



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana**

**Ampliação, caracterização fenotípica e estruturação da Coleção
de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos nativas do
solo do Distrito Federal**

Paulo Henrique Rosa Martins

PAULO H Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Microbiana da
Universidade de Brasília para a obtenção do Título
de Doutor em Biologia Microbiana

Ampliação, caracteri

Trabalho realizado no Laboratório de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos — LaBafes, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular. Apoio financeiro: UnB, CNPq, Capes e FAPDF.

Dedico esse trabalho aos meus pais Angelita e Francisley (in memoriam), que certamente de onde estejam, tenho a certeza que estão felizes com as minhas conquistas. Dedico também ao meu avô Lucino Picanço (in memoriam), pois sem ele e seu apoio eu nunca teria chegado onde cheguei. E, por fim dedico à minha avó Marlene de Castro, pois sem ela nada disto seria possível.

Agradecimentos

Quando eu iniciei minha graduação em agosto de 2006 eu nunca imaginei que chegaria onde cheguei. Filho de pais analfabetos, estudante de escola pública e bolsista do Prouni. Eu sempre tive a mania de escrever em todos os lugares possíveis da casa da minha avó. E numa dessas minhas “loucuras” eu tracei um objetivo: graduação na PUC, mestrado na UFG e doutorado na UnB. E por incrível que pareça, eu consegui realizar os três.

Mas eu não caminhei sozinho, eu vivi um sonho que não era só meu. Por essa razão eu gostaria de agradecer às pessoas que compartilharam dessas conquistas comigo e que foram peças fundamentais em todo esse processo. Primeiramente, eu agradeço à minha avó Marlene de Castro, a minha base, meu bem maior. Sem ela eu não sei onde eu estaria agora. Aproveitando, agradeço a toda a minha família, meus tios, meus irmãos e primos que sempre acreditam em mim e nos meus sonhos.

Agradeços aos meus amigos, em especial a Danielle (quase uma irmã) que sempre esteve ao meu lado, e à Suelen (minha psicóloga particular). Duas pessoas especiais que a vida me deu de presente. E não poderia me esquecer de agradecer à Nayara, que me hospedou quando eu vim para Brasília, e que foi minha companheira de casa por quase dois anos.

Agradeço também aos meus amigos do LaBafes. Ao Danilo e a Juliana, duas pessoas que eu admiro muito, pois são extremamente inteligentes e bons naquilo que fazem. Agradeço imensamente à Maria Inês e ao Arthur, pois sem eles eu ainda estaria fazendo caracterização fenotípicas. E agradeço também à Professora Marlene por ter me aceito como aluno, ter me orientado e me proporcionado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Agradeço ao Dr. Leon Rabinovitch e toda a equipe da Fiocruz-RJ (Prof. Adriana Vivoni, Edmar, Victor, Ronaldo, Roseane e Vera), muito obrigado pelo aprendizado e por toda a ajuda. Agradeço também ao Dr. Luciano Paulino da Embrapa-Cenargem por toda a ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço também ao meu companheiro Riam Dornelas, por ter acreditado nos meus sonhos, e ter mudado a sua vida (sair de Goiânia e vir para Brasília) para ficar ao meu lado me dando todo o apoio necessário.

E por fim, e não menos importante, agradeço a Deus por ter me proporcionado a dádiva da vida, do trabalho e do aprendizado. Obrigado por ter me fortalecido e me ajudado a chegar até onde estou agora.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	i
LISTA DE ABREVIATURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
Estrutura da Tese	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – O filo <i>Firmicutes</i>	1
1.2 – Endoesporulação	3
1.3- Bactérias aeróbias formadoras de endósporos	10
1.4- Taxonomia de Bafes	13
1.5 – Caracterização Polifásica	17
1.6 – Caracterização fisiológica e bioquímica	21
1.7 – Caracterização fenotípica por espectrometria de massas	23
1.8- Coleções biológicas e microbiológicas	28
1.9 – Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos	30
2. JUSTIFICATIVA	31
Referências	32
3. OBJETIVOS	44
3.1 – Geral	44
3.2 – Especificos	44
4. METODOLOGIA E RESULTADOS	45
4.1 – Ampliação do acervo de linhagens SDF da CBafes	45
4.2 – Caracterização fenotípica inicial	48
4.3 - Protein profiling as a tool for identifying environmental aerobic endospore-forming bacteria	59
4.4 – Biochemical characterization of the aerobic endospore-forming bacteria Collection of the University of Brasília, Brazil	78
5. CONCLUSÕES	100

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1. Estrutura atual do filo Firmicutes..	1
Figura 2. Endoesporulação.	5
Figura 3. Características estruturais do esporo maduro..	6
Figura 4. Processo de germinação do esporo.	9
Figura 5. Visão esquemática dos vários componentes celulares e técnicas utilizadas no processo de caracterização polifásica.	18
Figura 6. Observação microscópica de Bafes.	19
Figura 7. Princípio da técnica de espectrometria de massas por MALDI-TOF.	25
Figura 8. Localização do endósporo.	48
Figura 9. Morfologia do endósporo/esporo.	49
Figura 10. Característica fenotípicas de linhagens SDF.	50
Figura 11. Demonstrativo das morfologias observadas pelo exame a fresco	51

QUADROS E TABELAS

Quadro I. Padrões mínimos para a caracterização e identificação de Bafes.....	20
Tabela 1. Geolocalização e data das coletas das amostras de solo.....	45
Tabela 2. Estrutura atual da CBafes	47
Tabela 3. Características fenotípicas das linhagens SDF	52

LISTA DE ABREVIATURAS

Bafes: Bactérias aeróbias formadoras de endósporos

CBafes: Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos

CHCA: *alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid* (ácido α -ciano-4 hidroxicinâmico)

DHB: *2,5-Dihydroxybenzoic acid* (ácido 2,5-di-hidroxibenzóico)

DPA: *pyridine-2,6-dicarboxylic acid* (ácido dipicolínico)

DPA-Ca: *calcium dipicolinate* (dipicolinato de cálcio)

FA: *Ferulic acid* (ácido ferúlico)

LaBafes: Laboratório de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos

MALDI-TOF MS: *Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight Mass Spectrometry Mass Spectrometry* (Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz com análise de tempo de voo)

MCF: microscopia por contraste de fases

MS: *Spectrometry Mass* (Espectrometria de massas)

SA: *Sinapinic acid* (ácido sinapínico)

SASP: *small, acid-soluble proteins* (pequenas proteínas ácido-solúveis)

SDF: Solo do Distrito Feral (código utilizado para nomear as linhagens pertencentes à Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos)

HCT: meio de cultura próprio para a esporulação de *Bacillus* spp.

TOF: *Time of Flight* (tempo de voo)

RESUMO

Em escassez de nutrientes, bactérias aeróbias formadoras de endósporos (Bafes) – filo *Firmicutes* – são capazes de produzir uma estrutura de resistência denominada esporo, o produto final do evento de diferenciação celular do esporângio, denominada endoesporulação. As Bafes são ubíquas e representam a maior parte da microbiota de muitos ambientes, sendo o solo o principal reservatório. A Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporo (CBafes) da UnB está localizada no Laboratório de Microbiologia e é especializada em linhagens isoladas do solo do DF (SDF) por choque térmico. Este acervo vem sendo inspecionado em abordagem polifásica que visa a integração de diferentes tipos de informações (fenotípicas, genotípicas e moleculares) para auxiliar na classificação robusta das espécies. O presente trabalho teve como objetivo ampliar a CBafes, realizar a caracterização fenotípica por MALDI-TOF MS e estabelecer o perfil bioquímico das linhagens SDF pertencentes à CBafes. Foram isoladas e introduzidas à Coleção mais 158 novas SDF, linhagens essas em forma de bastonetes, contendo endósporos/esporos com formato variando entre esféricos (41%), cilíndricos (34%) e elípticos (25%). Além disto, observou-se o predomínio de endósporo em posição subterminal (42%). Em relação à caracterização fenotípica por MALDI-TOF MS foi realizada a identificação de 64 linhagens, onde 31 (48%) foram identificadas a nível de espécie e 33 (52%) a nível de gênero. Além disto, foi estabelecido o perfil bioquímico de todas as 312 linhagens pertencentes à CBafes. Durante este trabalho, observou-se a dificuldade na identificação espécies estreitamente relacionadas. Portanto, reforça-se a importância da caracterização polifásica na identificação de Bafes, e ressaltando a importância do fenótipo nesse processo.

Palavras-chave: *Firmicutes*; caracterização fenotípica; MALDI-TOF MS; caracterização bioquímica.

ABSTRACT

In a lack of nutrients, aerobic endospores-forming bacteria (AEFB) - filo *Firmicutes* - can produce a resistance structure called the spore, the end product of the sporangium cellular differentiation event, called endosporulation. The AEFB are ubiquitous and represent the major part of the microbiota of many environments, the soil being the main reservoir. The Endospore-forming Aerobic Bacteria Collection (CBafes) of UnB is located in the Microbiology Laboratory and specializes in isolates of the soil of the DF (SDF) by thermal shock. This collection has been inspected in a polyphasic approach that aims to integrate different types of information (phenotypic, genotypic and molecular) to aid in the robust classification of species. The objective of the present work was to expand CBafes, to perform phenotypic characterization by MALDI-TOF MS and to establish the biochemical profile of SDF strains belonging to CBafes. A total of 158 new SDFs were isolated and introduced to the Collection, with rods containing endospores/spores ranging in size from spherical (41%), cylindrical (34%) and elliptic (25%). In addition, the predominance of endospore in the subterminal position (42%) was observed. In relation to the phenotypic characterization by MALDI-TOF MS, 64 strains were analyzed, where 31 (48%) were identified at the species level and 33 (52%) were identified at the genus level. In addition, the biochemical profile of all 312 lines belonging to CBafes was established. During the present study the difficulty in identifying closely related species was observed. Therefore, the importance of the polyphase characterization in the identification of Bafes is reinforced and demonstrates the importance of the phenotype in this process.

Keywords: *Firmicutes*; phenotypic characterization; MALDI-TOF MS; biochemical characterization.

Estrutura da Tese

A presente tese foi dividida em cinco seções apresentando, portanto, a seguinte estrutura:

1° seção: INTRODUÇÃO, onde encontra-se a revisão da literatura relacionada aos aspectos gerais do Filo *Firmicutes*, das Bactérias aeróbias formadoras de endósporos e do processo de caracterização destes microrganismos, além de ressaltar a importância de coleções biológicas.

2° seção: JUSTIFICATIVA, que reforça a relevância do presente trabalho.

3° seção: OBJETIVOS, que descreve as metas gerais e específicas do trabalho.

4° seção: RESULTADOS, que foram divididos em quatro partes. Na primeira parte encontram-se os dados referentes à ampliação do acervo da CBafes; na segunda parte os dados referentes à caracterização inicial das 312 linhagens pertencentes à Coleção, sendo 154 do acervo anterior a realização deste trabalho e 158 adicionadas durante a execução desta pesquisa; na terceira parte os dados da caracterização fenotípica realizada por espectrometria de massas (MALDI-TOF MS); e por fim, a quarta parte com os dados referentes à caracterização bioquímica das 312 linhagens SDF.

Vale ressaltar que a metodologia utilizada está descrita em cada uma das seções, em conjunto com os respectivos dados.

5ª seção: CONCLUSÕES.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – O filo *Firmicutes*

O filo *Firmicutes* é conhecido por compreender microrganismos Gram positivos, com baixo teor de G + C, com parede celular rígida ou semi-rígida contendo peptidoglicano (Gibbons e Murray, 1978). No entanto, esse filo inclui muitas bactérias que possuem grande diversidade de características (filogenéticas, fenotípicas, quimiotaxonômicas e patogênicas), além de microrganismos Gram negativos. Assim, a hierarquia taxonômica deste filo permanece bastante fluida (Jumas-Bilak *et al.*, 2009; Yutin e Galperin, 2013; Alauzet *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2015).

Atualmente o filo *Firmicutes* consiste em sete classes: *Bacilli*, *Clostridia*; *Erysipelotrichia*, *Limnochordia*, *Negativicutes*, *Thermolithobacteria* e *Tissierellia* (Figura 1), abrangendo 45 famílias e cerca de 479 gêneros (Seong *et al.*, 2018). A qualificação de *Firmicutes*, bem como a atribuição de novos isolados aos vários *taxa* dentro do filo, baseia-se principalmente, em padrões de similaridade entre sequências do gene de rRNA 16S, na espessura das paredes das células, entre outras características adicionais, como a formação do endósporo (Galperin, 2013).

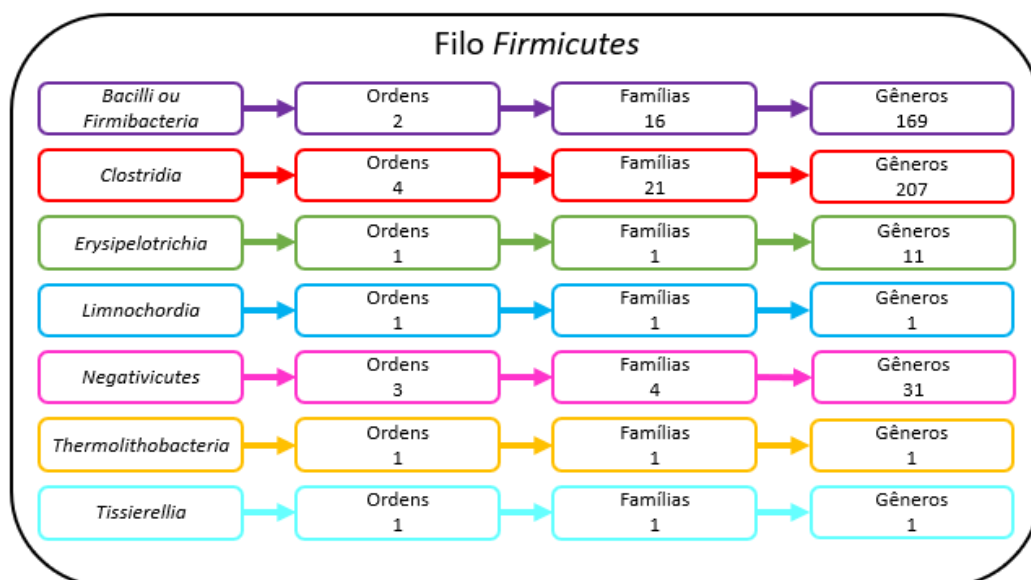


Figura 1. Estrutura atual do filo *Firmicutes*. Segundo a *List of Prokaryotic names* (<http://www.bacterio.net/>) atualmente o filo *Firmicutes* é composto por 7 classes, 13 ordens, 45 famílias e mais de 400 gêneros.

S
são
aer

A
s
linh
age
ns
de
*Fir
mic
ute*

óbias, facultativas ou anaeróbias estritas e parte é termófila e/ou halófila (Seong *et al.*, 2018; Galperin *et al.*, 2013; Logan *et al.*, 2009; de Vos *et al.*, 2009). As células vegetativas se apresentam nas formas esféricas, bastões, curvadas e helicoidais, e podem ou não apresentar flagelo. Grande parte dos membros é quimio-organotrófica e alguns são fotoheterotróficos anoxigênicos. O crescimento ótimo, *in vitro*, da maioria das espécies se dá em pH neutro, mas também já foram descritas espécies acidófilas ou alcalífilas. As linhagens pertencentes ao filo são ubíquas, podendo ser encontradas em diferentes reservatórios, sendo o solo o principal (Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013; Maughan e Auwera, 2011), onde estão envolvidos na decomposição e reciclagem de matéria orgânica (Baik *et al.*, 2008). No entanto, vários gêneros fazem parte da microbiota normal do intestino de mamíferos ou são patogênicos para humanos, outros animais e plantas (Lee *et al.*, 2009; Nguyen e Götz, 2016). Alguns membros do filo também são industrialmente valiosos para a produção de antibióticos, enzimas e produtos lácteos, dentre outros (Liu *et al.*, 2012; Kwak *et al.*, 2013).

Como supracitado, o filo apresenta linhagens produtoras e não produtoras de endósporos (Galperin, 2013). Entretanto, as linhagens alocadas na classe *Thermolithobacteria*, são todas asporogênicas. As espécies formadoras de endósporos alocadas nas outras seis classes coexistem com não formadoras, sendo que um mesmo gênero pode incluir espécies esporulantes e asporogênicas. Já a classe *Negativicutes* unifica membros Gram negativos, embora as sequências de marcadores moleculares apresentem alto nível de conservação com os demais membros do filo. A retirada da classe *Mollicutes* do filo *Firmicutes* levou a proposição de uma nova classe, *Erysipelotrichia*, estabelecida para realocar os membros formadores de esporos da então classe *Mollicutes*, que foi elevada à categoria de filo (de Vos *et al.*, 2009; Galperin, 2013).

1.2 – Endoesporulação

Uma propriedade característica do filo é a capacidade de formação de endósporos. A formação do endósporo (endoesporulação/ esporulação) é observada em linhagens aeróbias e anaeróbias e envolve um complexo programa de diferenciação celular (Fritze, 2004; de Vos *et al.*, 2009; Galperin, 2013; Hutchison *et al.*, 2014), entretanto, não constitui uma característica universal entre os membros de *Firmicutes*. Há no filo linhagens onde o processo de diferenciação celular não foi comprovado, mesmo apresentando estrutura genética necessária para a ativação do processo. Além disto, encontram-se outras linhagens que durante o processo de evolução, perderam genes específicos para a formação do endósporo (Galperin *et al.*, 2013; de Vos *et al.*, 2009; Logan, 2009).

A espécie *Bacillus subtilis* constitui o modelo consagrado para estudar a morfologia, bioquímica e os determinantes genéticos da endoesporulação, aspectos fundamentais do programa permanecem desconhecidos para outros gêneros (Fritze, 2004; de Vos *et al.*, 2009; Galperin, 2013; Hutchison *et al.*, 2014). De fato, apesar da endoesporulação ocorrer mais comumente em bactérias em forma de bastão, o evento, também, pode ser observado em células filamentosas e cocos (Hutchison *et al.*, 2014). Adicionalmente, pouco se sabe sobre as vias metabólicas da endoesporulação que evoluíram para novos sistemas reprodutivos e que resultaram na capacidade de formar células descendentes, que permanecem no interior do citoplasma em diversas linhagens de *Firmicutes*, como nas espécies de *Epulopiscium* e gêneros correlatos.

Ainda assim, a genômica comparada tem revelado um conjunto de genes e alguns aspectos estruturais do programa de esporulação que parecem ser universalmente conservados entre as linhagens formadoras de endósporos de *Firmicutes*. Segundo Hutchison *et al.* (2014), isto sugere que um programa de diferenciação celular robusto e sofisticado estava presente no último ancestral comum de todos os membros do filo que produzem descendentes ou esporos no interior do esporângio, a célula em diferenciação. A diversidade de bactérias produtoras de endósporos e os variados estilos de vida sugerem que o evento endoesporulação é finamente sintonizado para a vida em um ambiente particular e constitui uma estratégia celular vantajosa de sobrevivência, dispersão e, em alguns casos, reprodução.

Como citado anteriormente, o sistema modelo proposto para o estudo do processo de endoesporulação é baseado na espécie *B. subtilis*. Porém há diversas espécies que seguem padrões de esporulação diferentes do modelo proposto (Galperin, 2013; Hutchison *et al.*, 2014). Hutchison *et al.* (2014) destacam que diferentemente do modelo (*B. subtilis*), diversas espécies podem produzir mais de um endósporo por esporângio, como *Clostridium oceanicum* (dois endósporos, um em cada extremidade do esporângio), *Anaerobacter polyendosporus* (até seis endósporos) e *Metabacterium polyspora* (até sete endósporos). Estes descendentes nem sempre são produzidos com fins de resistência como no caso das Bactérias aeróbias formadoras de endósporo, mas para reprodução e/ou dispersão.

Dentro deste contexto, é oportuno enfatizar que os eventos descritos abaixo foram desenvolvidos com base em estudos realizados com o paradigma da endoesporulação, *B. subtilis*, outras espécies do gênero e linhagens relacionadas, em conjunto denominadas Bafes (Bactérias aeróbias formadoras de endósporos).

A endoesporulação ou formação do endósporo é assim designada em razão do desenvolvimento do esporo — a estrutura resultante desse processo de diferenciação celular — ocorrer no interior do esporângio (Errington, 2003; Hilbert e Piggot, 2004; Onyenwoke *et al.*, 2004). Os esporos são formados, em resposta a uma complexa rede de transdução de sinal, que responde a uma variedade de características ambientais e, pelo menos, dois fatores principais: a privação de nutrientes e densidade populacional (Driks, 1999; McKenney *et al.*, 2013).

O processo de esporulação (Figura 2) é coordenado, temporal e espacialmente, pela expressão ordenada de uma série de genes específicos desse evento de diferenciação celular (Hilbert e Piggot, 2004; Mckenney *et al.*, 2013).

A formação do esporo (Figura 2) é dividida, didaticamente, em um estágio inicial 0 e sete estágios (I à VII), morfológica e bioquimicamente reconhecíveis (Piggot e Coote, 1976; Fujita e Losick, 2003; Piggot e Hilbert, 2004). No estágio 0 ocorre a duplicação do genoma, que se estende no sentido longitudinal por todo o citoplasma do esporângio, formando o filamento axial (estágio I) e causando um alongamento da célula. A formação do septo (estágio II) origina dois compartimentos, o da célula mãe, o maior e do pré-esporo, o menor, momento em que o processo se torna irreversível. Em seguida, ocorre o engolfamento do pré-esporo pelo envelope da célula mãe (estágio III). A partir de então, inicia-se a formação e montagem das camadas concêntricas que irão compor o esporo maduro:

a deposição do córtex, a formação do exospório, apenas em algumas espécies (estágio IV) e, finalmente, a estruturação da capa e demais componentes externos (estágio V e VI), como a recém descrita crosta de *B. subtilis* (McKenney *et al.*, 2013; McKenzie *et al.*, 2010) e apêndices externos ao exospório (Vary, 1994; Walker *et al.*, 2007). No estágio final (estágio VII), a parede celular do esporângio é lisada, liberando o esporo maduro para o ambiente (Driks, 1999; Fujita e Losick, 2003; Hilbert e Piggot, 2004).

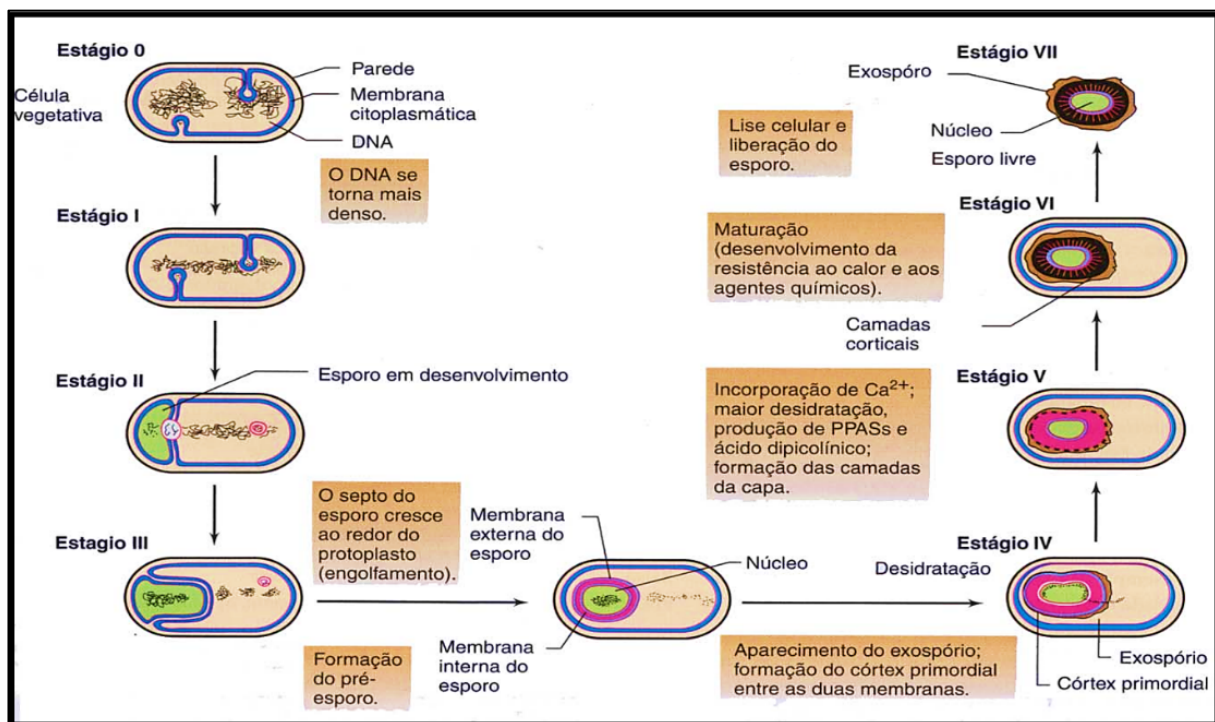


Figura 2. Endoesporulação. Após a duplicação do genoma (**Estágio 0**) inicia-se o processo de diferenciação celular, como a formação do filamento axial (**Estágio I**), seguido da formação de dois septos assimétricos, separando em célula-mãe e pré-esporo (**Estágio II**), engolfamento pela célula mãe (**Estágio III**), formação do pré-esporo (**Estágio III**), formação da capa e demais estruturas externas (**Estágio V**), maturação (**Estágio VI**) e liberação do esporo (**Estágio VII**). Fonte: Madigan *et al.*, (2004).

O esporo maduro, é uma célula dormente, metabolicamente inativa e altamente diferenciada, resistente ao tempo (Cano *et al.*, 1994; Vreleend, 2000), agentes físicos e químicos e diversos outros tipos de pressões ambientais (Hilbert e Piggot, 2004; de Vos *et al.*, 2009; Niall e Halket, 2011; Galperin *et al.*, 2013). O esporo maduro apresenta uma morfologia em multicamadas concêntricas e bem estruturadas, que, em conjunto com outras características dessa célula, garantem a capacidade de resistência a estresses tipicamente letais às células vegetativas (Giorno *et al.*, 2007). Esporos ainda são capazes de resistir a extremos de

temperatura, radiação, agentes químicos e tempo (Driks, 1999; Driks, 2002). Observando as estruturas da parte mais externa para a interna, tem-se primeiramente o exospório (estrutura nem sempre presente), a crosta, descrita até o momento apenas para *B. subtilis*, que consiste em uma estrutura morfológicamente similar à capa externa, porém de aparência mais consistente e grosseira (McKenney *et al.*, 2013), seguido das capas (interna e externa), membrana externa, córtex, membrana interna e cerne ou citoplasma (Figura 3).

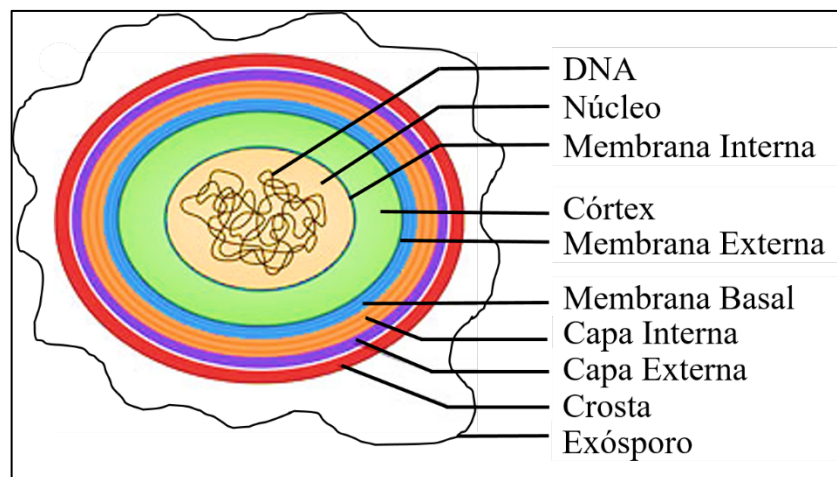


Figura 3. Características estruturais do esporo maduro. Estruturas usualmente descritas em esporos, da parte mais externa para a interna: exospório e crosta (ausentes em algumas espécies), capas, membranas (basal e externa), córtex, membrana interna e cerne. Adaptado de McKenney *et al.*, 2013.

O exospório é composto por proteínas, lipídeos e carboidratos, organizados em camada basal paracristalina e região externa (Redmond *et al.*, 2004), e pode ser encontrado em diversas espécies, como os membros do grupo do *B. cereus*, mas não no modelo *B. subtilis* (Driks, 1999; Waller *et al.*, 2004; McKenney *et al.*, 2013). Por esta razão, acredita-se que essa estrutura delgada não é essencial ao esporo. O exospório pode ser facilmente removido do restante da estrutura do esporo por aplicação de agentes desnaturantes como ureia, mercaptoetanol ou hidróxido de sódio (Setlow, 2006) ou sonicação (Redmond *et al.*, 2004).

Prosseguindo para o interior do esporo, a próxima estrutura é um revestimento proteico composto de várias camadas, as capas (interna e externa) (Setlow *et al.*, 2012). A capa é majoritariamente composta por cisteína e proteínas ricas em tirosina, poucos lipídios e carboidratos. O conjunto formado por essas estruturas representam a primeira linha de defesa dos esporos, pois as múltiplas camadas proteicas agem como um filtro químico, mas desempenham uma menor

resistência à radiação UV e ao calor úmido (Pedraza-Reyes *et al.*, 2012; Setlow, 2012). Além disto, a capa protege o córtex contra enzimas líticas (como lisozima) e predação por protozoários (Driks, 1999). Entretanto, o revestimento permite a entrada de moléculas de nutrientes para a germinação dos esporos (Setlow, 2003).

A membrana externa, é uma estrutura essencial durante a formação dos esporos, mas não retém a integridade nos esporos maduros (Popham, 2002). Após a membrana externa há uma camada de espessa de peptidoglicano, o córtex, com estrutura semelhante à parede celular das células vegetativas, mas contém algumas modificações específicas do esporo (Popham, 2002). No córtex cerca de 50% dos resíduos de ácido murâmico são substituídos por lactama murâmico, o que resulta em um peptidoglicano mais flexível, pois o número de ligações cruzadas é muito inferior ao típico encontrado na parede celular de células vegetativas, sendo em consequência, fracamente reticulado (Warth e Stroming, 1972). Presumivelmente, o córtex serve, assim, como uma estrutura de retenção para suportar a pressão de turgescência gerada pela elevada concentração de solutos no cerne (Popham, 2002).

A membrana interna dos esporos é análoga à membrana citoplasmática da célula vegetativa e representa uma forte barreira de permeabilidade. E, por conseguinte, desempenha um papel chave na resistência dos esporos a muitos produtos químicos que danificam o DNA (Nicholson *et al.*, 2000). Além disso, a membrana interna é o fator determinante para a manutenção do baixo conteúdo de água no cerne (Popham, 2002). No esporo dormente, a membrana interna é uma estrutura muito compactada, mas durante os primeiros minutos da germinação (e na ausência de ATP), o volume da célula aumenta em duas vezes (Cowan *et al.*, 2004). Em adição, a membrana interna é a localização dos diferentes tipos de receptores de nutrientes (Setlow, 2003).

O cerne, ou citoplasma, do esporo apresenta várias características que contribuem para o elevado nível de resistência do mesmo (Popham, 2002). Estas propriedades únicas são o baixo teor de água, os elevados níveis de Ca^{++} associados ao ácido dipicolínico (DPA) em forma polimérica (dipicolinato de Ca : DPA-Ca), a diminuição da permeabilidade, e a saturação do DNA por pequenas proteínas ácido solúveis (do inglês SASPs), que baixam o pH do citoplasma para 5,5-6 (Pedraza-Reyes *et al.*, 2012). Em comparação com células em crescimento, que têm o teor de água de 75-80%, a água só constitui de 27-55% do peso úmido do

esporo. A baixa permeabilidade da membrana interna e o acúmulo de DPA-Ca são essenciais para manter esse baixo teor de água (Sapru e Labuza, 1993; Ablett *et al.*, 1999).

Os esporos são as células de maior longevidade conhecida e podem permanecer dormentes por milhares de anos (Losick, *et al.*, 1986; Cano, 1994; Setlow, 1995; Vreeland, 2000; Jedrzejewski e Setlow 2001; Setlow, 2003). Durante o estado de dormência, sem metabolismo detectável, proteínas do esporo monitoram o ambiente, e quando as condições são favoráveis para o crescimento, inicia-se o processo de germinação. Após a detecção de nutrientes (agentes germinantes), uma cascata de reações bioquímicas e hidrolíticas é iniciada (Setlow, 2003; Christie, 2012). O processo da germinação pode ser subdividido didaticamente em duas etapas, denominadas fase I e II (Figura 4).

A fase I inicia-se depois que os receptores de germinação são acionados, ocorrendo então a liberação de cátions monovalentes (H^+ , K^+ e Na^+) a partir do cerne (Setlow, 2003). Acontece também o aumento do pH interno do citoplasma (5,5-6) para níveis adequados (pH neutro) para a reativação do metabolismo (Swerdlow *et al.*, 1981). A liberação de cátions é seguida pela liberação de DPA, e em paralelo à liberação são liberados aminoácidos livres, tais como, arginina e ácido glutâmico (Johnstone *et al.*, 1982; Setlow *et al.*, 2008). O citoplasma é parcialmente reidratado, e nesse ponto as propriedades de resistência ao calor são parcialmente reduzidas (Setlow *et al.*, 2003; Cowan *et al.*, 2004). Quando observado por microscopia de contraste de fase (MCF) o brilho do esporo também torna-se progressivamente mais fraco até desaparecer no final do processo.

O evento que define o início da fase II é a degradação do córtex por hidrolases específicas (Setlow, 2003). As hidrólises do córtex promovem o aumento da absorção de água e a expansão do cerne, da membrana interna e parede do cerne. O nível de hidratação neste momento torna-se elevado o suficiente para retomar a mobilidade proteica e ação enzimática (Christie, 2012). Realiza-se então a degradação das proteínas responsáveis pela saturação do DNA (SASP), seguida da síntese de macromoléculas, ruptura das capas e liberação da nova célula, um evento denominado extrusão (Setlow, 2008).

A localização do endósporo no interior do esporângio é uma característica notável e é utilizada no processo de identificação e classificação de bactérias formadoras de endósporos, variando entre posições central, subterminal e terminal

(Logan & de Vos, 2009). Quando observados utilizando MCF, observar-se estruturas com as formas esférica, cilíndrica ou oval e, raramente, apresenta-se em formato semelhante ao um rim ou uma banana. Além disto, observe-se a capacidade ou não do endósporo em causar a deformação do esporângio.

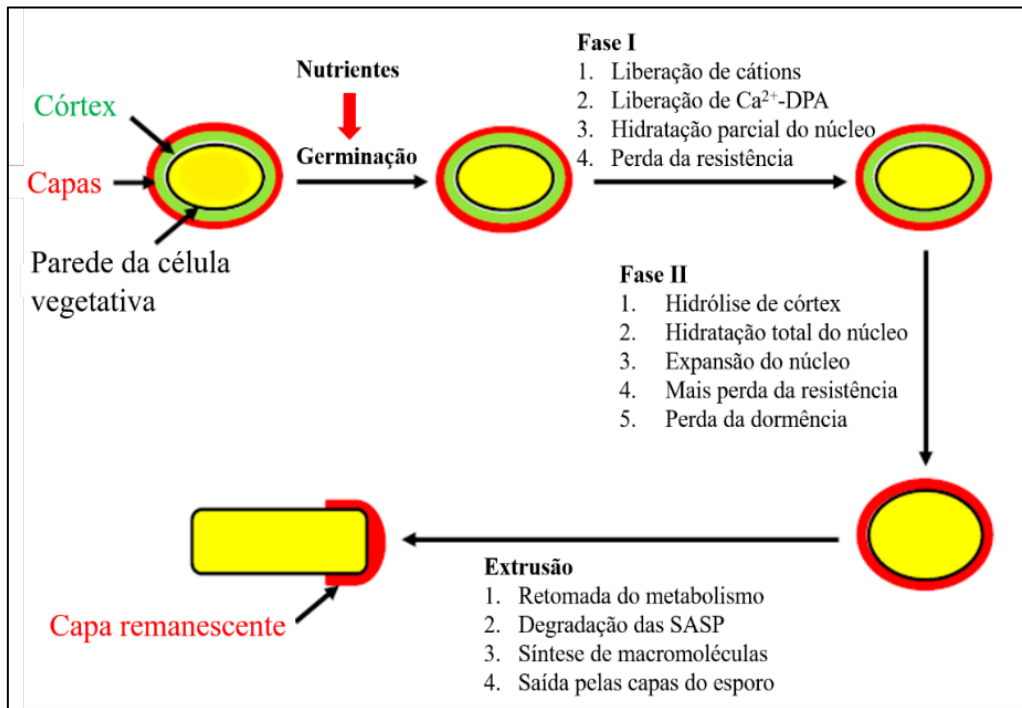


Figura 4. Processo de germinação do esporo. Imagem ilustra as duas fases do processo de germinação que culminam com a extrusão da nova célula. Os principais eventos são a saída de Ca -DPA do citoplasma levando à hidratação do mesmo, ativando o metabolismo celular. Adaptado de Setlow, 2014.

1.3- Bactérias aeróbias formadoras de endósporos

As Bafes são microrganismos que possuem a capacidade de, após uma complexa sequência de eventos de diferenciação celular, produzir células dormentes, com metabolismo indetectável, e altamente resistentes, denominadas esporos (Niall e Halket, 2011). Estão alocadas na ordem *Bacillales* dentro da classe *Bacilli*, onde encontram-se dez famílias, dentre as quais, sete abrigam gêneros produtores de endósporo: *Bacillaceae*, *Alicyclobacillaceae*, *Paenibacillaceae*, *Planococcaceae*, *Pasteuriaceae*, *Sporolactobacillaceae* e *Thermoactinomycetacea*. Os gêneros que acomodam o maior número de espécies são: *Bacillus* (cerca 377 espécies e 8 subespécies), *Paenibacillus* (cerca de 240 espécies e 4 subespécies), *Alicyclobacillus* (26 espécies e 2 subespécies), *Virgibacillus* (35 espécies), *Halobacillus* (21 espécies), *Geobacillus* (20 espécies e 4 subespécies) e *Brevibacillus* (23) (Fritze, 2004; de Vos *et al.*, 2009; Niall e Halket, 2011; Parte, 2018).

Em razão da excepcional resistência dos esporos maduros, linhagens de Bafes são ubíquas, podendo ser encontradas desde solos de regiões desérticas até a Antártica, com acidez e umidade variadas, ambientes aquáticos de água doce ou salina, dentre outros (Niall e Halket, 2011; Maughan e Van der Auwera, 2011; Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013). A termoresistência, apresentada pelos esporos, é uma propriedade diretamente relacionada com a quantidade de água encontrada dentro do cerne, quanto menor a quantidade de água, maior será a resistência do esporo (Setlow, 2006). Esporos com menores quantidades de dipicolinato de cálcio (DPA-Ca) nuclear tendem a apresentar alto conteúdo de água livre, o que torna essas células mais sensíveis a temperaturas elevadas (Nicholson *et al.*, 2000). Além da água, outros fatores estão associados com a termoresistência, por exemplo, a termoestabilidade intrínseca de proteínas e a presença de íons (Setlow, 2006).

Assim como para os demais membros do filo *Firmicutes*, a solo é o principal reservatório de Bafes, onde observa-se a interação com agentes orgânicos, outros microrganismos, insetos e nematoides. No solo, as diversas espécies de Bafes participam dos ciclos de transformação de matéria e energia, como o ciclo do carbono e nitrogênio e também na promoção do crescimento de plantas (Logan e Halket, 2011).

Espécies de Bafes são essenciais ao funcionamento de diversos ecossistemas sendo que pesquisas que preservem e abordem a diversidade genética são fundamentais para gerar conhecimento básico e, conseqüentemente, aumentar a perspectiva de aplicação destas espécies altamente importantes para a saúde humana, conservação ambiental, sustentabilidade agrícola e desenvolvimento industrial (Niall e Halket, 2011). Empregando metodologia simples (seleção de esporos por choque térmico ou agentes químicos como etanol) e eficiente, as linhagens de Bafes são isoladas de quase todo tipo de ambiente da biosfera (Damgaard, 2000; de Maaragd *et al.*, 2003; Ichimatsu *et al.*, 2004; Logan *et al.*, 2009).

A identificação inicial de espécies Bafes é baseada em morfologias de colônias e células vegetativas, esporângio e esporos maduros; resposta a coloração diferencial de Gram; propriedades fisiológicas e bioquímicas; além de resultados obtidos por diversas técnicas de genética molecular (Fritze, 2004; Onyenwoke *et al.*, 2004; Logan *et al.*, 2009). As Bafes apresentam grande diversidade quanto ao aspecto macroscópico, mas há espécies que compartilham características comuns, por exemplo, o *B. cereus* e *B. thuringiensis*. Em meio complexo, essas duas espécies formam colônias que medem em torno de 2 a 7 mm de diâmetro, se apresentam entre formatos circular irregular, com bordas onduladas ou fimbriadas, geralmente, apresentam textura granulosa e úmidas (Logan *et al.*, 2009; de Vos *et al.*, 2009; Ehling-Schulz *et al.*, 2013). Embora as colônias de *B. cereus* e *B. anthracis* também sejam similares, as da última espécie são, geralmente, menores, não hemolíticas, apresentam pontas mais profusas e são mais firmes em comparação à consistência daquela observadas para *B. cereus* (Logan e de Vos, 2009). Uma diferença marcante entre morfologia de colônias dentro do grupo do *B. cereus* são colônias rizoides de *B. mycoides* e *B. pseudomycoides* (Flugge, 1886; Nakamura, 1998).

A formação do esporo é fundamental para a caracterização e é realizada, inicialmente, por MCF, onde o esporo em formação se apresenta brilhante e de forma regular. A morfologia da célula em diferenciação (esporângio) e do esporo em formação (pré-esporo), assim como a localização, desde cedo constituiu uma propriedade reconhecidamente fácil de ser acessada e que auxilia na diferenciação taxonômica (Logan e de Vos, 2009).

Dois fatores contribuíram para o crescimento rápido do conhecimento sobre o número de espécies de Bafes (Fritze, 2004). Primeiramente, a diversificação e o

aumento na eficiência do processo de isolamento, que repercute melhor a amplitude fisiológica e o requerimento nutricional para o cultivo destes organismos ubíquos. O segundo fator é o desenvolvimento de técnicas cada vez mais sofisticadas para a caracterização e identificação de linhagens bacterianas, em particular, no nível molecular, onde se destaca a análise de sequências de rDNA/rRNA 16S, outros marcadores, além de genomas completos (Fritze, 2004; Galperin *et al.*, 2013).

Um grande número de espécies de Bafes apresentam amplo potencial biotecnológico, podendo ser utilizadas na agricultura, indústria e área médica. Como exemplos de aplicação podemos destacar o *B. subtilis*, espécie produtora de diversas hidrolases, antibióticos, vitaminas e biossurfactantes, além de ser empregada na produção de vacinas, dentre outras (Liu *et al.*, 2013; Eijlander *et al.*, 2014); *Geobacillus stearothermophilus* e *Paenibacillus polymyxa* utilizados como agentes denitrificante em solos (Verbaendert e de Vos, 2011; Márquez *et al.*, 2011); *B. licheniformis*, além de agente denitrificante presente no solo, apresenta uso potencial em estações de tratamento de água (Verbaendert e de Vos, 2011); *B. thuringiensis*, espécie produtora de cristais parasporais tóxicos para diversos invertebrados, sendo utilizado na agricultura e no controle de vetores de doenças infecciosas (Jensen *et al.*, 2003; Ohba, 2009; Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013) e *P. lentimorbus* e *P. popilliae* que apresentam atividade larvicida contra besouros pragas de gramíneas (de Vos *et al.*, 2009). Em adição, o *B. anthracis* é associado a atos de bioterrorismo e armas de guerra (Jensen *et al.*, 2003; Kølsto *et al.*, 2009; Mertens *et al.*, 2014).

1.4- Taxonomia de Bafes

O gênero *Bacillus* e demais gêneros correlatos abrigam uma grande variedade de Bafes. A seguir, temos as características dos principais gêneros onde estão alocadas essas espécies:

a) Gênero *Bacillus*: é altamente heterogêneo e constitui o maior número de espécies de Bafes conhecidas, sendo superior a 300 (Fritze, 2004; Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013; Parte, 2018). O interesse sempre crescente em estudar espécies do gênero é resultante de uma série de características apresentadas por estas bactérias, destacando-se: i) a grande diversidade em tipos fisiológicos; ii) o fato de a maioria dos membros não ser patogênica; iii) alocar células acessíveis à manipulação genética; iv) ser bons excretores de proteínas e outros metabólitos e v) apresentar muitas espécies razoavelmente simples de cultivar tanto em escala laboratorial quanto industrial.

O gênero *Bacillus* é composto por espécies aeróbias ou facultativas, sendo a utilização de oxigênio a principal característica que diferencia este do gênero, altamente relacionado, *Clostridium*, anaeróbio estrito. *Bacillus* spp. são quimio-organotróficos e distribuídas em onze grupos, de acordo com as características ecofisiológicas, bem como pela produção de antibióticos e patogenicidade para insetos, outros invertebrados e animais (Priest *et al.*, 1997; Fritze, 2004; de Vos *et al.*, 2009). Embora essas características formassem a definição de grupo até recentemente, novas espécies descritas no gênero incluem uma espécie anaeróbia estrita, não formadora de endósporos e células em forma de cocos (Logan e Halket, 2011).

Estas espécies de Bafes degradam uma grande variedade de substratos, incluindo proteínas e carboidratos complexos, como celulose, amido, pectina, dentre outros (Priest *et al.*, 1997; Deutscher *et al.*, 2002; Logan e de Vos, 2009). A elevada variedade de enzimas extracelulares solúveis produzidas pela maioria das espécies do gênero, também, refletem a diversidade de *habitat* destes organismos. Espécies de *Bacillus* têm sido utilizadas há décadas, e com alto índice de sucesso, como biossímios, inseticidas naturais, probióticos, nas indústrias de enzimas, antibióticos, vitaminas e alimentos, além de serem exploradas como produtoras de veículos para drogas, antígenos vacinais e de outras moléculas imunomoduladoras (

Bravo *et al.*, 2011; Oliveira-Nascimento *et al.*, 2012; Eijlander *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2015).

b) Gênero *Paenibacillus*: dentro do gênero encontra-se mais de 200 espécies de Bafes em forma de bastonetes aeróbios ou facultativos, que produzem esporos elípticos (de Vos *et al.*, 2009; Galperin, 2013; Parte, 2018). Quando coradas pela técnica de Gram reagem fracamente, e mesmo as colônias jovens podem apresentar-se como células Gram negativas, apesar de terem estrutura de parede celular típica de uma espécie Gram positiva (Shida *et al.*, 1996). São microrganismos móveis, não produzem pigmentos, secretam uma variedade de enzimas extracelulares, algumas espécies produzem polissacarídeos e compostos antimicrobianos como a polimixina, octopitina e antifúngicos (Shida *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 2002). O principal representante do gênero é o *P. azotofixans* isolado de solos e raízes de cana-de-açúcar, trigo e outras gramíneas. A principal característica dessa espécie está relacionada à sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio superior às outras espécies (Rosado *et al.*, 1996; Neves & Rumjanek, 1998).

c) Gênero *Geobacillus*: apresenta cerca de 20 espécies de Bafes aeróbias ou facultativas que crescem como células isoladas ou em pequenas cadeias, e quando móveis, apresentam flagelos peritríquios (Nazina *et al.*, 2004). A estrutura da parede celular é Gram positiva, mas a reação à coloração pode variar entre positiva e negativa (Gram variável). Apresentam esporos elipsoidais de localização subterminal a terminal. O crescimento ocorre entre 30 a 80 °C, com temperatura ótima entre 50-60 °C, sendo, portanto, termófilos. A faixa de pH se estende entre 5 e 9, com crescimento ótimo entre pH 6,2 e 7,5. Vitaminas, NaCl e KCl não são exigidos como fatores de crescimento pela maioria das espécies. O percentual de bases G+C das espécies varia de 48,4 a 54,5% e a espécie tipo é *Geobacillus stearothermophilus* (Nazina *et al.*, 2004; Banat *et al.*, 2011).

d) Gênero *Brevibacillus*: os membros do gênero *Brevibacillus* são aeróbios estritos, Gram positivos ou Gram variáveis, apresentam motilidade por flagelos peritríquios e apresentam conteúdo G+C entre 42,8-57,4%. Espécies do gênero são utilizadas na agricultura como agentes de controle biológico (de Oliveira *et al.*, 2004) e também como microrganismos desnitrificantes (Baek *et al.*, 2006). Um dos principais representantes do gênero é o *B. laterosporus*, uma espécie que se caracteriza pela capacidade de produzir uma inclusão parasporal lamelar em forma de canoa adjacente ao esporo, resultando na deformação do esporângio. Algumas

linhagens produzem inclusões parasporais de várias formas e tamanhos, que são liberadas separadamente do esporo depois da lise do esporângio. O *B. laterosporus* é usado como um agente de controle biológico, demonstrando um espectro amplo de atividades biológicas (Shida *et al.*, 1996; de Oliveira *et al.*, 2004). A atividade entomopatogênica é ampla e inclui as ordens *Coleoptera*, *Lepidoptera* e *Diptera*, além das ordens *Nematoda* e *Mollusca* (Ruiu *et al.*, 2013).

e) Gênero *Lysinibacillus*: os membros do gênero são em maioria móveis, produzem endósporos elipsoidais ou esféricos em posição terminal e deformam o esporângio. São catalase e indol positivos e produzem H₂S. Apresentam lisina e ácido aspártico como constituintes da parede celular, característica esta que levou à diferenciação do grupo. São comumente encontrados no solo (Ahmed *et al.*, 2007), tendo sido isolados a partir de tecidos de plantas (Melnick *et al.*, 2011), produtos derivados da fermentação de sementes (Parkouda *et al.*, 2010) e, até mesmo, de amostras de fígado do peixe baiacu (Wang *et al.*, 2010). A espécie tipo é o *L. boronitoleterans*, que além das características descritas para o gênero, apresenta células medindo de 3,0-5,0 µm de comprimento, colônias circulares com margens inteiras, de elevação plana e coloração opaca. A temperatura ótima de crescimento é 37 °C, em pH 7,5 (Ahmed *et al.*, 2007).

f) Gênero *Alicyclobacillus*: assim como as demais Bafes, os membros do gênero *Alicyclobacillus* são microrganismos que podem ser isolados de uma grande variedade de *habitat* e substratos geotérmicos (fontes termais, riachos quentes e fontes quentes submarinas) ou não (solos, esterco, superfície de frutas e bebidas ácidas) (Eguchi *et al.*, 1999). As células do gênero *Alicyclobacillus* são aeróbias estritas em forma de bastonetes que medem de 0,3 a 0,8 µm de largura e 2,0 a 4,5 µm de comprimento, sendo Gram positivas ou variável, acidotermofílicas e não patogênicas. *Alicyclobacillus spp.* crescem em faixas de temperaturas entre 20 a 70 °C, com ótimo de 42 a 60 °C e pH entre 2,5 e 6,0 (Wisotzkey *et al.*, 1992). O grupo apresenta como componente predominante da membrana citoplasmática ácidos graxos ω-alicíclicos, característica esta que deu nome ao gênero (Pontius *et al.*, 1998; Kannenberg *et al.*, 1984; Oshima e Ariga, 1975). Acredita-se que este padrão de ácidos graxos esteja diretamente relacionado com a resistência excepcional de *Alicyclobacillus spp.* às condições de acidez e alta temperatura. A espécie mais estudada é o *A. acidoterrestris*, que apresenta esporos ovais, subterminais ou terminais, podendo deformar o esporângio, células vegetativas flageladas, colônias

circulares com pigmentação branco-amarelada, temperatura ótima de crescimento de 42 a 53 °C, pH entre 2,2 a 5,8 e conteúdo de G+C de 51,6 a 53,3 mol (Deinhard *et al.*, 1987; Chang e Kang, 2004).

g) Gênero *Virgibacillus*: os integrantes do gênero são facultativos em maioria, móveis, Gram positivos com 0,3-0,7 × 2,6 µm (Heyndrickx *et al.*, 1998). Apresentam endósporo oval/elipsoidal que deformam o esporângio e as colônias são pequenas, circulares, convexas e com tonalidade variando de ligeiramente transparente ao opaco. O crescimento pode ocorrer entre 15 e 50 °C, com um ótimo de 28 a 37 °C. São catalase positivos e apresentam como requisito nutricional o ácido pantotênico, tiamina, biotina e aminoácidos. O teor de G+C é de 36-43 molar, a espécie tipo é *V. pantothenicus*.

h) Gênero *Halobacillus*: os membros do gênero são aeróbios estritos, halófilos moderados, móveis e quimiorganotróficos (catalase e oxidase positivas, redução de nitrato a nitrito negativa e reação de Voges-Proskauer negativa) e as colônias formam um pigmento laranja (Spring *et al.*, 1996). Espécies do gênero apresentam a habilidade de produzir endósporos elipsoidais ou esféricos na posição central ou subterminal, como a capacidade de resistir ao aquecimento a 75 °C por até 10 minutos. Uma das principais características do gênero é a parede celular constituída por um tipo especial de peptidoglicano de ornitina e asparagina (L-Orn–D-Asp), que difere do peptidoglicano dos demais gêneros relacionados, que é formado pelo ácido meso-diaminopimélico (Dapi) ou L-lisina (L-Lys) (Shida *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 2003; Spring *et al.*, 1996). O conteúdo de G+C varia entre 40-43 mol. A espécie tipo é o *H. halophilus* (Spring *et al.*, 1996), anteriormente conhecido como *Sporosarcina halophila*, que foi isolada de um pântano de sal na costa do Mar do Norte na Alemanha (Claus *et al.*, 1983). A característica mais marcante da espécie é o fato de que tanto o crescimento das células vegetativas quanto a germinação dos esporos serem estritamente dependentes de cloreto (Roeßler e Muller, 1998; Roeßler *et al.*, 2000).

1.5 – Caracterização Polifásica

Os termos Taxonomia e Sistemática têm sido frequentemente usados de forma intercambiável, mas os dois diferem em significado (Gevers *et al.*, 2005; Amann *et al.*, 1995). Enquanto a Taxonomia é a teoria e a prática, ou Ciência da identificação, classificação e nomenclatura, a Sistemática refere-se ao estudo da diversidade de organismos e as respectivas relações entre esses, incluindo a evolucionária (filogenia) e todas as possíveis interações biológicas (Mayr e Ashlock, 1991).

As técnicas que prevaleciam há alguns séculos não eram suficientes para fornecer um esboço completo sobre o qual a Taxonomia bacteriana poderia se basear. A maioria das descrições baseava-se unicamente em características fenotípicas, como forma, cor, tamanho, propriedades de coloração, mobilidade, gama de hospedeiros, patogenicidade e assimilação de fontes de carbono (Clarridge, 2004; Woese, 1987). Houve, no entanto, a necessidade de uma abordagem mais abrangente para fornecer informações convincentes para derivar linhagens bacterianas.

A primeira tentativa de classificação microbiana baseada em DNA de fita simples foi feita por Schildkraut e colaboradores em 1961 (Schildkraut *et al.*, 1961). Este foi um grande avanço no mundo da classificação microbiana, pavimentando o caminho para o desenvolvimento do sistema polifásico de classificação em sua forma atual. A abordagem polifásica é uma tendência recente na taxonomia microbiana, que fornece um sistema natural e autêntico de classificação de microrganismos (Colwell, 1970; Prakash *et al.*, 2007). O termo cunhado por Colwell em 1970 refere-se à integração de informações genotípicas, quimiotáticas e fenotípicas de um microrganismo para realizar um agrupamento confiável do organismo.

A abordagem polifásica é usada para distinguir espécies bacterianas com base em dados morfológicos e bioquímicos suplementados com informações obtidas de técnicas moleculares (Colwell, 1970). Avanços na abordagem polifásica para a classificação bacteriana, como o sequenciamento de genes de rRNA 16S (Clarridge, 2004) e técnicas de Biologia Molecular tornaram-se ferramentas importantes para a Taxonomia e Sistemática microbianas (Prakash *et al.*, 2007).

Todo conjunto de informação de uma da espécie pode ser incorporado ao processo de classificação polifásica (Vandamme *et al.*, 1996). Um número variado de critérios que incluem características genotípicas, quimiotípicas e fenotípicas usadas para caracterização polifásica de bactérias (Figura 5).

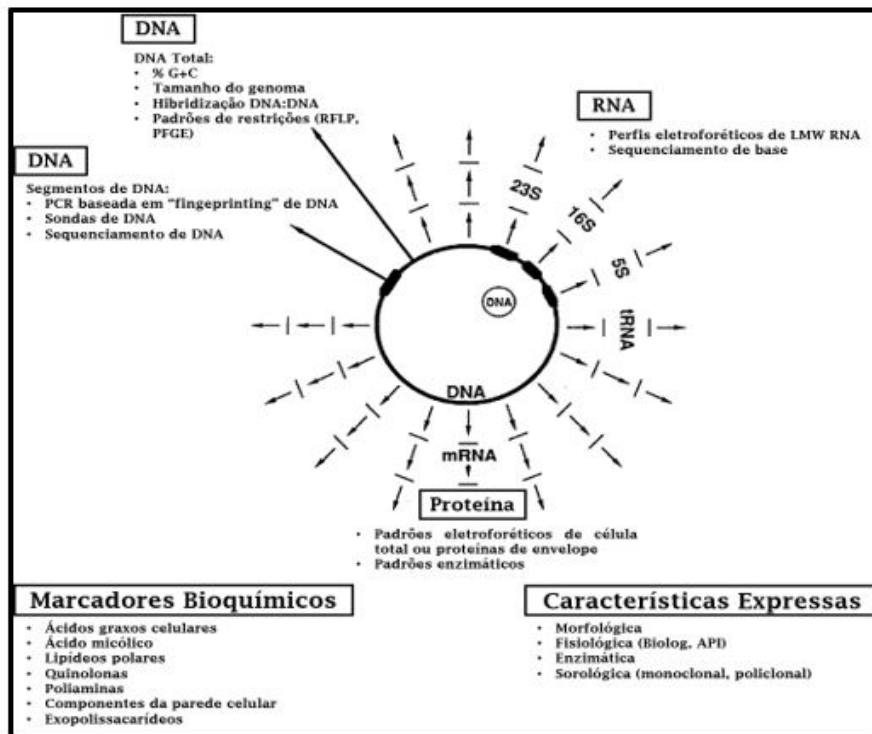


Figura 5. Visão esquemática dos vários componentes celulares e técnicas utilizadas no processo de caracterização polifásica. Os termos representados por abreviaturas são do inglês: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*); PFGE (*Pulsed-field Gel Electrophoresis*) ARDRA (*Amplified rDNA Restriction Analysis*); RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e LMW (*Low Molecular Weight*), respectivamente. Adaptado de Vandamme *et al.*, 1996.

A caracterização polifásica de Bafes segue os padrões mínimos propostos por Logan *et al.*, (2009) com base em normas estabelecidas pelo *Subcommittee on the Taxonomy of the Genus Bacillus and Related Organisms*, integrante do *International Committee on Systematics of Prokaryotes* e publicações como a *Recommendation 30b of the Bacteriological Code*. O resumo das normas para a descrição de novas taxa de Bafes encontram-se no Quadro 1.

Na caracterização de Bafes, descrições detalhadas sobre o procedimento adotado para induzir a esporulação; ocorrência de deformação do esporângio; posição do endósporo (central, subterminal ou terminal); formato do esporo (cilíndrico, esférico e elíptico) e presença de corpos parasporais, são indispensáveis (Figura 6). Todos os dados devem ser bem documentados assim como todos os

protocolos utilizados durante o processo de caracterização, visto que toda pesquisa deve apresentar a capacidade de ser reproduzível (Logan *et al.*, 2009).

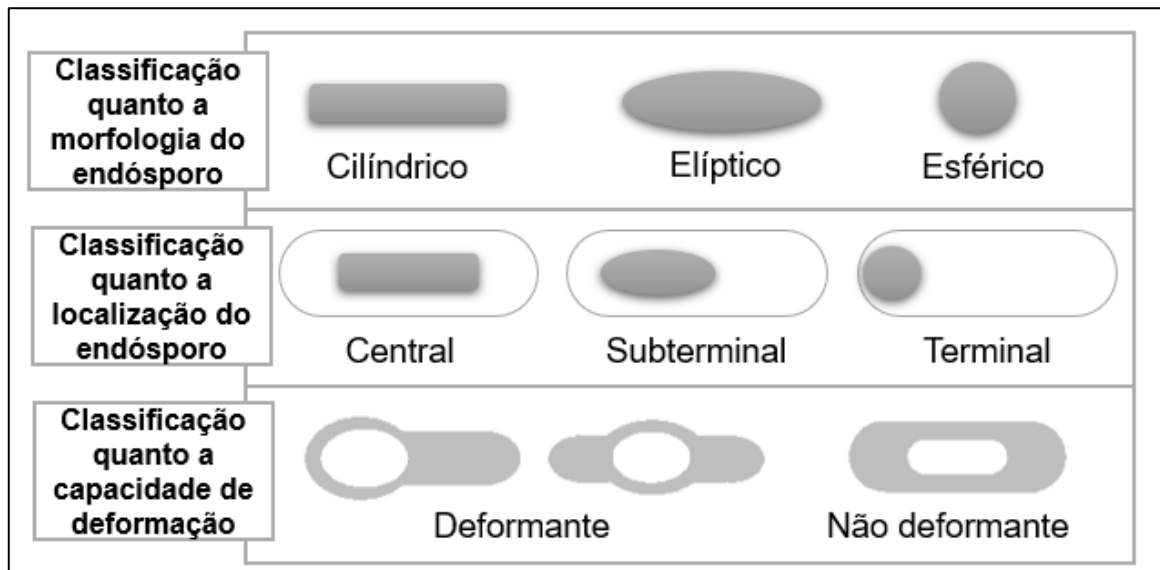


Figura 6. Observação microscópica de Bafes. Classificação quanto a morfologia do endósporo ou esporo livre; classificação quanto a localização do endósporo no esporângio e a classificação quanto a capacidade do endósporo em deformar ou não o esporângio. Adaptado de Rabinovitch e Oliveira, 2015; e <https://pt.wikipedia.org/wiki/End%C3%B3sporo>.

É importante ressaltar que antes do advento da Biologia Molecular, a taxonomia bacteriana era baseada unicamente em estudos comparativos de características fenotípicas e esta prática é diretamente ligada ao cultivo de culturas puras em laboratórios (Coenye *et al.*, 2007; Mora e Amann, 2001; Vandamme *et al.*, 1996). As características fenotípicas bacterianas clássicas estão relacionadas à morfologia, fisiologia e as características bioquímicas (Coenye *et al.*, 2007). Quanto à morfologia da célula bacteriana, destacam-se dados como a forma, produção e características do endósporo, motilidade, inclusões citoplasmáticas, composição da parede celular (resposta à coloração de Gram e ao teste de viscosidade). Quanto ao aspecto macroscópico, a cor da colônia, forma e dimensões. As características fisiológicas e bioquímicas incluem dados sobre crescimento em diferentes faixas de temperaturas, pH e concentrações de NaCl, ou presença de substâncias variadas, atividades enzimáticas e fatores de virulência (On e Holmes, 1991).

Uma das principais desvantagens dos métodos fenotípicos é a natureza condicional da expressão gênica, em que o mesmo organismo pode apresentar caracteres fenotípicos diferentes de acordo com as variações das condições ambientais. Portanto, a identificação fenotípica tradicional é complexa e lenta. Além disso, quando métodos fenotípicos são utilizados na identificação bacteriana, a

interpretação dos resultados envolve julgamento subjetivo, havendo assim a necessidade de uma padronização constante desses testes (Stager e Davis, 1992).

Quadro I. Padrões mínimos para a caracterização e identificação de Bafes

CARACTERÍSTICA MICROSCÓPICA
Tamanho das células (comprimento e largura), a forma global, forma das extremidades das células
Resposta da cultura jovem ao Gram
A presença de inclusões de armazenamento; presença de corpos parasporais e outras inclusões
Morfologia do esporângio; deformação do esporângio e motilidade
Forma dos esporos e a posição
Fotomicrografia do esporângio
O meio de crescimento usado
Condições de cultivo (temperatura, pH, salinidade, tempo de incubação)
Diâmetro das colônias após determinado período de incubação
Morfologia colonial, elevação, menção de qualquer tendência a espalhar ou motilidade colonial, morfologia das bordas, textura da superfície, cor, consistência e a menção de qualquer tendência a aderir ao meio de cultura
CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS
Meio de cultivo recomendado; pH ótimo para crescimento (máximo e mínimo)
Temperaturas ótimas de crescimento (máximas e mínimas)
Necessidades de oxigênio
Tolerância ou exigência de NaCl (concentração mínima, ótima e máxima)
Catalase, oxidase e qualquer necessidade nutricional especial conhecida
CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS
Produção de ácido a partir de l-arabinose, d-manitol, d-xilose e outros hidratos de carbono específicos; reação de voges-proskauer
Hidrólise de caseína, amido e gelatina; hidrólise de esculina e ureia; redução de nitrato, e redução de nitrato ou nitrito a óxido nitroso e arginina-deidrolase
Utilização de citrato; utilização de propionato e outros ácidos orgânicos como única fonte de carbono; utilização de aminoácidos como únicas fontes de carbono; utilização de hidratos de carbono como únicas fontes de carbono; produção de lecitinase; produção de indol a partir de triptofano.
ESTUDO DE ÁCIDO NUCLÉICO
Sequência de genes rRNA 16S e análises filogenéticas baseada nesse e/ou outros em genes constitutivos (<i>housekeeping genes</i>) e a relação molecular DNA-DNA em espécies estreitamente relacionadas.

Fonte: Logan *et al.*, 2009.

1.6 – Caracterização fisiológica e bioquímica

Uma variedade de técnicas pode ser utilizada para avaliar a ecologia bacteriana em diferentes substratos (solo, água e outros). Para a caracterização bacteriana, as técnicas comuns são métodos baseados em cultura e caracterização bioquímica (Keinanen *et al.*, 2004). As características fisiológicas e bioquímicas incluem dados sobre o crescimento em diferentes temperaturas, valores de pH, concentrações de sal, condições atmosféricas (aeróbico/anaeróbico), crescimento na presença de várias substâncias, como agentes antimicrobianos, e dados sobre a presença ou atividade de várias enzimas, metabolização de compostos, e assim por diante (Tindall *et al.*, 2010; Hussain *et al.*, 2013)

As características fisiológicas e bioquímicas estão diretamente relacionadas à atividade de enzimas microbianas e proteínas reguladoras (Xu *et al.*, 2004; Tindall *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2016). Enzimas e proteínas são produtos genéticos; assim, a comparação das características fisiológicas e bioquímicas é a comparação indireta do genoma, e a determinação dessas características é muito mais fácil do que a análise direta do genoma (Li *et al.*, 2016). Exames de morfologia, fisiologia e propriedades bioquímicas são as ferramentas mais antigas para a caracterização e classificação de procariontes (Tindall *et al.*, 2010), mas ainda podem ser consideradas como ferramentas com valor significativo (Xu *et al.*, 2004).

Além de uma completa caracterização fenotípica de uma nova espécie, é importante determinar quais características fenotípicas são as mais úteis para sua identificação. Além disso, os métodos específicos usados para caracterizar um organismo devem sempre ser descritos e padronizados, uma vez que os resultados dos testes fenotípicos podem variar com a metodologia (Li *et al.*, 2016). Vale ressaltar que todas as características relevantes devem ser listadas (Tindall *et al.*, 2010). A inclusão de controles positivos e negativos adequados devem ser enfatizados, particularmente quando as condições de teste diferem daquelas documentadas em trabalhos de referência (Christensen *et al.*, 2001; Felis e Dellaglio, 2007).

As provas de identificação bioquímica estão fundamentadas, principalmente:

- a) na pesquisa de enzimas estruturais, importantes no metabolismo do microrganismo (fenilalanina desaminase, catalase, descarboxilases, citocromo C

oxidase); b) na pesquisa de produtos metabólicos e catabólicos (acetoína, indol, ácidos orgânicos) e na sensibilidade a diferentes compostos (bacitracina, optoquina, novobiocina) (Trabulsi e Altherthum, 2008).

A identificação bioquímica fornece uma ideia do que esses microrganismos são capazes de fazer, sendo possível a discriminação de diferentes linhagens da mesma espécie por perfis bioquímicos específicos, já que muitas linhagens de uma mesma espécie não compartilham todas as mesmas características bioquímicas. As diferenças nas atividades enzimáticas concretas nos dizem sobre a ecologia, a fisiologia ou o habitat natural do microrganismo.

Testes fisiológicos e bioquímicos devem ser realizados em meios de teste e sob condições que sejam identicamente padronizadas ou pelo menos comparáveis (Stucliffe *et al.*, 2012). Deve-se notar que novos *táxons* devem ser descritos com base nas características de mais de uma cepa relacionada e na cepa tipo das espécies-tipo dos gêneros apropriados (Tindall *et al.*, 2010). Deve-se enfatizar que alguns fenótipos são codificados por fatores de herança extracromossômica e que os fatores de influência que afetam a expressão de características fisiológicas e bioquímicas são complicados (Li *et al.*, 2016).

Portanto, para determinar as relações genéticas baseadas em características fisiológicas e bioquímicas, a classificação sistemática deve ser integrada com outras características, particularmente a análise das características genotípicas (Li *et al.*, 2016). As características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas devem ser cuidadosamente avaliadas para determinar aquelas que são comuns (ou mesmo únicas) de determinado *táxon*, ou quando essas características são variáveis, podem indicar subgrupos dentro de um mesmo *táxon* (Tindall *et al.*, 2010).

1.7 – Caracterização fenotípica por espectrometria de massas

A espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz com análise de tempo de voo, ou do inglês *Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) é um método rápido, preciso e econômico de caracterização e identificação microbiana (Emonet *et al.*, 2010; Croxatto *et al.*, 2012). Esta tecnologia gera impressões digitais espectrais de massas moleculares características, que são assinaturas únicas para cada microrganismo e são, portanto, utilizadas para identificação microbiana.

Historicamente a identificação de microrganismos é realizada, principalmente, pela análise de reações bioquímicas e outras características fenotípicas, como o crescimento em diferentes meios, morfologia de colônias e coloração de Gram (Bizzini *et al.*, 2011; Croxatto *et al.*, 2012). Quando combinadas, essas técnicas laboratoriais de rotina possibilitam a identificação dos microrganismos, porém são de alto custo, exigem muito tempo para execução e, em alguns casos, a disponibilidade de técnicos bem treinados para uma interpretação correta (Croxatto *et al.*, 2012). Uma das maiores vantagens do uso da tecnologia MALDI-TOF MS para identificação bacteriana é o curto tempo de execução e obtenção de resultados, que pode ser reduzido de 24 a 48 horas para menos de uma hora, quando comparados aos demais testes fenotípicos (Bizzini *et al.*, 2011).

A espectrometria de massas (MS) tem sido usada há várias décadas em abordagens químicas, mas foi em 1975 que Anhalt e Fenselau (Anhalt e Fenselau, 1975) propuseram pela primeira vez que a caracterização bacteriana poderia ser alcançada usando esta técnica. Esses autores notaram que espectros de massa únicos foram produzidos a partir de extratos bacterianos de diferentes gêneros e espécies. Desde então, a técnica MALDI-TOF MS tem sido usada para caracterizar uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus (Giebel *et al.*, 2010). A capacidade em caracterizar/identificar rapidamente microrganismos favorece as aplicações em múltiplas áreas, incluindo diagnósticos médicos, biodefesa, monitoramento ambiental e controle de qualidade de alimentos (Croxatto *et al.*, 2012).

Um espectrômetro de massa é composto de três unidades funcionais: i) uma fonte para ionizar e transferir as moléculas ionizadas para uma fase gasosa; ii) um

analisador de massa que separa os íons de acordo com sua relação massa-carga (m/z) e iii) um dispositivo de detecção para monitorar íons separados (Croxatto *et al.*, 2012). O método de ionização é determinado de acordo com a natureza da amostra e o objetivo da análise de MS (Emonet *et al.*, 2010). No geral, o desempenho esperado de um analisador de massa depende do tipo de amostra a ser analisada (misturas complexas/ simples, proteínas, peptídeos, lipídios e polissacarídeos) e o objetivo final da análise (quantificação, identificação de proteínas, identificação de microrganismos, e biotipagem).

Na análise MALDI, as amostras são preparadas misturando-as a uma matriz que resulta na cristalização da amostra dentro da matriz. A matriz é composta de pequenas moléculas de ácido que possuem uma forte absorção óptica na faixa do comprimento de onda do laser utilizado. A composição da matriz varia de acordo com a biomolécula a ser analisada e o tipo de laser utilizado (Fenselau & Demirev, 2001). Com maior frequência, os compostos utilizados como matrizes são o ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (DHB), o ácido α -ciano-4 hidroxicinâmico (CHCA), o ácido sinapínico (SA) e o ácido ferúlico (FA). Vale ressaltar que FA, SA e CHCA demonstraram ser mais eficazes para a detecção de biomarcadores de proteínas (Fenselau & Demirev, 2001; Vaidyanathan *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2003), enquanto que o DHB parece ser a melhor escolha para a detecção de glicopeptídeos e glicoproteínas (Giebel *et al.*, 2010). O tamanho e as intensidades dos picos das moléculas detectadas dependem da matriz selecionada para o experimento. DHB e CHCA são geralmente ótimos para a detecção de íons de menor massa (Hathout *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2003; Ruelle *et al.*, 2004), apresentando resolução para detectar moléculas com até 10 kDa, quando o solvente adequado é usado. Por sua vez, SA e FA demonstram melhor eficiência quando usados para a detecção de íons de massa superior (acima de 15 kDa) (Madonna *et al.*, 2000; Conway *et al.*, 2001; Ruelle *et al.*, 2004; Vargha *et al.*, 2006). Entretanto, fornecem uma sensibilidade mais baixa que o CHCA (Wang *et al.*, 1998; Ruelle *et al.*, 2004).

Na prática, uma amostra microbiana é misturada a uma matriz em uma placa de metal condutora. A mistura pode ser depositada no suporte de metal ou, alternativamente, a amostra microbiana é depositada e seca no suporte antes da adição da matriz. Após a cristalização da mistura matriz e do composto, o alvo na placa de metal é introduzido no espectrômetro de massa, onde é bombardeado com

breves pulsos a partir de um laser de nitrogênio (Figura 7). A matriz absorve energia do laser, levando à dessorção dos analitos, que são vaporizados e ionizados na fase gasosa. Essa dessorção assistida por matriz e ionização dos analitos leva à formação de íons de amostra predominantemente carregados individualmente. As moléculas dessorvidas e ionizadas são primeiro aceleradas através de um campo eletrostático e, depois, são então ejetadas através de um tubo de metal que é submetido a um vácuo até que elas atinjam um detector. Nesta condição, os íons menores viajam mais rápido que os íons maiores. O *time of flight* ou tempo de voo (TOF) necessário para atingir o detector é dependente da massa (m) e carga (z) do bioanalito e é proporcional à raiz quadrada de m/z . Assim, os bioanalitos com diferentes razões m/z que compõem uma amostra complexa são separados de acordo com o TOF e criam um espectro de massa que é caracterizado tanto pela razão m/z , quanto pela intensidade dos íons, que é o número de íons de uma determinada m/z que atingiu o detector. Os resultados de uma assinatura espectral são compostos por picos que variam geralmente de 1000 a 20.000 m/z . Normalmente, MALDI produz íons de carga simples ($z = 1$) e, assim, a m/z de um analito corresponde ao valor de respectiva massa (Croxatto *et al.*, 2012).

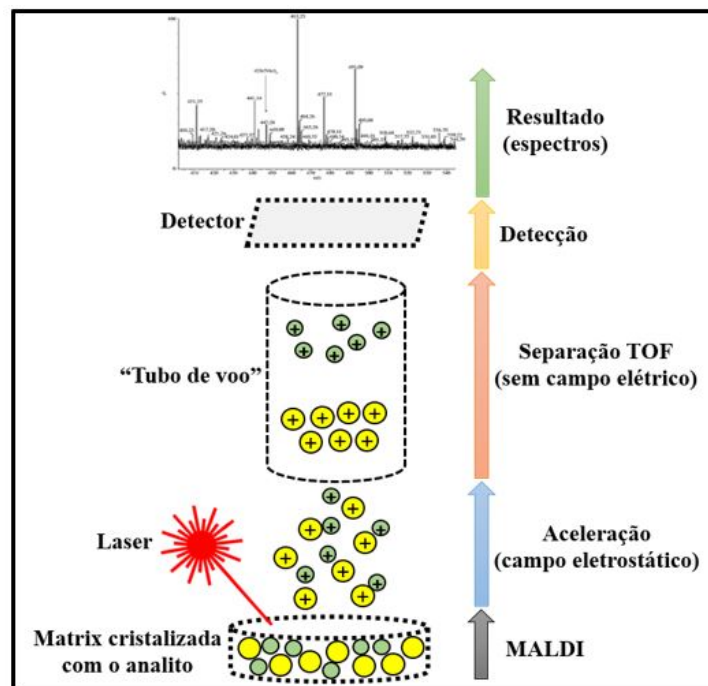


Figura 7. Princípio da técnica de espectrometria de massas por MALDI-TOF. A amostra é misturada com uma matriz sobre uma placa de metal condutora. Depois da cristalização da mistura, a placa é introduzida no espectrômetro de massa e bombardeada com breves pulsos de laser. As moléculas dessorvidas e ionizadas são aceleradas através de um campo eletrostático e ejetadas por meio de um tubo de voo até atingirem um detector, onde são gerados os espectros de massa. Adaptado de Croxatto *et al.*, (2012).

Os microrganismos intactos podem ser analisados diretamente por MALDI-TOF sem pré-tratamento adicional, pois a maioria das células vegetativas bacterianas pode ser lisadas após a exposição a água, solvente orgânico e/ou ácido forte presente na matriz. Enquanto isto, os microrganismos resistentes, como alguns vírus, esporos bacterianos e células de levedura, devem ser analisados utilizando ácidos orgânicos fortes e/ou álcoois adicionados em etapas de pré-tratamento. Da mesma forma, para algumas espécies bacterianas (como *Actinomyces* spp.), procedimentos específicos de pré-tratamento ou extração de proteínas podem ser úteis (Bizzini *et al.*, 2011).

Dentre as proteínas detectadas por MALDI-TOF MS, as mais abundantes, representando grande parte das proteínas identificadas, são as ribossômicas (Arnold *et al.*, 1999; Ryzhov e Fenselau, 2001). Esta é uma característica bioquímica favorável para a ionização eficiente durante o processo (Krause *et al.*, 1999). Assim, a abundância (mais de 20% do total de proteínas celulares) e a natureza básica das proteínas ribossomais, explicam porque a maioria dos picos detectados em um espectro correspondem a proteínas ribossômicas. Além disso, a lise de células bacterianas em solventes orgânicos e em condições ácidas, que favorecem a extração de proteínas ribossômicas, combinadas com a utilização de uma matriz específica, permitiu o desenvolvimento de um método que leva à ionização de proteínas, principalmente ribossômicas (Suh e Limbach, 2004). Assim, a maioria dos espectros de MALDI-TOF MS são compostos de proteínas muito conservadas, com funções constitutivas, cuja síntese é pouco afetada pelas condições ambientais e, portanto, consideradas ideais para a identificação rotineira de bactérias.

A reprodutibilidade do espectro MALDI-TOF MS é problemática, já que grandes variações podem ser vistas nos espectros das mesmas espécies bacterianas obtidas em diferentes condições. Muitos parâmetros experimentais podem ter um efeito importante nos espectros de massa observados (Wang *et al.*, 1998). A reprodutibilidade é dependente do instrumento, da matriz utilizada, da fase de crescimento do microrganismo, razão amostra/matriz, concentração da amostra, do meio de cultura e das condições de crescimento (Valentine *et al.*, 2005).

Dois métodos gerais foram propostos para caracterizar microrganismos utilizando o MALDI-TOF MS: i) comparação de espectros de massa com banco de dados de impressões digitais e ii) combinação de massas de biomarcadores com um

banco de dados de proteoma (Carbonnelle *et al.*, 2007; Demirev *et al.*, 1999). Na primeira abordagem, os espectros únicos gerados são comparados com bibliotecas de impressões digitais previamente coletadas que estão disponíveis comercialmente. Esta abordagem é conveniente para desenvolver bancos de dados específicos constituídos de picos únicos e conservados que podem ser usados para identificação de espécies e subespécies, independentemente das condições de cultura utilizadas para o crescimento do microrganismo (Carbonnelle *et al.*, 2007).

Na segunda abordagem, as massas de biomarcadores associadas a um microrganismo desconhecido são identificadas pela combinação de massas moleculares de proteínas, obtidas pelo o espectro e após a tradução *in silico* dos genes correspondentes anotados de genomas sequenciados (Demirev *et al.*, 1999). No entanto, esta aplicação é limitada a microrganismos com genomas disponíveis, sendo necessário um maior desenvolvimento nas estratégias de organização do banco de dados do proteoma. A vantagem de tal abordagem baseada em bioinformática comparada com a impressão digital bacteriana é que a identificação tolera variações nos perfis de proteína e, portanto, diferenças no crescimento da cultura e nas condições de tratamento da amostra.

Muitas das identificações bacterianas que podem ser realizadas somente a nível de gênero devem-se a espectros de referência incompletos que cobrem muitos isolados ou espécies diferentes de um determinado gênero. Por exemplo, apenas um espectro de referência de *Propionibacterium acnes* (cepa DSM 1897) ou *B. cereus* é incluído no banco de dados da empresa Bruker (Alemanha). Estes dados são totalmente insuficientes para cobrir a verdadeira diversidade dessas espécies de bactérias e, assim, identificar com precisão esses microrganismos (Bizzini *et al.*, 2010). Além disso, a identificação errônea de espécies bacterianas no banco de dados pode causar erros de identificação por MALDI-TOF MS (Seng *et al.*, 2009; Bizzini *et al.*, 2010; Croxatto *et al.*, 2012).

1.8- Coleções biológicas e microbiológicas

A evolução da pesquisa e da indústria biotecnológica é dependente de certas condições de infraestrutura. Entre as condições essenciais para a competitividade neste campo do conhecimento, encontra-se a valorização das coleções biológicas – viáveis e não viáveis (Yoshida *et al.*, 2005). As coleções incluem organismos vivos, células, genes, e toda informação relacionada a esses recursos (Sharma e Shouche, 2014; Yoshida *et al.*, 2005). Os estudos de genômica e proteômica aproveitam-se de recursos biológicos para melhorar o desenvolvimento de fármacos, o combate às pragas da agricultura, entre outras finalidades (Yoshida *et al.*, 2005).

As coleções biológicas existentes nas instituições de ensino e pesquisa do Brasil formam um patrimônio de informação e conhecimento de mais de 180 anos de pesquisa sobre a fauna, flora e microbiota brasileiras (Egler, 2005). Esses acervos biológicos têm crescente importância científica, econômica e educacional, além de grande potencial para apoiar a elaboração de políticas públicas voltadas ao uso sustentável de recursos naturais.

Reconhece-se que os microrganismos podem fornecer soluções para problemas mundiais em saúde pública, alimentação, meio ambiente e pobreza (Pointing e Hyde, 2001; Sugawara *et al.*, 1999; Wrigley *et al.*, 2000). Os microrganismos são importantes nos ecossistemas, decompondo os restos complexos de animais e plantas no solo, formando relações mutualísticas benéficas com várias plantas (rizóbios fixadores de nitrogênio com leguminosas e micorrizas com árvores da floresta), além da sua utilização em benefício da saúde humana (produzindo drogas valiosas, usados como agentes de controle biológico de pragas e patógenos, na desintoxicação e desagregação de resíduos) (Sette, 2005; Smith, 2003). Sendo assim, é crucial que a diversidade microbiana do planeta não seja perdida e que seja identificada, caracterizada e explorada de forma sustentável para o benefício da humanidade, das demais espécies e do meio ambiente (Smith, 2003).

Coleções de culturas de microrganismos são centros de conservação de recursos genéticos *ex situ*, que têm como função principal aquisição, caracterização, manutenção e distribuição de microrganismos e células autenticadas e reagentes biológicos certificados (Canhos, 2005). Estas coleções *ex situ* atuam também como provedores de serviços especializados e centros de informação. Os diferentes tipos de coleções de culturas, incluindo coleções de trabalho, coleções institucionais e

principalmente as coleções de serviço, têm uma importância destacada na conservação e exploração da diversidade genética e metabólica. O material biológico autenticado destas coleções é matéria-prima para produtos e processos biotecnológicos (Canhos, 2005; Smith, 2003).

As primeiras coleções de culturas surgiram a partir das necessidades dos próprios pesquisadores da época em manter amostras. Posteriormente, essas coleções foram crescendo em razão da incorporação de linhagens de outros pesquisadores. Atualmente, existem coleções importantes localizadas no mundo inteiro, as quais atuam como centros de excelência em conservação *ex situ* e oferecem serviços fundamentais para a comunidade científica e tecnológica industrial do país, como é o caso da ATCC (*American Type Culture Collection*, Estados Unidos da América), DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, Alemanha), JCM (*Japan Collection of Microorganisms*, Japão), BCCM (*Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms*, Bélgica), entre outras (Sette, 2005).

Das instituições brasileiras, são exemplos bem-sucedidos a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), o Centro Brasileiro de Estocagem de Genes (BCCCenter), a Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) e o Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Instituto Biológico de São Paulo (Canhos e Vazoller, 2004).

1.9 – Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos

A importância de estudos básicos da diversidade e potencialidades biotecnológicas de Bafes motivou o isolamento, a identificação e preservação de linhagens de solo do DF com diferentes características fenotípicas, genotípicas e filogenéticas. A Coleção de Bafes (CBafes), da UnB/IB/Departamento de Biologia Celular, está localizada no Laboratório de Microbiologia/LaBafes é especializada em linhagens de interesse científico e com potencial tecnológico para os setores médicos (humano e veterinário) agropecuário, ambiental e industrial. Até a realização deste trabalho, a Coleção dispunha de um acervo catalogado com 190 amostras, sendo 154 linhagens selvagens, isoladas do solo do DF (SDF) e designadas SDF0001-SDF0154.

As 154 linhagens SDF foram selecionadas por choque térmico a 80 °C, e estão sendo inspecionadas por uma abordagem polifásica. Os métodos microbiológicos clássicos e moleculares, incluem análises filogenética (rDNA 16S); filoproteômica (espectrometria de massa MALDI-TOF MS), perfil plasmidial, termo resistência de esporos e microscopia eletrônica de transmissão de células vegetativas, esporângios, esporos e cristais.

A ultraestrutura de esporos por microscopia eletrônica de transmissão (Cavalcante, 2014), além de perfil plasmidial (Orem, 2014) apontaram para uma considerável diversidade. Filogenia baseada em sequências de rDNA 16S (Orem, 2014) e filoproteômica por MALDI-TOF-MS (Bezerra, 2015) corroboram esses dados.

O acervo da CBafes ainda inclui a linhagem *B. cereus* FT9, isolada de uma fonte termal, com genoma sequenciado (Raiol *et al.*, 2014) e linhagens recombinantes expressando uma proteína de fluorescência verde (GFP), sendo oito de *B. thuringiensis* (Parente *et al.*, 2008) e mutantes derivados e uma de *B. circulans* (Sinott *et al.*, 2014) também estão incluídas. Células tipo e mutantes de *B. thuringiensis* totalmente curado de plasmídeos (*Cry*-; hospedeiras para expressão heteróloga) provenientes de centros de referência, dentre outras, completam a Coleção atual. As amostras depositadas na CBafes estão acondicionadas em forma de esporos em criotubos (cinco tubos por SDF) à temperatura ambiente.

A solicitação de Acesso a Amostra Componente do Patrimônio Genético foi autorizada pelo CNPq (010439/2015-3).

2. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de novas técnicas para detecção, isolamento e caracterização proporcionou um conhecimento mais real da diversidade do mundo microbiano (Fritze, 2004). Contudo, muitas vezes os novos *taxa* propostos não refletem a diversidade de uma espécie, pois, muitas vezes, a caracterização é baseada em apenas uma única linhagem, o que não contempla a diversidade intra-espécie. Por outro lado, o pouco conhecimento sobre a diversidade entre linhagens de uma espécie quase sempre leva à dificuldade de identificação e, em isolamentos futuros, quase sempre, levam a emendas de descrição e, não raramente, na taxonomia e nomenclatura (Fritze, 2004; Logan *et al.*, 2009; Galperin, 2013). Nesse contexto, existe uma demanda crescente para isolamento de novas linhagens e identificação efetiva de Bafes, por razões que incluem conhecimento básico sobre a diversidade e ecologia, taxonomia apropriada, saúde pública, biodefesa, dentre outros.

A decisão apropriada para definição de espécie e realocação dentro dos grupos de Bafes dependem de métodos robustos e da concordância nos critérios taxonômicos para definir as fronteiras entre as diversas espécies (Logan *et al.*, 2009). Este tipo de estratégia também servirá como base para que novas espécies descobertas sejam alocadas de maneira adequada. Recentemente, novas ferramentas moleculares baseadas em MS, como a variação MALDI-TOF, têm sido utilizadas com grande êxito como abordagens analíticas complementares para identificação microbiana (Saffert *et al.*, 2011). Esta metodologia emergiu como uma estratégia rápida para a caracterização em nível de gênero, espécie e linhagens, incluindo aquelas de Bafes membros dos dois grupos principais do gênero *Bacillus* (Tsilia *et al.*, 2012).

A CBafes tem o propósito de dispor material biológico para pesquisa básica, ensino e rastreamento de atividades biológicas de interesse socioeconômico. Vale ressaltar que o presente trabalho não apresenta cunho ecológico, tendo como principal objetivo o isolamento, caracterização, identificação e armazenamento de Bacterias aeróbias formadoras de endósporos.

Referências

- Ablett, S; Darke, A.H; Lillford, P.J (1999) **Glass formation and dormancy in bacterial spores**. *International Journal of Food Science and Technology*, 34(1): 59-69.
- Ahmed, I; Yokota, A; Yamazoe, A & Fujiwara, T (2007) **Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1117–1125.
- Alauzet, C.; Marchandin, H.; Courtin, P.; Mory, F.; Lemee, L.; Pons, J.L.; Chapot-Chartier, M.P.; Lozniewski, A.; Jumas-Bilak, E (2014). **Multilocus analysis reveals diversity in the genus *Tissierella*: description of *Tissierella carlieri* sp. nov. in the new class *Tissierellia classis* nov.** *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 23–34.
- Amann, R.I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H (1995) **Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.** *Microbiol Rev* 59: 143–169.
- Anhalt, J.P.; Fenselau, C (1975) **Identification of bacteria using mass spectrometry.** *Anal Chem* 47: 219–225.
- Arnold, R.J.; Karty, J.A.; Ellington, A.D.; Reilly, J.P (1999) **Monitoring the growth of a bacteria culture by MALDI-MS of whole cells.** *Anal Chem* 71: 1990–1996.
- Baek, S.H; Im, W.T; Oh, H.W; Lee, J.S; Oh, H.M; Lee, S.T (2006) ***Brevibacillus ginsengisoli* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from soil of a ginseng field.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:2665–2669.
- Baik, K.S.; Park, S.C.; Kim, E.M.; Bae, K.S.; Ahn, J.H.; Ka, J.O.; Chun, J.; Seong C.N (2008) **Diversity of bacterial community in freshwater of Woopo wetland.** *J. Microbiol.* 46, 647–655.
- Banat, I.M.; Marchant, R. **Geobacillus Activities in Soil and Oil Contamination Remediation.** Em: **Endospore-Forming Soil Bacteria.** Springer, 1^a. Ed, 2011.
- Bezerra F.P.C. **Biblioteca de perfis moleculares de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF, com sistema de Qualidade.** [Dissertação de mestrado apresentação ao Programa de pós-graduação em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, 2015] Orientação: Marlene Teixeira De-Souza.
- Bizzini, A.; Jaton, K.; Romo, D.; Bille, J.; Prod'hom, G.; Greub, G (2011) **Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains.** *J Clin Microbiol* 49: 693–696.
- Bravo, A; Likitvivanavong, S; Gill, S.S; Soberón, M (2011) ***Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide.** *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423–431.

- Canhos, V.P (2005) **Coleções Microbiológicas, Centros de Recursos Biológicos e Conformidade de Material Biológico**. I Simpósio Nacional de Coleções Científicas, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz.
- Canhos, V.P.; Vazoller, R.F (2004) **A importância das coleções biológicas: falta ao Brasil uma política adequada para os centros de recursos de microrganismos e tecidos**. *Fronteiras, Scientific American Brasil*.
- Cano, R.J; Borucki, M.K; Higby-Schweitzer, M; Poinar, H.N; Poinar, G.O; Pollard, K. J (1994) **Bacillus DNA in fossil bees: an ancient symbiosis?** *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2164–2167.
- Carbonnelle, E.; Mesquita, C.; Bille E et al. (2010) **MALDITOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory**. *Clin Biochem* 44: 104–109.
- Cavalcante, D.A. **Ultraestrutura e termorresistência de esporos e identificação de proteínas de bactérias aeróbias de solo do Distrito Federal**. [Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, 2014]. Orientação: Marlene Teixeira De-Souza.
- Chang, S.S.; Kang, D.H (2004) **Alicyclobacillus spp. in the fruit juice industry: History, characteristics, and current isolation/detection procedures**. *Crit. Rev. Microbiol*, 30, 55–74.
- Christensen, H.; Bisgaard, M.; Frederiksen, W.; Mutters, R.; Kuhnert, P.; Olsen, J.E. (2001). **Is characterization of a single isolate sufficient for valid publication of a new genus or species? Proposal to modify Recommendation 30b of the Bacteriological Code (1990 Revision)**. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 2221–2225.
- Christie, G (2012) **Inition of Germination in Bacillus and Clostridium Spores**. In E. Abel-Santos: *Bacterial spores* (89-106). Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Clarridge, J.E (2004) **Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases**. *Clin Microbiol Rev* 17:840–862.
- Claus, D.F; Fahmy, H. J; Rolf, and Tosunoglu (1983). **Sporosarcina halophila sp. nov., an obligate, slightly halophilic bacterium from salt marsh soils**. *Syst. Appl. Microbiol.* 4:496–506.
- Coenye, T; Gevers, D; Van de Peer, Y; Vandamme, P & Swings, J (2007) **Towards a prokaryotic genomic taxonomy**. *FEMS Microbiol Rev*, 29:147–167.
- Colwell, R.R (1970) **Polyphasic taxonomy of the genus Vibrio: numerical taxonomy of Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus and related Vibrio species**. *J Bacteriol* 104: 410–433.
- Conway, G.C.; Smole, S.C.; Sarracino, D.A.; Arbeit, R.D.; Leopold, P.E (2001) **Phyloproteomics: species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry**. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3: 103–112.
- Cowan, A.E; Olivastro, E.M; Koppel, D.E; Loshon, C.A; Setlow, B; Setlow, P (2004) **Lipids in the inner membrane of dormant spores of Bacillus species are**

- largely immobile.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 7733–7738.
- Croxatto, A; Prod'hom; Greub, G (2012) **Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology.** *FEMS Microbiol Rev*, 36, 380–407.
- Damgaard, P.H (2000) **Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment.** In Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application. Charles, J.-F., Delecluse, A., and Nielsen-LeRoux, C. (eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 23–40.
- de Maagd, RA; Bravo, A; Berry, C; Crickmore, N and Schnepf, H.E (2003) **Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria.** *Annu Rev Genet* 37:409-433.
- de Oliveira, E.J; Rabinovitch, L; Monnerat, R.G; Jannotti; Passos, L.K; Zahner, V (2004) **Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control.** *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6657–6664.
- de Vos, P; Garrity, G; Jones, D; Krieg, N.R; Ludwig, W; Rainey, F.A; Schleifer, K.-H; Whitman, W.B. (Eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Volume 3: The Firmicutes. Second Ed, 2009.
- Deinhard, G; Saar, J; Krischke, W; Poralla, K (1987) ***Bacillus cycloheptanicus* sp. nov., a new thermophile containing ω -cycloheptane fatty acids.** *Syst. Appl. Microbiol.*, 10, 47–53.
- Demirev, P.A.; Ho, Y.P.; Ryzhov, V.; Fenselau, C (1999) **Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches.** *Anal Chem* 71: 2732– 2738.
- Deutscher, J.; Galinier, A and Martin-Verstraete (2002). **Carbohydrate uptake and metabolism. In *Bacillus subtilis* and its Closest Relatives.** ASM Press, Washington, D.C., pp. 129–150.
- Driks, A (1999) **The *Bacillus subtilis* spore coat.** *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 1–20.
- Driks, A (2002) **Maximum shields: the assembly and function of the bacterial spore coat.** *TRENDS in Microbiology* Vol.10 No.6.
- Egler, I (2005) **Desenvolvimento de Políticas e Programas de Biodiversidade no Âmbito do Ministério da Ciência e Tecnologia.** I Simpósio Nacional de Coleções Científicas, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz.
- Eguchi, S.Y; Manfio, G.P; Pinhatti, M.E.C; Azuma, E; Variane, S.F (1999) **Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in Orange juices: detection methods, ecology and involvement in the deterioration of fruit juices.** Campinas: Fundação André Tosello & ABEcitrus.
- Ehling-Schulz, M and U Messelhäusser (2013) ***Bacillus* “next generation” diagnostics: moving from detection toward subtyping and risk-related strain profiling.** *Front. Microbiol.* 4:32.
- Eijlander, R. T; De Jong, A; Krawczyk, A.O; Holsappel, S; Kuipers, O.P (2014) **SporeWeb: an interactive journey through the complete sporulation cycle of *Bacillus subtilis*.** *Nucleic Acids Research*, 42, Database issue D685–D691.

- Emonet, S; Shah, H.N; Cherkaoui, A; Schrenzel, J (2010) **Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology.** *Clin. Microbiol. Infect.* 16(11):1604–1613.
- Errington, J (2003) **Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*.** *Nature Reviews. Microbiol*, 1:117-126.
- Felis, G.E.; Dellaglio, F. (2007). **On species descriptions based on a single strain: proposal to introduce the status species proponenda (sp.pr.).** *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 2185–2187.
- Fenselau, C.; Demirev, P.A (2001) **Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry.** *Mass Spectrom Rev* 20: 157–171.
- Flugge, C. **Die Mikroorganismen.** Leipzig: Voge, 1886.
- Fritze, D (2004) **Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: The aerobic endospore-forming bacteria.** *Phytopathology* 94:1245-1248.
- Fritze, D. (2002). **Bacillus Identification-Traditional Approaches.** In: Berkeley, R., Heyndrickx, M., Logan, N. and Vos, P. (Eds.), *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*, Blackwell Publishing, Cambridge, pp 100-123.
- Fujita, M; Losick, R (2003) **The master regulator for entry into sporulation in *Bacillus subtilis* becomes a cell-specific transcription factor after asymmetric division.** *Genes and development*, 17: 1166-1174.
- Galperin, M.Y (2013) **Genome diversity of spore-forming Firmicutes.** *Microbiol Spectrum* 1(2): TBS-0015-2012.
- Gevers, D.; Cohan, F.M.; Lawrence, J.G.; Spratt, B.G.; Coenye, T.; Feil, E.J.; Stackebrandt, E.; Van de Peer, Y.; Vandamme, P.; Thompson, F.L.; Swings, J (2005) **Opinion: Re-evaluating prokaryotic species.** *Nat Rev Microbiol* 3:733–739.
- Gibbons, N.E. and Murray, R.G.E (1978) **Proposals concerning the higher taxa of bacteria.** *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28, 1–6.
- Giebel, R.; Worden, C.; Rust, S.M.; Kleinheinz, G.T.; Robbins, M.; Sandrin, T.R (2010) **Microbial fingerprinting using matrixassisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges.** *Adv Appl Microbiol* 71: 149–184.
- Giorno, R; Bozue. J; Cote, C; Wenzel, T; Sulayman, M; Krishna, M; Michael, R.M; Wang, R; Zielke, R.R; Maddock, J; Friedlander, A; Welkos, S. and Driks, A (2007) **Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* Spore.** *Journal of bacteriology*, 189: 691–705.
- Hathout, Y.; Ho, Y.P.; Ryzhov, V.; Demirev, P.; Fenselau, C (2000) **Kurstakins: a new class of lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*.** *J Nat Prod* 63: 1492–1496.
- Heyndrickx, M; Lebbe, L; Kersters, K; De Vos, P; Forsyth, C. and Logan, N.A (1998) **"Virgibacillus: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*." *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:99-106.**

- Hilbert, D. W. and Piggot, P.J (2004) **Compartmentalization of Gene Expression during *Bacillus subtilis* Spore Formation**. *Microbiol and Mol Biol Reviews*, 68(2):234–262.
- Hussain, T; Roohi, A; Munir, S; Ahmed, I; Khan, J; Edel-Hermann, V; Kim, K.Yand; Anees, M. (2013) **Biochemical characterization and identification of bacterial strains isolated from drinking water sources of Kohat, Pakistan**. *Afr. J. Microbiol. Res.* Vol. 7(16), pp. 1579-1590.
- Hutchison, E.A; Miller, D.A; Angert, E.R (2014) **Sporulation in bacteria: beyond the standard model**. *Microbiol Spectrum* 2(5):TBS-0013-2012.
- Ichimatsu, T; Mizuki, E; Nishimura, K; Akao, T; Saitoh, H; Higuchi, K. and Ohba, M (2004) **Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh waters of Japan**. *Curr Microbiol* 40:217–220.
- Jedrzejewski, M.J; Setlow, P (2001) **Comparison of the binuclear metalloenzymes diphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase and alkaline phosphatase: their mechanism of catalysis by a phosphoserine intermediate**. *Chem Rev*, 101:607-618.
- Jensen, G.B; Hansen, B.M; Eillenbergh, J; Mahillon, J (2003) **The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives**. *Environmental Microbiology*, 5(8): 631-640.
- Johnstone, K; Stewart, G.S.A.B; Scott, I.R., et al. (1982) **Zinc Release and the Sequence of Biochemical Events during Triggering of *Bacillus megaterium* Km Spore Germination**. *Biochemical Journal*, 208(2), 407-411.
- Jumas-Bilak, E.; Roudière, L.; Marchandin, H (2009) **Description of 'Synergistetes' phyl. nov. and emended description of the phylum 'Deferribacteres' and of the family Syntrophomonadaceae, phylum 'Firmicutes'**. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1028–1035.
- Kannenbergh, E; Blume, A; Poralla, K (1984) **Properties of ω -cyclohexane fatty acids in membranes**. *FEBS Lett.* 172, 331–334.
- Keinanen, M.M.; Martikainen, P.J.; Kontro, M.H. (2004) **Microbial community structure and biomass in developing drinking water biofilms**. *Can. J. Microbiol.* 50(3):183-191.
- Kølsto, A.-B; Tourasse, N.J; Okstad, O.A (2009) **What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species?** *Annual reviews microbiology*, 63: 451-476.
- Krause, E.; Wenschuh, H.; Jungblut, P.R (1999) **The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins**. *Anal Chem* 71: 4160–4165.
- Kwak, M.K.; Liu, R.; Kwon, J.O.; Kim, M.K.; Kim, A.H.J.; Kang, S.O (2013) **Cyclic dipeptides from lactic acid bacteria inhibit proliferation of the Influenza A virus**. *J. Microbiol.* 51, 836–843.
- Lee, D.Y.; Seo, Y.S.; Rayamajhi, N.; Kang, M.L.; Lee, S.I.; Yoo, H.S (2009) **Isolation, characterization, and evaluation of wild isolates of *Lactobacillus reuteri* from pig feces**. *J. Microbiol.* 47, 663–672.
- Li, Q.; Chen, X.; Jiang, Y.; Jiang, C. (2016) **Cultural, Physiological, and Biochemical Identification of Actinobacteria**. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, cap. 4.

- Liu, L; Liu, Y; Shin, H.D; Chen, R.R; Wang, N.S; Li, J; Du, G.G.; Jian, C (2013) **Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology.** *Appl Microbiol Biotechnol* **97**:6113 – 6127.
- Liu, Q.; Roh, J.Y.; Wang, Y.; Choi, J.Y.; Tao, X.Y.; Kim, J.S.; Je, Y.H (2012) **Construction and characterisation of an antifungal recombinant *Bacillus thuringiensis* with an expanded host spectrum.** *J. Microbiol.* **50**, 874–877.
- Logan, N.A. and De Vos, P (2009) **Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** 174AL. Vol3. The firmicutes 2nd Edition.
- Logan, N.A; Berge, O; Bishop, A.H; Busse, H.J; De Vos, P; Fritze, D; Heyndrickx, M; Kämpfer, P; Salkinoja-Salonen, M.S; Seldin, L; Rabinovitch, L; Ventosa A (2009) **Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria.** *Int J Syst Evol Microbiol* **59**:2114–2121.
- Losick, R; Youngman, P; Piggot P.J (1986) **Genetics of endosporeformation in *Bacillus subtilis*.** *Annu Rev Genet* **20**:625–669.
- Madigan, M.T; Martinko, J.M; Parker, J. **Microbiologia de Brock.** São Paulo: Prentice Hall, 10^ªed, 2004.
- Madonna, A.J.; Basile, F.; Ferrer, I.; Meetani, M.A.; Rees, J.C.; Voorhees, K.J (2000) **On-probe sample pretreatment for the detection of proteins above 15 KDa from whole cell bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* **14**: 2220–2229.
- Márquez, M. C.; Sánchez-Porro, C.; Ventosa, A (2011) **Halophilic and haloalkaliphilic, aerobic endospore-forming bacteria in soil.** In: Logan, N. A.; De Vos, Paul. **Endospore-forming Soil Bacteria.** *Soil Biology*, **27**, ch.16: 309-339. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Maughan, H; Auwera, G.V (2011) ***Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading Infection.** *Genetics and Evolution.* **11789–797.**
- Mayr, E.; Ashlock, P.D (1991) **Principles of Systematic.** *Zoology* 2nd ed. McGraw-Hill, Inc. pp 1–12.
- McKenney, P.T; Driks, A; Eichenberger, P (2013) **The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat.** *Nat Rev Microbiol.* **33-44.**
- McKenney, P.T; Driks, A; Eskandarian, H.A; Grabowski, P; Guberman, J; Wang, K.H; Gitai, Z; Eichenberger, P (2010) **A distance-weighted interaction map reveals a previously uncharacterized layer of the *Bacillus subtilis* spore coat.** *Curr Biol*; **20(10)**: 934-8.
- Melnick, R.L; Suárez, C; Bailey, B.A; Backman, P.A (2011) **Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases.** *Biol. Control* **57**:236 –245.
- Mertens, K; Freund, L; Schmook, G; Hänsel, C; Melzer, F; Elschner, M.C (2014) **Comparative evaluation of eleven commercial DNA extraction kits for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis* spores in spiked dairy samples.** *International Journal of Food Microbiology*, **170**: 29-37.

- Mora, R.R.; Amann, R (2001) **The species concept for prokaryotes**. *FEMS Microbiol Rev* 25:39–67.
- Nakamura, L.K (1998) **Bacillus pseudomycooides sp. nov.** *International Journal of Systematic Bacteriology*.48, 103 1-1 035.
- Nazina, TN; Lebedeva, E. V; Poltarau, A. B; Tourova, T. P; Grigoryan, A. A; Sokolova, D. Sh; Lysenko, A. M. & Osipov, G.A (2004). **Geobacillus gargensis sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of Bacillus vulcani as Geobacillus vulcani comb. nov.** *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 2019–2024.
- Neves, M.C.P; Rumjanek, N.G (1998) **Ecologia das Bactérias Diazotróficas nos solos tropicais** In: Melo, I.S; Azevedo, J.L (eds) *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA.
- Nguyen, M.T.; Götz, F (2016) **Lipoproteins of Gram-positive bacteria: Key players in the immune response and virulence**. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 891–903.
- Niall, A.L.; Halket, G (2011) **Developments in the taxonomy of aerobic, endospore forming Bacteria**. *Endospore forming soil bacteria*, 27, 1-7.
- Nicholson, W.L; Munakata, L; Horneck, G., et al. (2000) **Resistance of Bacillus endospores to extrem terrestrial and extraterrestrial environments**. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 549-560.
- Ohba, M; Mizuki, E. and Uemori, A (2009) **Parasporin, a New Anticancer Protein Group from Bacillus thuringiensis**. *Anticancer Research*, 29: 427-434.
- Oliveira-Nascimento, L; Caricati, A.T.P; Abdulack-Lopes, F; Neves, L.C.M; Penna, C.P; Stephano, T.C.V; Caricati, M.A; Caricati, M.A (2012) **Bacillus atrophaeus inactivated spores as a potential adjuvant for veterinary rabies vaccine**. *Vaccine*, 30: 3351-3354.
- On, SLW & Holmes, B (1991) **Reproducibility of tolerance tests those are useful in the identification of compylobacteria**. *J Clin Microbiol* 29:1785–1788.
- Onyenwoke, R.U; Brill, J.A; Farahi, K and Juergen Wiegel (2004) **Sporulation genes in members of the low G+C Gram-type-positive phylogenetic branch (Firmicutes)**.*Arch Microbiol*, 182:182–192.
- Orem, J.C. **Filogenia e perfil plasmidial de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos isoladas de solo**. [Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, 2014]. Orientação: Marlene Teixeira De-Souza.
- Oshima, M; Ariga, T (1975) **ω -cyclohexil fatty acids in acidophilic thermophilic bacteria**. *Journal of Biological Chemistry*, 250, p. 6963-6968.
- Parente, A; Silva-Pereira, I; Baldani, J; Tibúrcio, V; Bão, S; De-Souza, M (2008) **Construction of Bacillus thuringiensis wild-type S76 and Cry- derivatives expressing a green fluorescent protein: two potential marker organisms to study bacteria-plant interactions**. *Canadian Journal Of Microbiology*;54(9):786-790.
- Parkouda, C; Thorsen, L; Compaoré, C.S; Nielsen, D.S; Tano-Debrah, K; Jan S. Jensen, J.S; Diawara, B; Jakobsen, M (2010) **Microorganisms associated**

- with maari, a baobab seed fermented product.** *Int. J. Food Microbiol.* 142:292–301.
- Parte, A.C. (2018). **LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, 1825-1829; doi: 10.1099/ijsem.0.002786
- Patel, N.B.; Tito, R.Y.; Obregón-Tito, A.J.; O’Neal, L.; Trujillo-Villaroel, O.; Marin-Reyes, L.; Troncoso-Corzo, L.; Guija-Poma, E.; Hamada, M.; Uchino, Y., et al. (2015) **Ezakiella peruensis gen. nov., sp. nov. isolated from human fecal sample from a coastal traditional community in Peru.** *Anaerobe* 32, 43–48.
- Pedraza-Reyes, M; Ramírez-Ramírez, N; Vidales-Rodríguez, L.E. et al. (2012) **Mechanisms of Bacterial Spore Survival.** In E. Abel-Santos: *Bacterial Spores* (73-88). Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Piggot, P.J; and Coote, J.G (1976) **Genetic aspects of bacterial endospore formation.** *Bacteriol. Rev.* 40, 908–962.
- Pointing, S.B.; Hyde, K.D (2001) **Exploiting filamentous fungi.** *The University of Hong Kong: Fungal Diversity Press*, Hong Kong, pp 467.
- Pontius, A.J; Rushing, J.E; Foegeding, P.M (1998) **Heat Resistance of Alicyclobacillus acidoterrestris spores as affect various pH values and organic acids.** *Journal of Food Protection*, 61, n. 1, p. 41-46.
- Popham, D.L (2002) **Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore: the inner wall of the lockbox.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(3), 426-433.
- Prakash, O; Verma, M; Sharma, P; Kumar, M; Kumari, K; Singh, A; Kumari, H; It, S; S. K. Gupta, S.K; Khanna, M; Lal, R (2007) **Polyphasic approach of bacterial classification – An overview of recent advances.** *Indian J. Microbiol.* 47:98–108.
- Priest, F.G (1997) **Extracellular enzyme synthesis in the genus Bacillus.** *Bacteriol. Rev.* 41: 711-753.
- Raiol, T; De-Souza, M.T; Oliveira, J.V.A; Silva, H.S.D.I.L; Orem, J.C; Cavalcante, D.A; Almeida, N.F; Telles, G.P; Setubal, J.C; Brigido, M.M; Torres, F.A.G; Stadler, P.S; Walter, M.E.M.T; Moraes, L.M.P (2014) **Draft genome sequence of FT9, a novel Bacillus cereus strain isolated from a Brazilian thermal spring.** *Genome Announc.* 2(5):e01027-14.
- Redmond, C; Baillie, L.W; Hibbs, S; Moir, A.J. and Moir, A (2004) **Identification of proteins in the exosporium of Bacillus anthracis.** *Microbiology* 150, 355–363.
- Roeßler, M., and V. Muller (1998) **Quantitative and physiological analyses of chloride dependence of growth of Halobacillus halophilus.** *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3813–3817.
- Roeßler, M; Wanner, G; Muller, V (2000) **Motility and Flagellum Synthesis in Halobacillus halophilus Are Chloride Dependent.** *Journal Of Bacteriology.* p. 532–535.

- Rosado, A.S; Seldin, L; Wolters, A.C; van Elsas, J.D (1996) **Quantitative 16S rDNA-targeted polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization for the detection of Paenibacillus azotofixans in soil and the rhizosphere.** *FEMS Microbiology Ecology*, Amsterdam, 19, p. 153-164.
- Ruelle, V.; El Moualij, B.; Zorzi, W.; Ledent, P.; Pauw, E.D (2004) **Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 18: 2013–2019.
- Ruiu, L; Floris, I; Satta, A (2013) **Emerging entomopathogenic bacteria for insect pest management.** *Bulletin of Insectology* 66 (2): 181-186.
- Ryu, E (1939) **On the gram-differentiation of bacteria by the simplest method. II. The caustic potash method.** *Jpn. J. Vet. Sci.* 1, 209-210.
- Ryu, E (1940) **A simple method of differentiation between gram-positive and gram-negative organisms without staining.** *Kitasato Archives of Experimental Medicine*, Tokyo, 17, p. 58-63.
- Ryzhov, V.; Fenselau, C (2001) **Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells.** *Anal Chem* 73: 746–750.
- Saffert, R.T; Cunningham, S.A; Ihde, S.M; Monson Jobe, K.E; Mandrekar, J. and Robin Patel (2011) **Comparison of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometer to BD Phoenix Automated Microbiology System for Identification of Gram-Negative Bacilli.** *J Clinical Microbiol*, 49(3): 887–892.
- Sapru, V. & Labuza, T. P (1993) **Glassy State in Bacterial-Spores Predicted by Polymer Glass- Transition Theory.** *Journal of Food Science*, 58(2), 445-448.
- Schildkraut, C.L.; Marmur, J.; Doty, P (1961) **The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA homologies.** *J Mol Biol* 3:595–617.
- Seng, P.; Drancourt, M.; Gouriet, F.; La Scola, B.; Fournier, P.E.; Rolain, J.M.; Raoult, D (2009) **Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Clin Infect Dis* 49: 543–551.
- Seong, C.N.; Kang, J.W.; Lee, J.H.; Seo, S.Y.; Woo, J.J.; Chul Park, C.; Bae, K.S.; Kim, M.S (2018) **Taxonomic hierarchy of the phylum Firmicutes and novel Firmicutes species originated from various environments in Korea.** *Journal of Microbiology*, 56(1):1–10.
- Setlow P (2003) **Spore germination.** *Curr Opin Microbiol* 6:550–556.
- Setlow P (2006) **Spores of Bacillus subtilis: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals.** *J Appl Microbiol* 101(3):514– 525.
- Setlow, B; Wahome, P.G. & Setlow, P (2008) **Release of small molecules during germination of spores of Bacillus species.** *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4759-4763.
- Setlow, P (1995) **Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of Bacillus species.** *Ann Rev Microbiol* 49, 29–54.

- Setlow, P (2012) **Dynamics of the assembly of a complex macromolecular structure - the coat of spores of the bacterium *Bacillus subtilis***. *Molecular Microbiology*, 83(2), 241-244.
- Sette, L.D (2005) **Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI**. I Simpósio Nacional de Coleções Científicas, *Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz*.
- Sharma, A.; Shouche, Y (2014) **Microbial Culture Collection (MCC) and International Depository Authority (IDA) at National Centre for Cell Science, Pune**. *Indian J Microbiol*, 54(2):129–133.
- Shida, O; Takagi, H; Kadowaki, K. & Komagata, K (1996) **Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov.** *Int J Syst Bacteriol* 46, 939–946.
- Shida, O; Takagi, H; Kadowaki, K; Nakamura, L.K. & Komagata, K (1997) **Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus***. *Int J Syst Bacteriol* 47, 289–298.
- Shida, O; Takagi, H; Kadowaki, K; Nakamura, L.K; Komagata, K (1977) **Emended description of *Paenibacillus amylolyticus* and description of *Paenibacillus illinoisensis* sp. nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov.** *Int J Syst Bacteriol*, Spencers Wood, 4, n.2, p. 289-298.
- Sinott, M.C; Dias de Castro, L.L; Leite, F.L; Gallina, T; De-Souza, M.T; Santos, D.F.L; Leite, F.P.L (2016) **Larvicidal activity of *Bacillus circulans* against the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* in sheep**. *J Helminthol*. 90(1):68-73.
- Smith, D (2003) **Culture collections over the world**. *Int Microbiol* 6: 95–100.
- Spring, S; Ludwig, W; Marquez, M. C; Ventosa, A. & Schleifer, K.-H (1996) ***Halobacillus* gen. nov., with description of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov.** *Int J Syst Bacteriol* 46, 492–496.
- Stager, C.E.; Davis, J.R (1992) **Automated systems for identification of microorganisms**. *Clin. Microbiol. Rev.* 5:302–327, 1992.
- Stucliffe, I.C.; Trujillo, M.E.; Goodfellow, M. (2012) **A call to arms for systematists: revitalizing the purpose and practices underpinning the description of novel microbial taxa**. *Antonie van Leeuwenhoek*. 101:12–20.
- Sugawara, H.; Ma, J.; Miyazaki, S (1999) **World directory of collections of cultures of microorganisms, 5th edn**. WFCC World Data Center on Microorganisms, Japan.
- Suh, M.J.; Limbach, P.A (2004) **Investigation of methods suitable for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of proteins from ribonucleoprotein complexes**. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)* 10: 89–99.

- Swerdlow, B.M; Setlow, B. & Setlow, P (1981) **Levels of H⁺ and Other Mono-Valent Cations in Dormant and Germinating Spores of Bacillus megaterium.** *Journal of Bacteriology*, 148(1), 20-29.
- Tindall, B.J.; Rosselló-Mora, R.; Busse, H.J.; Ludwig, W.; Kämpfer, P. (2010) **Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes.** *Int J Syst Evol Microbiol.* 60:249–66.
- Tsilia, V; Bart Devreese; Ilse de Baenst; Bart Mesuer; Andreja Rajkovic; Mieke Uyttendaele; Tom Van de Wiele and Marc Heyndrickx (2012) **Application of MALDI-TOF mass spectrometry for the detection of enterotoxins produced by pathogenic strains of the Bacillus cereus group.** *Anal Bioanal Chem*, 404:1691–1702.
- Vaidyanathan, S.; Winder, C.L.; Wade, S.C.; Kell, D.B.; Goodacre, R (2002) **Sample preparation in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of whole bacterial cells and the detection of high mass (>20 kDa) proteins.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 16: 1276–1286.
- Valentine, N.; Wunschel, S.; Wunschel, D.; Petersen, C.; Wahl, K (2005) **Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry.** *Appl Environ Microbiol* 71: 58–64.
- Vandamme, P; Pot, B; Gillis, M; De Vos, P; Kersters, K; Swings, J (1996) **Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics.** *Microbiological Reviews.* p. 407–438.
- Vargha, M.; Takats, Z.; Konopka, A.; Nakatsu, C.H (2006) **Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of Arthrobacter isolates.** *J Microbiol Methods* 66: 399–409.
- Vary, P.S (1994) **Prime time for Bacillus megaterium.** *Microbiology* 140 (Part 5): 1001–1013.
- Verbaendert, I; De Vos, P (2011) **Studying denitrification by aerobic endospore-forming bacteria in soil.** In: Logan, N. A.; de Vos, Paul. **Endospore-forming Soil Bacteria.** *Soil Biology*, 27, ch.14: 271-285.
- Vreeland, R.H; Rosenzweig, W.D; Powers, D.W (2000) **Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt Crystal.** *Nature*; 407,897–900.
- Walker, J.R; Gnanam, A.J; Blinkova, A.L; Hermandson, M.J; Karymov, M.A and Lyubchenko, Y.L (2007) **Clostridium taeniosporum spore ribbon-like appendage structure, composition and genes.** *Mol Microbiol.* 63(3):629-43.
- Waller, L.N; Fox, N; Fox, K.F., et al. (2004) **Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of Bacillus anthracis and Bacillus subtilis.** *Journal of Microbiological Methods*, 58(1), 23-30.
- Wang, J; Fan, Y; Yao, Z (2010) **Isolation of a Lysinibacillus fusiformis strain with tetrodotoxin-producing ability from puffer fish Fugu obscurus and the characterization of this strain.** *Toxicon* 56:640–643.
- Wang, Z.P.; Russon, L.; Li, L.; Roser, D.C.; Long, S.R (1998) **Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-**

- assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 12: 456–464.
- Warth, A. D.; Stroming, J.L (1972) **Structure of Peptidoglycan from Spores of *Bacillus subtilis*.** *Biochemistry*, 11(8), 1389.
- Williams, T.L.; Andrzejewski, D.; Lay, J.O.; Musser, S.M (2003) **Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells.** *J Am Soc Mass Spectrom* 14: 342–351.
- Wisotzkey, J.D; Jurtschuk, P.; Fox, G; Deinard G; Poralla, K (1992) **Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA). of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus *Alicyclobacillus* gen.nov.** *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, n. 2, p. 263-269.
- Woese, C.R (1987) **Bacterial evolution.** *Microbiol Rev* 51: 221–272.
- Wrigley, S.K.; Hayes, M.A.; Thomas, R.; Chrystal, E.J.T.; Nicholson, N (2000) **Biodiversity: new leads for pharmaceutical and agrochemical industries.** *Royal Society for Chemistry, UK.*
- Xie, C; Li, J; Wang, K; Li, Q; Chen, D (2015) **Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in older patients: A systematic review.** *Travel Medicine and Infectious Disease*, 13: 128-134.
- Xu, L.H.; Li, W.J.; Liu, Z.H.; Jiang, C.L. (2007) **Actinomycete Systematics-Principle, Methods and Practice.** 1st ed. *Science Press: Beijing.*
- Yoon, J.H; Kang, K.H.; Park, Y.H (2003) ***Halobacillus salinus* sp. nov., isolated from a Salt Lake on the coast of the East Sea in Korea.** *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 687–693.
- Yoon, J; Seo, W; Shin, Y.K; Kho, Y.H; Kang, K.H; Park, Y (2002) ***Paenibacillus chinjuensis* sp. nov., a novel exopolysaccharide-producing bacterium.** *Int J Syst Bacteriol and Evol. Microb, Spencers Wood*, 52, p. 415-421.
- Yoshida, C.F.T.; Chamas, C.I.; Tepedino, J.L.S (2005) **Coleções Biológicas: Gestão, Planejamento e Propriedade Industrial.** I Simpósio Nacional de Coleções Científicas, *Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz.*
- Yutin, N.; Galperin, M.Y (2013) **A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia.** *Environ. Microbiol.* 15, 2631–2641.

3. OBJETIVOS

3.1 – Geral

Ampliação, caracterização fenotípica e molecular da Coleção de Bafes nativas do solo do Distrito Federal.

3.2 – Especificos

- ✓ Coletar novas amostras de solo no território do DF;
- ✓ Isolar novas linhagens de Bafes;
- ✓ Estocar de forma estável as novas linhagens de Bafes (linhagens SDF);
- ✓ Realizar a caracterização fenotípica clássica de 312 linhagens SDF;
- ✓ Realizar a classificação fenotípica em nível molecular de 154 linhagens SDF por MALDI-TOF MS ;
- ✓ Comparar as classificações moleculares baseada em fenótipo, obtida por MALDI-TOF MS e genótipo, baseado em sequências de genes de rRNA 16S obtidas em projeto paralelo;
- ✓ Realizar caracterização fenotípica das linhagens SDF baseada em perfil bioquímico.

4. METODOLOGIA E RESULTADOS

4.1 – Ampliação do acervo de linhagens SDF da CBafes

a) **Coleta de amostras do solo:** com o auxílio de uma espátula estéril foram transferidos cerca de 50 g da superfície do solo, coletados entre 5 e 8 cm de profundidade, para tubos plásticos de 50 mL, com tampa de rosca e estéreis. Foram realizadas três coletas de amostras de solo (5 tubos em cada coleta). A primeira coleta foi realizada no dia 03 de junho de 2015, a segunda em 17 agosto de 2015 e a terceira em 13 de junho de 2016. Os diferentes locais de coleta foram selecionados aleatoriamente dentro do *campus* Darcy Ribeiro da UnB. O posicionamento geográfico foi obtido com o auxílio de um receptor de sinais do tipo GPS (Garmin eTrex Legend H). Os dados de coleta e georeferenciamento estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Geolocalização e data das coletas das amostras de solo

Data da coleta	Coordenadas	
	Latitude	Longitude
Tubo 1		
03/06/2015	16.021944	48.081667
17/08/2015	15.781667	48.102500
13/06/2016	15.766666	47.866111
Tubo 2		
03/06/2015	16.020556	48.080000
17/08/2015	15.780556	48.102222
13/06/2016	15.766667	47.865556
Tubo 3		
03/06/2015	16.019722	48.079167
17/08/2015	15.778889	48.102500
13/06/2016	15.766667	47.866389
Tubo 4		
03/06/2015	16.018056	48.085278
17/08/2015	15.761111	48.104167
13/06/2016	15.766389	47.866611
Tubo 5		
03/06/2015	16.020000	48.086667
17/08/2015	15.785556	48.103056
13/06/2016	15.765556	47.870278

b) Isolamento de Bafes: a partir de cada um dos 10 tubos foram retiradas 3 alíquotas de 5 g de solo e transferidas para um pedaço de papel alumínio. As alíquotas foram pré-tratadas por 5 h em 3 temperaturas: 65 °C, 70 °C ou 80 °C (Santana *et al.*, 2008). Após a incubação e homogeneização da amostra, 1 g de solo pré-tratado foi transferido para tubos de 15 mL e contendo 10 mL de NaCl 0,8%, agitados em vórtice por 60 s e deixados em repouso a temperatura ambiente, por 2 min. Um mL da suspensão foi submetido a choque térmico, na respectiva temperatura de pré-tratamento, por 10 min e incubado em gelo por 5 min. Cem µL de cada suspensão foram inoculados em ágar nutriente, pH 7,2 e incubados a 28 °C por 24 h a 7 dias. Nas amostras da primeira coleta foram isoladas e selecionadas 58 linhagens de Bafes (SDF0155-0212), na segunda 56 linhagens (SDF0213-0268) e na terceira foram 44 linhagens (SDF0269-0312). As temperaturas de seleção estão listadas na Tabela 2.

c) Meios de cultura:

Caldo nutriente (peptona 0,5% (p/v); extrato de carne 0,3% (p/v); MnSO₄ 0,010 g; pH 7,2. Esterilização : 121 °C, 1 atm, por 21 min.

HCT. Triptona 0,5%; hidrolisado de caseína 0,2% acrescidos de 50 mL de solução I (KH₂PO₄ 0,5 M); 10 mL de solução II (MgSO₄.7H₂O, 50 mM; MnSO₄.H₂O, 1 mM; ZnSO₄.7H₂O 4 mM); 10 mL de solução III (Fe₂(SO₄)₃ 7 mM; H₂SO₄ 0,1 M) e 10 mL de solução IV (CaCl₂.2H₂O 0,1 M) para volume final de 1 L. O pH 7,25 foi ajustado com KOH e o meio foi autoclavado a 115 °C, por 30 min. No momento da utilização foi adicionada glicose na concentração final de 0,3%.

Luria-Bertani (LB). Extrato de levedura 0,5% (p/v); peptona de caseína 1% (p/v); NaCl 1% (p/v); pH 7,2.

Meios sólidos. Os meios sólidos foram obtidos acrescentando-se ágar bacteriológico na concentração final de 1,8%.

d) Estoque de esporos: células de uma colônia isolada obtidas como descrito anteriormente, foram induzidas à esporulação em meio HCT líquido, a 28 °C, com agitação de 200 rpm. Após pelo menos 90% da população estar completamente esporulada (esporos livres no meio), uma alíquota de 1,7 mL da cultura foi submetida a um choque térmico de 65; 70 ou 80 °C por 10 min, respectivamente, de acordo com a temperatura de seleção e incubada em gelo por 5

min. Aproximadamente 250 µL da suspensão de esporos foram transferidos para 5 tubos de criopreservação contendo tiras de papel de filtro. O material foi seco em estufa a 37 °C. Quando completamente seco, o tubo foi vedado com Parafilm™ e estocado à temperatura ambiente até o momento da utilização.

Todas as 158 linhagens isoladas foram induzidas à esporulação e armazenadas, onde as mesmas foram separadas em caixas e em diferentes gavetas, agrupadas de acordo com a temperatura de isolamento e coleta. Atualmente, a CBafes apresenta a seguinte configuração (Tabela 2):

Tabela 2. Estrutura atual da CBafes

Gaveta	Caixa	Linhagens SDF	Temperatura de Isolamento (°c)	Ano da Coleta
1	01	SDF0001 - 0010	80	2011
1	02	SDF0011 - 0020	80	2011
1	03	SDF0021 - 0029	80	2011
2	04	SDF0030 - 0040	80	2012
2	05	SDF0041 - 0047	80	2012
2	06	SDF0048 - 0056	80	2012
2	07	SDF0057 - 0066	80	2012
2	08	SDF0067 - 0076	80	2012
2	09	SDF0077 - 0086	80	2012
3	10	SDF0087 - 0097	80	2012
3	11	SDF0098 - 0108	80	2012
3	12	SDF0109 - 0119	80	2012
3	13	SDF0120 - 0129	80	2012
3	14	SDF0130 - 0139	80	2012
3	15	SDF0140 - 0149	80	2012
4	16	SDF0150 - 0154	80	2012
5	17	SDF0155 - 0164	65	2015/1
5	18	SDF0165 - 0174	65	2015/1
5	19	SDF0175 - 0182	65	2015/1
6	20	SDF0183 - 0192	70	2015/1
6	21	SDF0193 - 0201	70	2015/1
7	22	SDF0202 - 0212	80	2015/1
8	23	SDF0213 - 0222	65	2015/2
8	24	SDF0223 - 0232	65	2015/2
8	25	SDF0233 - 0241	65	2015/2
9	26	SDF0242 - 0251	70	2015/2
9	27	SDF0252 - 0257	70	2015/2
10	28	SDF0258 - 0268	80	2015/2
11	29	SDF0269 - 0278	80	2016/1
11	30	SDF0279 - 0287	80	2016/1
12	31	SDF0288 - 0297	70	2016/1
12	32	SDF0298 - 0300	70	2016/1
13	33	SDF0301 - 0310	65	2016/1
13	34	SDF0311 - 0312	65	2016/1

4.2 – Caracterização fenotípica inicial

a) Análise macroscópica, morfologia de colônias: as linhagens SDF001 a SDF0312, depositadas na CBafes, foram cultivadas em meio LB sólido e a formação das colônias isoladas após a incubação a 28 °C por 24, 48 ou 72 h foram analisadas por inspeção visual. Foram observadas colônias com diferentes morfologias, variando entre puntiformes, convexas, com borda irregular ou regular.

b) Exame a fresco: no exame a fresco das células vegetativas, realizado por microscopia com contraste de fase (Axiolab, Zeiss) observou-se a forma bacilar, dispostas em diferentes arranjos (pares ou cadeias: estreptobacilos), com tamanhos variados e esporos livres com formas cilíndricas, esféricas ou elípticas. Ao analisar a localização dos endósporos (Figura 8), observou-se que a maioria apresentou na posição subterminal (42,3%), seguido da posição central (25%).

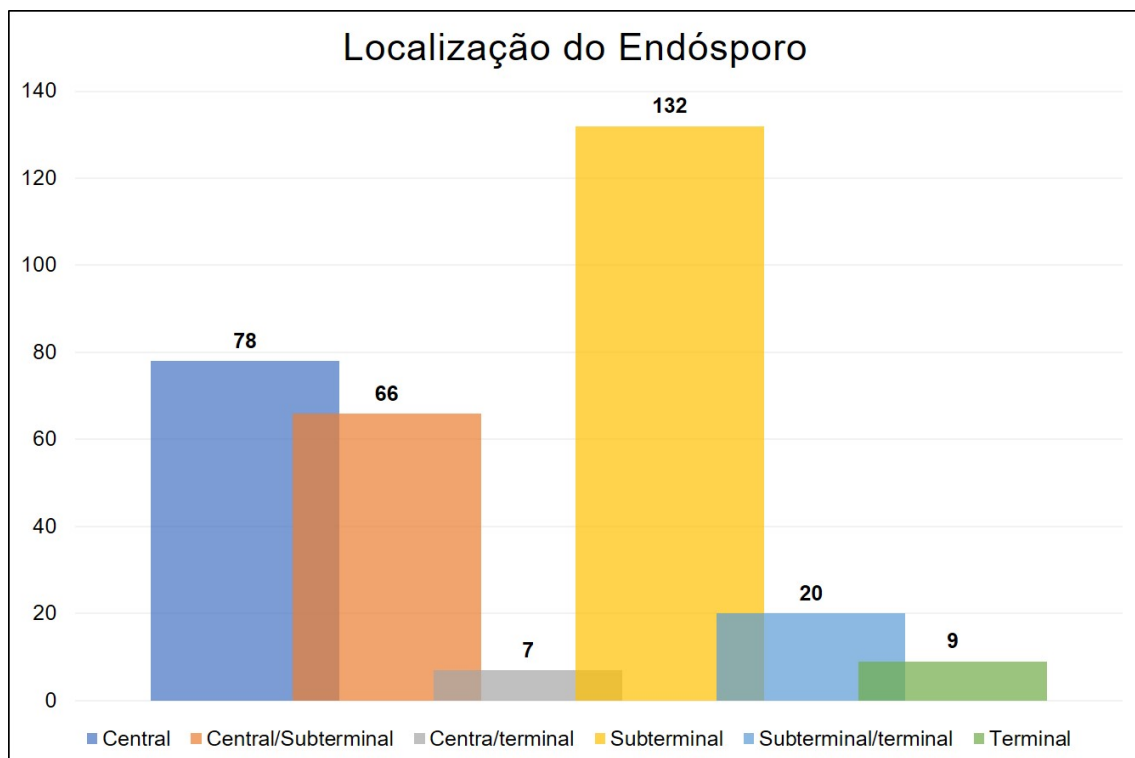


Figura 8. Localização predominante do endósporo. Distribuição dos dados referentes à localização do endósporo observada no exame a fresco.

Em relação à morfologia do endósporo/esporo (Figura 9), observou-se o predomínio da forma esférica (41%), seguida da forma cilíndrica (34%). Além disto, observou-se o predomínio de esporângios não deformados (84%; Figura 10) e de células móveis. Vale ressaltar que não foi realizado o teste de motilidade em meio específico, apenas observou no exame a fresco se as células apresentavam ou não movimento flagelar típico. Todos os dados referentes ao exame à fresco encontram-se na tabela 3. Um demonstrativo das principais morfologias encontradas na CBafes encontra-se representadas na Figura 11.

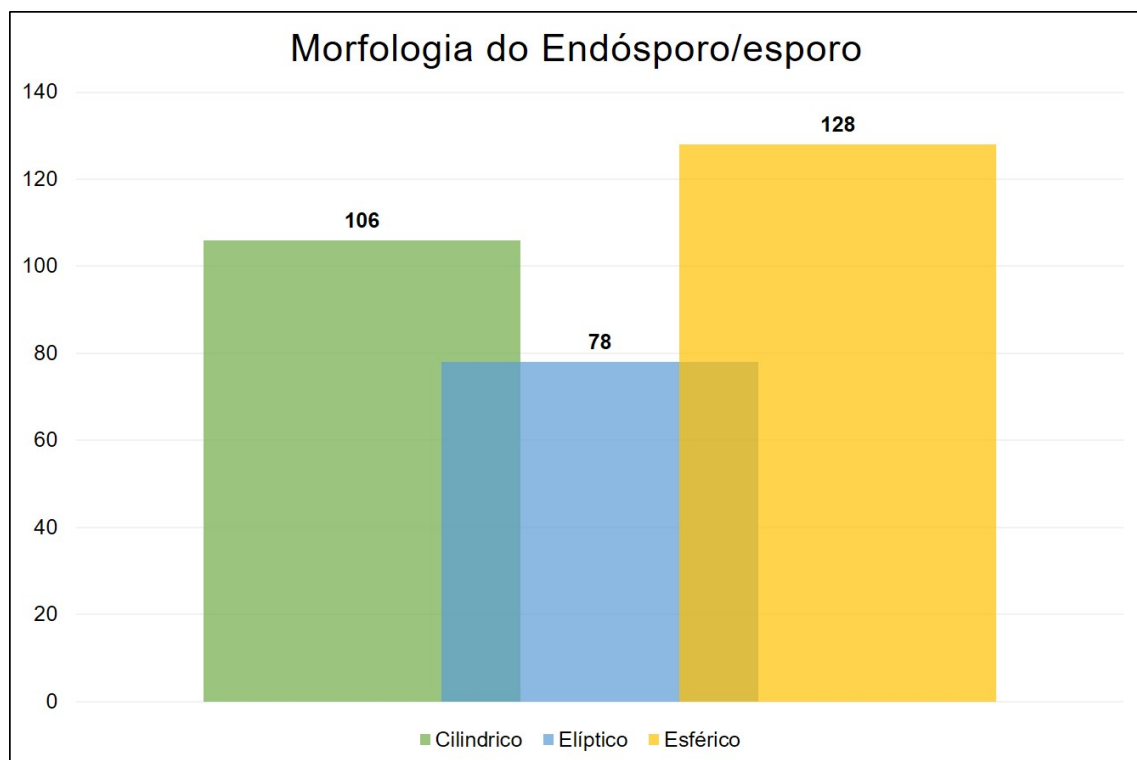


Figura 9. Morfologia do endósporo/esporo. Distribuição dos dados referentes à morfologia do endósporo/esporo observada no exame a fresco.

c) Coloração de Gram: como esperado, a maioria das células respondeu de forma positiva a coloração de Gram (93%) e os 7% restante responderam como Gram negativas/variáveis (Figura 9). Esses resultados foram confirmados pelo teste de Ryu (1938). No método de Ryu, foi adicionada uma gota de KOH a 3% a uma porção de colônia bacteriana em uma lâmina de microscopia. Para a avaliação, observou-se a viscosidade desta mistura: suspensão de bactérias Gram negativas tornam-se viscosas ao contato com esse hidróxido, em decorrência de extravasamento de conteúdo citoplasmático. Geralmente, em Gram positivas nenhuma mudança visível ocorre nessa mistura, mas em alguns casos observa-se a formação de grumos (Ryu, 1938).

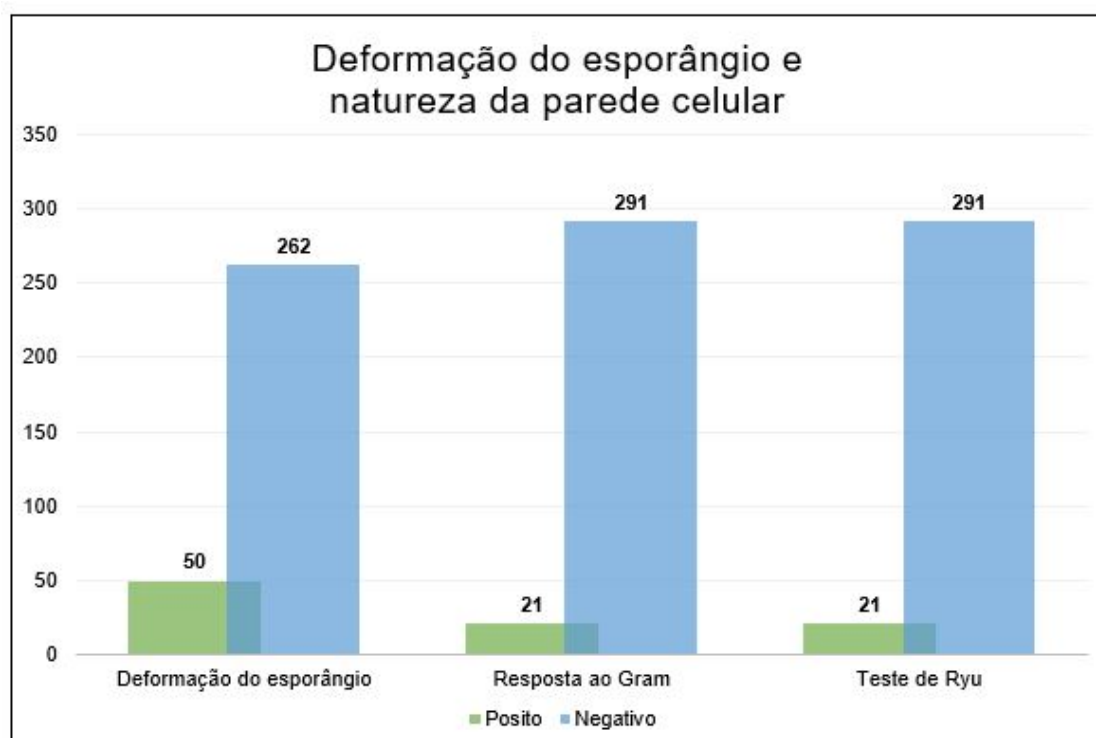


Figura 10. Características fenotípicas de linhagens SDF. Os dados mostram o número de linhagens referentes à deformação do esporângio, resposta à coloração de Gram e ao teste de Ryu das 312 linhagens SDF que compoem o acervo atual da CBafes.

A presença de células Gram variáveis, não é surpreendente, pois, apesar da maioria das Bafes ser Gram positiva, já foram descritas algumas espécies Gram variáveis, como espécies de *Paenibacillus* (Shida *et al.*, 1996). Os dados gerais obtidos pela coloração de Gram encontram-se dispostos na Tabela 3.

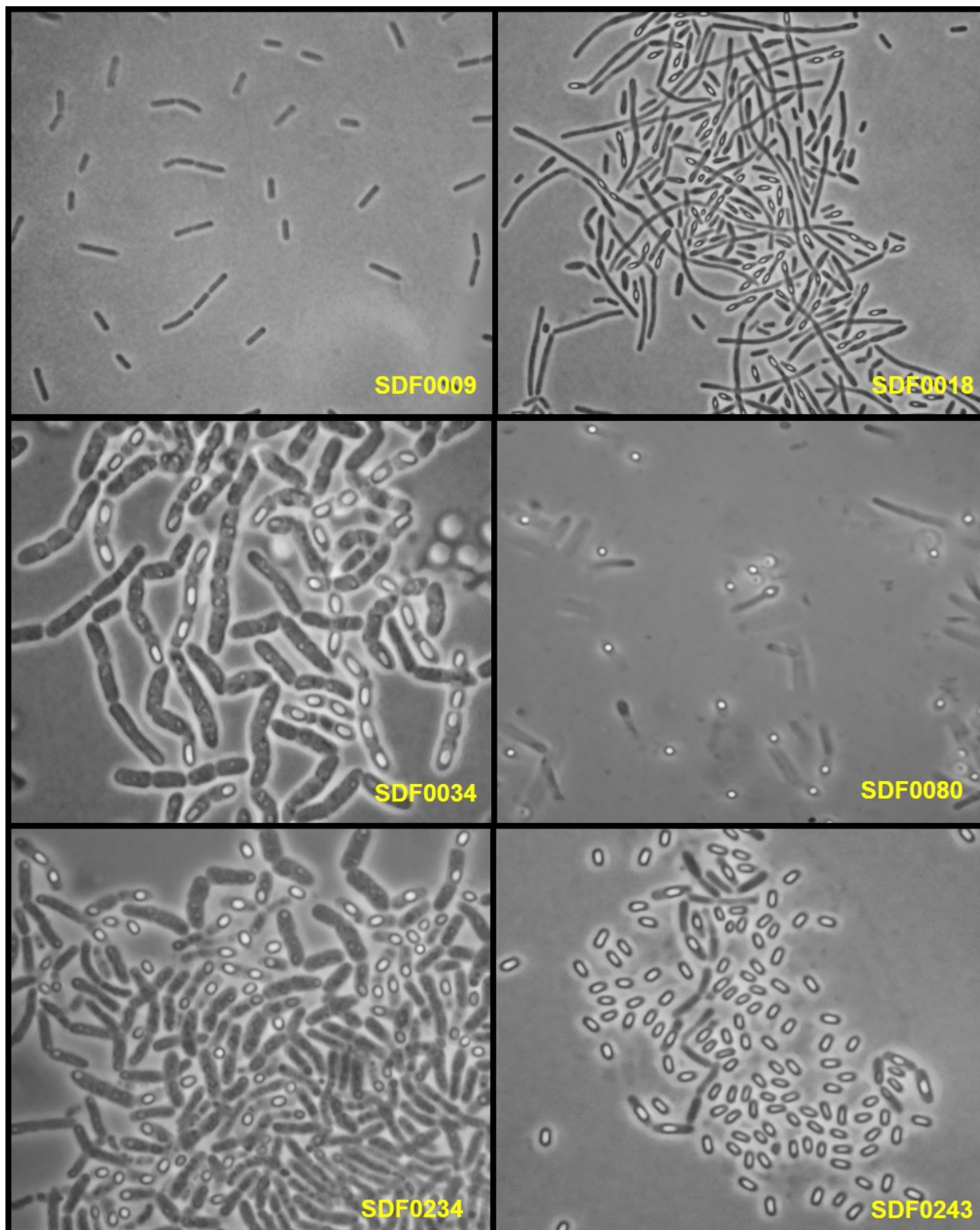


Figura 11. Demonstrativo das principais morfologias observadas pelo exame a fresco. **SDF0009** observa-se a presença de bastonetes isolados, aos pares e em pequenas cadeias; **SDF0018** observa-se a presença de endósporo elíptico, subterminal e deformante; **SDF0034** observa-se a presença de endósporos cilíndricos, subterminais não deformantes; **SDF0080** apresenta endósporo esférico, subterminal e deformante; **SDF0234** apresenta endósporos esféricos, subterminais/terminais que não deformam o esporângio; **SDF0243** observa-se a presença de endósporo cilíndrico, centra/subterminal e não deformante.

Tabela 3. Características fenotípicas de linhagens SDF. Dados gerais do exame à fresco, resposta a coloração de Gram e teste de Ruy de 312 linhagens SDF do acervo da CBafes.

SDF	Localização do endósporo	Morfologia do endósporo	Deformação esporângio	Motilidade	Resposta ao Gram	Teste de Ryu
0001	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0002	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0003	Central	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0004	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0005	Central/terminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0006	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0007	Terminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0008	Subterminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0009	Central/Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0010	Subterminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0011	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0012	Subterminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0013	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0014	subterminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0015	Subterminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0016	Central/Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0017	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0018	Subterminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0019	Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0020	Central	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0021	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0022	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0023	Subterminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0024	Central/Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0025	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0026	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0027	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0028	Subterminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0029	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0030	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0031	Subterminal/terminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0032	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0033	Central/terminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0034	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0035	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0036	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0037	Subterminal/terminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0038	Terminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0039	Terminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0040	Subterminal/terminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0041	terminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0042	Central/terminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0043	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo

SDF	Localização do endósporo	Morfologia do endósporo	Deformação esporângio	Motilidade	Resposta ao Gram	Teste de Ryu
0044	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0045	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0046	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0047	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0048	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0049	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0050	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0051	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0052	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0053	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0054	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0055	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0056	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0057	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0058	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0059	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0060	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0061	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0062	terminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0063	Central/terminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0064	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0065	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0066	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0067	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0068	Central/Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0069	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0070	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0071	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0072	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0073	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0074	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0075	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0076	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0077	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0078	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0079	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0080	Subterminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0081	Subterminal/terminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0082	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0083	Central/terminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0084	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0085	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0086	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0087	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0088	Subterminal/terminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo

SDF	Localização do endósporo	Morfologia do endósporo	Deformação esporângio	Motilidade	Resposta ao Gram	Teste de Ryu
0089	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0090	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0091	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0092	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0093	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0094	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0095	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0096	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0097	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0098	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0099	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0100	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0101	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0102	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0103	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0104	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0105	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0106	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0107	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0108	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0109	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0110	Central/Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0111	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0112	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0113	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0114	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0115	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0116	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0117	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0118	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0119	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0120	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0121	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0122	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0123	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0124	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0125	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0126	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0127	Central/Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0128	Central	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0129	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0130	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0131	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0132	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0133	Subterminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo

SDF	Localização do endósporo	Morfologia do endósporo	Deformação esporângio	Motilidade	Resposta ao Gram	Teste de Ryu
0134	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0135	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0136	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0137	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0138	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0139	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0140	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0141	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0142	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0143	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0144	Central/Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0145	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0146	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0147	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0148	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0149	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0150	Central/Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0151	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0152	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0153	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0154	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0155	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0156	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0157	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0158	Subterminal/terminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0159	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0160	Central/Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0161	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0162	Terminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0163	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0164	Subterminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0165	Terminal/Subterminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0166	Terminal/Subterminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0167	Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0168	Subterminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0169	Central	Esférico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0170	Terminal/Subterminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0171	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0172	Terminal/Subterminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0173	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0174	Terminal/Subterminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0175	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0176	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0177	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0178	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo

SDF	Localização do endósporo	Morfologia do endósporo	Deformação esporângio	Motilidade	Resposta ao Gram	Teste de Ryu
0179	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0180	Terminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0181	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0182	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0183	Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0184	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0185	Terminal/Subterminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0186	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0187	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0188	Subterminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0189	Terminal/Subterminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0190	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0191	Subterminal	Elíptico	Positiva	Negativa	Gram positivo	Gram positivo
0192	Central/Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0193	Central/Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0194	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0195	Central	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0196	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0197	Central	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0198	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0199	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0200	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0201	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0202	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0203	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0204	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0205	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0206	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0207	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0208	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0209	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0210	Terminal/Subterminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0211	Central/Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0212	Subterminal/Terminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram negativo
0213	Subterminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram negativo
0214	Subterminal/Terminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0215	Subterminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram negativo
0216	Central/Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0217	Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0218	Central/Subterminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0219	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0220	Central	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0221	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0222	Terminal/Subterminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0223	Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo

SDF	Localização do endósporo	Morfologia do endósporo	Deformação esporângio	Motilidade	Resposta ao Gram	Teste de Ryu
0224	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0225	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0226	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0227	Subterminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0228	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0229	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0230	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0231	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0232	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0233	Subterminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0234	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0235	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0236	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0237	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0238	Terminal/Subterminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0239	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0240	Terminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0241	Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0242	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0243	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0244	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0245	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0246	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0247	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0248	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0249	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0250	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0251	Terminal/Subterminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0252	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0253	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0254	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0255	Terminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0256	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0257	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0258	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0259	Subterminal/Terminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0260	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0261	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0262	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0263	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0264	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0265	Subterminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram variável	Gram negativo
0266	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0267	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0268	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo

SDF	Localização do endósporo	Morfologia do endósporo	Deformação esporângio	Motilidade	Resposta ao Gram	Teste de Ryu
0269	Central/Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0270	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0271	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0272	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0273	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0274	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0275	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0276	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0277	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0278	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0279	Central/Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0280	Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0281	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0282	Central	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0283	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0284	Central/terminal	Esférico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0285	Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0286	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0287	Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0288	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0289	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0290	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0291	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0292	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0293	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0294	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0295	Central	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0296	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0297	Subterminal	Elíptico	Positiva	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0298	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0299	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0300	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0301	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0302	Subterminal	Elíptico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0303	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0304	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0305	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0306	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0307	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0308	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0309	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0310	Central	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0311	Central/Subterminal	Esférico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo
0312	Subterminal	Cilíndrico	Negativa	Positiva	Gram positivo	Gram positivo

4.3 – MALDI-TOF MS e sequenciamento do gene rRNA 16S

Protein profiling as a tool for identifying environmental aerobic endospore-forming bacteria

As bactérias aeróbias formadoras de endósporos (Bafes) apresentam espécies do gênero *Bacillus* e gêneros relacionados, localizadas no filo *Firmicutes*. As Bafes são amplamente distribuídas nos ambientes naturais, sendo o solo seu principal repositório. O MALDI-TOF MS é uma ferramenta amplamente utilizada em análises bacterianas devido ao seu potencial em produzir padrões espectrais relativamente simples e reprodutíveis, resultando em informações específicas que são úteis para identificar espécies bacterianas. Isso é feito comparando os espectros obtidos com as bibliotecas disponíveis depositadas em bancos de dados comerciais. Neste trabalho, avaliamos a eficácia da MALDI-TOF MS na identificação de 64 amostras de Bafes isoladas a partir de amostras de solo do Distrito Federal, citadas neste estudo como linhagens SDF (Solo do Distrito Federal). Para comparar a classificação das linhagens SDF por MALDI-TOF MS, a identificação baseada em sequências consensos parciais de genes rRNA 16S foi realizada em paralelo. MALDI-TOF MS identificou 31 linhagens em nível de espécie, enquanto as sequências do gene rRNA 16S apresentaram indicativo de espécies em 60 linhagens. Entre as linhagens identificadas em nível da espécie, apenas 19 apresentaram a mesma identificação pelas duas técnicas. Este trabalho reforça a necessidade da criação de bancos de dados de espectros de massa de livre acesso, incluindo amostras ambientais, e enfatiza a importância da caracterização polifásica, aplicando as duas técnicas de forma complementar.

O trabalho a seguir apresenta os dados da identificação de 64 linhagens SDF realizados por MALDI-TOF MS e a comparação dos resultados com os dados da identificação por rRNA 16S. Neste artigo destacam-se as limitações da técnica e reforça a necessidade da abordagem polifásica na identificação de Bafes

Protein profiling as a tool for identifying environmental aerobic endospore-forming bacteria

Paulo Henrique R. Martins^a, ph.biomedicina@gmail.com;
Luciano Paulino da Silva^b, lucianopaulinosilva@gmail.com;
Juliana Capella de Orema, jucorem@gmail.com;
Maria Inês A. de Magalhães^a, miamagalhaes@gmail.com;
Danilo de Andrade Cavalcante^a, danilo.ac9@gmail.com;
and Marlene Teixeira De-Souza[#], marlts@unb.br

^aUniversity of Brasilia, Department of Cellular Biology, Campus Universitário Darcy Ribeiro; Brasilia, DF, Brazil. Zip code: 70.910-900

^bEmbrapa Genetic Resources and Biotechnology, Caixa Postal 02372, Brasilia, DF, Brazil.

Zip code: 70.770-917

#Corresponding author

Address: Universidade de Brasília; IB/Departamento de Biologia Celular; Campus Universitário Darcy Ribeiro; 70.910-900 - Brasília - DF - Brazil.

Telephone: +55 61 3107-3044

e-mail: marlts@unb.br

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1538-2657>

Running title: Aerobic endospore-forming bacteria identification

ABSTRACT

Aerobic endospore-forming bacteria (AEFB) are both taxonomically and physiologically diverse group comprising species of genus *Bacillus* and related genera. The usefulness of a great number and risk of others make the demarcation of species in industrially and medically important strains essential. MALDI-TOF MS is widely used in bacterial analyses because of its potential to produce simple and reproducible spectral patterns, which are compared to spectra deposited in commercial databases, mainly composed of clinical isolates. In this work, we evaluated the efficacy of MALDI-TOF MS to identify 64 AEFB strains isolated from Brazilian soils, quoted here as SDF (Solo do Distrito Federal). To further assist the classification of the SDF strains identification based on sequences of 16S rRNA gene were performed in parallel. MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequences identified 31 (48.43%) and 60 (93.75%) strains at the species level, respectively. Among those identified at the species level, 19 (29.68%) presented the same identification by both technics. However, other 10 predictions revealed by 16S rRNA gene sequences could indicate two or more species alternatives within the same affiliation group and thus could match the same classification obtained by MALDI-TOF MS. Although the discriminatory powers of both methods at the species level are low, our results show that MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequences are both useful to classify AEFB in a complementary way. This work also reinforces the need to generate free databases built from mass spectra, including environmental samples, and emphasizes the importance of the polyphasic characterization.

Keywords: *Bacillales*; taxonomy; polyphasic characterization; MALDI-TOF MS; 16S rRNA gene; environmental bacteria.

Introduction

Species of the genus *Bacillus* and related genera are collectively designated aerobic endospore-forming bacteria (AEFB). Inside the phylum Firmicutes, these species are allocated in the class Bacilli, order Bacillales which contains seven out of ten families harbouring endospore-formers: Alicyclobacillaceae, Bacillaceae, Paenibacillaceae, Pasteuriaceae, Planococcaceae, Sporolactobacillaceae, and Thermoactinomycetacea (Galperin, 2013; Logan *et al.*, 2009). AEFB are widely distributed in natural environments, including extreme ones, and the soil is considered their main repository (Logan & Halket, 2011). Two species are known for infecting humans (*B. anthracis* and *B. cereus*). However, the biological potential of AEFB span from degradation of pollutants through a high diversity of hydrolytic enzymes, plant growth promoters, nitrogen fixation, biocontrol activity toward insects, nematodes and fungi, among other bioproducts (Logan & Halket, 2011).

The high level of physiological and genetic diversities of AEFB make the demarcation of genus and species borders a very difficult task (Fritze, 2004; Galperin, 2013; Garrity, Bell, Lilburn, & Lansing, 2004; Logan *et al.*, 2009). Currently, 16S rRNA gene sequences are used to assign taxa in a phylogenetic tree and draw the largest frontiers in the prokaryotic classification system. However, phenotypic consistency is necessary to generate useful characterization (Maughan & Van der Auwera, 2011; Vandamme *et al.*, 1996). Thus, phenotype can influence the depth of a hierarchical line (Cobb, DeClerck, Greenberg, Clark, & McCouch, 2013; Wayne, 1988). The scarceness of phenotypic characteristic descriptions in the literature often causes problems in describing or differentiating taxa, especially bacterial groups, such as endospore-formers (Maughan & Van der Auwera, 2011; Vandamme *et al.*, 1996).

Among the phenotype-based methods for the identification of microorganisms, the use of the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has dramatically increased (AIMasoud, Xu, Nicolaou, & Goodacre, 2014; Cherkaoui *et al.*, 2010). This technic is based on fingerprint analyses of relatively large biomolecules, including ribosomal proteins. MALDI-TOF MS does not require long biochemical reactions and is also faster than other conventional bacterial phenotypic identification methods. During the last decade, clinical laboratories have been successfully using MALDI-TOF MS in order to identify

microorganisms at the species level (Wieser, Schneider, Jung, & Schubert, 2012). Apart from the application in clinical specimens and taxonomy, MALDI-TOF MS is also indicated for environmental samples analysis (Dickinson *et al.*, 2004; Dieckmann, Graeber, Kaesler, Szewzyk, & Von Döhren, 2005; Emami *et al.*, 2012; Ruelle, El Moualij, Zorzi, Ledent, & De Pauw, 2004; Santos, Hildenbrand, & Schug, 2016), and food-associated microorganisms (Barreiro *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2013; Salaün *et al.*, 2010).

Identification of microorganisms from environmental sources is necessary to understand microbial communities, to monitor the environment, to detect possible pathogens, besides increasing the possibility of finding novel bioproducts (Santos *et al.*, 2016). Moreover, in many environments the proportion of unknown bacteria is very high making the characterization of these species a significant challenge.

To learn more about the diversity of AEFB, we previously isolated strains from soil samples collected from random areas in Distrito Federal, Midwest region of Brazil (Cavalcante *et al.*, 2019). These environmental bacteria were designated SDF strains and are deposited in the Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos (CBafes, or AEFB Collection). The CBafes is hosted at University of Brasilia, Brazil, and has been inspected by a polyphasic approach for taxonomic classification. This work evaluated the efficiency of the protein profiles generated by MALDI-TOF MS to identify 64 SDF strains and compared the resulting identification to that achieved using 16S rRNA gene sequences.

MATERIAL AND METHODS

SDF strains. Soil samples and SDF strains isolation were described in Cavalcante *et al.* (2019). The 64 SDF strains used in this work (Table 1) are deposited at the CBafes, hosted at the University of Brasilia, Brazil.

Ethics statement. Specific permissions required for collection of bacterial strains used in this study were endorsed by the Federal Brazilian authority (CNPq; Authorization of Access and Sample of Genetic Patrimony nº 010439/2015-3). Sampling did not involve endangered or protected species.

MALDI-TOF MS. Using a 10 µL plastic loop, cells from 4 single colonies per SDF strain (Table 1), cultured in solid Luria-Bertani (28 °C/24-48 h), were transferred to 4 microtubes containing 300 µL of ultra-pure water (Mille-Q™), resulting in 4 different extractions and 4 different measurements for each strain. After vortex

stirring, 900 μL of 100% ethanol was added, the suspension stirred again, and centrifuged at 12,000 $\times g$ for 2 min. Air-dried pellets were resuspended in 30 μL of 70% formic acid and acetonitrile in the ratio of 1:1 (v/v). The final mixture was stirred and centrifuged at 12,000 $\times g$ for 2 min, and 1 μL of the supernatants was transferred to a spot onto a 96-well stainless steel MALDI target plate. The matrix, prepared in an organic solvent mixture to a final concentration of 10 mg mL^{-1} in a 50:40:10 acetonitrile:water:3% trifluoroacetic acid (TFA) ration solution, was overlaid and allowed to dry. Each sample was spotted for times. The mass spectra for the SDF strains were acquired (MicroFlex mass spectrometer; Bruker Daltonics, Bremen, Germany) at Embrapa Mass Spectrometry Laboratory (Brasilia, DF, Brazil). The spectra were recorded in the linear positive mode at a laser frequency of 60 Hz within a mass range from m/z 2,000 to 20,000. For each spectrum, 240 laser shots in 40-shot steps from different positions of the target spot were collected and analysed. Spectra were externally calibrated employing *Escherichia coli* rProteins (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). SDF strains spectra were loaded with the MALDI Biotyper software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and analysed using the standard pattern-match algorithm, which compared the spectrum acquired to all inputs present in the manufacture library. The results of the pattern-matching process were expressed as log values ranging from 0 to 3.000, according to the manufacture instructions: score values of >1.700 and of >2.000 indicate identification at the genus and species levels, respectively, and scores of <1.700 is interpreted as no identification.

Consensus sequences of 16S rRNA genes of SDF strains and taxonomic assignments. Total DNA preparation, PCR amplification, sequencing and sequences analyses were performed as described in Orem *et al.*, (2019).

RESULTS

Using MALDI-TOF MS we generated spectra from 64 samples, randomly selected among strains SDF0001-SDF0154 that we previously isolated from Brazilian soil. The predictive relationship of protein profiling obtained was further compared with identification based on 16S rRNA gene sequences.

The 64 spectra acquired by Bruker Daltonics brand MALDI-TOF mass spectrometer (MicroFlex model) and analysed with the FlexAnalysis 3.3 and MALDI-Biotyper 3.0 programs (Bruker Daltonics), revealed that 31 (48.43%) SDF strains

presented log score values ≥ 2.000 , which indicates species-level identification (Table 1). For the remaining 33 (51.56%), the score ranged from 1.700 to 1.999, thus identifying these SDF strains at genus level (Table 1). Genus *Bacillus* was predominant comprising 60 (93.75%) strains, while the other 4 (6.25%) were distributed among genera *Brevibacillus* (2), *Paenibacillus* (1), and *Lysinibacillus* (1).

Considering similarity $\geq 97\%$ and 95-96% as the threshold value for identification at the species and genus levels, respectively (Schloss & Handelsman, 2005), the 16S rRNA gene sequences analyses classified 60 (93.75%) SDF strains at species level and 4 (6.25%) at genus level (Table 1). This technic failed to identify strains SDF0108 and SDF0139, even at genus level, since the similarity in both cases was 94% (Table 1). Similarly, for the identification attained by MALDI-TOF MS, there was a predominance of genus *Bacillus* (58 strains; 90.62%). Additional genera identified (Table 1) were *Lysinibacillus* (2 strains; 3.12%), *Paenibacillus* (2 or 3.12%), *Brevibacillus* (1 or 1.56%), and *Rummeliibacillus* (1 or 1.56%).

When comparing the results of identification at species level obtained by both technics, it was observed that among the 31 SDF strains identified by MALDI-TOF MS (Table 1), 19 (61.29%) presented 16S rRNA gene sequence similarity $\geq 97\%$, therefore, being also characterized at species level (highlighted in red). For strains identified at the species level by MALDI-TOF MS, a total of 2 strains (6.45%) presented similarity $< 97\%$, therefore, were identified only at the genus level by 16S rRNA gene sequence (highlighted in black). Moreover, 10 out of 64 (15.62%) strains identified at the species level by both methods were classified as different species (highlighted in blue).

From the 33 SDF strains that were identified at the genus level by MALDI-TOF MS (Table 1), 30 (90.90%) were also allocated in the same genus when analysed by 16S rRNA gene sequences (highlighted in purple). The remainder (3 or 9.09%) presented different genera (highlighted in green). In addition, among these 33 SDF strains, 16S rRNA gene sequence-based analysis failed to identify 2 (6.06%) strains at the species level (Table 1). One was identified as a *Bacillus* sp. (SDF0139) by both technics. The second (SDF0066) were assigned to two different genera: *Bacillus* (score 1.915) by MALDI-TOF MS and *Rummeliibacillus* (96% similarity) by 16S rRNA gene sequence.

Table 1. Identification of 64 SDF strains by MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequence analyses

SDF strain	Bruker Biotyper MALDI TOF MS		16S rRNA sequencing	
	Species (best match)	Score value	Species (% of identify)	Accession no*.
0005	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2.079	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (98)	MH356291
0006	<i>Bacillus cereus</i>	2.203	<i>Bacillus cereus</i> (98)	MH356292
0014	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	2.209	<i>Brevibacillus borstelensis</i> (96)	MH356299
0015	<i>Bacillus oleronius</i>	2.155	<i>Bacillus oleronius</i> (99)	MH356300
0016	<i>Bacillus spp.</i>	1.868	<i>Bacillus simplex</i> (98)	MH356301
0029	<i>Bacillus megaterium</i>	2.252	<i>Bacillus aryabbathai</i> (99)	MH356310
0030	<i>Bacillus cereus</i>	2.028	<i>Bacillus thuringiensis</i> (99)	MH356311
0043	<i>Bacillus pumilus</i>	1.911	<i>Bacillus safensis</i> (98)	MH356317
0050	<i>Bacillus megaterium</i>	2.258	<i>Bacillus megaterium</i> (98)	MH356322
0051	<i>Bacillus megaterium</i>	1.982	<i>Bacillus megaterium</i> (99)	MH356323
0053	<i>Bacillus cereus</i>	1.915	<i>Bacillus toyonensis</i> (98)	MH356325
0055	<i>Bacillus megaterium</i>	2.218	<i>Bacillus aryabbathai</i> (98)	MH356327
0056	<i>Bacillus megaterium</i>	2.335	<i>Bacillus megaterium</i> (99)	MH356328
0057	<i>Bacillus megaterium</i>	2.198	<i>Bacillus megaterium</i> (98)	MH356329
0058	<i>Bacillus megaterium</i>	2.036	<i>Bacillus megaterium</i> (98)	MH569349
0061	<i>Bacillus cereus</i>	1.913	<i>Bacillus thuringiensis</i> (99)	MH356331
0063	<i>Brevibacillus formosus</i>	1.871	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> (99)	MH356333
0064	<i>Bacillus megaterium</i>	2.273	<i>Bacillus megaterium</i> (98)	MH356334
0065	<i>Bacillus megaterium</i>	2.163	<i>Bacillus aryabbathai</i> (98)	MH356335
0066	<i>Bacillus simplex</i>	1.915	<i>Rummeliibacillus pycnus</i> (96)	MH356336
0068	<i>Bacillus simplex</i>	1.960	<i>Bacillus simplex</i> (100)	MH356337
0069	<i>Bacillus megaterium</i>	2.234	<i>Bacillus megaterium</i> (99)	MH356338
0072	<i>Bacillus megaterium</i>	2.24	<i>Bacillus megaterium</i> (99)	MH569350
0074	<i>Bacillus megaterium</i>	2.159	<i>Bacillus megaterium</i> (99)	MH356341
0075	<i>Bacillus simplex</i>	2.004	<i>Bacillus simplex</i> (99)	MH356342
0076	<i>Bacillus megaterium</i>	2.064	<i>Bacillus megaterium</i> (99)	MH356343
0078	<i>Bacillus megaterium</i>	2.047	<i>Bacillus megaterium</i> (99)	MH356344
0080	<i>Paenibacillus alvei</i>	1.857	<i>Paenibacillus alvei</i> (99)	MH356346
0082	<i>Bacillus megaterium</i>	2.221	<i>Bacillus aryabbathai</i> (99)	MH356347
0086	<i>Bacillus megaterium</i>	2.183	<i>Bacillus aryabbathai</i> (98)	MH356349
0089	<i>Bacillus cereus</i>	2.100	<i>Bacillus anthracis</i> (100)	MH356351
0094	<i>Bacillus megaterium</i>	2.091	<i>Bacillus megaterium</i> (98)	MH356355
0095	<i>Bacillus megaterium</i>	2.227	<i>Bacillus megaterium</i> (100)	MH356356

0096	<i>Bacillus megaterium</i>	2.243	<i>Bacillus megaterium</i> (100)	MH356357
0097	<i>Bacillus megaterium</i>	2.266	<i>Bacillus megaterium</i> (98)	MH356358
0098	<i>Bacillus megaterium</i>	2.053	<i>Bacillus safensis</i> (98)	MH356359
0099	<i>Bacillus megaterium</i>	1.944	<i>Bacillus megaterium</i> (97)	MH356360
0103	<i>Bacillus pumilus</i>	1.886	<i>Bacillus safensis</i> (98)	MH356362
0108	<i>Bacillus pumilus</i>	2.023	<i>Bacillus pumilus</i> (94)	MH569355
0110	<i>Bacillus pumilus</i>	2.043	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (100)	MH356366
0112	<i>Bacillus pumilus</i>	1.729	<i>Bacillus pumilus</i> (100)	MH356367
0113	<i>Bacillus pumilus</i>	1.830	<i>Bacillus pumilus</i> (100)	MH569356
0114	<i>Bacillus altitudinis</i>	1.762	<i>Bacillus pumilus</i> (98)	MH569357
0115	<i>Bacillus pumilus</i>	1.945	<i>Bacillus pumilus</i> (99)	MH356368
0117	<i>Bacillus pumilus</i>	2.018	<i>Bacillus altitudinis</i> (99)	MH356369
0118	<i>Bacillus altitudinis</i>	1.845	<i>Bacillus megaterium</i> (99)	MH356370
0119	<i>Bacillus cereus</i>	2.152	<i>Bacillus cereus</i> (100)	MH356371
0120	<i>Bacillus altitudinis</i>	1.822	<i>Bacillus pumilus</i> (100)	MH356372
0121	<i>Bacillus safensis</i>	1.796	<i>Bacillus pumilus</i> (100)	MH356373
0123	<i>Bacillus pumilus</i>	1.744	<i>Bacillus pumilus</i> (100)	MH356375
0126	<i>Bacillus pumilus</i>	1.927	<i>Bacillus pumilus</i> (100)	MH356377
0127	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1.719	<i>Bacillus siamensis</i> (98)	MH356378
0130	<i>Bacillus safensis</i>	1.836	<i>Bacillus pumilus</i> (99)	MH356380
0132	<i>Bacillus altitudinis</i>	1.742	<i>Bacillus pumilus</i> (99)	MH356382
0133	<i>Bacillus pumilus</i>	1.760	<i>Paenibacillus alvei</i> (99)	MH356383
0135	<i>Bacillus pumilus</i>	1.815	<i>Bacillus pumilus</i> (100)	MH356385
0136	<i>Bacillus pumilus</i>	1.771	<i>Bacillus pumilus</i> (99)	MH356386
0139	<i>Bacillus pumilus</i>	1.765	<i>Bacillus pumilus</i> (94)	MH569360
0145	<i>Bacillus pumilus</i>	1.799	<i>Bacillus pumilus</i> (99)	MH356393
0146	<i>Bacillus pumilus</i>	1.713	<i>Bacillus pumilus</i> (98)	MH356394
0147	<i>Bacillus altitudinis</i>	1.766	<i>Bacillus safensis</i> (98)	MH356395
0152	<i>Bacillus pumilus</i>	1.779	<i>Bacillus pumilus</i> (99)	MH356400
0153	<i>Bacillus pumilus</i>	1.993	<i>Bacillus altitudinis</i> (99)	MH569362
0154	<i>Bacillus pumilus</i>	1.851	<i>Bacillus pumilus</i> (99)	MH569363

*NCBI. Strains highlighted in: black are those identified at species-level by MALDI-TOF MS; in red represent those identified as the same species by both technics; in blue were identified as different species in each technic; in purple are those that were identified at the genus level by both technics; in green were identified at genus level by MALDI-TOF MS and presented the genus divergence when compared to identification based on 16S rDNA sequence.

DISCUSSION

Identification by MALDI-TOF MS. Several studies using MALDI-TOF MS for identifying species allocated into the genus *Bacillus* and related genera (or AEFB)

from clinical source are often reported. Due to the importance in health, those concerning *B. anthracis* (Castanha, Fox, & Fox, 2006; Dybwad, van Der Laaken, Blatny, & Paauw, 2013; Jeong, Lee, & Kim, 2013; Lasch et al., 2009) along with *B. cereus* (Fernández-No et al., 2013; Fiedoruk et al., 2016; Ryzhov, Hathout, & Fenselau, 2000) prevail. Aside from these two species, studies involving *B. pumilus* (Branquinho, Sousa, et al., 2014; Dickinson et al., 2004) and members of genera such as *Lysinibacillus* (Wenzler, Kamboj, & Balada-Llasat, 2015); *Paenibacillus* (Celandroni et al., 2016; Schäfer et al., 2014); *Brevibacillus* (AlMasoud et al., 2014, 2016), among others, have been also reported.

Species assignments based on database held by manufacturer of MALDI-TOF mass spectrometer can become inefficient for the identification of several environmental isolates (Emami et al., 2012; Lovecka et al., 2015). Probably because most protein spectra deposited in the databases is biased towards clinical organisms (Santos et al., 2016; Wieser et al., 2012) and may result in the lack of information on environmental samples. In addition to the few reference spectra, other limitations for this technic are the deposition of incomplete mass spectra, and the poor discrimination of closely related species spectra (Opota, Prod'hom, & Greub, 2016; Romo et al., 2010). Moreover, since the existing repositories are kept private, and expensive access fees are required, the access to databases also restricts the use of this technic (Böhme et al., 2013).

Considering that in the present study less than 50% of the tested strains were identified at the species level using MALDI-TOF MS, results showed in table 1 corroborate the importance of the creation of public libraries established using environmental, besides to the clinical samples. Thus, a publically available standardized database of MALDI-TOF MS profiles would enable the usage of this phenotypic tool for differentiating species of bacteria at molecular level.

Beyond the lack of database information, non-standardized or poorly executed protocols can interfere with the quality of MALDI-TOF MS analyses. Therefore, factors such as culture conditions involving medium composition, incubation time, and temperature (Rajakaruna et al., 2009; Salaün et al., 2010; Valentine, Wunschel, Wunschel, Petersen, & Wahl, 2005), sample preparation and peptide extraction (Trimpin, Rouhanipour, Az, Räder, & Müllen, 2001; Wang, Russon, Li, Roser, & Long, 1998), as well as the matrix used in the analyses (Cohen & Chait, 1996; Toh-

Boyo & Basile, 2012; Yao, Scott, Young, & Wilkins, 1998) are critical to accomplish the goals.

Phenotypic versus genotypic identification of SDF strains. The identification and phylogeny based on 16S rRNA gene sequences is accepted as the reference method for taxonomic assignment of prokaryotic species (Maughan & Van der Auwera, 2011). However, when used for differentiation of closely related species, this technic may present limitations. Thus, this molecular marker alone cannot provide an efficient differentiation (Maughan & Van der Auwera, 2011; Mellmann *et al.*, 2009).

Some groups of *Bacillus* species have tremendously large conserved regions of 16S rRNA gene sequences that appear indistinguishable based on this marker. Inside the *B. pumilus* group, *B. pumilus sensu stricto/safensis/altitudinis/amyloliquefaciens* share 99-100% of similarity (Alina, Constantinescu, & Petruța, 2015). Members of *B. cereus* group share 99.5 to 100% of similarity for their 16S rRNA gene sequences (Ash, Farrow, Dorsch, & Stackebrandt, 1991; Guinebretière *et al.*, 2013; Keim *et al.*, 1997; Petersen, Shishido, Holl, & Chanway, 1995).

Correspondingly, *Bacillus megaterium/aryabhatai* are also among many pairs of distinct taxa of AEFB that bear extreme close evolutionary relationship sharing 99.7% similarity of 16S rRNA sequences (Shivaji *et al.*, 2009).

Our classification based on 16S rRNA gene sequences is a preliminary determination of species. Thus, when 16S rRNA gene profiling placed these strains within these groups, the sample analysed can belong to two or more species alternatives within the same affiliation group. Therefore, in these instances the 16S rRNA gene can only identify these groups of bacteria but cannot assign it accurately to a certain species according to its low discrimination capacity.

In spite of the low discrimination power of closely related species spectra, the protein profiling is a prompt, useful, and sensitive technology to differentiate closely related species of AEFB. Thus, MALDI-TOF MS can be suitable to differentiate the species *B. subtilis sensu stricto* and *B. amyloliquefaciens*, both allocated in the *B. subtilis* rRNA group (Fernández-No *et al.*, 2013). In contrast, identification based on 16S rRNA gene sequences fails to differentiate these species, which present over 99% sequence similarity. Similarly, these authors reported the difficulty in

distinguishing species from *B. cereus* group based on 16S rRNA gene sequences. However, the phyloproteomic analysis based on MALDI-TOF MS spectral profiles allowed the definition of three subgroups within the *B. cereus* group. In these studies, the phyloprotein analysis resulted in a more robust molecular relationship of these species when compared to that obtained using 16S rRNA gene sequences. Likewise, MALDI-TOF MS can be considered an alternative tool in discriminating species belonging to the *B. pumilus* group (Branquinho, Meirinhos-Soares, Carriço, Pintado, & Peixe, 2014; Branquinho, Sousa, *et al.*, 2014; Dickinson *et al.*, 2004; Dickinson *et al.*, 2004). Besides 16S rRNA gene sequences, members of this group share other similar characteristics, such as biochemical and other phenotypic proprieties.

From the 31/64 SDF strains identified at the species level by MALDI-TOF MS (Table 1), 19 (61.29%) were also characterized at species level (highlighted in red) and 2 strains (6.4%) were identified only at the genus level (highlighted in black) by 16S rRNA gene sequences. The remaining 10 strains (highlighted in blue) were identified at the species level by both methods, however classified as different species. Interestingly, in the latter observation the results obtained by both techniques pointed out to a pair of alternative species, as described in the examples above. Five strains (SDF0029, SDF0055, SDF0065, SDF0082, and SDF0086) were classified as *B. megaterium* and *B. aryabathai* by MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequences, respectively. Considering the high genetic similarity between these two species, these observations were not surprising. Furthermore, by the moment of these analyses, there was no representative strain of species *B. aryabhattai* in the Biotyper 3.0 library (Bruker Daltonics). The availability of higher number of *B. megaterium* spectra and library entries belonging to *B. aryabathai* could help discriminating these two species.

Another set of results showed that 33 SDF strains (Table 1) were identified at the genus level by MALDI-TOF MS. While 30 (90.90%) strains were also allocated in the same genus when using 16S rRNA gene sequences (highlighted in purple), 3 (9.09%) presented different genera (highlighted in green). Among these 33 SDF strains, 16S rRNA gene sequence-based analysis failed to identify 2 (6.06%) at the species level. Strain SDF0139 was assigned as a specie of the genus *Bacillus* by MALDI-TOF MS, but 16S rRNA gene sequence presented similarity of 94% and could not be allocated to any genus by this technic. However, the second (SDF0066)

were assigned to two different genera: *Bacillus* (score 1.915) by MALDI-TOF MS and *Rummeliibacillus* (96% similarity) by 16S rRNA gene sequence.

Besides strain SDF0139, identification based on 16S rRNA gene sequences indicated 94% of sequence similarity and also failed to allocate strain SDF0108, even at genus level (Table 1). Though, sometimes the use of 16S rRNA gene sequences as a single marker is not enough to delineate species, low gene sequence similarity may grant the first indication that a novel species has been isolated (Tindall, Rosselló-Móra, Busse, Ludwig, & Kämpfer, 2010). However, description of novel species is beyond the scope of this study.

The results obtained in here demonstrated that both technics used for the identification of SDF stains had good resolution at the genus level. Nevertheless, 16S rRNA gene sequences demonstrated superior capacity in identifying these environmental AEFB strains at the species level when compared with MALDI-TOF MS method. Furthermore, both technics showed a lack of efficiency to discriminate closely related species. Overall sequence similarity values or score ranges can help if comprehensive high-quality reference datasets are available.

Therefore, we emphasize that the two methods are important tools in the identification of AEFB strains, being complementary to each other. Since resolving AEFB isolates into well-defined species is not a simple task, these conclusions also reinforce the need of using phenotypic along with genotypic methods to accomplish classification. Still, this data highlights the importance of polyphasic approaches for taxonomic purposes.

Conclusion

The results obtained in this study demonstrated that the both technics used for identification of SDF stains had good resolution at the genus level. However, 16S rRNA gene sequences demonstrated superior capacity in identifying these AEFB strains at the species level when compared with MALDI-TOF MS method. Furthermore, both technics showed a lack of efficiency to discriminate closely related species. Therefore, we emphasize that the two methods are important tools in the identification of AEFB strains, being complementary to each other. These conclusions also reinforce the need of using phenotypic along with genotypic characteristics to accomplish classification, thus highlighting the importance of polyphasic characterization for taxonomic purpose.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgement

We thank University of Brasilia, and the Brazilian research funding agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

- Alina, S. O., Constantinescu, F., & Petruța, C. C. (2015). Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection. *Romanian Biotechnological Letters*, 20(5), 10737–10750. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>
- AlMasoud, N., Xu, Y., Nicolaou, N., & Goodacre, R. (2014). Optimization of matrix assisted desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) for the characterization of *Bacillus* and *Brevibacillus* species. *Analytica Chimica Acta*, 20;840:49-57. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.06.032>
- AlMasoud, N., Xu, Y., Trivedi, D. K., Salivo, S., Abban, T., Rattray, N. J. W., ... Goodacre, R. (2016). Classification of *Bacillus* and *Brevibacillus* species using rapid analysis of lipids by mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(27), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9890-4>
- Ash, C., Farrow, J. A. E., Dorsch, M., & Stackebrandt, E. (1991). Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(3), 343–346. <https://doi:10.1099/00207713-41-3-343>
- Barreiro, J. R., Ferreira, C. R., Sanvido, G. B., Kostrzewa, M., Maier, T., Wegemann, B., dos Santos, M. V. (2010). Short communication: Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5661-7. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3614>
- Böhme, K., Fernández-No, I. C., Pazos, M., Gallardo, J. M., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., & Calo-Mata, P. (2013). Identification and classification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria: 16S rRNA sequencing versus MALDI-TOF MS fingerprinting. *Electrophoresis*, 34(6), 877-87. <https://doi.org/10.1002/elps.201200532>
- Branquinho, R., Meirinhos-Soares, L., Carriço, J. A., Pintado, M., & Peixe, L. V. (2014). Phylogenetic and clonality analysis of *Bacillus pumilus* isolates uncovered a highly heterogeneous population of different closely related

- species and clones. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(3), 689-98. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12426>
- Branquinho, R., Sousa, C., Lopes, J., Pintado, M. E., Peixe, L. V., & Osório, H. (2014). Differentiation of *Bacillus pumilus* and *Bacillus safensis* Using MALDI-TOF-MS. *PLoS ONE*, 14;9(10), e110127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110127>
- Castanha, E. R., Fox, A., & Fox, K. F. (2006). Rapid discrimination of *Bacillus anthracis* from other members of the *B. cereus* group by mass and sequence of “intact” small acid soluble proteins (SASPs) using mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 67(2), 230-40. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.03.024>
- Celandroni, F., Salvetti, S., Gueye, S. A., Mazzantini, D., Lupetti, A., Senesi, S., & Ghelardi, E. (2016). Identification and pathogenic potential of clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* isolates. *PLoS ONE*, 11(3), e0152831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152831>
- Cherkaoui, A., Hibbs, J., Emonet, S., Tangomo, M., Girard, M., Francois, P., & Schrenzel, J. (2010). Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1169-75. <https://doi.org/10.1128/JCM.01881-09>
- Cobb, J. N., DeClerck, G., Greenberg, A., Clark, R., & McCouch, S. (2013). Next-generation phenotyping: Requirements and strategies for enhancing our understanding of genotype-phenotype relationships and its relevance to crop improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(4), 867-87. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2066-0>
- Cohen, S. L., & Chait, B. T. (1996). Influence of matrix solution condition on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins. *Anal. Chem*, 68(1), 31–37. <https://doi.org/10.1021/ac9507956>
- Cavalcante, D., De-Souza, M. T., de Orem, J. C., de Magalhães, M. I. A., Martins, P. H., Boone, T. J., Driks, A. (2018). Ultrastructural analysis of spores from diverse Bacillales species isolated from Brazilian soil. *Environmental Microbiology Reports*, 11(2), 155-164. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12713>
- Dickinson, D., Duc, M., Haskins, W., Gornushkin, I., Winefordner, J., Powell, D., & Venkateswaran, K. (2004). Species Differentiation of a Diverse Suite of *Bacillus* Spores by Mass Spectrometry-Based Protein Profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 475–482. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.475>
- Dickinson, D. N., La Duc, M. T., Satomi, M., Winefordner, J. D., Powell, D. H., & Venkateswaran, K. (2004). MALDI-TOFMS compared with other polyphasic taxonomy approaches for the identification and classification of *Bacillus pumilus*

- spores. *Journal of Microbiological Methods*, 58(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.02.011>
- Dieckmann, R., Graeber, I., Kaesler, I., Szewzyk, U., & Von Döhren, H. (2005). Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(4), 539-48. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1812-2>
- Dybwad, M., van Der Laaken, A. L., Blatny, J. M., & Paauw, A. (2013). Rapid identification of bacillus anthracis spores in suspicious powder samples by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5372-83. <https://doi.org/10.1128/AEM.01724-13>
- Emami, K., Askari, V., Ullrich, M., Mohinudeen, K., Anil, A. C., Khandeparker, L., Mesbahi, E. (2012). Characterization of bacteria in Ballast water using MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS ONE*, 7(6), e38515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038515>
- Fernández-No, I. C., Böhme, K., Díaz-Bao, M., Cepeda, A., Barros-Velázquez, J., & Calo-Mata, P. (2013). Characterisation and profiling of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Food Microbiology*, 33(2), 235-42. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.022>
- Fiedoruk, K., Daniluk, T., Fiodor, A., Drewicka, E., Buczynska, K., Leszczynska, K., Swiecicka, I. (2016). MALDI-TOF MS portrait of emetic and non-emetic *Bacillus cereus* group members. *Electrophoresis*, 37(15-16), 2235-47. <https://doi.org/10.1002/elps.201500308>
- Fritze, D. (2004). Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore Forming Bacteria. *Phytopathology*, 94(11), 1245-8. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1245>
- Galperin, M. Y. (2013). Genome Diversity of Spore-Forming Firmicutes. *Microbiology Spectrum*, 1(2), 1–15. <https://doi.org/10.1128/microbiolspectrum.TBS-0015-2012.Correspondence>
- Garrity, G. M., Bell, J. a, Lilburn, T. G., & Lansing, E. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2(May), 1–399. <https://doi.org/10.1007/bergeysoutline200405>
- Guinebretière, M. H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., de Sarrau, B., de Buyser, M. L., Sorokin, A. (2013). *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(1), 31–40. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.030627-0>
- Jeong, Y.-S., Lee, J., & Kim, S.-J. (2013). Discrimination of bacillus anthracis spores by direct in-situ analysis of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 34(9), 2635–2639. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2013.34.9.2635>

- Keim, P., Kalif, A., Schupp, J., Hill, K., Travis, S. E., Richmond, K., ... Jackson, P. (1997). Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *Journal of Bacteriology*, 179(3), 818–824. <https://doi.org/10.1128/jb.179.3.818-824.1997>
- Logan, N. A., Berge, O., Bishop, A. H., Busse, H. J., De Vos, P., Fritze, D., ... Ventosa, A. (2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(Pt 8), 2114-21. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.013649-0>
- Logan, N. A., & Halket, G. (2011). Endospore-forming Soil Bacteria, 27. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-19577-8>
- Lovecka, P., Pacovska, I., Stursa, P., Vrchotova, B., Kochankova, L., & Demnerova, K. (2015). Organochlorinated pesticide degrading microorganisms isolated from contaminated soil. *New Biotechnology*, 32(1), 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.07.003>
- Maughan, H., & Van der Auwera, G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 789-97. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.001>
- Mellmann, A., Bimet, F., Bizet, C., Borovskaya, A. D., Drake, R. R., Eigner, U., Harmsen, D. (2009). High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11), 3732–3734. <https://doi.org/10.1128/JCM.00921-09>
- Nguyen, D. T. L., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., Aerts, M., Binh Thanh, L., & Vandamme, P. (2013). A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam. *International Journal of Food Microbiology*, 163(1), 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.024>
- Opota, O., Prod'hom, G., & Greub, G. (2016). Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Diagnostic Microbiology. *MALDI-TOF and Tandem MS for Clinical Microbiology*, 36, 55–92. <https://doi.org/10.1002/9781118960226.ch3>
- Orem, J. C., Silva, W. M. C., Raiol, T., Magalhães, M. I., Martins, P. H., Cavalcante, D. A., Kruger, R. H., Brigido, M. M., De-Souza, M. T. (2019). Phylogenetic diversity of aerobic spore-forming Bacillales isolated from Brazilian soils. *Int Microbiol*. <https://doi:10.1007/s1012301900080-6>.
- Petersen, D. J., Shishido, M., Holl, F. B., & Chanway, C. P. (1995). Use of species- and strain-specific PCR primers for identification of conifer root-associated *Bacillus* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 133(1–2), 71–76. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00337-5](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00337-5)
- Rajakaruna, L., Hallas, G., Molenaar, L., Dare, D., Sutton, H., Encheva, V., Shah, H. N. (2009). High throughput identification of clinical isolates of *Staphylococcus*

- aureus using MALDI-TOF-MS of intact cells. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4), 507-13. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.01.012>
- Romo, D., Prod'hom, G., Jaton, K., Bizzini, A., Greub, G., & Bille, J. (2010). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry as an Alternative to 16S rRNA Gene Sequencing for Identification of Difficult-To-Identify Bacterial Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(2), 693–696. <https://doi.org/10.1128/jcm.01463-10>
- Ruelle, V., El Moualij, B., Zorzi, W., Ledent, P., & De Pauw, E. (2004). Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(18), 2013-9. <https://doi.org/10.1002/rcm.1584>
- Ryzhov, V., Hathout, Y., & Fenselau, C. (2000). Rapid characterization of spores of *Bacillus cereus* group bacteria by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 66(9), 3828–3834. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3828-3834.2000>
- Salaün, S., Kervarec, N., Potin, P., Haras, D., Piotto, M., & La Barre, S. (2010). Whole-cell spectroscopy is a convenient tool to assist molecular identification of cultivatable marine bacteria and to investigate their adaptive metabolism. *Talanta*, 80(5), 1758-70. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.10.020>
- Santos, I. C., Hildenbrand, Z. L., & Schug, K. A. (2016). Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst*, 141(10), 2827-37. <https://doi.org/10.1039/c6an00131a>
- Schäfer, M. O., Genersch, E., Fünfhaus, A., Poppinga, L., Formella, N., Bettin, B., & Karger, A. (2014). Rapid identification of differentially virulent genotypes of *Paenibacillus larvae*, the causative organism of American foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Veterinary Microbiology*, 170(3-4), 291-7. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.006>
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2005). Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness, *Applied And Environmental Microbiology*, 71(3), 1501–1506. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1501>
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Begum, Z., et al. (2009) *Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhattai* sp. nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59(Pt 12), 2977-86. doi:10.1099/ijs.0.002527-0
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W., & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 249–266. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>
- Toh-Boyo, G. M., & Basile, F. (2012). Comparison of Sample Preparation Methods and Evaluation of Intra- and Intersample Reproducibility in Bacteria MALDI-MS

- Profiling. *Analytical Chemistry*, 84, 9971–9980.
<https://doi.org/10.1021/ac302375e>
- Trimpin, S., Rouhanipour, A., Az, R., Räder, H. J., & Müllen, K. (2001). New aspects in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: A universal solvent-free sample preparation. In *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15(15), 1364–73. <https://doi.org/10.1002/rcm.372>
- Valentine, N., Wunschel, S., Wunschel, D., Petersen, C., & Wahl, K. (2005). Effect of Culture Conditions on Microorganism Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Effect of Culture Conditions on Microorganism Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 58–64. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.58>
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60(2), 407–438. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0022-x>
- Wang, Z., Russon, L., Li, L., Roser, D. C., & Long, S. R. (1998). Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 12(8), 456–464. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19980430\)12:8<456::AID-RCM177>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19980430)12:8<456::AID-RCM177>3.0.CO;2-U)
- Wayne, L. G. (1988). International Committee on Systematic Bacteriology: announcement of the report of the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Zentralblatt Fur Bakteriologie, Mikrobiologie, Und Hygiene. Series A, Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 268(4), 433–434. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-463>
- Wenzler, E., Kamboj, K., & Balada-Llasat, J. M. (2015). Severe Sepsis Secondary to Persistent *Lysinibacillus sphaericus*, *Lysinibacillus fusiformis* and *Paenibacillus amylolyticus* Bacteremia. *International Journal of Infectious Diseases*, 35, 93–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.04.016>
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., & Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 965–74. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3783-4>
- Yao, J., Scott, J. R., Young, M. K., & Wilkins, C. L. (1998). Importance of matrix:analyte ratio for buffer tolerance using 2,5-dihydroxybenzoic acid as a matrix in matrix-assisted laser desorption/ionization-Fourier transform mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 9(8), 805–813. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(98\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(98)00046-4).

4.4 – Biochemical characterization of the aerobic endospore-forming bacteria Collection of the University of Brasília, Brazil

As bactérias aeróbicas formadoras de endósporos (Bafes) englobam espécies do gênero *Bacillus* e gêneros relacionados, alocados no filo *Firmicutes*, dentro da classe *Bacilli*, ordem *Bacillales* que abriga nove famílias, onde sete contêm membros formadores de endósporos. As Bafes são amplamente distribuídas em ambientes naturais, sendo o solo o principal reservatório. Embora os *Bacillus* spp. Representem bactérias primeiramente caracterizadas, as amplas diversidades fisiológica e genética tornam a demarcação de gênero e espécie uma tarefa muito difícil. As características bioquímicas, morfológicas e fisiológicas tradicionais são ferramentas essenciais para a identificação de Bafes. Essas características incluem o crescimento em diferentes temperaturas, valores de pH, concentrações de sal, crescimento na presença de várias substâncias, como agentes antimicrobianos, e dados sobre a presença ou atividade de várias enzimas e metabólitos. A fisiologia diversificada das Bafes exige testes bioquímicos elaborados para identificação. A Coleção de Bactérias aeróbicas formadoras de endósporos (CBafes)/UnB abriga 312 linhagens ambientais (SDF) isoladas do solo do Distrito Federal. Como parte de uma abordagem de caracterização polifásica foram realizados 30 testes bioquímicos para cada linhagem pertencente à CBafes e o perfil bioquímico das 312 linhagens SDF analisado. É importante ressaltar que a caracterização bioquímica é uma importante ferramenta utilizada para identificar Bafes, entretanto, quando usada individualmente, esta técnica não fornece todas as características necessárias para diferenciar e identificar espécies intimamente relacionadas. No futuro, juntamente com os demais dados fenotípicos e genotípicos, os presentes resultados serão de grande importância para identificação e classificação robusta dessas linhagens ambientais no escopo da abordagem polifásica utilizada para fins taxonômicos.

**Biochemical characterization of the aerobic endospore-forming bacteria
Collection of the University of Brasília, Brazil**

Martins, P.H.R.; Rabinovitch, L.; Vivoni, A.M.; Brito, J.T.; Cavalcante, D.A.; Orem, J.C.; Magalhães, M.I.A., and De-Souza, M.T.

Abstract

The aerobic and facultative aerobic endospore-forming bacteria (AEFB) comprise species of the genus *Bacillus* and related genera, allocated in the phylum *Firmicutes*, inside the class *Bacilli*, order *Bacillales*. Although *Bacillus spp.* are among the first species of bacteria to be characterized, the wide physiological and genetic diversities make the demarcation of genera and species a very difficult task. The traditional morphological, biochemical, and physiological characteristics are essential tools for the identification of AEFB. Objective: to perform the biochemical/physiological characterization of the 312 environmental AEFB (SDF strains). Material and Methods: to perform 30 biochemical and physiological tests the SDF strains were isolated in nutrient agar under atmospheric aerobic conditions. Cells from a single colony were transferred to a tube containing nutrient broth and incubated at 33 °C, under constant stirring, until turbidity was well visible. Conclusion: biochemical and physiological characterization are important tools used to identify AEFB. However, when used individually, this technique does not provide all the necessary characteristics to differentiate and identify closely related species. In the future, along with the other phenotypic and genotypic data the present results will be of great importance for a robust identification and classification of these environmental strains within the scope of polyphasic approach used to taxonomic purposes.

Key words: *Firmicutes*; *Bacillales*; *Bacillus*; taxonomy; metabolism; endospore formation.

Introduction

Aerobic endospore-forming bacteria (AEFB) encompass species from genus *Bacillus* and related genera, which are able to produce metabolic dormant and highly resistant cells called spores, which can germinate within seconds when external conditions become favourable¹. In the phylum *Firmicutes*, AEFB are allocated within the class *Bacilli* order *Bacilales*, where seven families harbor spore-forming genera: *Bacillaceae*, *Alicyclobacillaceae*, *Paenibacillaceae*, *Planococcaceae*, *Pasteuriaceae*, *Sporolactobacillaceae*, and *Thermoactinomycetaceae*^{2,3,1,4,5}. Strains of AEFB are widely distributed in nature and the soil is recognized as their main repository^{6,7,8}.

Historically, the initial identification of AEFB species was based on the morphologies of colonies, vegetative cells, sporangia, and spores; Gram staining response; and biochemical, physiological and chemotaxonomic properties^{8,9}. The identification and classification process of that combines these data with those obtained by several molecular methods, is called polyphasic approach^{10,2,11,8}. Thus, the polyphasic taxonomy is used to distinguish and classify bacterial strains based on classical phenotypic data supplemented with genotypic and phenotypic results obtained at molecular level^{10,12,9}.

Biochemical tests are based on enzymes important in the metabolism of a microorganism and evaluate chemical transformations of several substrates^{13,14,15}. Therefore, these essays investigate the intrinsic metabolic activities of a species, enabling a biochemical profile to be formed. Since many strains do not necessarily share the same biochemical and physiological characteristics, these results allow discriminating species¹⁶. Hence, biochemical characterization is useful for the evaluation of bacterial ecology and physiology or the natural habitat of the microorganism^{17,18}, as well as in the identification process¹⁹. Biochemical and physiological assays are essential and strongly recommended in the characterization of AEFB strains⁸.

To help understanding AEFB diversity and primary explore their biotechnological potential based on metabolic products and behaviour, we isolated 312 strains from soil samples collected at random areas of the Federal District, Midwest region of Brazil. These strains, designated SDF0001-SDF0312 (Solo do Distrito Federal or SDF) are deposited at the Coleção de Bactérias aeróbias

Table 1. Biochemical and physiological tests with respective controls

formadoras de endósporos (CBafes, or AEFB Collection - AEFBC), hosted at the University of Brasilia and is being analysed for taxonomic classification by a polyphasic strategy^{20,21}. The present work aimed to establish biochemical and physiological profiles of these 312 environmental strains to, in the future, use this data to corroborate a robust classification of the SDF strains.

Material and Methods

Soil samples and bacterial strains. The 312 SDF strains evaluated in this study were isolated as described in Cavalcante et al.²⁰ except that SDF strains from 0001-0154 were obtained by heat-shocking soil samples at 80 °C and SDF0115-0312 were isolated by heat-shocking soil samples at 65, 70 or 80 °C. The positive and negative controls for the biochemical and physiological tests (Table 1) are deposited at *Coleção de Culturas do Gênero Bacillus e Gêneros Correlatos* (CCGB), of the Instituto Oswaldo Cruz (LFB-Fiocruz-RJ, Brazil).

Ethics statement. Specific permissions required for collection of bacterial strains used in this study were endorsed by the Federal Brazilian Authority (CNPq; Authorization of Access and Sample of Genetic Patrimony nº 010439/2015-3). Sampling did not involve endangered or protected species.

Biochemical characterization. Strains were grown in nutrient agar (33 °C, 24 h) under atmospheric aerobic conditions. Cells from a single colony were transferred to a tube containing nutrient broth and incubated at 33 °C, under constant stirring (200 rpm), for about 16 h. The 30 biochemical tests (Table 1) were performed according to *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*³, Smith et al.²², Gordon et al.²³, Claus and Berkeley²⁴, and Rabinovitch and Oliveira²⁵. All tests were performed in duplicate in two independent experiments.

Biochemical and physiological tests	Controls	
	Positive	Negative
Growth at pH 5.7	<i>B. cereus</i> CCGB406	<i>P. alvei</i> CCGB414
Anaerobic growth	<i>B. cereus</i> CCG406	<i>B. megaterium</i> CCGB408
Growth in 7% NaCl	<i>B. amyloliquefaciens</i> CCGB452	<i>P. macerans</i> CCGB126
Growth in 10% NaCl	<i>B. amyloliquefaciens</i> CCGB452	<i>P. macerans</i> CCGB126
Phenylalanine	<i>B. megaterium</i> CCGB408	<i>B. cereus</i> CCGB406
Tyrosine degradation	<i>B. cereus</i> CCGB406	<i>L. sphaericus</i> CCGB745
Casein hydrolysis	<i>B. megaterium</i> CCGB408	<i>P. macerans</i> CCGB126
Gelatin hydrolysis	<i>B. cereus</i> CCGB406	<i>G. stearothermophilus</i> CCGB412
Starch hydrolysis	<i>B. cereus</i> CCGB406	<i>L. sphaericus</i> CCGB745
Voges-Proskauer test	<i>B. cereus</i> CCGB406	<i>B. megaterium</i> CCGB408
Catalase	<i>B. cereus</i> CCGB406	NA*
Indole production	<i>P. alvei</i> CCGB414	<i>B. cereus</i> CCGB406
Oxidase	<i>L. sphaericus</i> CCGB745	<i>B. cereus</i> CCGB406
Nitrates reduction	<i>B. cereus</i> CCGB406	<i>B. megaterium</i> CCGB408
Growth in Lysozyme 0,001%	<i>B. cereus</i> CCGB406	<i>B. pumilus</i> CCGB124
Esculin hydrolysis	<i>B. subtilis</i> CCGB1249	<i>L. fusiformis</i> CCGB743
Citrate utilization	<i>B. cereus</i> CCGB406	<i>P. macerans</i> CCGB126
Propionate utilization	<i>B. licheniformis</i> CCGB407	<i>B. subtilis</i> CCGB1249
Lysine decarboxylase	<i>B. thuringiensis</i> CCGB1163	<i>B. megaterium</i> CCGB408
Ornithine decarboxylase	<i>B. thuringiensis</i> CCGB1163	<i>B. megaterium</i> CCGB408
Arginine dihydrolase	<i>B. licheniformis</i> CCGB407	<i>B. megaterium</i> CCGB408
Production of acid from D-Glucose	<i>B. megaterium</i> CCGB408	<i>L. fusiformis</i> CCGB743
Production of acid from L-Arabinose	<i>B. megaterium</i> CCGB408	<i>Brev. brevis</i> CCGB052
Production of acid from Mannitol	<i>B. megaterium</i> CCGB408	<i>L. fusiformis</i> CCGB743
Production of acid from D-Xylose	<i>B. megaterium</i> CCGB408	<i>Brev. brevis</i> CCGB052
Production of acid from Lactose	<i>B. megaterium</i> CCGB408	<i>L. fusiformis</i> CCGB743
Production of acid from Sucrose	<i>B. amyloliquefaciens</i> CCGB452	<i>L. sphaericus</i> CCGB745
Growth at 45 °C	<i>G. stearothermophilus</i> CCGB412	NA*
Growth at 65 °C	<i>G. stearothermophilus</i> CCGB412	<i>B. thuringiensis</i> CCGB1163
Hemolysis	<i>B. thuringiensis</i> CCGB1163	<i>L. sphaericus</i> CCGB745

*not applied

Results

The results for the 30 biochemical tests (Table 1) performed on 312 SDF (SDF0001-SDF0312) strains are presented as supplementary information in Table S1. A summary of the of the results obtained are shown in figure 1.

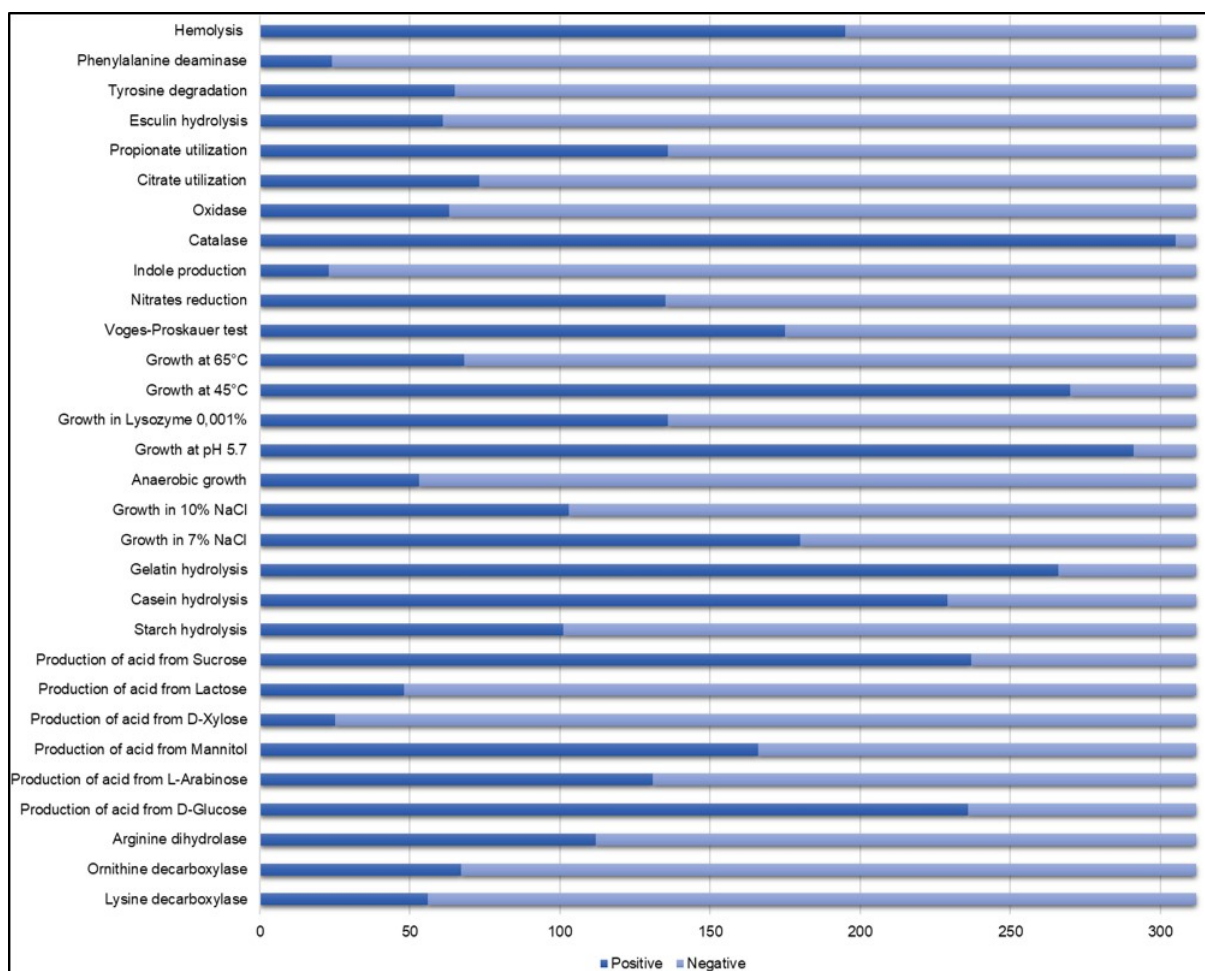


Figure 1. General distribution of biochemical profile of SDF strains. Image representing the general distribution of the results of the biochemical tests performed with the 312 SDF-strains belonging to CBafes. The results were described as positive or negative for each test.

Discussion

AEFB exhibit great resistance to adversely environmental and the soil represents the leading reservoir^{6,7, 8}. The genera that accommodate the largest number of species of AEFB are: *Bacillus* (377 species and 8 subspecies), *Paenibacillus* (240 species and 4 subspecies); *Virgibacillus* (35 species); *Alicyclobacillus* (26 species and 2 subspecies) and *Brevibacillus* (23 species)⁵.

Due to complexity and importance of metabolism, biochemical and physiological profiles are indispensable for identification and classification of AEFB new isolates. In this study, we described the results of 30 tests (Table 1) applied to 312 SDF strains. This atlas includes enzymatic reactions and growth conditions for

well-known AEFB species and some environmental species that are scarcely or, not at all, described.

Among the SDF strains described in the present work, *Bacillus spp.*, allocated in the family *Bacillaceae*, are the most prevalent. *Bacillus spp.* are predominantly aerobic or facultative, a feature that allows to differentiate them from the members of the genera *Clostridium*, family *Clostridiaceae*, and *Desulfotomaculum* (family *Peptococcaceae*), obligatorily anaerobic^{3,2}. The respiratory metabolism, fermentation or both, with the production of catalase, can also differentiates *Bacillus spp.* from those belonging to genus *Sporolactobacillus*, also allocated in the family *Bacillaceae*²⁶, nevertheless catalase-negative. The taxonomy within the genus *Bacillus* is hampered by the high heterogeneity in the phenotypic and genotypic characteristics of this group^{27,28,29}.

Phylogenetic studies based on the 16S rRNA gene sequences suggest five groups of related AEFB species: *Bacillus cereus sensu lato (sl)*, *B. subtilis sl*, *B. megaterium*, *B. circulans*, and *Brevibacillus brevis*³⁰. Closely related species, known as *Bacillus pumilus* subgroup, are included in the *B. subtilis* group^{31,30}. Members of these groups harbour many species of great importance in health, environment, and economy^{30,32}.

Because of their medical and economic importance, the founders of the group *B. cereus* includes *B. cereus sensu stricto* (ss or *B. cereus*), *B. anthracis*, and *B. thuringiensis*³². The group still hosts *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. toyonensis*, *B. cytotoxicus*, *B. manliponensis*, *B. gaemokensis*, *B. bombysepticus*, and *B. bingmayongensis*. Traditionally, these organisms have been differentiated based on their phenotypic characteristics, including pathogenic potential³³. However, this group forms a highly homogeneous subdivision of the genus *Bacillus*^{34,35}, which is difficult to discern using standard biochemical schemes, chemotaxonomic methods, or phylogenetically relevant target genes^{36,37}.

Nevertheless, some specific biochemical and physiological characteristics of the *B. cereus sl* are useful to differentiate them from the other endospore-forming species. Among these, the lecithinase test is generally positive for the species of the *B. cereus* group and negative for the others. Conversely, the formation of acid from D-mannitol is negative for members of the *B. cereus sl* and generally positive for strains of other groups. The development in the presence of lysozyme and the

production of acid from glucose in anaerobiosis are characteristic of the *B. cereus* group and do not normally occur in the other species of other groups³⁸.

The production of haemolysin and cell morphology in some strains of *B. cereus* *sl* are also phenotypes with relevance for taxonomic studies³⁹. *B. cereus* *ss*, generally mobile, is heavily haemolytic, but does not produce rhizoid growth pattern, a characteristic that can be used to differentiate from colonies of *B. mycoides* strains³⁸. In majority, *B. anthracis* strains are neither mobile nor haemolytic, but some non-mobile *B. cereus* strains, as well as hemolytic *B. anthracis*, may hinder the differentiation between these two species²⁸. In addition, the latter species can be also differentiated by parasporal crystal formation typically described to *B. thuringiensis*, motility, penicillin resistance, and gamma phages susceptibility³⁸.

B. subtilis group are also formed by closely related species with great biochemical and genetics similarities³⁰. In addition to *B. subtilis* *ss*, the group encloses *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. axarquiensis*, *B. licheniformis*, *B. malacitensis*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. sonorensis*, *B. tequilensis*, *B. vallismortis*, and *B. velezensis*^{40,30}.

Due to the *high*-level of molecular *relationships*, *B. subtilis* group members are also not easily distinguishable^{41, 2}. Strains from these groups are generally mesophilic and neutrophils, but often tolerant to higher pH levels. The faster production of acid from lactose and lower gluconate utilization is one of the physiological characteristics used to differentiate *B. amyloliquefaciens* from *B. subtilis* *ss*². Another helpful feature to distinguish the two species is acid production from inulin, positive for *B. amyloliquefaciens*⁴². The pigment production is also used to differentiate this species from *B. mojavensis* and *B. vallismortis*³.

The similarities among members of *B. subtilis* *sl* are so great that the phenotypic differentiation between *B. mojavensis* and *B. subtilis* *ss* is possible only by analysis of fatty acid composition⁴³. *B. sonorensis* and *B. licheniformis* are also reported to be highly phenotypically and genotypically similar⁴⁴. However, these two species can be distinguished based on some phenotypic characteristics such as pigmentation in solid medium containing tyrosine, growth in glycerol/glutamate, at pH 5-6, and different NaCl concentrations (5, 7, and 10%), besides sensitivity to different levels of the antibiotic clindamycin^{45,30}.

B. subtilis group also includes the so-called subgroup of *B. pumilus*, consisting of *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. stratosphericus*, *B. altitudinis*, and *B. aerophilus*, which

are almost identical in the 16S rRNA gene sequence, sharing above 99.5% similarity^{46,30}. *B. pumilus* is amylase-, lipase-, and protease-positive. In addition, this species is able to reduce nitrate, and produces gas from sugar such as glucose, arabinose, mannitol, xylose, and lactose. The production of acetylbutanediol (ABD) from acetoin, as seen by a positive result for the Voges-Proskauer test, is also observed⁴⁷.

Outside from family *Bacillaceae*, two other genera (*Paenibacillus* and *Brevibacillus*), allocated in the family *Paenobacillaceae*, are frequently found among SDF strains. The genus *Paenibacillus* harbours species of aerobic or facultative rods^{3,4,5}. When stained by the Gram method, even young cells react weakly, or even as Gram-negative, despite having a typical Gram-positive cell wall structure⁴⁸. The *Paenibacillus spp.* are mobile, do not produce pigments, secrete a variety of extracellular enzymes, and some species produce polysaccharides and antimicrobial compounds such as polymyxin, octopine, and antifungals^{49,50}. The type species is *P. azotofixans* isolated from soils and roots of sugarcane, wheat and other grasses. The main characteristic of this species is related to the capacity of biological nitrogen fixation superior to the other species^{51,52}.

According to Seldin *et al.*,⁵³ physiologically and chemically, the species *P. azotofixans* is characterized by growing at a minimum temperature of 15 °C and maximum of 40 °C, growing at acidic pH (5.7), and in small amounts of NaCl (1-3%). However, it does not show the ability to grow in the presence of lysozyme at 0.001%. They are optionally anaerobic, catalase positive, oxidase negative, and Voges-Proskauer positive. The production of acid from carbohydrates occurs in the presence of glucose, sucrose, galactose, maltose, raffinose, cellobiose, inulin and mannitol. It does not use citrate as a carbon source; it decomposes casein but does not hydrolyse starch, tyrosine, and gelatin.

Members of the genus *Brevibacillus* (quoted here as *Br.*) includes a high diversity of thermophilic, psychrophilic, acidophilic, alkalophilic, and halophilic strains that utilize a variety of carbon sources for either heterotrophic or autotrophic growth⁵⁴. Members of the genus are strict aerobes, Gram-positive or Gram-variable and present motility by peritrichal flagella⁵⁵. Therefore, *Brevibacillus spp.* can be used as a factory for the expression of many biotechnologically important enzymes (e.g., alpha-amylase, sphingomyelinase, xylanase, CGTase, and chitosanase), as well as, heterologous proteins including cytokines (EGF, IL-2, NGF, IFN-c, TNF-a,

and GM-CSF), antigens, and adjuvants⁵⁶, and can be also exploited as an excellent tool for structural and functional biology⁵⁴.

Brevibacillus strains, especially from the species *Br. brevis*, *Br. choshinensis*, and *Br. laterosporus*, have attracted considerable interest owing to the production or transformation of valuable compounds, or the potentials as biocontrol agents³. The entomopathogenic activity is broad and includes species from orders such as *Coleoptera*, *Lepidoptera*, and *Diptera*, besides from phyla *Nematoda* and *Mollusca*⁵⁷. The physiological and biochemical profile of *Br. laterosporus* presents a minimal growth characteristic at 15 °C and maximum of 50 °C. However, growth does not occur in acid medium (pH 5.7). The strain is catalase positive, reduces nitrate to nitrite, and hydrolyses casein and gelatin, but does not hydrolyze the starch and urea, and does not produce indole. In addition, acid production occurs from D-fructose, D-glucose, D-mannitol, D-mannose, D-ribose, trehalose, and diverse other carbohydrates molecules. Some amino and organic acids are also used as sources of carbon and energy³.

Conclusion

Biochemical and physiological characterizations are an important tool used to identify AEFB. In order to achieve identification at the species level these assay results should be used in association with other methods, such as classification based on 16S rRNA gene sequences and matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. It is important to note that biochemical/physiological characterizations are part of the minimum standards proposed by Logan et al.,⁸ for the identification of new species of AEFB. However, when used individually, this technique does not provide all the necessary attributes to differentiate and identify closely related species. In the present study, biochemical and physiological tests were used to provide the profile of all the 312 SDF strains deposited at CBafes. In the future, along with the other phenotypic and genotypic data, besides complete genome sequences, the present results will be of great importance for a robust identification and, thus, classification of these environmental strains within the scope of polyphasic approach used to taxonomic purposes.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Aknowlogde

We thank University of Brasilia, and the Brazilian research funding agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We are in debt with Arthur S. Araujo, Felipe A. Mesquita, and Liliam de Oliveira F. Marceneiro for excellent technical assistance.

References

1. Niall AL, Halket G. Developments in the taxonomy of aerobic, endospore forming Bacteria. *Endospore forming soil bactéria*, 2011 jul;(27):1-7.
2. Fritze D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: The aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*. 2004 Nov;94(11):1245-8.
3. de Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 3: The Firmicutes. Second Ed, 2009.
4. Galperin MY. Genome diversity of spore-forming Firmicutes. *Microbiol Spectr*. 2013 Dec;1(2).
5. Parte AC. LPSN – List of Prokaryotic names with standing in nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, 1825-1829, 2018.
6. Damgaard PH. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. 2000 jan;23-40.
7. Ichimatsu T, Mizuki E, Nishimura K, Akao T, Saitoh H, Higuchi K, Ohba M. Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh waters of Japan. *Curr Microbiol*. 2000 Apr;40(4):217-20.
8. Logan NA, Berge O, Bishop AH, Busse HJ, De Vos P, Fritze D, Heyndrickx M, Kämpfer P, Salkinoja-Salonen MS, Seldin L, Rabinovitch L, Ventosa A. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009 Aug;59(Pt 8):2114-21.

9. Das S, Dash HR, Mangwani N, Chakraborty J, Kumari S. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *J Microbiol Methods*. 2014 Aug; 103:80-100.
10. Colwell RR. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. *J Bacteriol*. 1970 Oct; 104(1): 410–433.
11. Onyenwoke RU, Brill JA, Farahi K, Wiegel J. Sporulation genes in members of the low G+C Gram-type-positive phylogenetic branch (Firmicutes). *Arch Microbiol*. 2004 Oct;182(2-3):182-92.
12. Prakash O, Verma M, Sharma P, Kumar M, Kumari K, Singh A, Kumari H, Jit S, Gupta, S.K; Khanna, M; Lal, R. Polyphasic approach of bacterial classification – An overview of recent advances. *Indian J Microbiol*. 2007 Jun; 47(2):98–108.
13. Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*, 5^a Ed., Atheneu, 2008.
14. Muyzer G, Stams AJM. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Jun;6(6):441-54
15. Douterelo I, Sharpe R, Boxall J. Bacterial community dynamics during the early stages of biofilm formation in a chlorinated experimental drinking water distribution system: implications for drinking water discolouration. *J Appl Microbiol*. 2014 Jul;117(1):286-301.
16. Janda JM, Abbott SL. Bacterial identification for publication: when is enough enough? *J Clin Microbiol*. 2002 Jun;40(6):1887-91.
17. Eggert T, Pencreach G, Douchet I, Verger R, Jaeger KE. A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. *Eur J Biochem*. 2000 Nov;267(21):6459-69.
18. Singh D, Sharma A, Saini GK. Biochemical and molecular characterisation of the bacterial endophytes from native sugarcane varieties of Himalayan region. *3 Biotech*. 2013 Jun; 3(3):205–212.
19. Hussain T, Roohi A, Munir S, Ahmed I, Khan J, Edel-Hermann V, Kim KY, Anees M. Biochemical characterization and identification of bacterial strains isolated from drinking water sources of Kohat, Pakistan. *Afr. J. Microbiol. Res*. 2013 Apr;7(16):1579-1590.
20. Cavalcante DA, De-Souza MT, Orem JC, Magalhães MIA, Martins PH, Boone TJ, Castillo, JA, Driks A. 2019. Ultrastructural analysis of spores from diverse

Bacillales species isolated from Brazilian soil. *Environ Microbiol Rep.* 2019 Apr;11(2):155-164.

21. Orem JC, Silva WMC, Raiol T, Magalhaes MIA, Martins PHR, Cavalcante DA, Kruger RH, Brigido MM, De-Souza MT. 2019. Phylogenetic diversity of aerobic spore-forming Bacillales isolated from Brazilian soils. *International Microbiology.* 2019. DOI: 10.1007/s10123-019-00080-6.
22. Smith NR, Gordon RE, Clark FE. *Aerobic Sporeforming Bacteria.* Monograph 16. U.S. Department of Agriculture, Washington, DC, 1952.
23. Gordon RE, Haynes WC, Pang CHN. *The genus Bacillus.* U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C. 1973.
24. Claus D, Berkeley RCW. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (eds P.H.A. Sneath et al.), vol. 2, pp. 1105–1139. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1986.
25. Rabinovitch L, Oliveira EJ. *Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de Bacillus e gêneros esporulados aeróbios correlatos.* 1. Ed. – Rio de Janeiro: Montenegro Comunicação, 2015.
26. Dromigny E, Vincent P, Jouve JL. *Bacillus cereus.* In: Bourgeois CM, Mescle JF, Zucca J. (Eds). *Microbiología alimentaria.* Zaragoza: Acribia, 1994. p.107-11.
27. Ash C, Farrow JAE, Wallbanks S, Collins MD. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology* 1991 Oct;13, 202-206.
28. Drobniowski FA. *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev.* 1993 Oct;6(4):324-38.
29. Carlson CR, Johansen T, Kolstø AB. The chromosome map of *Bacillus thuringiensis* subsp. *canadensis* HD224 is highly similar to that of the *Bacillus cereus* type strain ATCC 14579. *FEMS Microbiol Lett.* 1996 Aug 1;141(2-3):163-7.
30. Alina SO, Constantinescu F, Petruța CC. Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection. *Romanian Biotechnological Letters* 2015 Sept;20(5):10737-10750.
31. Berkeley R, Heyndrickx M, Logan N, de Vos P. *Applications and systematics of Bacillus and relatives.* Wiley-Blackwell, 2008.
32. Fiedoruk K, Drewnowska JM, Daniluk T, Leszczynska K, Iwaniuk P, Swiecicka I. Ribosomal background of the *Bacillus cereus* group thermotypes. *Sci Rep.* 2017 Apr;7:46430.

33. Rasko DA, Altherr MR, Han CS, Ravel J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol Rev.* 2005 Apr;29(2):303-29.
34. Chen ML, Tsen HY. Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene-based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *J Appl Microbiol.* Apr;2002;92(5):912-9.
35. Helgason E, Okstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, Hegna I, Kolstø AB. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Jun;66(6):2627-30.
36. Arnesen LPS, Fagerlund A, Granum PE. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev.* 2008 Jul;32(4):579-606.
37. Bavykin SG, Lysov YP, Zakhariyev V, Kelly JJ, Jackman J, Stahl DA, Cherni A. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J Clin Microbiol.* 2004 Aug;42(8):3711-30.
38. Fritze D. *Bacillus* Identification-Traditional Approaches. In: Berkeley R, Heyndrickx M, Logan N, de Vos P. (Eds.), *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*, Blackwell Publishing, Cambridge, pp 100-123, 2002.
39. Jääskeläinen EL. Assessment and control of *Bacillus cereus* emetic toxin in food [thesis]. Helsinki (FI): Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki; 2008
40. Jeyaram K, Romi W, Singh TA, Adewumi GA, Basanti K, Oguntoyinbo FA. Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance. *J Microbiol Methods.* 2011 Nov;87(2):161-4.
41. Public Health England. Identification of *Bacillus* species. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 9 Issue 3. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. Review Article | Published: 07 May 2008, 2015.
42. Logan NA, Berkeley RCW. Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J Gen Microbiol.* 1984 Jul;130(7):1871-82.
43. Wang LT, Lee FL, Tai CJ, Kuo HP. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008 Mar;58(Pt 3):671-5.

44. Adimpong DB, Sørensen KI, Nielsen DS, Thorsen L, Rasmussen TB, Derkx PMF, Jespersen L. Draft whole-genome sequence of *Bacillus sonorensis* strain L12, a source of nonribosomal lipopeptides. *Genome Announc.* 2013 Mar 28;1(2):e0009713.
45. Palmisano MM, Nakamura LK, Duncan KE, Istock CA, Cohan FM. *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001 Sep;51(Pt 5):1671-9.
46. Liu Y, Lai Q, Dong C, Sun F, Wang L, Li G, Shao Z. Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by Multilocus Sequence Analysis. *PLoS One.* 2013 Nov 11;8(11):e80097.
47. Xiao Z, Ma C, Xu P, Lu JR. Acetoin catabolism and acetylbutanediol formation by *Bacillus pumilus* in a chemically defined medium. *PLoS One.* 2009 May 20;4(5):e5627.
48. Shida O, Takagi H, Kadowaki K, Komagata K. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1996 Oct;46(4):939-46.
49. Shida O, Takagi H, Kadowaki K, Nakamura LK, Komagata K. Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int J Syst Bacteriol.* 1997 Apr;47(2):289-98.
50. Yoon J, Seo W, Shin YK, Kho YH, Kang KH, Park Y. *Paenibacillus chinjuensis* sp. nov., a novel exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002 Mar;52(Pt 2):415-21.
51. Rosado AS, Seldin L, Wolters AC, van Elsas JD. Quantitative 16S rDNA-targeted polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization for the detection of *Paenibacillus azotofixans* in soil and the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol.* 1996 Mar;19:153-164.
52. Neves MCP, Rumjanek NG. Ecologia das Bactérias Diazotróficas nos solos tropicais In: Melo, I.S; Azevedo, J.L (eds) *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998.
53. Seldin L, Elsas JD, Penido EGC. *Bacillus azotofixans* sp. nov. a Nitrogen-Fixing Species from Brazilian Soils and Grass Roots. *Int J Syst Bacteriol.* 1984 Oct;34:451-456.

54. Panda AK, Bisht SS, DeMondal SN, Kumar S, Gurusubramanian G, Panigrahi AK. *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2014 Apr;105(4):623-39.
55. Nazina TN, Lebedeva EV, Poltarauk AB, Tourova TP, Grigoryan AA, Sokolova DSh, Lysenko AM, Osipov GA. *Geobacillus gargensis* sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of *Bacillus vulcani* as *Geobacillus vulcani* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004 Nov;54(Pt 6):2019-24.
56. Mizukami M, Hanagata H, Miyauchi A. *Brevibacillus* expression system: host-vector system for efficient production of secretory proteins. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010 Apr;11(3):251-8.
57. Ruiu L, Floris I, Satta A. Emerging entomopathogenic bacteria for insect pest management. *Bulletin of Insectology*. 2013 May;66(2):181-186.

SDF Strains	Lysine Decarboxylase	Ornithine	Arginine Dihydrolase	D-Glucose	L-Arabinose	Mannitol	D-Xylose	Lactose	Sucrose	Starch Hydrolysis	Casein Hydrolysis	Gelatin Hydrolysis	Growth in 7% NaCl	Growth in 10% NaCl	Anaerobic Growth	Growth At Ph 5.7	Growth In Lysozyme	Growth At 45°C	Growth At 65°C	Voges-Proskauer Test	Nitrates Reduction	Indole Production	Catalase	Oxidase	Citrate Utilization	Propionate Utilization	Esculin Hydrolysis	Tyrosine Degradation	Phenylalanine	Hemolysis
0276	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	
0277	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	
0278	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	
0279	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	
0280	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	
0281	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	
0282	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
0283	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	
0284	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	
0285	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	
0286	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	
0287	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	
0288	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	
0289	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	
0290	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	
0291	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	
0292	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	
0293	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
0294	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	
0295	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	
0296	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
0297	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
0298	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	
0299	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	
0300	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	
0301	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	
0302	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	
0303	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	
0304	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	
0305	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	
0306	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	
0307	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	
0308	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	
0309	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	
0310	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	
0311	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	
0312	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

5. CONCLUSÕES

Como dito durante o presente trabalho, as Bafes são ubíquas podendo ser isoladas de diferentes ambientes naturais. E, o maior reservatório desses microrganismos é o solo. Portanto, tendo como matéria prima amostras coletadas do solo, foi possível isolar mais 158 linhagens de Bafes que agora fazem parte do acervo da CBafes. Ao realizar a análise microscópica dessas novas linhagens, observou-se o predomínio de células no formato de bastão, móveis e produzindo endósporos/esporos com diferentes formatos e localizações dentro do esporângio.

Ao realizar a caracterização fenotípica por MALDI-TOF MS observou que por mais que essa metodologia seja uma técnica rápida, necessita de alguns ajustes para melhor identificar Bafes de origem ambiental. Ao comparar os resultados obtidos por MALDI-TOF MS e filogenia por sequências de genes de rRNA 16S observou-se que ambas as técnicas utilizadas apresentaram uma boa resolução para a identificação a nível do gênero. No entanto, as sequências de genes rRNA 16S demonstraram capacidade superior na identificação dessas linhagens em nível de espécie quando comparado com o método MALDI-TOF MS. Além disso, ambas as técnicas demonstraram ineficientes para discriminar espécies intimamente relacionadas. Portanto, enfatizamos que os dois métodos são ferramentas importantes na identificação de Bafes, sendo complementares entre si.

Quanto à caracterização bioquímica é importante ressaltar que a mesma é utilizada como uma ferramenta para a identificação de Bafes. No entanto, quando usada individualmente, esta técnica não fornece todas as características necessárias para diferenciar e identificar espécies intimamente relacionadas. No presente estudo, os testes bioquímicos foram utilizados para fornecer o perfil bioquímico de todas as 312 linhagens SDF depositadas na CBafes. No futuro, juntamente com os demais dados fenotípicos e genotípicos, os resultados serão de grande importância para uma robusta identificação e classificação dessas cepas ambientais.

Por fim, a presente tese reforça a importância do fenótipo na identificação e caracterização de Bafes, reiterando a necessidade do uso de características fenotípicas e genotípicas para a classificação, evidenciando assim a importância da caracterização polifásica para fins taxonômicos.