

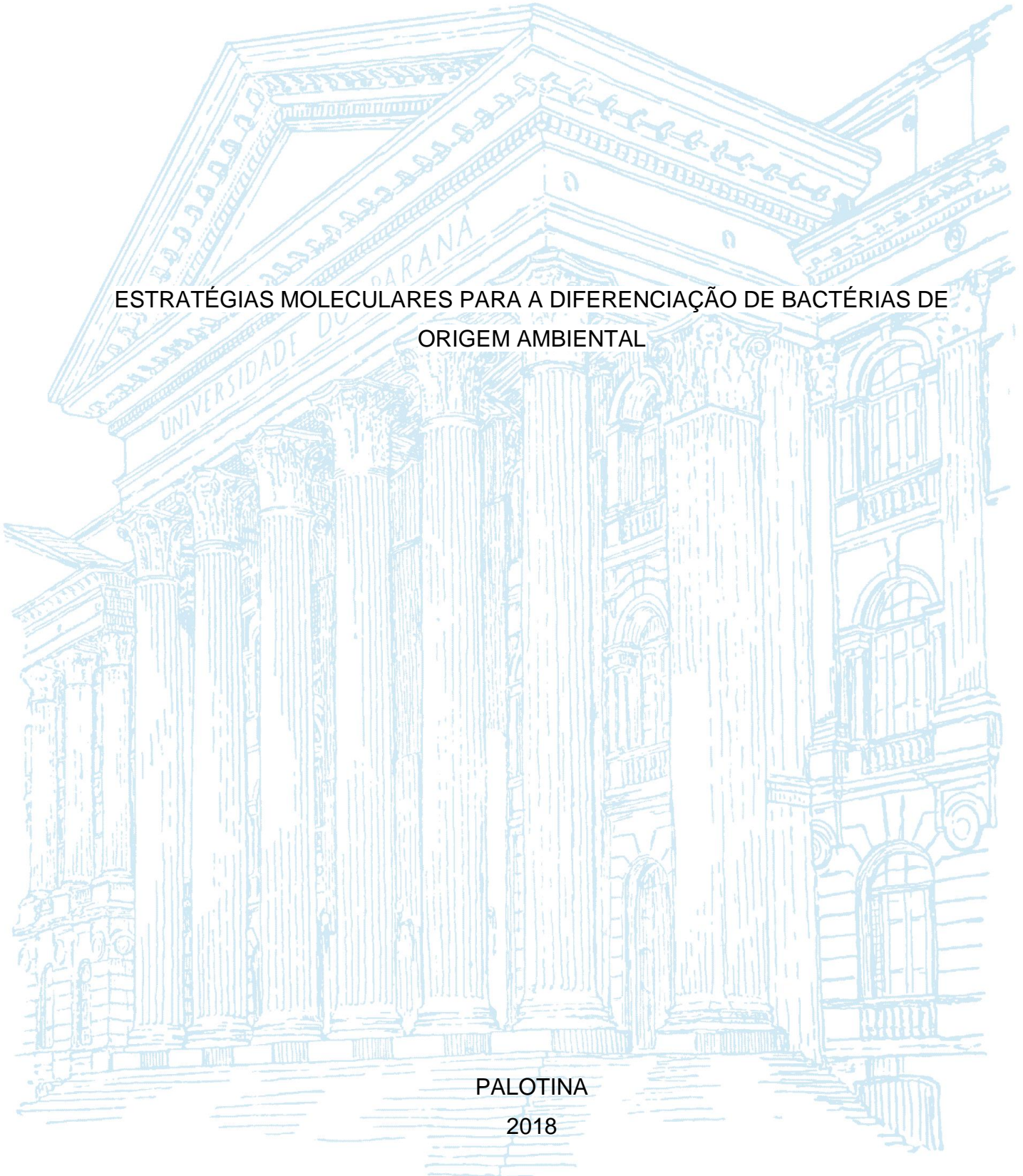
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA PEREIRA DOS SANTOS

ESTRATÉGIAS MOLECULARES PARA A DIFERENCIAÇÃO DE BACTÉRIAS DE
ORIGEM AMBIENTAL

PALOTINA

2018



GABRIELA PEREIRA DOS SANTOS

ESTRATÉGIAS MOLECULARES PARA A DIFERENCIAÇÃO DE BACTÉRIAS DE
ORIGEM AMBIENTAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Tecnologia em Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina como requisito à obtenção do título de Tecnólogo em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Fiorini Rosado

PALOTINA

TERMO DE APROVAÇÃO

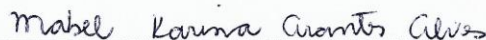
GABRIELA PEREIRA DOS SANTOS

**ESTRATÉGIAS MOLECULARES PARA A DIFERENCIAÇÃO DE BACTÉRIAS DE
ORIGEM AMBIENTAL**

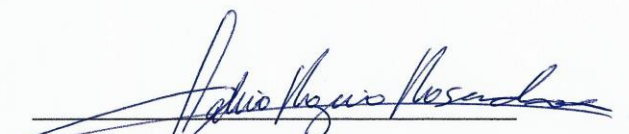
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Tecnologia em Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, como requisito parcial à obtenção do título de Tecnólogo em Biotecnologia, pela seguinte banca examinadora:



Prof^a. Dr^a. Adriana Fiorini Rosado
Orientadora - Departamento de Biociências. Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.



Prof^a. Msc. Mabel Karina Arantes Alves
Departamento de Engenharia e Exatas. Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.



Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado
Departamento de Biociências. Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

Palotina, 29 de Junho de 2018

Gostaria de dedicar mais essa vitória principalmente a minha mãe Luceni e irmãos, só nós sabemos o quão difícil foi chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus e ao Espírito Santo, pelo discernimento, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

À Universidade Federal do Paraná-Setor Palotina, seu corpo docente, direção, administração, e aos servidores terceirizados, por sempre oferecer toda ajuda e um ambiente agradável, deixo aqui a minha total admiração e agradecimento a toda equipe que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

À Prof^a Dr^a Eliane C. Gruska Vendruscolo por me permitir a utilização do Labiogen (Laboratório de Bioquímica e Genética) da UFPR-Setor Palotina para a realização desse trabalho.

À Prof^a Mabel Karina Arantes Alves e a doutoranda Andressa Caroline Neves, por cederem os isolados bacterianos para a realização desse trabalho.

À Gabriela Cristina Alves da Silva pelo auxílio incondicional nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado e a Prof^a Ms. Mabel Karina Arantes Alves por aceitarem a fazer parte da banca e por se disponibilizarem a avaliar esse trabalho.

Agradeço todos os meus mestres, principalmente a minha orientadora Adriana Fiorini Rosado que fez toda a diferença nesse semestre, obrigada pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções, incentivos e amizade.

À minha mãe Luceni, pelo amor, incentivo e apoio incondicional, mãe, seu cuidado e dedicação foi que deram, em alguns momentos, a esperança para seguir.

Agradeço imensamente aos amigos que conheci através da universidade, meus companheiros de curso, Elisa, Gabriel Luca e Sabrina parceiros de trabalhos, provas e de muito sufoco, fizeram parte da minha formação e mostraram mais uma vez que sem amigos não somos nada, e pretendo leva-los para o resto da vida perto de mim.

Ao meu amor Eric Lucas, pessoa com quem quero compartilhar muitas vitórias. Obrigado pelo carinho, paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada semestre, desde o primeiro ano da graduação; você também é um dos principais motivos de eu estar concluído essa graduação o meu maior incentivador.

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”

(Walter S. Landor)

RESUMO

A caracterização de bactérias em nível de espécie é um desafio para os microbiologistas, pois muitos gêneros bacterianos possuem propriedades morfológicas e bioquímicas semelhantes entre espécies do mesmo gênero ou até mesmo entre diferentes gêneros. Técnicas de biologia molecular estão sendo cada vez mais utilizadas em laboratórios de microbiologia, não com o intuito de substituir as análises microbiológicas convencionais, mas como ferramentas auxiliares nos casos em que um microrganismo é de difícil caracterização, de difícil cultivo ou mesmo pela necessidade de agilidade em fechar um diagnóstico. O objetivo desse trabalho foi utilizar técnicas de biologia molecular para a caracterização de duas espécies de enterobactérias e duas espécies de *Staphylococcus*. Todas as bactérias foram isoladas do ambiente, sendo as enterobactérias isoladas de cama de aviário e as espécies de *Staphylococcus*, de biodiesel. Após o isolamento em meio de cultura específico, o DNA das bactérias foi extraído e submetido às análises moleculares. As duas amostras de enterobactérias foram submetidas à amplificação, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando iniciadores espécie específicos e sequenciamento da região rDNA 16S e o DNA dos dois isolados de *Staphylococcus* spp. foram submetidos à reação de sequenciamento da região rDNA 16S e análise por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) da região do gene da catalase, utilizando a enzima de restrição *AluI*. As análises permitiram identificar duas espécies de enterobactérias (*Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*) e duas espécies *Staphylococcus* (*S. warneri* e *S. pasteurii*). A caracterização destes isolados bacterianos em nível de espécie contribuirá com a continuação das pesquisas destes isolados em experimentos em andamento e futuros, visando a utilização destas bactérias em pesquisas com biohidrogênio e biodiesel, de grupos de pesquisadores da UFPR-Setor Palotina.

Palavras-Chave: Enterobactéria. *Staphylococcus* spp. Reação em Cadeia da Polimerase. RFLP. Sequenciamento.

ABSTRACT

Characterization of bacteria at the species level is a challenge for microbiologists, since many bacterial genera have similar morphological and biochemical properties between species of the same genus or even between different genera. Molecular biology techniques have been increasingly used in microbiology laboratories not only as a substitute for conventional microbiological analyzes, but as auxiliary tools in cases where a microorganism is difficult to characterize, to grow or even when the diagnosis must be rapid. The aim of this work was to use molecular biology techniques to characterize two species of enterobacteria and two species of *Staphylococcus*. The bacteria were isolated from the environment, being the enterobacteria isolated from avian litter and *Staphylococcus* species from biodiesel. After isolation in specific culture medium, the bacterial DNA was extracted and subjected to molecular analyzes. The two enterobacteria samples were amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR), using specific species primers and sequencing of the 16S rDNA region and the DNA of the two isolates of *Staphylococcus* spp. were submitted to the 16S rDNA region sequencing reaction and RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) analysis of the catalase gene region, using the restriction enzyme *AluI*. The analysis allowed identifying two species of enterobacteria (*Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae*) and two species of *Staphylococcus* (*S. warneri* and *S. pasteurii*). The characterization of these isolates at the species level will contribute to the continuation of the researches in ongoing and future experiments, aiming the use of these bacteria in biohydrogen and biodiesel research, from groups of researchers from the UFPR-Setor Palotina.

Keywords: Enterobacteria. *Staphylococcus* spp. Polymerase Chain Reaction. RFLP. Sequencing.

CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

O trabalho de conclusão de curso foi desenvolvido presencialmente pela modalidade de orientação direta, entre os meses de Março a Junho de 2018. As atividades previstas eram: realizar ensaios microbiológicos, bioquímicos e moleculares para a diferenciação de espécies dos gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus* e de *enterobactérias*, pertencentes ao banco de bactérias do Labiogen, UFPR-Palotina. No entanto, tratando-se de um período muito limitado, a proposta do trabalho foi contribuir apenas com a identificação e caracterização molecular de bactérias, previamente isoladas de fontes ambientais por pesquisadores do laboratório LabCatProBio da Universidade Federal do Paraná-Setor Palotina, que estudam o potencial de bactérias isoladas de biodiesel e de outras fontes, como cama de aviário, para a produção de biohidrogênio. Além disso, o aprendizado e aplicação destas técnicas de identificação foram muito importantes para a formação do aluno como Tecnólogo em Biotecnologia.

As pesquisas envolvendo a caracterização molecular dos isolados bacterianos foram desenvolvidas nos laboratórios de Microbiologia e Labiogen (Laboratório de Bioquímica e Genética), da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. O cultivo bacteriano foi realizado no laboratório de Microbiologia e os procedimentos como extração de DNA, amplificação por PCR, clivagem com enzimas de restrição e eletroforese foram realizados no Labiogen. A reação de sequenciamento foi preparada no Labiogen e encaminhada à empresa Ludwig Biotecnologia (Alvorada, RS).

Os resultados obtidos poderão ser utilizados pela equipe envolvida para futuras publicações nas mais diversas áreas da biotecnologia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ANÁLISE, ATRAVÉS DA FERRAMENTA BLAST _n , DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS DA REGIÃO rDNA 16S DOS ISOLADOS AN8 E AN9 DE <i>Staphylococcus</i> spp.	27
FIGURA 2 - ALINHAMENTO DA REGIÃO INICIAL DAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO rDNA 16S DE <i>S. warneri</i> E <i>S. pasteurii</i> , OBTIDAS NO GENBANK.	27
FIGURA 3 – PADRÃO DE CLIVAGEM COM A ENZIMA <i>AluI</i> DA REGIÃO DO GENE DA CATALASE DOS ISOLADOS AN8 E AN9 DE <i>Staphylococcus</i> spp., ANALISADO EM GEL DE AGAROSE A 2,5%.	29
FIGURA 4 – ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DO PADRÃO DE CLIVAGEM COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>AluI</i> E GÉIS VIRTUAIS DA REGIÃO DE 1114 pb DO GENE DA CATALASE DE <i>S. warneri</i> E <i>S. pasteurii</i> , ATRAVÉS DO SOFTWARE NEBcutterV2.2.	30
FIGURA 5 – ANÁLISE, ATRAVÉS DA FERRAMENTA BLAST _n , DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS DA REGIÃO rDNA 16S DOS ISOLADOS E1 (A) E E2 (B) DE ENTEROBACTÉRIAS.	31
FIGURA 6 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR COM PRIMERS ESPÉCIE-ESPECÍFICOS PARA <i>K. pneumoniae</i> (KHE) E <i>E. cloacae</i> (ATPD).....	32

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO rDNA 16S DOS ISOLADOS AN8 E AN9.	28
TABELA 2 – RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO rDNA 16S DOS ISOLADOS E1 E E2.	33

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO <i>Staphylococcus</i>	18
2.1.1 Potencial biotecnológico de <i>Staphylococcus warneri</i>	18
2.1.2 Potencial biotecnológico de <i>Staphylococcus pasteurii</i>	19
2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS BACTÉRIAS DA FAMÍLIA <i>Enterobacteriaceae</i>	19
2.2.1 Potencial biotecnológico de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	20
2.2.2 Potencial biotecnológico de <i>Enterobacter cloacae</i>	20
2.3 TÉCNICAS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA	21
2.3.1 Sequenciamento da região do gene rDNA 16S	21
2.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	22
2.3.3 Polimorfismos de Tamanho de Fragmento de Restrição (RFLP)	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 ISOLADOS BACTERIANOS	24
3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Staphylococcus spp.</i>	24
3.2.1 Sequenciamento da região rDNA 16S	24
3.2.2 Análise <i>in silico</i> das sequências da região rDNA 16S	24
3.2.3 Análise por PCR-RFLP da região da catalase	25
3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ENTEROBACTÉRIAS <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Enterobacter cloacae</i>	26
3.3.1 Sequenciamento da região rDNA 16S e análises <i>in silico</i>	26
3.3.2 PCR de colônia com <i>primers</i> espécie-específicos para <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Enterobacter cloacae</i>	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 SEQUENCIAMENTO REGIÃO rDNA 16S DOS ISOLADOS DE <i>Staphylococcus spp.</i> E ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	28
4.2 ANÁLISE POR PCR-RFLP DO GENE DA CATALASE PARA A CONFIRMAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>Staphylococcus spp.</i>	31
4.3 SEQUENCIAMENTO REGIÃO rDNA 16S DOS ISOLADOS DE ENTEROBACTÉRIAS	34

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
5.1 SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS	37
REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

Microrganismos isolados de fontes ambientais nem sempre possuem características para o desenvolvimento de doenças em animais e vegetais, podendo desempenhar importantes papéis biotecnológicos. Dentre estes microrganismos, grande foco tem sido dado às bactérias, por serem microrganismos fáceis de cultivar e com grandes propriedades bioquímicas reconhecidas. A correta identificação de bactérias isoladas de fontes ambientais é um desafio (UNGAR et al., 2008), pois o ambiente de origem pode propiciar alterações no material genético e, conseqüentemente nas suas características fenotípicas (MANFIO, 2003).

O desenvolvimento da caracterização microbiológica de bactérias foi influenciado pela necessidade de conhecimento sobre os microrganismos causadores de doenças em seres humanos e animais (ATLAS e BARTHA, 1998). A caracterização molecular de bactérias isoladas de fontes ambientais auxilia no conhecimento das substâncias que produzem, mostrando-se relevante tanto para uso no controle biológico de doenças e pragas, como para aplicação no setor biotecnológico ou indústria farmacêutica para o tratamento de doenças causadas por bactérias patogênicas.

Dentre os patógenos de importância na medicina veterinária e humana, o gênero *Staphylococcus* tem sido amplamente estudado. Espécies de *Staphylococcus* resistentes à metilina (MRS) tornaram-se importantes patógenos nosocomiais, exigindo medidas efetivas para controlar sua disseminação. Atualmente existem ao menos 50 espécies e muitas linhagens identificadas. No entanto, espécies não relacionadas a patologias podem ser importantes candidatas a prospecção biotecnológica, e, se tratando de espécies de *Staphylococcus*, é bem conhecida a sua capacidade de produção de peptídeos antimicrobianos (estafilococinas) capazes de inibir vários patógenos humanos e animais, e também com propriedades biotecnológicas como conservantes de alimentos ou agentes terapêuticos (BASTOS et al., 2009). No entanto, outras utilizações biotecnológicas e descobertas de compostos de interesse biotecnológico ainda são incipientes.

Outra classe de bactérias reconhecida com importantes patógenos humanos e animais são gêneros da família *Enterobacteriaceae*, que inclui aproximadamente 46 gêneros e 263 espécies e subespécies. Os gêneros que foram estudados nesse trabalho foram *Klebsiella* e *Enterobacter spp.*, importantes patógenos entéricos. No

entanto, relatos sobre a utilização destes gêneros bacterianos em estudos sobre sua utilização biotecnológica ainda são pouco frequentes. A caracterização molecular (realizada durante este estágio) permitiu a identificação das espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*, em amostras isoladas de resíduos de cama de aviário, rendendo um artigo científico já publicado, utilizando o isolado de *K. pneumoniae* para produção de biohidrogênio (ESTEVAM et al., 2018).

A proposta do trabalho foi identificar, através de análises moleculares como sequenciamento e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e análises *in silico*, bactérias do gênero *Staphylococcus*, isoladas de biodiesel e *Enterobactérias* isoladas a partir de cama de aviário ,por meio da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) com *primers* espécie-específicos, sequenciamento e análises *in silico*, para realizar a correta identificação em nível de espécie,visando contribuir em projetos de pesquisa de prospecção biotecnológica de microrganismos de fontes ambientais da equipe do LabCatProBio da UFPR-Setor Palotina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO *Staphylococcus*

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram positivos, com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, apresentando-se isolados, aos pares, em tétrades ou em forma de cachos (BANNERMAN, 2003). São mesófilos, tolerantes a concentrações salinas que variam entre 10% a 20%, e crescem em uma faixa de pH que varia de 4 a 9,8 (FRANCO e LANDGRAF, 2004). São encapsulados ou com formação de capsula limitada, usualmente catalase positivos, não apresentam motilidade e nem produzem esporos sendo os mesmos classificados como anaeróbios facultativos, exceto *S. saccharolyticus* e *S. aureus* subsp. *anaerobius* (BANNERMAN, 2003).

Os *Staphylococcus* são um grupo de bactérias que ocorrem amplamente na natureza. O gênero inclui patógenos humanos e animais, geralmente estafilococos coagulase-positivos (SCP) como *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. pseudintermedius* (SASAKI et al., 2007; VAN HOOVELS et al., 2006) e estafilococos coagulase-negativos (SCN) como *S. equorum*, *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. succinus*, *S. warneri*, *S. vitulinus*, *S. pasteurii*, *S. epidermidis* e *S. lentus*.

Os SCN são geralmente reconhecidos como patógenos de baixa virulência. No entanto, este grupo de espécies bacterianas está sendo atualmente reavaliado como uma importante causa de infecção grave tanto na comunidade quanto nos serviços de saúde, tendo sido isolados de pacientes com imunossupressão e identificados como os agentes causadores de infecções causadas por equipamentos médicos contaminados e alimentos (PIETTE e VERSCHRAEGEN, 2009), mas ainda é pouco explorada a importância dos SCN na biotecnologia.

2.1.1 Potencial biotecnológico de *Staphylococcus warneri*

S. warneri é um SCN comumente presente na microbiota do epitélio humano e membranas mucosas. Atualmente, ainda faltam dados científicos sobre a patogênese e epidemiologia dessa espécie e até onde sabemos, não existem ainda muitos relatos na literatura sobre estudos dessa espécie ou aplicações biotecnológicas. O único trabalho encontrado foi referente à aplicação de

polidimetilsiloxano para aperfeiçoar o cultivo e a produção de lipase por essa espécie, em biorreatores (RECH et al., 2011).

Existem identificadas várias cepas de *S. warneri* como patogênicas a seres humanos (CAMPOCCIA et al., 2010). Em animais, há relatos de isolamento de *S. warneri* a partir de rins e fígados de trutas arco-íris doentes que exibiam ulcerações nas barbatanas e exoftalmia, juntamente com fluido ascético no abdômen (GIL et al., 2000).

2.1.2 Potencial biotecnológico de *Staphylococcus pasteurii*

S. pasteurii é um SCN emergente em infecções nosocomiais, embora seu papel na causa de doenças em humanos ainda é controverso (MORFIN-OTERO et al., 2012). Tem sido relatada recentemente uma capacidade de resistência contra várias classes de antibióticos, como meticilina/oxacilina, macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina e fosfomicina, bem como compostos quaternários de amônio (SAVINI et al., 2009).

Em comparação a *S. warneri*, o potencial biotecnológico de *S. pasteurii* tem sido mais bem explorado. Kanmani et al. (2015) purificaram parcialmente uma lipase a partir de *S. pasteurii* e a imobilizaram em esferas de celite para ser utilizada na hidrólise enzimática de efluente de moinho de óleo de coco. Recentemente, Haidar et al. (2018) demonstraram que uma linhagem de *S. pasteurii* exibiu diversas atividades de promoção de crescimento vegetal *in vitro* e um efeito promotor de crescimento significativo em experimentos *in vivo*, com potencial para serem utilizadas como bioinoculantes. *S. pasteurii* também foi encontrado em sedimentos marinhos contaminados com óleo, como relatado por Alonso-Gutiérrez et al. (2008), indicando a habilidade desta espécie em degradar o biodiesel.

2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS BACTÉRIAS DA FAMÍLIA *Enterobacteriaceae*

As *Enterobacteriaceae* são bactérias Gram negativas, com formato bacilar, apresentam ou não motilidade, dependendo da espécie, aeróbias ou anaeróbias facultativas, fermentam açúcares e crescem numa variedade de meios sólidos.

Habitam comensalmente o trato gastrointestinal de vertebrados e estão entre os agentes patogênicos mais comuns que infectam seres humanos e animais.

2.2.1 Potencial biotecnológico de *Klebsiella pneumoniae*

Embora *K. pneumoniae* seja considerada um importante patógeno de humanos e animais, existem alguns relatos na literatura sobre a utilização de dessa espécie para fins biotecnológicos, principalmente relacionados ao seu papel na produção de biohidrogênio (ESTEVAM et al., 2018; PUGAZHENDHI e THAMARAISELVI, 2017). *K. pneumoniae* também tem sido estudada como produtora de propano-1,3-diol, composto que entra na formulação de diversos produtos industriais, incluindo materiais compósitos, adesivos, películas, moldes, poliésteres alifáticos, copoliésteres, solventes e anticongelantes. Além disso, *K. pneumoniae* produz vitamina B12, uma coenzima de glicerol desidratase, que está envolvida na síntese do precursor propano-1,3-diol, o 3-hidroxi propionaldeído (KUMAR et al., 2017).

2.2.2 Potencial biotecnológico de *Enterobacter cloacae*

E. cloacae é mais conhecida como um patógeno oportunista, responsável por bacteremia, endocardite, osteomielite, artrite séptica, assim como por infecções de pele, do trato respiratório e urinário. Muitas destas infecções são nosocomiais, isto é, resultam de tratamento hospitalar. No entanto, existem relatos na literatura sobre a importância biotecnológica dessa bactéria. Chen et al. (2018) reportou uma cepa de *E. cloacae* com potencial para remoção de mercúrio, em solos contaminados. Padhi et al. (2017) isolaram uma linhagem de *E. cloacae* que apresentou um grande potencial para nitrificação e desnitrificação aeróbia na presença de alta concentração de hidroxilamina, em tanques de peixes, apresentando também uma alta capacidade de produção de bioflocos. Uma cepa de *E. cloacae* foi capaz de usar celobiose como única fonte de carbono (LIAN et al., 2016). O rápido consumo desse açúcar por microrganismos poderia levar à eliminação de carbono na forma de ácidos orgânicos, em vez de sua incorporação na biomassa.

2.3 TECNICAS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

2.3.1 Sequenciamento da região do gene rDNA 16S

Na maioria dos laboratórios microbiológicos, os microrganismos são identificados com base nos aspectos morfológicos das colônias, coloração de Gram e produção de enzimas ou pigmentos, o que às vezes permitem apenas uma classificação presuntiva. Sendo assim, métodos de identificação genotípica baseados no sequenciamento de DNA são mais precisos e rápidos, mas ainda são pouco empregados na rotina de um laboratório de diagnóstico, sendo utilizados mais na área da pesquisa.

O sequenciamento de DNA é uma ferramenta de análise molecular onde uma sequência de nucleotídeos é determinada. Em 1977, Frederick Sanger propôs um método diferente e mais eficiente chamado de método enzimático ou de Sanger. Sanger descobriu que se conseguisse interromper a replicação de um mesmo DNA em pontos diferentes ele poderia juntar essas fitas menores e formar a sequência completa do DNA. O DNA de interesse é replicado várias vezes, produzindo fragmentos de tamanhos distintos. O método consiste em adicionar desoxiribonucleotídeos (ddNTP's), que são nucleotídeos modificados que não possuem o grupo OH livre no carbono 3' da pentose. Quando os ddNTP's tentam se ligar com a fita de DNA, com a ausência do OH, o próximo nucleotídeo não tem onde se ligar e a replicação é interrompida.

O sequenciamento da região do gene rDNA 16S de bactérias possui aproximadamente 1500 nucleotídeos é o marcador mais usado para sequenciamento e análise taxonômica bacteriana. Essa região é comum para todas as espécies bacterianas, apresentando o mesmo tamanho, mas com variações nucleotídicas que podem caracterizar as espécies dentro de um mesmo gênero ou gêneros diferentes (CLARRIDGE., 2004)

A molécula 16S é uma molécula menor que a 23S (+-3000pb), que contém duas vezes mais informações e conseqüentemente gera maior exatidão nas inferências filogenéticas (REIS et al., 2002). A análise da região do gene 16S rDNA tem auxiliado em estudos de diversidade genética bacteriana e identificação a nível de gênero e espécie. Atualmente inúmeras sequências completas de muitas espécies já são conhecidas e registradas em bancos genéticos como o NCBI (National Center for Biotechnology Information).

2.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Considerada uma técnica da biologia molecular revolucionária, a PCR (polymerase chain reaction) permitiu o rápido desenvolvimento no estudo de sequências de ácidos nucleicos. Essa técnica descrita por Saiki et al. (1985), possibilita amplificar fragmentos pequenos e específicos do genoma, permitindo a obtenção, de várias cópias de uma determinada região do DNA. Desenvolvida por Kary Banks Mullis (prêmio Nobel de química de 1993) em abril de 1983, essa técnica da biologia molecular consiste na síntese enzimática de cópias de ácidos nucleicos (COSTA, 2010). A PCR é uma técnica altamente sensível, por meio da qual, pequenas quantidades de sequências de DNA ou RNA específicas podem ser enzimaticamente amplificadas até que sejam obtidas milhões de cópias da sequência alvo (KONEMAM et al., 1999). A dupla fita do DNA serve como molde para a síntese da nova molécula e o uso de *primers* irá definir a região alvo do DNA que deverá ser amplificada. Ao final, têm-se milhões de moléculas de DNA de fita dupla, que são cópias da sequência de DNA entre os *primers* (SAIKI et al., 1985).

2.3.3 Polimorfismos de Tamanho de Fragmento de Restrição (RFLP)

A análise de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) dentre as diversas técnicas da Biologia Molecular é muito utilizada em estudos taxonômicos e determinação em nível de gênero ou espécie por ser simples e abranger diversas regiões do genoma (FERREIRA e SOUZA-CHIES, 2005).

O polimorfismo de comprimento de fragmentos é obtido a partir de uma clivagem na fita dupla de DNA por uma ou mais enzimas de restrição e os fragmentos obtidos podem ser analisados por eletroforese em géis de agarose.

O polimorfismo observado na técnica de RFLP ocorre porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos difere na sequência de nucleotídeos ao longo da fita. A presença ou ausência de sequências específicas, reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, pode variar entre diferentes indivíduos, gerando o polimorfismo (ANTONINI et al., 2004).

É considerada uma estratégia bastante econômica, que dispensa o sequenciamento, podendo ser a região alvo o gene rDNA 16S ou um gene

específico para um determinado gênero ou espécie bacteriana. Considerando que, espécies podem apresentar variações nucleotídicas nessas sequências, o padrão de clivagem pode ser utilizado para se definir uma espécie bacteriana (FUNKE e CARLOTTI, 1994).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLADOS BACTERIANOS

As duas amostras de *Staphylococcus* spp. (AN8 e AN9) foram isoladas de amostras de biodiesel, pela acadêmica Andressa Carolina Neves, durante o seu projeto de mestrado e as duas amostras de enterobactérias (E1 e E2), foram isoladas a partir de cama de aviário, pela acadêmica Andressa Estevam, durante o seu projeto de dissertação de mestrado e também pela Prof^a Mabel Karina Arantes Alves, por ocasião de seu projeto de doutoramento. As cepas ATCC 13883 de *K. pneumoniae* e 13047 de *E. cloacae* foram cedidas gentilmente pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá.

3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Staphylococcus* spp.

3.2.1 Sequenciamento da região rDNA 16S

A extração de DNA e sequenciamento da região do gene rDNA 16S já haviam sido realizados antes do início do TCC, sendo realizada neste trabalho apenas a finalização das análises *in silico* das sequências obtidas, descritas no item 3.2.2.

3.2.2 Análise *in silico* das sequências da região rDNA 16S

Sequências de nucleotídeos da região rDNA 16S, obtidas previamente por sequenciamento, dos dois isolados de *Staphylococcus* spp (NA8 e NA9), foram analisadas empregando-se o software Bioedit version 7.2.5. (HALL, 1999), e processadas no Nucleotide BLAST (BLASTn), do *National Center for Biotechnology Information Site*, para a determinação da espécie ou gênero bacteriano.

Adicionalmente, uma sequência pertencente à mesma região rDNA 16S de *S. warneri* e de *S. pasteurii* foram obtidas no GenBank e analisadas quanto ao nível de similaridade entre estas duas espécies.

3.2.3 Análise por PCR-RFLP da região da catalase

Para a identificação, em nível de espécie, a região do gene da catalase (*katA*) dos dois isolados de *Staphylococcus* spp., previamente caracterizados por sequenciamento da região 16S com pertencentes à espécies *warneri* ou *pasteuri*, foi amplificada por PCR utilizando oligonucleotídeos degenerados *kdn forward* (5'-AARGGWTCHGGWGCWTTYGG-3') e *kdn reverse* (5'-TGTTTCRAARTTRTCRTCATC-3') Blaiotta et al. (2004), cujo produto de PCR é de 1114 pb. O DNA genômico foi diluído na proporção 1:10 em água Milli-Q estéril e misturado com Tampão de PCR 1x, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM do mix de dNTP, 1 unidade da *Taq* DNA Polimerase (Bioron) e 0,2 µM de cada *primer*, em um volume final de 20 µl. As reações foram amplificadas em termociclador Bioer Life Express modelo MJ96. As condições de amplificação foram: 3 min iniciais a 95°C, 40 ciclos de 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 52°C e 90 segundos a 72°C, como extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão TBE 1X (45mM Tris-Borato, 1mM EDTA, pH 8,0) utilizando o padrão de peso molecular de 100 pb (Bioron), com 0,5 µg/ml de brometo de etídio e foto documentado em equipamento Loccus Biotecnologia L.PIX.

Para a obtenção do perfil de RFLP, um total de 5 µl do produto de PCR obtido na reação anterior, foi clivado com 1 U da enzima de restrição *AluI* (SibEnzyme®), em um volume total de 20 µl, utilizando tampão de clivagem 1x. Após incubação da reação por 2 horas a 37° C, os produtos de clivagem foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5% e fotodocumentado como nas condições descritas acima. Além do padrão de peso molecular de 100 pb (Bioron), também foi utilizado o padrão de 50 pb (Ludwig Biotec).

A análise *in silico* do padrão de clivagem da região do gene da catalase (*katA*) de *Staphylococcus* spp., pela enzima de restrição *AluI*, foi realizado utilizando a ferramenta NEBcutterV2.0.

3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ENTEROBACTÉRIAS *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*

3.3.1 Sequenciamento da região rDNA 16S e análises *in silico*

A extração de DNA e o sequenciamento da região do gene rDNA 16S do DNA dos isolados E1 e E2 de enterobactérias também já haviam sido realizados antes do início do TCC, sendo realizada neste trabalho apenas a finalização das análises *in silico* das sequências, utilizando a mesma metodologia como descrito no item 3.2.2, para os isolados de *Staphylococcus* spp.

3.3.2 PCR de colônia com *primers* espécie-específicos para *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*

Colônias de ambos os isolados de enterobactérias foram obtidas em Agar XLD (Desoxicolato-lisina-xilose) e uma colônia foi selecionada para a identificação através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos específicos de uma região que codifica hemolisina para *K. pneumoniae* Khe *forward* (5'- GATGAAACGACCTGATTGCATTC-3') e Khe *reverse* (5'- CCGGGCTGTCGGGATAAG-3') Hartmann et al. (2009), cujo produto de PCR é de 77pb e os oligonucleotídeos específicos para *E. cloacae* ATPD *forward* (5'- CGAGAGCCTGGTGCTGC-3') e ATPD *reverse* (5'- GATTGGCTGACCCAAT-3') (ANBAZHAGAN et al., 2010). Como controle positivo foram utilizadas as cepas ATCC 13883 de *K. pneumoniae* e ATCC 13047 de *E. cloacae*. Para a amplificação, uma colônia foi fervida em água estéril por 96° C durante 6 minutos. Após uma breve centrifugação, um total de 2 µL do sobrenadante foi misturado com Tampão de PCR 1x, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM do mix de dNTP, 1 unidade da *Taq* DNA Polimerase (Bioron) e 0,2 µM de cada *primer*, em um volume final de 20 µl. As reações foram amplificadas em termociclador Bioer Life Express modelo MJ96. As condições de amplificação para Khe e ATPD foram: 5 min iniciais a 94°C, 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C e 45 segundos a 72°C, como extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão TBE 1X utilizando o padrão de

peso molecular de 50 pb (Ludwig Biotec), com 0,5 µg/ml de brometo de etídio e fotodocumentado em equipamento Loccus Biotecnologia L.PIX.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SEQUENCIAMENTO REGIÃO rDNA 16S DOS ISOLADOS DE *Staphylococcus* spp. E ANÁLISES *IN SILICO*.

As informações sobre as sequências obtidas por sequenciamento da região rDNA 16S do DNA dos isolados AN8 e AN9 de *Staphylococcus* spp. estão apresentadas na FIGURA 1 e TABELA 1.

FIGURA 1 – ANÁLISE, ATRAVÉS DA FERRAMENTA BLASTn, DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS DA REGIÃO rDNA 16S DOS ISOLADOS AN8 E AN9 DE *Staphylococcus* spp.

Amostra AN9

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Staphylococcus pasteurii strain CIFRI Y-TSB17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	896	896	98%	0.0	97%	JF784013.1
<input type="checkbox"/>	Staphylococcus sp. strain SP3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	96%	0.0	98%	MH191107.1
<input type="checkbox"/>	Staphylococcus pasteurii strain ATCC 51129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	96%	0.0	98%	MG757632.1
<input type="checkbox"/>	Staphylococcus pasteurii strain RD2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	96%	0.0	98%	MG680735.1
<input type="checkbox"/>	Staphylococcus sp. strain Ns6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	96%	0.0	98%	MG544103.1

Amostra AN8

<input type="checkbox"/>	Staphylococcus warneri strain E170 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	632	1112	92%	4e-177	97%	MF681861.1
<input type="checkbox"/>	Staphylococcus warneri strain P0099Karwar 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	632	1112	92%	4e-177	97%	MG800691.1
<input type="checkbox"/>	Staphylococcus warneri strain JST1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	632	1112	92%	4e-177	97%	MH311992.1
<input type="checkbox"/>	Staphylococcus warneri strain JRT4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	632	1112	92%	4e-177	97%	MH311988.1
<input type="checkbox"/>	Staphylococcus warneri strain B4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	632	632	51%	4e-177	97%	MH279787.1

FONTE: O autor (2018).

A Figura 1 apresenta o resultado da análise das sequências da região parcial do gene rDNA 16S das amostras de *Staphylococcus* AN8 e AN9, obtido através da plataforma BLASTn. Um total de cinco sequências do GenBank que apresentaram similaridades com a sequência obtida é apresentado na figura. Foi possível observar similaridades, para ambos os isolados, tanto com sequências do GenBank de *S. pasteurii* como de *S. warneri*. No entanto, a análise da sequência da amostra AN8

apresentou mais *hits* relacionados com *S. warneri* e a análise da amostra AN9, mais *hits* relacionados com *S. pasteurii*.

Adicionalmente, uma sequência de aproximadamente 1400 pb da região rDNA 16S de *S. warneri* (número de acesso: L37603.1) e *S. pasteurii* (número de acesso: AB269765) foi escolhida através do GenBank e foi realizado o alinhamento entre estas duas sequências, usando a ferramenta BLASTn do NCBI. Foi possível observar uma grande similaridade de sequência entre estas duas espécies, com 99% de identidade (FIGURA 2). Na figura 2 é apresentado apenas a região inicial (aproximadamente 300 pb) da região analisada.

TABELA 1 – RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO rDNA 16S DOS ISOLADOS AN8 E AN9.

Amostra	Tamanho da sequência obtida (em pb)	Resultado do sequenciamento (maior hit)
AN9		
<i>Primer Reverse</i>	522	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
AN8		
<i>Primer Reverse</i>	320	
<i>Primer Forward</i>	393	<i>Staphylococcus warneri</i>

FONTE: O autor (2018).

Os dados apresentados na tabela 1 são baseados nos *hits* apresentados na figura 1.

FIGURA 2 - ALINHAMENTO DA REGIÃO INICIAL DAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO rDNA 16S DE *S. warneri* E *S. pasteurii*, OBTIDAS NO GENBANK.

Staphylococcus warneri 16S ribosomal RNA (16S rRNA) gene
 Sequence ID: [L37603.1](#)
[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 38 to 1470 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2604 bits(1410)	0.0	1425/1433(99%)	0/1433(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGCGAACAGATAAGGAGCTT	GCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG	60	
Sbjct 38	AGCGAACAGATAAGGAGCTT	GCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG	97	
Query 61	GATAACCTACCTATAAGACTGGGATAA	CTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAAGAT	120	
Sbjct 98	GATAACCTACCTATAAGACTGGGATAA	CTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACAT	157	
Query 121	TTTGAACCGCATGGTTCAATAGTGA	AAGACGGCCTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGC	180	
Sbjct 158	ATTGAACCGCATGGTTCAATAGTGA	AAGACGGCCTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGC	217	
Query 181	GCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTA	AACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTG	240	
Sbjct 218	GCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTA	AACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTG	277	
Query 241	AGAGGGTGATCGGCCACACTGGA	ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG	300	
Sbjct 278	AGAGGGTGATCGGCCACACTGGA	ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG	337	
Query 301	TAGGGGAATCTTCCGCAATGGGCG	AAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGG	360	
Sbjct 338	TAGGGGAATCTTCCGCAATGGGCG	AAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGG	397	

Query: Sequência rDNA 16S de *S. warneri*

Sbjct: Sequência rDNA 16S de *S. pasteurii*

FONTE: O autor (2018).

Resultados de estudos baseados em amplificação e sequenciamento da região rDNA 16S têm demonstrado que a diversidade de microrganismos em amostras ambientais é vasta. Mas embora o sequenciamento de rDNA 16S seja universalmente aceito como um padrão para identificação bacteriana, a técnica pode não ser útil para algumas espécies, por apresentarem sequências similares, até mesmo entre gêneros diferentes (MIGNARD e FLANDROIS, 2006), apresentando por volta de 90 a 99% de similaridades interespecies.

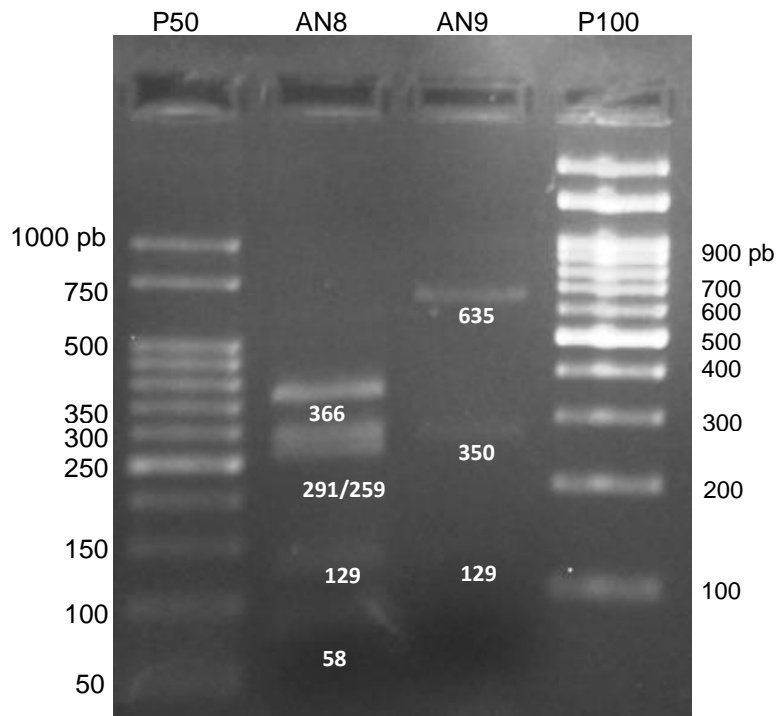
Kim et al. (2018) utilizaram a técnica de sequenciamento da região rDNA 16S para identificação de 55 isolados de *Staphylococcus*, sendo as principais espécies encontradas por estes autores, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. pasteurii*, *S. saprophyticus*, *S. warneri* e *S. xylosus*. Estes autores reportaram que esta técnica também não discriminou de maneira efetiva espécies estreitamente relacionadas, e sequenciamento adicional de outras regiões no DNA bacteriano foi necessário. Para isso, realizaram a amplificação do gene *sodA* (superóxido dismutase A), um gene *housekeeping*, com *primers* específicos.

Neste trabalho propomos à amplificação do gene da catalase (gene *housekeeping*), seguida de clivagem com uma enzima de restrição (PCR-RFLP), descrita a seguir.

4.2 ANÁLISE POR PCR-RFLP DO GENE DA CATALASE PARA A CONFIRMAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Staphylococcus* spp.

Para complementar a análise por sequenciamento, descrita anteriormente, a região do gene da catalase dos isolados AN8 e AN9 foi amplificada por PCR (dados não mostrados) e posteriormente submetida à clivagem com a enzima de restrição *AluI*. O padrão de clivagem foi analisado por eletroforese e o resultado é apresentado na Figura 3.

FIGURA 3 – PADRÃO DE CLIVAGEM COM A ENZIMA *AluI* DA REGIÃO DO GENE DA CATALASE DOS ISOLADOS AN8 E AN9 DE *Staphylococcus* spp., ANALISADO EM GEL DE AGAROSE A 2,5%. P50: PADRÃO DE 50 pb; P100: PADRÃO DE 100 pb. Pb: PARES DE BASES.



FONTE: O autor (2018).

Para auxiliar na análise do perfil de bandas gerados pela técnica de RFLP, a sequência de 1114 pb do gene da catalase de *S. warneri* (número de acesso: AB045340.1) e *S. pasteurii* (EU259834.1) obtida pelo GenBank, e a simulação do padrão de clivagem e o gel virtual foram obtidos (FIGURA 4). O padrão de bandas gerado pela clivagem foi compatível com o padrão de bandas virtual, obtido pela análise *in silico*, confirmando a identidade das amostras como sendo *S. warneri* a amostra AN8 e *S. pasteurii* a amostra AN9.

FIGURA 4 – ANÁLISE *IN SILICO* DO PADRÃO DE CLIVAGEM COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *AluI* E GÉIS VIRTUAIS DA REGIÃO DE 1114 pb DO GENE DA CATALASE DE *S. warneri* E *S. pasteurii*, ATRAVÉS DO SOFTWARE NEBcutter.

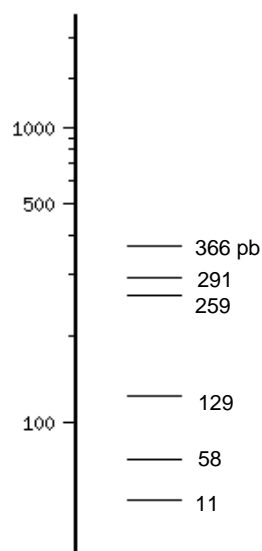
Padrão de clivagem *in silico* de *S. warneri*

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	AluI-AluI	271-636	366
2	AluI-AluI	766-1056	291
3	(LeftEnd)-AluI	1-259	259
4	AluI-AluI	637-765	129
5	AluI-(RightEnd)	1057-1114	58
6	AluI-AluI	260-270	11

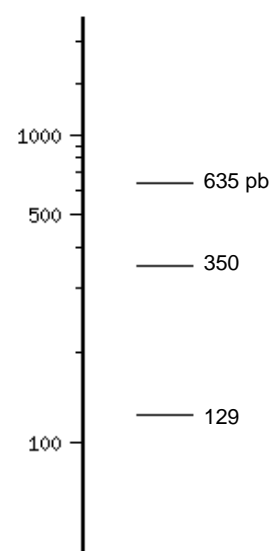
Padrão de clivagem *in silico* de *S. pasteurii*

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	(LeftEnd)-AluI	1-635	635
2	AluI-(RightEnd)	765-1114	350
3	AluI-AluI	636-764	129

Gel virtual de *S. warneri*



Gel virtual de *S. pasteurii*



FONTE: o autor (2018)

Sabemos que a técnica de PCR-RFLP consiste da amplificação da região do gene da catalase seguido de clivagem com a enzima de restrição *AluI*, para a diferenciação de espécies de *Staphylococcus*, foi apenas realizada análises em *in silico*, em uma região de 900 bp interna ao gene *katA*, por Blaiotta e colaboradores (2010), trabalho que foi referência para a seleção dos *primers* e enzima de restrição utilizados nesse trabalho. Experimentalmente, estes autores utilizaram outras enzimas de restrição, como *CfoI* e *TaqI* para um *amplicon* interno ao gene *katA* de 544 pb, mas para a região de 1114 pb total do gene, realizaram a clivagem com a enzima *CfoI* para alguns isolados.

Os genes *katA* exibem um alto nível de polimorfismo de sítios de clivagem para enzimas de restrição, oferecendo boas oportunidades para uma rápida e precisa identificação em nível de espécie de isolados estafilocócicos. Como indicado pelas análises *in silico* realizado por Blaiotta e colaboradores (2010), o padrão de clivagem de uma região de 900 pb deste gene (tamanho referente as sequencias obtidas pela técnica de sequenciamento), foi precisa para diferenciar 49 isolados estafilocócicos. O presente trabalho, com base na análise realizada por estes pesquisadores, foi possível diferenciar as espécies de *S. warneri* e *S. pasteurii* pela amplificação, por PCR, da região de 1114 pb do gene *katA*, seguido por clivagem com a enzima de restrição *AluI*.

4.3 SEQUENCIAMENTO REGIÃO rDNA 16S DOS ISOLADOS DE ENTEROBACTÉRIAS.

FIGURA 5 – ANÁLISE, ATRAVÉS DA FERRAMENTA BLASTn, DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS DA REGIÃO rDNA 16S DOS ISOLADOS E1 (A) E E2 (B) DE ENTEROBACTÉRIAS.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

A	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Uncultured Enterobacter sp. clone hkn1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	998	998	95%	0.0	98%	MH400169.1
<input type="checkbox"/>	Enterobacter cloacae subsp. dissolvens strain MF-02 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	998	998	95%	0.0	98%	MH177231.1
<input type="checkbox"/>	Enterobacter ludwigii strain I42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	998	998	95%	0.0	98%	MH244330.1
<input type="checkbox"/>	Enterobacter cloacae complex sp. FDA-CDC-AR_0164 chromosome, complete genome	998	7975	95%	0.0	98%	CP028950.1
<input type="checkbox"/>	Klebsiella aerogenes strain PP03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	998	998	95%	0.0	98%	MH169130.1

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

B	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Uncultured organism clone ELU0075-T355-S-NIPCRAMgANa_000094 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1561	2674	97%	0.0	98%	HQ774347.1
<input type="checkbox"/>	Klebsiella sp. strain Pa2S2E 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	1555	2354	97%	0.0	98%	MG518367.1
<input type="checkbox"/>	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain ATTA32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1555	1937	72%	0.0	98%	KJ783439.1
<input type="checkbox"/>	Klebsiella pneumoniae strain SD9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1555	2668	97%	0.0	98%	JQ993102.1
<input type="checkbox"/>	Klebsiella pneumoniae strain Ri27b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1552	2057	78%	0.0	98%	KU724384.1

FONTE: O autor (2018).

A Figura 5 apresenta o resultado da análise das sequências da região parcial do gene rDNA 16S das amostras de enterobactérias E1 e E2, obtido através da plataforma BLASTn. Um total de cinco sequências do GenBank que apresentaram similaridades com as sequências obtidas é apresentado na figura.

As informações sobre as sequências obtidas por sequenciamento da região rDNA 16S do DNA dos isolados de enterobactérias E1 e E2 estão apresentadas na TABELA 2.

TABELA 2 – RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO rDNA 16S DOS ISOLADOS E1 E E2.

Amostra	Tamanho da sequência obtida (em pb)	Resultado do sequenciamento (maior hit)
E1		
Primer Forward	596	<i>Enterobacter spp.</i>
E2		
Primer Reverse	676	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Primer Forward	908	

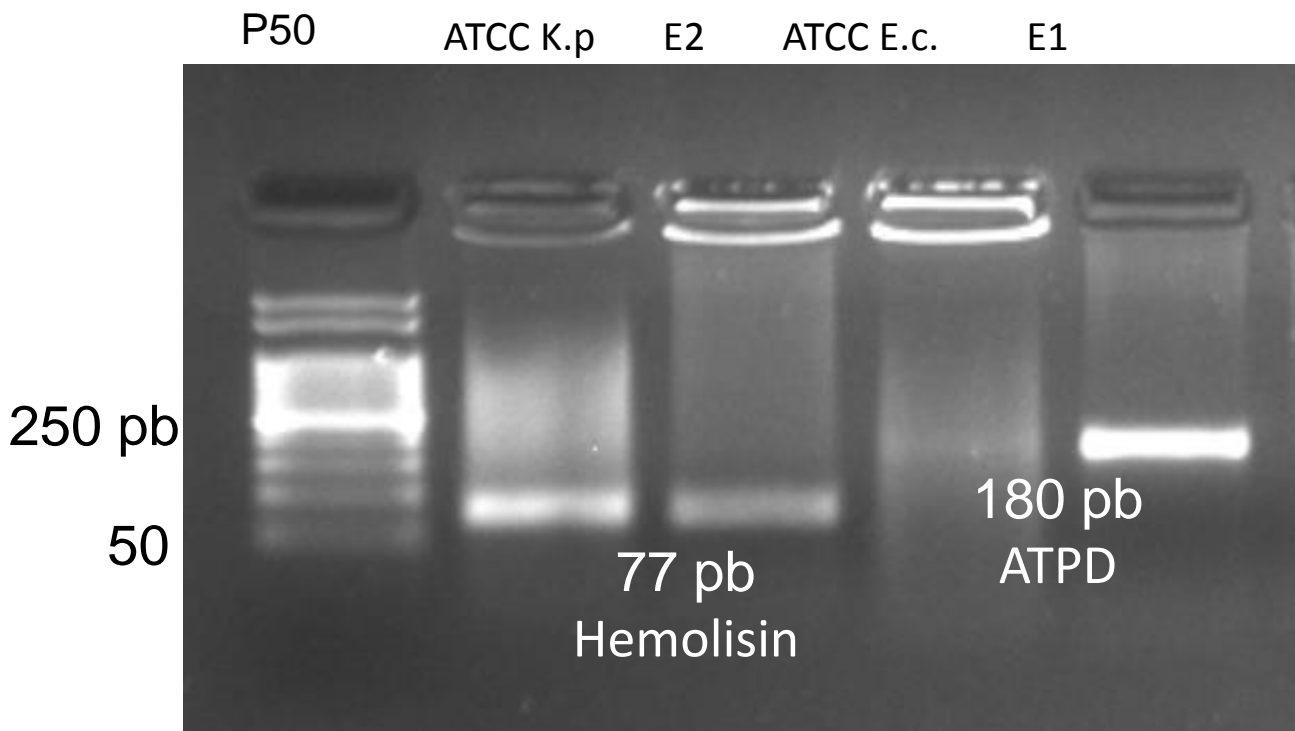
FONTE: O autor (2018).

Foi possível observar similaridades com espécies do gênero *Enterobacter* spp, para o isolado E1 e *Klebsiella pneumoniae* para o isolado E2. Considerando os demais hits, além dos cinco primeiros, que apresentaram alguma similaridade com a sequência da região rDNA 16S obtida para o isolado E1, foi possível também observar espécies do gênero *Klebsiella*. Pesquisadores de nossa equipe, que foram responsáveis pelo isolamento dessas bactérias, realizaram um alinhamento com sequências da região rDNA 16S de *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae*, obtidas via GenBank. Verificaram que os dois gêneros apresentaram muita similaridade de sequência entre si. Consideramos, portanto, que a região rDNA 16S não é considerada um marcador molecular ideal para a diferenciação destes dois gêneros.

Da mesma forma com mencionado acima, sobre a dificuldade de caracterizar algumas espécies utilizando o sequenciamento da região 16S, *primers* que amplificam outras regiões foram utilizados para estes isolados. Como *K. pneumoniae* era a espécie de interesse para este grupo de pesquisa, *primers* que amplificam o gene da hemolisina, *Khe (housekeeping)* dessa espécie foram utilizados para a realização de uma PCR *primer*-específica. Foi utilizado também o *primer* ATPD (ATP sintase subunidade beta) para *E. cloacae* (ANBAZHAGAN ET AL., 2010). A amplificação confirmou a identidade dos isolados como sendo *K.*

pneumoniae para o isolado E2 e *E. cloacae* para o isolado E1 (FIGURA 6). Cepas ATCC foram utilizadas como controle positivo.

FIGURA 6 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR COM *PRIMERS* ESPÉCIE-ESPECÍFICOS PARA *K. pneumoniae* (KHE) E *E. cloacae* (ATPD). P50: PADRÃO DE TAMANHO MOLECULAR 50 pb (LUDWIG BIOTECNOLOGIA). 1) *AMPLICON* DE 77 pb DE *k. pneumoniae* ATCC. 2) *AMPLICON* DE 77 PB DE *K. pneumoniae*, ISOLADO E2. 3) *AMPLICON* DE 180 pb DE *E. cloacae* ATCC. 4) *AMPLICON* DE 180 pb DE *E. cloacae* ISOLADO E1.



FONTE: o autor (2018)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi possível verificar que o sequenciamento da região do gene rDNA 16S, marcador molecular muito utilizado para caracterização bacteriana, não foi o marcador ideal para a diferenciação das duas espécies de enterobactérias (*Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae*) e das duas espécies de *Staphylococcus* (*S. warneri* e *S. pasteurii*), isoladas de fontes ambientais. A alternativa encontrada foi a utilização de *primers* espécie-específicos para a diferenciação das enterobactérias e a técnica de PCR-RFLP da região do gene da catalase (*katA*), seguido por clivagem com a enzima de restrição *AluI*. A realização deste trabalho de conclusão de curso foi importante para o aprendizado de novas técnicas e aperfeiçoamento de técnicas de domínio dos pesquisadores envolvidos.

5.1 SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aplicar a técnica de PCR-RFLP, utilizada nesse trabalho, para a confirmação em nível de espécie de 30 isolados de *Staphylococcus* spp., pertencentes ao banco de bactérias do Labiogen, caracterizados previamente através de análises microbiológicas como *S. aureus*.

- Explorar o potencial biotecnológico das espécies de *Enterobacter* e *Staphylococcus*, que foram identificadas nesse trabalho, além de identificar outras espécies de microrganismos a partir das técnicas que utilizamos para realizar esse trabalho de conclusão de curso.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula, Porto Alegre: Artes Médicas**, p. 291-334, 1997.
- ALONSO-GUTIERREZ, J.; COSTA, M. M.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B. Alcanivorax strain detected among the cultured bacterial community from sediments affected by the 'Prestige' oil spill. **Marine Ecology Progress Series**. v. 362, p. 25–36, 2008.
- ANBAZHAGAN, D.; KATHIRVALU, G. G.; MANSOR, M.; YAN, G. O. S.; YUSOF, M. Y.; SEKARAN, S. D. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) assays for the detection of Enterobacteriaceae in clinical samples. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 11, p. 1186-1191, 2010.
- ANTONINI, S.; MENEGHIN, S. P.; URASHIMA A. S. **Técnicas Básicas de Biologia Molecular**. São Carlos: Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, 2004. p. 57.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology: fundamentals and applications**. 4. Ed. CA, USA: **Benjamin Cummings Publishing Company**, 1998.
- BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology Microbiology**, ASM Press: Washington, p. 384-404. 2003.
- BASTOS, M.C.; CEOTTO, H.; COELHO, M.L.; NASCIMENTO, J.S. Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. **Curr Pharm Biotechnol**. v.10, n.1, p.38-61, jan. 2009.
- BLAIOTTA, G.; D. ERCOLINI, C.; PENNACCHIA, V.; FUSCO, A.; CASABURI, O.; PEPE, F. VILLANI. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**. v. 97, p. 719–730, 2004.
- BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; ERCOLINI, D.; PEPE, O.; COPPOLA, S. Diversity of *Staphylococcus* Species Strains Based on Partial *kat* (Catalase) Gene Sequences and Design of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for Identification and Differentiation of Coagulase-Positive Species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). **Journal of Clinical Microbiology**. p. 192–201, Jan. 2010.
- CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L.; VISAI, L.; CORAZZARI, T.; POGGIO, C.; MASO, A.; PIRINI, V.; RAVAIOLI, S.; CANGINI, I.; SPEZIALE, P.; ARCIOLA, CR. Characterization of 26 *Staphylococcus warneri* isolates from orthopedic infections. **Journal of Artificial Organs**. 2010. v. 33, p.575–581.

CHEN, SC.; LIN, WH.; CHIEN, CC.; TSANG, DCW.; KAO, CM. Development of a two-stage biotransformation system for mercury-contaminated soil remediation. **Chemosphere**. v. 200, p. 266-273, 2018.

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

COSTA, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. **Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas**. Ciência Rural. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.

ESTEVAM, A.; ARANTES, M. K.; ANDRIGHETO, C.; FIORINI, A.; SILVA, E. A.; ALVES, E. J. Production of biohydrogen from brewery wastewater using *Klebsiella pneumoniae* isolated from the environment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.43, Issue 9, 2018.

FERREIRA, T. F.; SOUZA-CHIES, T. T. 2005. Genetic diversity among *Paspalum L.* species (Poaceae) belonging to the Notata and Linearia groups based on restriction fragment length polymorphism analyses. **Genetica**, v. 125, n. 2-3, p. 133-140, 2005.

FRANCO, B.D.GM.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. **Microbiologia dos Alimentos**, São Paulo. 2004. Editora: Atheneu, cap.4, p.33-81.

FUNKE, G.; CARLOTTI, A. Differentiation of *Brevibacterium* spp. encountered in clinical specimens. **Journal of clinical microbiology**, v. 32, n. 7, p. 1729-1732, 1994.

GIL, P.; VIVAS, J.; GALLARDO, CS.; RODRIGUEZ, LA. First isolation of *Staphylococcus warneri*, from diseased rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Northwest Spain. **Journal of Fish Diseases**. 2000. v. 23, p.295–298.

Haidar, B.; FERDOUS, M.; FATEMA, B.; FERDOUS, A. S.; ISLAM, M. R.; KHAN, H. Population diversity of bacterial endophytes from jute (*Corchorus olitorius*) and evaluation of their potential role as bioinoculants. **Microbiological Research**. Mar, v. 208, p. 43-53, 2018.

Hall, T. A BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program. for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. London: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999. p. 95-98.

Hartman, L.J.; Selby, E.B.; Whitehouse, A.C.; Coyne, S.R.; Jaissle, J.G.; Twenhafel, N.A.; Burke, R.L.; Kulesh, D.A. Rapid Real-Time PCR Assays for Detection of *Klebsiella pneumoniae* with the *rmpA* or *magA* Genes Associated with the Hypermucoviscosity Phenotype. **Journal of Molecular Diagnostics**. American Society for Investigative Pathology and the Association for Molecular Pathology., September, v. 11, 2009.

KANMANI, P.; KUMARESAN, K.; ARAVIND, J. Pretreatment of coconut mill effluent using celite-immobilized hydrolytic enzyme preparation from *Staphylococcus pasteurii*

and its impact on anaerobic digestion. **Biotechnology Progress**. Sep-Oct, v. 31 (5), p. 1249-1258, 2015.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKERNBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas color**. 1999.

KUMAR, V.; PARK, S. Potential and limitations of *Klebsiella pneumoniae* as a microbial cell factory utilizing glycerol as the carbon source. **Biotechnology Advances**. v. 36, p. 150–167, 2017.

LIAN, J.; CHOI, J.; TAN, Y. S.; HOWE, A.; WEN, Z.; JARBOE, L. R. Identification of Soil Microbes Capable of Utilizing Cellobiosan. **Plos One**. v. 11 (2), 2016.

MANFIO, G. P. **Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil (Microbiota)**. Ministério do Meio Ambiente - COBIO/MMA – GTB/CNPq – NEPAM/UNICAMP, 2003. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/arquivos/microb1.pdf>>. Acesso em: 10 junho. 2018.

MIGNARD, S.; FLANDROIS J. P. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. **Journal Microbiological Methods**. v. 67, p. 574–581, 2006.

MORFIN-OTERO, R.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.A.; LÓPEZ, D.; RODRÍGUEZ-NORIEGA, E.; GARZA-GONZÁLEZ, E. Isolation of rare coagulase-negative isolates in immunocompromised patients: *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus pettenkoferi* and *Staphylococcus pasteurii*. **Annals of Clinical Laboratory Science**. v. 42, p. 182-185, 2012.

PADHI, S. K.; TRIPATHY, S.; MOHANTY, S.; MAITI, N. K. Aerobic and heterotrophic nitrogen removal by *Enterobacter cloacae* CF-S27 with efficient utilization of hydroxylamine. **Bioresource Technology**. v. 232, p. 285-296, 2017.

PIETTE, A.; VERSCHRAEGEN, G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. **Veterinary microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 45-54, 2009.

PIETTE, A.; VERSCHRAEGEN, G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. **Veterinary Microbiology, Elsevier**, 2009, v. 134 (1-2), p.45-54.

PUGAZHENDHI, A.; THAMARAISELVI, K. Optimization of Fermentative Hydrogen Production by *Klebsiella pneumoniae* KTSMBNL 11 Isolated from Municipal Sewage Sludge. **Bioremediation and Sustainable Technologies for Cleaner Environment**. p. 267-278, 2017.

RECH, FR.; VOLPATO, G.; AYUB, MA. Optimization of lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17 using the polydimethylsiloxanes artificial oxygen carriers. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**. 2011. v. 38, p. 1599–1604.

REIS, JÚNIOR.F.B.; MENDES, I.C.; TEIXEIRA, K.R.; REIS, V.M. Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de Microrganismos do solo. **Planaltina, DF: Embrapa Cerrados**, 2002.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K.; Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, p.2770–2778, 2007.

SAVINI, V.; CATAVITELLO, C.; BIANCO, A.; BALBINOT, A.; D'ANTONIO, D. Epidemiology, pathogenicity and emerging resistances in *Staphylococcus pasteurii*: from mammals and lampreys, to man. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**. Jun; 4 (2):123-9, 2009.

UNGAR, A. B.; LOPES, M.; MARTINS, B. S.; ALARSA, M., & GOMEZ, J. G. C. **A importância da identificação e caracterização de microrganismos por técnicas moleculares para definição de taxas de degradação de compostos orgânicos em processos de biorremediação de hidrocarbonetos em aquíferos de ambiente tropical**. In: XV Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, Natal - RN, 2008.