminação por bactérias. Não há ainda um catálogo completo de informações sobre possíveis espécies bacterianas envolvidas na contaminação industrial, seus efeitos no processo e os fatores que levam a esses episódios. Estas informações serão fundamentais para se identificar possíveis focos de contaminação, assim como, as relações entre os parâmetros industriais de processo e a instalação de uma determinada linhagem bacteriana. Neste trabalho, foram coletadas amostras de mosto fermentado de destilarias de álcool e alambique durante a safra 2005-2006, representantes bacterianos foram isolados em meio MRS a 37°C em jarra de anaerobiose e utilizados neste estudo com a finalidade de conhecermos a diversidade bacteriana existente nos processos de fermentação alcoólica a partir da amplificação por PCR da região espaçadora 16S-23S dos genes de rRNA. Padrões típicos de diferentes espécies de *Lactobacillus* foram obtidos. Além disso, observou-se outros perfis de amplificação, sugerindo a presença de diferentes espécies bacterianas. Após análise do perfil de restrição dos fragmentos amplificados, foram identificadas 12 espécies entre os isolados estudados, das quais 7 pertencem ao gênero *Lactobacillus*, correspondendo a 61% dos isolados. Analisando a frequência das espécies identificadas por destilaria/alambique, verificou-se que algumas espécies estariam associadas a uma destilaria ou alambique específico. A espécie *Lactobacillus casei* só foi isolado no alambique, *L. fermentum* na destilaria A, *L. hilgardii* na destilaria B e *Bacillus subtilis* na destilaria C. Os resultados atuais sugerem que algumas espécies ocorrem apenas em determinadas destilarias ou alambiques, contudo, isso só poderá ser afirmado com o estudo detalhado das próximas safras, onde buscaremos verificar também se há alguma relação entre o período de safra e a espécie existente no processo.

8.4. Utilização da técnica de ARDRA para identificação de bactérias lácticas de fermentos comerciais utilizados na produção de iogurtes

Alguns fermentos lácteos comercializados para a produção de iogurtes e bebidas lácteas foram utilizados no início deste trabalho como modelo para o aprimoramento e para a ampliação do banco de dados genéticos descrito por Moreira et al (2005). Essa atividade foi realizada no contexto de prestação de serviço tecnológico do laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da UFPE, sob execução da aluna Brígida Lucena como parte de sua formação técnico-científica. Por questões de propriedade industrial o nome da empresa contratante e de seus fermentos comerciais foram substituídos por denominações fantasia. Os fermentos comerciais fornecidos de forma liofilizada foram reidratados em soro fisiológico estéril para a concentração final de 0.5 g/ml (50 g/L). Para isolamentos das colônias bacterianas, o fermento reidratado foi em seguida diluído até 10^{-6} em soro fisiológico estéril, sendo 100 µl das diluições (10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) plaqueados em Meio MRS com ciclohexitimida. As placas foram incubadas em estufa a 37°C em jarra de anaerobiose. Os isolados estão sendo mantidos em glicerol 30% a -20 °C. A placa da diluição de 10^{-4} foi a escolhida para identificação dos isolados bacterianos por apresentar um maior número de colônias e morfologia.

8.6.1. Fermento 1

Cerca de 30 colônias brancas foram obtidas após o crescimento, as quais apresentaram duas morfologias, uma lisa e outra enrugada, sendo, portanto, utilizadas para identificação 5 colônias lisas e 4 enrugadas. Todos isolados bacterianos apresentaram um perfil de amplificação com uma única banda de DNA espaçador com tamanho de aproximadamente 640 pb (Figura A6). A partir dos perfis de digestões obtidos e comparando com o banco de dados de Moreira et al (2005), os isolados foram identificados como *Streptococcus thermophilus* (Figura A7). A espécie *Streptococcus thermophilus* é atualmente reconhecida como espécie em substituição a nomenclatura anterior *Streptococcus salivarum* subsp. *thermophilus*. O fermento 1 possui a bactéria informada na embalagem comercial.

8.6.2. Fermento 2

Cerca de 30 colônias brancas redondas foram obtidas após o crescimento, que apresentaram as mesma morfologias, diferindo apenas no tamanho da colônia, em apenas 1 colônia se observou a morfologia enrugada, sendo, portanto, utilizadas para identificação 3 colônias

brancas redondas lisas grandes, 3 colônias brancas redondas lisas pequenas e 1 enrugada. Todos isolados bacterianos apresentaram um perfil de amplificação com uma única banda de DNA espaçador com tamanho de aproximadamente 640 pb. (Figura A8)

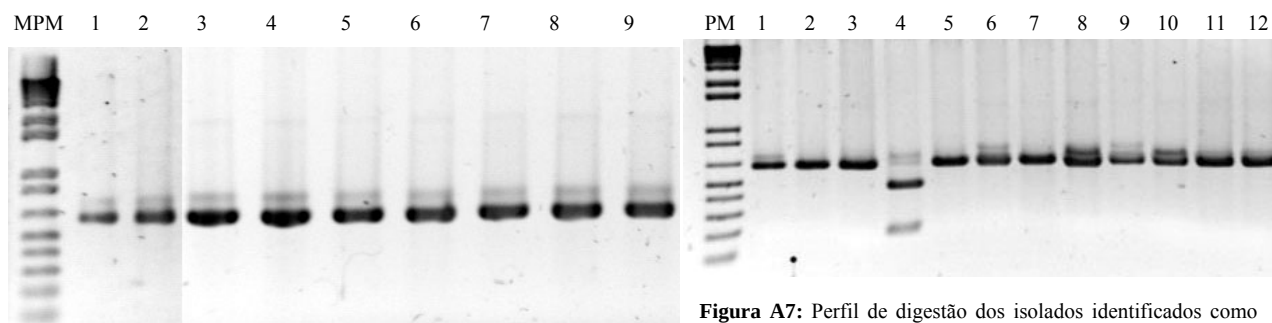


Figura A6: Amplificação da região espaçadora 16S-23S do agrupamento de genes de rDNA das amostras de bactérias lácticas do Fermento 1. MPM: marcador de peso molecular de 1Kb.

Figura A7: Perfil de digestão dos isolados identificados como *Streptococcus thermophilus*. Os produtos de amplificação da região espaçadora 16S-23S foram digeridos com as enzimas *SphI* (linha 1), *NcoI* (linha 2), *NheI* (linha 3), *SspI* (linha 4), *SfuI* (linha 5), *EcoRV* (linha 6), *DraI* (linha 7), *VspI* (linha 8), *HincII* (linha 9), *EcoRI* (linha 10), *HindIII* (linha 11) e *AvrII* (linha 12). PM representa o marcador de peso molecular de 1Kb.

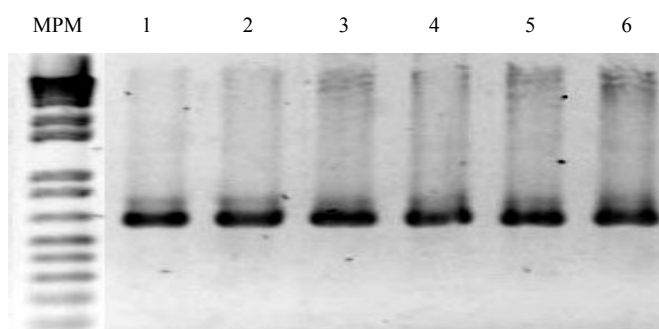


Figura A8: Amplificação da região espaçadora 16S-23S do agrupamento de genes de rDNA das amostras de bactérias lácticas do Fermento 2. MPM: marcador de peso molecular de 1 Kb.

A partir dos perfis de digestões obtidos e comparando com o banco de dados de Moreira et al (2005), os isolados foram identificados como *Streptococcus thermophilus* (Figura A9). O fermento 2 apresenta apenas uma das bactérias informadas na embalagem comercial. As possíveis explicações para este resultado são: a) a perda da viabilidade das células das outras três espécies, b) a inibição dos crescimento em placa das células das outras três espécies pela bacteriocina produzida pelas células de *Lactobacillus delbruckii* e c) inexistência das bactérias na formulação industrial. Adicionalmente, foi encontrado neste fermento representantes da espécie *Staphylococcus epidermidis*. Esta espécie faz parte da flora humana normal e também pode ser encontrada em ubres e amostras de leite. Não produz toxinas e fermenta ácido láctico

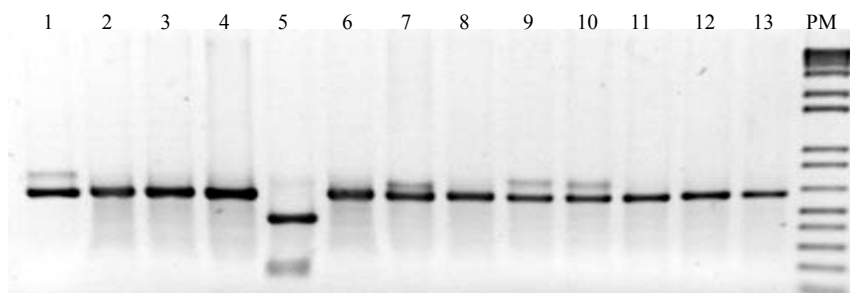


Figura A9: Perfil de digestão dos isolados identificados como *Streptococcus thermophilus*. Os produtos de amplificação da região espaçadora 16S-23S foram digeridos com as enzimas *SphI* (linha 2), *NcoI* (linha 3), *NheI* (linha 4), *SspI* (linha 5), *SfiI* (linha 6), *EcoRV* (linha 7), *DraI* (linha 8), *VspI* (linha 9), *HincII* (linha 10), *EcoRI* (linha 11), *HindIII* (linha 12) e *AvrII* (linha 13). PM representa o marcador de peso molecular de 1Kb. Controle negativo (linha 1)

8.6.3. Fermento 3

Cerca de 30 colônias foram obtidas após o crescimento, as quais apresentaram duas morfologias, uma arredondada com borda regular (esta apresentando colônias de tamanhos distintos) e outra enrugada, sendo, portanto, utilizadas para identificação 6 colônias arredondada com borda regular (sendo uma colônia pequena e 5 grandes) e 3 enrugadas. Os isolados apresentaram um perfil de amplificação típico de *Lactobacillus*, com bandas de amplificação correspondentes às três regiões espaçadoras. Por outro lado, o perfil de amplificação do isolado “1” (Colônia arredondada pequena) sugeriu que este deve pertencer a uma espécie bacteriana distinta dos demais isolados, por apresentar os três espaçadores com tamanho maior do que aqueles dos lactobacilos (Figura A10).

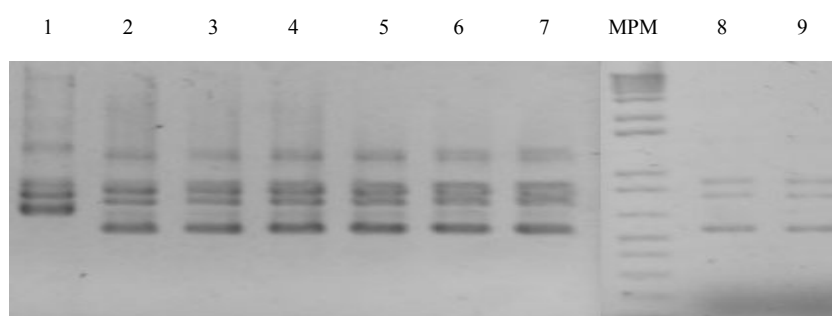


Figura A10: Amplificação da região espaçadora 16S-23S do agrupamento de genes de rDNA das amostras de bactérias lácticas do Fermento 3. MPM: marcador de peso molecular de 1 Kb.

A partir dos perfis de digestões obtidos e comparando com o banco de dados de Moreira et al (2005), a amostra 1 foi identificada como *Staphylococcus epidermidis* (Figura

A11-i). Já os isolados 2 a 9 foram identificados como *Lactobacillus delbruckii* (Figura A11-ii). O fermento 3 apresenta apenas uma das duas espécies informadas na embalagem comercial.

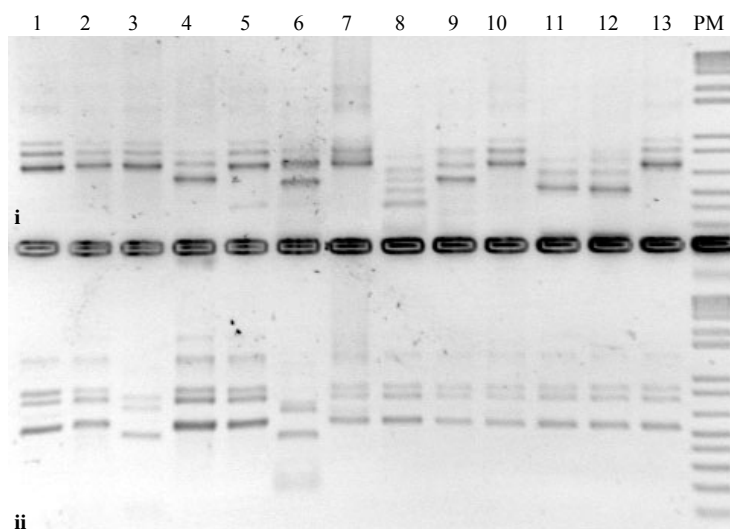


Figura A11: (i) Perfil de digestão dos isolados identificados como *Staphylococcus epidermidis*. (ii) Perfil de digestão dos isolados identificados como *Lactobacillus delbruckii*. Os produtos de amplificação da região espaçadora 16S-23S foram digeridos com as enzimas *SphI* (linha 2), *NcoI* (linha 3), *NheI* (linha 4), *SspI* (linha 5), *SfuI* (linha 6), *EcoRV* (linha 7), *DraI* (linha 8), *VspI* (linha 9), *HincII* (linha 10), *EcoRI* (linha 11), *HindIII* (linha 12) e *AvrII* (linha 13). PM representa o marcador de peso molecular de 1Kb. Controle negativo (linha 1)

8.6.4. Fermento 4

Após o crescimento, as colônias apresentaram colônias brancas pequenas e lisas. Todos isolados bacterianos apresentaram um perfil de amplificação com uma única banda de DNA espaçador com tamanho de aproximadamente 650 pb (Figura A12). A partir dos perfis de digestões obtidos e comparando com o banco de dados de Moreira et al (2005), os isolados foram identificados como *Lactococcus lactis* (Figura A13). O gênero *Lactococcus* foi definitivamente estabelecido em 1986 dentro do grupo dos estreptococos. Antes desse período, as bactérias desta espécie *Lactococcus lactis* eram identificadas como *Streptococcus lactis*. Portanto, estes dois gêneros apresentam dificuldades na separação taxonômica a partir das técnicas convencionais.

O fermento 4 não apresenta nenhuma das duas espécies bacterianas informadas na embalagem comercial. O gênero *Lactococcus* foi recentemente derivado do gênero *Streptococcus*, mais a espécie é nova. Isto indica que deve ter havido um problema taxonômico no momento da identificação do fermento industrial, ou seja, a espécie *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* informada seja na verdade a espécie *Lactococcus lactis*.

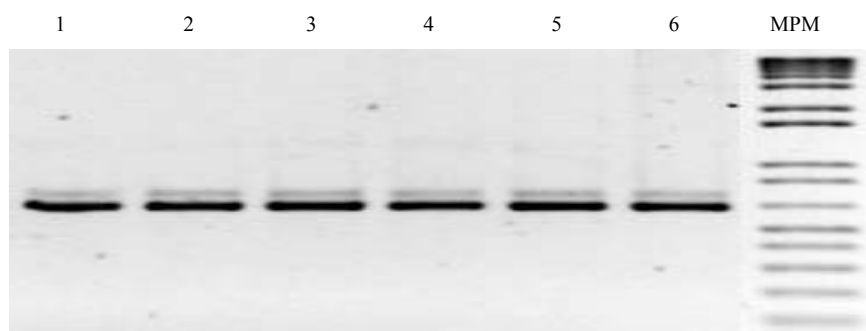


Figura A12: Amplificação da região espaçadora 16S-23S do agrupamento de genes de rDNA das amostras de bactérias lácticas do Fermento 4. MPM: marcador de peso molecular de 1 Kb.

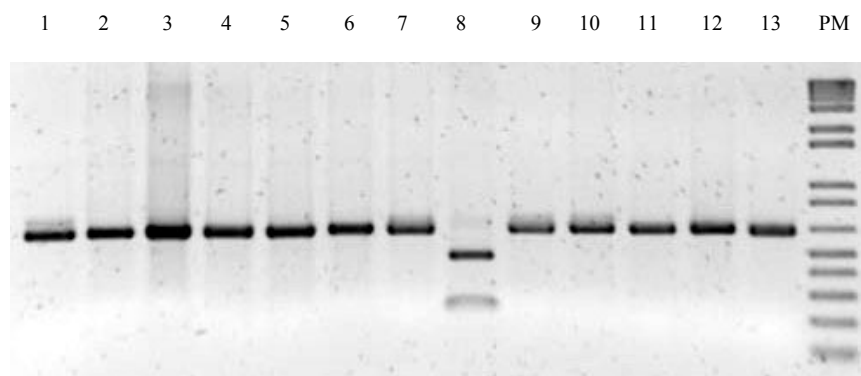


Figura A13: Perfil de digestão dos isolados identificados como *Lactococcus lactis*. Os produtos de amplificação da região espaçadora 16S-23S foram digeridos com as enzimas *SphI* (linha 2), *NcoI* (linha 3), *NheI* (linha 4), *SspI* (linha 5), *SfuI* (linha 6), *EcoRV* (linha 7), *DraI* (linha 8), *VspI* (linha 9), *HincII* (linha 10), *EcoRI* (linha 11), *HindIII* (linha 12) e *AvrII* (linha 13). PM representa o marcador de peso molecular de 1Kb. Controle negativo (linha 1)

8.6.5. Fermento 5

Após o crescimento, observaram-se colônias brancas e lisas, e colônias transparentes e lisas, sendo, portanto, utilizadas para identificação 7 colônias de cada morfologia. Todos isolados bacterianos apresentaram um perfil de amplificação com uma única banda de DNA espaçador com tamanho de aproximadamente 650 pb (Figura A14). A partir dos perfis de digestões obtidos e comparando com o banco de dados de Moreira et al (2005), os isolados foram identificados como *Lactococcus lactis* (Figura A15-i). Contudo três isolados apresentaram perfil de restrição distinto, o que sugere três possíveis espécies bacterianas distintas. Serão procedidas análises de sequenciamento de DNA para a correta identificação dessas bactérias. (Figuras A15-ii, A15-iii). O fermento 5 possui a espécie *Lactococcus lactis*, mas ainda não foi possível diferenciar as subespécies. Adicionalmente à ausência da espécie *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, foram encontradas três possíveis espécies bacterianas distintas. Serão procedidas análises de sequenciamento de DNA para a correta identificação dessas bactérias.

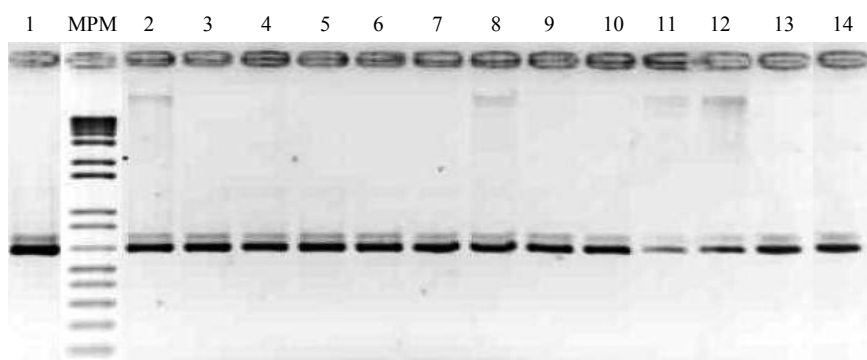


Figura A14: Amplificação da região espaçadora 16S-23S do agrupamento de genes de rDNA das amostras de bactérias lácticas do Fermento 5. MPM: marcador de peso molecular de 1 Kb.

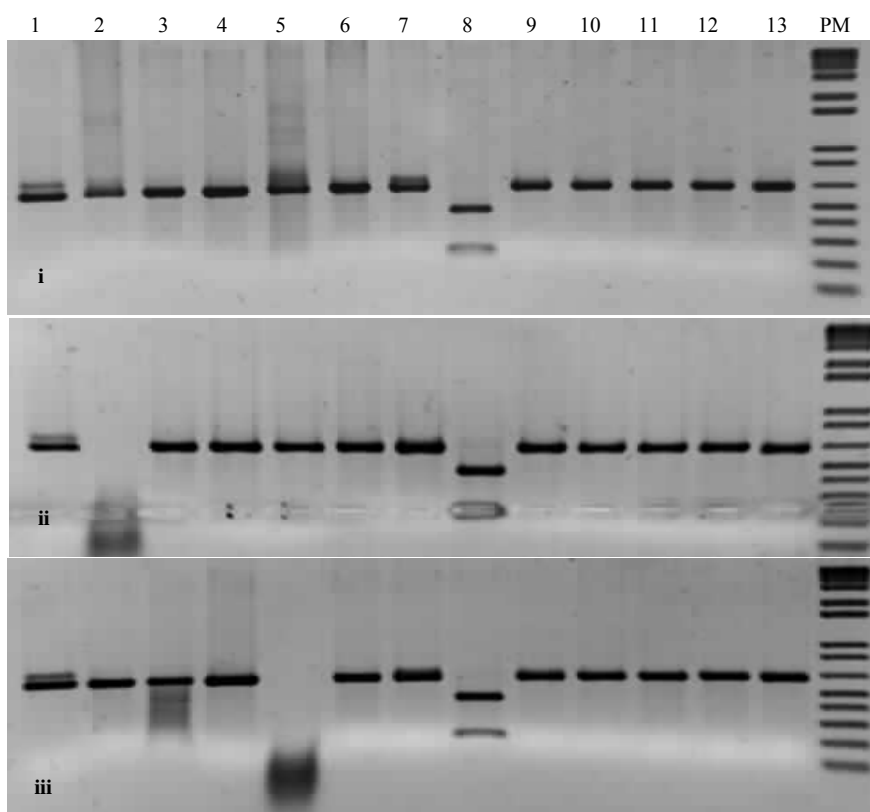


Figura A15: (i) Perfil de digestão dos isolados identificados como *Lactococcus lactis*. (ii, iii) Perfil de digestão dos isolados não identificados. Os produtos de amplificação da região espaçadora 16S-23S foram digeridos com as enzimas *SphI* (linha 2), *NcoI* (linha 3), *NheI* (linha 4), *SspI* (linha 5), *SfuI* (linha 6), *EcoRV* (linha 7), *DraI* (linha 8), *VspI* (linha 9), *HincII* (linha 10), *EcoRI* (linha 11), *HindIII* (linha 12) e *AvrII* (linha 13). PM representa o marcador de peso molecular de 1Kb. Controle negativo (linha 1)

8.6.6. Fermento 6

Após o crescimento, observaram-se colônias brancas e lisas, colônias transparentes e lisas, e colônias enrugadas, sendo, portanto, utilizadas para identificação colônias de cada morfologia. Os isolados apresentaram um perfil de amplificação típico de *Lactobacillus*, com bandas de amplificação correspondentes às três regiões espaçadoras. (Figura A16).

Os perfis de digestões obtidos não constam no banco de dados de Moreira et al (2005), e, portanto serão procedidas análises de seqüenciamento de DNA para a correta identificação dessas bactérias. (Figura A17)

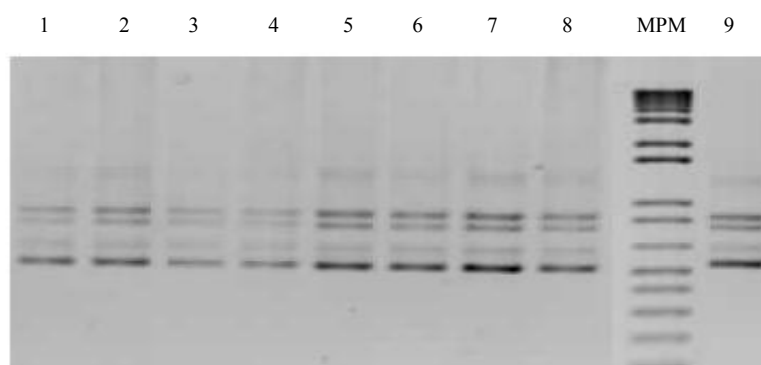


Figura A16: Amplificação da região espaçadora 16S-23S do agrupamento de genes de rDNA das amostras de bactérias lácticas do Fermento 6. MPM: marcador de peso molecular de 1 Kb.

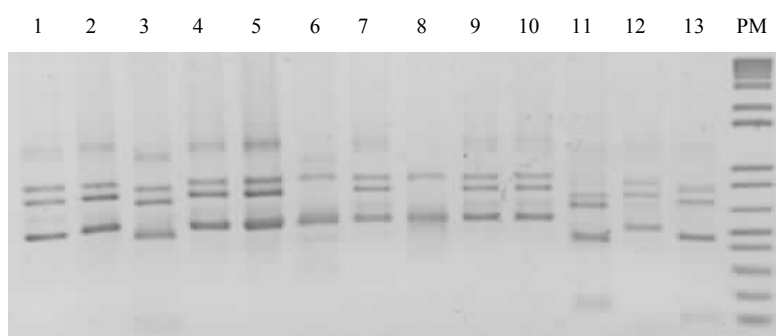


Figura A17: Perfil de digestão dos isolados do fermento 6. Os produtos de amplificação da região espaçadora 16S-23S foram digeridos com as enzimas *SphI* (linha 2), *NcoI* (linha 3), *NheI* (linha 4), *SspI* (linha 5), *SfiI* (linha 6), *EcoRV* (linha 7), *DraI* (linha 8), *VspI* (linha 9), *HincII* (linha 10), *EcoRI* (linha 11), *HindIII* (linha 12) e *AvrII* (linha 13). PM representa o marcador de peso molecular de 1Kb. Controle negativo (linha 1)

O fermento 6 não apresenta nenhuma das duas espécies informadas na composição comercial, e sim uma bactéria não identificada. Entretanto, há a possibilidade de que esta bactéria seja uma nova variante da espécie *Lactobacillus helveticus*. Serão procedidas análises de seqüenciamento de DNA para a correta identificação dessa bactéria.

Tabela A2: Quadro resumo das análises de identificação bacteriana de fermentos lácteos.

Fermento	Composição informada	Bactérias identificadas
1	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i> (non.nov.)
2	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbruckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus casei</i> --	Ausente <i>Lactobacillus delbruckii</i> ausente ausente <i>Staphylococcus epidermidis</i>
3	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbruckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i> (non.nov.) ausente
4	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbruckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> (gen.nov.) ausente
5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> --	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> ausente Três bacterias não identificadas
6	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> --	Ausente <i>Lactobacillus helveticus</i> espécie não identificada (todos os isolados)

9. Memorial da aluna

Brígida Thais Luckwu de Lucena [btluckwu@yahoo.com.br], nascida em 16 de fevereiro 1980, Bacharel em Ciências Biológicas, título obtido em 28 de maio de 2002, pela Universidade Federal de Pernambuco, com o trabalho de conclusão de curso: Caracterização Molecular de Leveduras de Fermentação Alcoólica. Especialista em Análise Clínicas pela FAFIRE, em 28 de abril de 2007, com monografia Caracterização de isolados de *Klebsiella pneumoniae* patogênicos e da microbiota normal através da ribotipagem por PCR e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. Mestre em Genética, pela UFPE, tendo colado grau em 09 de junho de 2004, com a dissertação Análise de Polimorfismos Cromossômicos em Linhagens de Leveduras de Fermentação Alcoólica, sendo aprovada com distinção, cujo trabalho foi publicado na Genetics and Molecular Research em 2007 como o artigo *Chromosome instability in industrial strains of Saccharomyces cerevisiae batch cultivated under laboratory conditions*. Também publicou os trabalhos Atividade Antimicrobiana de Fungos Isolados do Mangue Localizado no Município da Ilha de Itamaracá-PE e Atividade Antimicrobiana de Fungos Isolados do Mangue Localizado no Município de Rio Formoso-PE, esse como segundo autora, como resumos expandidos nos anais do VII Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental (2000), cuja apresentação oral foi realizada no mesmo evento. Já como resumo em anais de congresso publicou como primeira autora os seguintes trabalhos: Tipagem Intra-específica de *Lactobacillus fermentum* isolados do processo de fermentação alcoólica através do REP-PCR (54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008), Identificação de Contaminantes Bacterianos em Processos de Fermentação Alcoólica Através da ARDRA-PCR (XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007), Caracterização de isolados patogênicos de *Klebsiella pneumoniae* através da ribotipagem por PCR (52º Congresso Brasileiro de Genética, 2006), Análise do Polimorfismo Cromossômico em Linhagens de Leveduras de Fermentação Alcoólica (49º Congresso Nacional de Genética, 2003), Cariotipagem Molecular de Leveduras de Fermentação Alcoólica (48º Congresso Nacional de Genética, 2002). Contratada como Professora substituta de Genética da UFRPE de julho de 2007 a julho de 2009 e atuou como co-orientadora de iniciação científica e do trabalho de conclusão de curso do aluno Billy Manoel dos Santos, na Universidade Federal de Pernambuco. Como doutoranda, realizou estágio no Laboratório de Genética Celular e Molecular da UFMG, de 17 de julho a 18 de Setembro de 2006 e no Departamento de Genética da UFRJ, de 29 de julho a 08 de agosto de 2008. Como parte da formação técnica, participei do 3º Workshop Comparative Microbial Genomics and Taxonomy realizado no LNCC de 11 a 15 de agosto de 2008, dentre outros cursos de curta duração.