



**Tânia de Jesus Travassos Leandro**

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

**Descrição de duas novas espécies do género  
*Nevskia* da classe *Gammaproteobacteria***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Prof. Doutor Milton S. da Costa, Universidade de Coimbra

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Álvaro Luís Afonso Moreira Rato da Fonseca

Arguente: Prof. Doutora Olga Cristina Pastor Nunes

Descrição de duas novas espécies do género *Nevskia* da classe *Gammaproteobacteria*

Copyright Tânia de Jesus Travassos Leandro, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



**Tânia de Jesus Travassos Leandro**

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

**Descrição de duas novas espécies do género  
*Nevskia* da classe *Gammaproteobacteria***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Prof. Doutor Milton S. da Costa, Universidade de Coimbra

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Álvaro Luís Afonso Moreira Rato da Fonseca

Arguente: Prof. Doutora Olga Cristina Pastor Nunes

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Milton Costa, por me ter aceito no seu grupo de investigação, pelo seu valioso apoio, incentivo e disponibilidade durante a realização deste trabalho laboratorial, e auxílio na preparação desta dissertação.

Ao Luís França, por todo o seu precioso apoio, ensinamentos, disponibilidade e colaboração durante a realização do trabalho laboratorial e preparação desta dissertação.

À Dra. Fernanda Nobre, agradeço a simpatia e disponibilidade que sempre demonstrou para o esclarecimento de qualquer dúvida.

Ao Prof. Dr. Ramon Rosselló-Móra (Grupo de Microbiologia Marinha, IMEDEA, Ilhas Baleares) pela análise filogenética.

A todo o pessoal do laboratório que, directa ou indirectamente, apoiaram e colaboraram na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Álvaro Fonseca pela disponibilidade demonstrada.

À minha família e amigos, pelo seu apoio, compreensão e incentivo ao longo de todo o percurso de vida.



## Resumo

No decurso do estudo da avaliação da diversidade microbiológica de uma água natural mineral proveniente de um aquífero em Portugal, na origem e após engarrafamento, quatro novos isolados foram recuperados. Os isolados formam células Gram negativas em bastonete. As estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 foram isoladas a partir de um furo artesiano e apresentam uma temperatura ótima de 25–30 °C e pH ótimo entre 6–6,5. As estirpes são aeróbias, não móveis, floculam em meio líquido, são positivas para a presença de catalase e oxidase e assimilam açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e alcanos. Os ácidos gordos maioritários são *Summed feature 8* (C<sub>18:1</sub>ω7c/C<sub>18:1</sub>ω6c) e C<sub>16:0</sub>. Os lípidos polares maioritários são difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, conjuntamente com três aminolípidos não identificados.

As estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54 foram isoladas a partir de água mineral natural engarrafada com 180 e 6 dias de armazenamento, respectivamente, apresentam temperatura ótima de 30 °C e pH ótimo entre 6–6,5. As estirpes são aeróbias, têm mobilidade, são positivas para a presença de catalase e oxidase e assimilam açúcares, álcoois, ácidos orgânicos, aminoácidos e alcanos. Os ácidos gordos maioritários são *Summed feature 8* (C<sub>18:1</sub>ω7c/C<sub>18:1</sub>ω6c) e *Summed feature 3* (C<sub>16:1</sub>ω7c/C<sub>16:1</sub>ω6c). Os lípidos polares maioritários são difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina e fosfatidilglicerol.

Todas as estirpes apresentam ubiquinona 8 como quinona respiratória maioritária. A análise do gene 16S rRNA revelou que agrupam com as espécies do género *Nevskia*, com as quais têm similaridade de sequência entre 95,2–95,5 % no caso das estirpes F2-63<sup>T</sup>/F2-178 e de 96,3–97,1 % no caso das estirpes G6M-30<sup>T</sup>/G6-54. Com base na análise da sequência do gene 16S rRNA e características fisiológicas e bioquímicas descreveram-se duas novas espécies do género *Nevskia*. A espécie representada pela estirpe F2-63<sup>T</sup> para a qual se propõe o nome *Nevskia aquatilis* e uma segunda espécie representada pela estirpe G6M-30<sup>T</sup> para qual se propõe o nome *Nevskia persephonica*.

**Termos-chave:** Aquífero, género *Nevskia*, espécie, abordagem polifásica.



## Abstract

In an ongoing study to assess microbiological diversity in a natural mineral water within a deep aquifer in Portugal and after bottling and storage, four new isolates were recovered. All isolates form Gram negative rod-shaped cells. Strains F2-63<sup>T</sup> and F2-178 with an optimum growth temperature of about 25–30 °C and an optimum pH for growth between 6–6.5, were isolated from an artesian aquifer through the borehole sampling port. Strains are aerobic, no-motile, flocculate in liquid media, catalase and oxidase positive, and assimilate carbohydrates, organic acids, amino acids and alkanes. The major fatty acids are *Summed feature 8* (C<sub>18:1</sub>ω7c/C<sub>18:1</sub>ω6c) and C<sub>16:0</sub>. The major polar lipids are diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol and three unidentified aminolipids.

Strains G6M-30<sup>T</sup> and G6-54 with an optimum growth temperature of 30 °C and an optimum pH for growth between 6–6.5 were isolated after bottling and storage for a period of 180 to 6 days, respectively. Strains are aerobic, motile, catalase and oxidase positive, and assimilate carbohydrates, alcohols, organic acids, amino acids and alkanes. The major fatty acids are *Summed feature 8* (C<sub>18:1</sub>ω7c/C<sub>18:1</sub>ω6c) and *Summed feature 3* (C<sub>16:1</sub>ω7c/C<sub>16:1</sub>ω6c). The major polar lipids are diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol.

All strains have ubiquinone 8 as the major respiratory quinone and analysis of the 16S rRNA gene shows the strains to cluster with species of the genus *Nevskia* to which they have pairwise sequence similarity in the range 95.2–95.5 % for strains F2-63<sup>T</sup> and F2-178, and in the range 96.3–97.1 % for strains G6M-30<sup>T</sup> and G6-54. Based on the 16S rRNA gene sequence analysis, physiological and biochemical characteristics we describe two new species of the genus *Nevskia*. One species represented by strain F2-63<sup>T</sup> for which we propose the name *Nevskia aquatilis*. The second species represented by strain G6M-30<sup>T</sup> for which we propose the name *Nevskia persephonica*.

**Keywords:** Aquifer, genus *Nevskia*, species, polyphasic approach.



# Índice Geral

## Capítulo 1

### Introdução Geral

1.1. Água mineral natural .....	2
1.2. Comunidade microbiana autóctone das águas minerais naturais .....	3
1.3. Estudo da diversidade da comunidade microbiana em águas subterrâneas e da dinâmica da população microbiana em água mineral engarrafada .....	4
1.4. Oligotrofia e estratégias de sobrevivência .....	5
1.5. Sistemática e Taxonomia .....	6
1.6. Evolução dos sistemas de classificação .....	6
1.7. Definição de espécie segundo a abordagem polifásica .....	8
1.8. Filo <i>Proteobacteria</i> .....	10
1.8.1. Género <i>Nevskia</i> .....	10
1.9. Objectivo .....	12

## Capítulo 2

### Materiais e Métodos

2.1. Origem e isolamento .....	14
2.2. Determinação das condições óptimas de crescimento .....	15
2.2.1. Cultura das estirpes bacterianas .....	15
2.2.2. Determinação da temperatura óptima de crescimento .....	16
2.2.3. Determinação do pH óptimo de crescimento .....	16
2.2.4. Determinação da tolerância a sal .....	17
2.3. Caracterização Morfológica .....	17
2.3.1. Morfologia das colónias .....	17
2.3.2. Morfologia celular .....	18
2.3.3. Determinação da formação de biofilme na ausência de azoto .....	18
2.3.4. Coloração de Gram .....	20
2.3.5. Coloração de flagelos .....	20
2.4. Caracterização Bioquímica .....	21

2.4.1. Ensaio de degradação enzimática .....	21
2.4.1.1. Presença de catalase .....	21
2.4.1.2. Presença de citocromo oxidase .....	21
2.4.1.3. Presença de lipases .....	22
2.4.1.4. Presença de DNase .....	22
2.4.1.5. Hidrólise de caseína .....	22
2.4.1.6. Hidrólise de amido .....	23
2.4.1.7. Hidrólise de esculina.....	23
2.4.1.8. Hidrólise de arbutina.....	24
2.4.1.9. Hidrólise de xilano .....	24
2.4.1.10. Detecção de actividades enzimáticas usando o sistema API ZYM (bioMérieux) .....	24
2.4.2. Detecção da produção de indol, presença de L-arginina di-hidrolase, β-galactosidase, urease e de hidrólise de gelatina usando o sistema API 20 NE (bioMérieux).....	25
2.4.3. Assimilação de fontes únicas de carbono .....	25
2.4.4. Determinação da produção de ácido usando o sistema API 50 CH.....	27
2.4.5. Redução de nitrato .....	28
2.4.6. Crescimento em anaerobiose .....	29
2.4.7. Crescimento químiolitoheterotrófico por utilização de tiosulfato .....	29
2.4.7.1. Quantificação de tiosulfato .....	30
2.4.7.2. Quantificação de sulfato .....	31
2.5. Caracterização quimiotaxonómica .....	32
2.5.1. Análise da composição em ácidos gordos .....	32
2.5.1.1. Cultura das estirpes bacterianas e recolha das células .....	32
2.5.1.2. Extracção de ésteres metílicos de ácidos gordos .....	33
2.5.1.3. Análise e identificação dos ésteres metílicos de ácidos gordos por cromatografia de gás .....	33
2.5.2. Composição em lipoquinonas respiratórias .....	34
2.5.2.1. Cultura e recolha de células .....	34
2.5.2.2. Extracção das lipoquinonas respiratórias.....	35

2.5.2.3. Separação e purificação das lipoquinonas respiratórias.....	35
2.5.2.4. Identificação das lipoquinonas respiratórias .....	35
2.5.3. Análise de lípidos polares.....	36
2.5.3.1. Cultura e recolha de células .....	36
2.5.3.2. Extracção de lípidos polares.....	36
2.5.3.3. Separação de lípidos polares por cromatografia monodimensional e bidimensional em camada fina .....	37
2.5.3.3.1 Cromatografia monodimensional em camada fina .....	37
2.5.3.3.2. Cromatografia bidimensional em camada fina .....	37
2.5.3.4. Revelação dos lípidos polares com corantes específicos.....	38
2.5.3.4.1. Revelação de fosfolípidos (reagente azul de molibdénio-ácido sulfúrico) .....	38
2.5.3.4.2. Revelação de aminolípidos (reagente de ninidrina) .....	38
2.5.3.4.3. Revelação de glicolípidos (reagente de $\alpha$ -naftol-ácido-sulfúrico) .....	39
2.5.3.4.4. Revelação de lípidos polares totais (reagente de ácido molibdofosfórico).....	39
2.6. Caracterização genética.....	40
2.6.1. Determinação do conteúdo em guanina e citosina .....	40
2.6.1.1. Extracção e purificação do DNA.....	40
2.6.1.2. Degradação do DNA .....	40
2.6.1.3. Quantificação do conteúdo G+C por HPLC .....	41
2.6.2. Determinação da sequência do gene rRNA 16S e análise filogenética .....	41
2.6.3. Análise das estirpes G6M-30 <sup>T</sup> e G6-54 por RAPD-PCR e ERIC-PCR.....	42

### **Capítulo 3**

#### **Resultados**

3.1. Sequenciação do gene rRNA 16S e análise filogenética .....	44
3.2. Determinação das condições óptimas de crescimento.....	46
3.2.1. Estirpes F2-63 <sup>T</sup> e F2-178 .....	46

3.2.2. Estirpes G6M-30 <sup>T</sup> e G6-54 .....	48
3.3. Caracterização morfológica e fenotípica .....	49
3.3.1. Morfologia celular e colonial .....	49
3.3.2. Capacidade de formação de biofilme na ausência de azoto .....	50
3.3.3. Crescimento em anaerobiose .....	50
3.3.4. Detecção de actividades enzimáticas, da capacidade de assimilação de fontes únicas de carbono e da produção de ácido a partir das fontes de carbono do sistema API 50 CH .....	50
3.3.5. Quantificação do consumo de tiosulfato e produção de sulfato.....	53
3.4. Caracterização quimiotaxonómica .....	56
3.4.1. Composição em quinonas isoprenóides .....	56
3.4.2. Análise da composição em ácidos gordos .....	56
3.4.3. Análise de lípidos polares.....	58
3.5. Caracterização genotípica.....	61
3.5.1. Análise do conteúdo em guanina e citosina (G+C) do DNA .....	61
3.5.2. RAPD e ERIC-PCR das estirpes G6M-30 <sup>T</sup> e G6-54 .....	61
<b>Capítulo 4</b>	
<b>Discussão .....</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo 5</b>	
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>71</b>

## Índice de Figuras

### Capítulo 2

**Figura 2.1.** Representação esquemática do modo de repicagem efectuado para cultivo das células para extracção de ácidos gordos. As setas indicam a primeira (a), segunda (b) e terceira (c) direcções de espalhamento. A zona rodeada pelo quadrado (□) indica a área de crescimento utilizada para recolha de células ..... 32

### Capítulo 3

**Figura 3.1.** Dendograma filogenético com base na comparação das sequências do gene rRNA 16S das estirpes F2-63<sup>T</sup>, F2-178, G6M-30<sup>T</sup> e G6-54 com as estirpes tipo dos géneros da família *Sinobacteriaceae*. As distâncias evolutivas representadas foram determinadas usando o método de *neighbour-joining*. Os números indicados nos nodos indicam a percentagem de *bootstrap*, resultante de 1000 réplicas. A escala indica 20 substituições de nucleótidos inferidas em 100..... 44

**Figura 3.2.** Dendograma filogenético com base na comparação das sequências do gene rRNA 16S das estirpes F2-63<sup>T</sup>, F2-178, G6M-30<sup>T</sup> e G6-54 com as estirpes tipo dos géneros da família *Sinobacteriaceae*. As distâncias evolutivas representadas foram determinadas usando o método de *maximum-likelihood*. Os números indicados nos nodos indicam a percentagem de *bootstrap*, resultante de 1000 réplicas. A escala indica 20 substituições de nucleótidos inferidas em 100..... 45

**Figura 3.3.** Formação de agregados de células da estirpe F2-63<sup>T</sup>, cultivada em meio líquido R2A após três dias de incubação a 30 °C..... 46

**Figura 3.4.** Placas de meio R2A inoculadas com gotas de uma suspensão celular da estirpe F2-63<sup>T</sup> com D.O. a 0,025; 0,05 e 0,1; observadas após 8 dias de incubação à respectiva temperatura: 10 °C (A), 15 °C (B), 20 °C (C), 25 °C (D), 30 °C (E), 35 °C (F) e 40 °C (G) ..... 47

**Figura 3.5.** Placas de meio R2A com pH ajustado no intervalo de 5–9, inoculadas com gotas de uma suspensão celular das estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 com D.O. a 0,025; 0,05 e 0,1, observadas após 8 dias de incubação a 30°C. pH 5 (A), pH 5,5 (B), pH 6 (C), pH 6,5 (D), pH 7 (E), pH 7,5 (F) e pH 8 (G) ..... 47

**Figura 3.6.** Variação da taxa específica de crescimento para as estirpes G6M-30<sup>T</sup> (●) e G6-54 (○) em função da temperatura (A) e do pH (B)..... 48

**Figura 3.7.** (A) Morfologia celular das estirpe F2-63<sup>T</sup> observada por microscopia óptica de contraste de fase, utilizando ampliação de 1000x. (B) Morfologia das colónias da estirpe F2-63<sup>T</sup> em meio R2A. A estirpe F2-178 apresenta a mesma morfologia celular e colonial que a estirpe F2-63<sup>T</sup> ..... 49

<b>Figura 3.8 (A)</b> Morfologia celular das estirpe G6M-30 <sup>T</sup> observadas por microscópio óptico de contraste de fase, utilizando uma ampliação de 1000x. <b>(B)</b> Morfologia das colónias da estirpe G6M-30 <sup>T</sup> em meio R2A, após quatro dias de incubação. A estirpe tipo G6-54 apresenta a mesma morfologia celular e colonial que a estirpe G6M-30 <sup>T</sup> .....	50
<b>Figura 3.9.</b> Quantificação do consumo de tiossulfato (●) e produção de sulfato (○) pelas estirpes G6M-30 <sup>T</sup> <b>(A)</b> e G6-54 <b>(C)</b> , cultivadas em condições aeróbias em meio 27 do DSMZ modificado e suplementado com 0,5 g/L de tiossulfato de sódio, e respectiva avaliação da capacidade de crescimento químiolitoheterotrófico na ausência (▲) e presença de 0,5 g/l de tiossulfato de sódio (△) para as estirpes G6M-30 <sup>T</sup> <b>(B)</b> e G6-54 <b>(D)</b> .....	53
<b>Figura 3.10.</b> Quantificação do consumo de tiossulfato (●) e produção de sulfato (○) pelas estirpes F2-63 <sup>T</sup> <b>(A)</b> e F2-178 <b>(B)</b> cultivadas em meio 27 do DSMZ modificado, e suplementado com 0,5 g/L de tiossulfato de sódio .....	54
<b>Figura 3.11. (A)</b> Quantificação do consumo de tiossulfato (●) e produção de sulfato (○) pela estirpe <i>N. soli</i> <sup>T</sup> . <b>(B)</b> Comparação do crescimento da estirpe <i>N. soli</i> <sup>T</sup> cultivada em meio 27 do DSMZ na ausência (▲) e presença de 0,5 g/L de tiossulfato de sódio (△).....	55
<b>Figura 3.12.</b> Cromatografia monodimensional de camada fina dos lípidos polares de F2-63 <sup>T</sup> , G6M-30 <sup>T</sup> , <i>N. ramosa</i> <sup>T</sup> e <i>N. soli</i> <sup>T</sup> . A placa foi revelada com corante específico para observação de lípidos totais <b>(A)</b> , de grupos fosfato <b>(B)</b> e de grupos amina <b>(C)</b> . DPG, difosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; AL, aminolípido .....	59
<b>Figura 3.13.</b> Cromatografia bidimensional de camada fina dos lípidos polares de F2-63 <sup>T</sup> revelados com corantes específicos para detecção de fosfolípidos <b>(A)</b> , aminolípidos <b>(B)</b> e lípidos totais <b>(C)</b> . DPG, difosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; AL, aminolípido .....	59
<b>Figura 3.14.</b> Cromatografia bidimensional de camada fina dos lípidos polares de G6M-30 <sup>T</sup> revelados com corantes específicos para detecção de fosfolípidos <b>(A)</b> , aminolípidos <b>(B)</b> e lípidos totais <b>(C)</b> . DPG, difosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; AL, aminolípido .....	60
<b>Figura 3.15.</b> Cromatografia bidimensional de camada fina dos lípidos polares de <i>N. ramosa</i> <sup>T</sup> revelados com corantes específicos para detecção de fosfolípidos <b>(A)</b> , aminolípidos <b>(B)</b> e lípidos totais <b>(C)</b> . DPG, difosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; AL, aminolípido .....	60
<b>Figura 3.16.</b> Cromatografia bidimensional de camada fina dos lípidos polares de <i>N. soli</i> <sup>T</sup> revelados com corantes específicos para detecção de fosfolípidos <b>(A)</b> , aminolípidos <b>(B)</b> e lípidos totais <b>(C)</b> . DPG, difosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; AL, aminolípido .....	60
<b>Figura 3.17.</b> Avaliação do perfil de RAPD <b>(A)</b> e ERIC-PCR <b>(B)</b> para as estirpes G6M-30 <sup>T</sup> (1) e G6-54 (2) .....	61

## Índice de Tabelas

### Capítulo 2

<b>Tabela 2.1.</b> Composição do meio R2A utilizado no crescimento das estirpes F2-63 <sup>T</sup> , F2-178, G6M-30 <sup>T</sup> , G6-54 e das estirpes de referência (Reasoner e Geldreich, 1985).....	15
<b>Tabela 2.2.</b> Composição do meio utilizado para determinação de formação de biofilme na ausência de azoto (Stürmeyer <i>et al.</i> , 1998) .....	18
<b>Tabela 2.3.</b> Composição da solução de oligoelementos SL-9 (Tschech e Pfennig, 1984).....	19
<b>Tabela 2.4.</b> Composição da solução de vitaminas (Pfennig, 1978) .....	19
<b>Tabela 2.5.</b> Fontes de carbono únicas testadas para suplementar o meio de cultura.....	19
<b>Tabela 2.6.</b> Constituição das soluções de corantes utilizados na coloração de Gram .....	20
<b>Tabela 2.7.</b> Constituição do corante de Ryu.....	21
<b>Tabela 2.8.</b> Composição do meio mínimo Degryse utilizado para determinação da assimilação de fontes únicas de carbono (Degryse <i>et al.</i> , 1978) .....	26
<b>Tabela 2.9.</b> Composição das soluções de oligoelementos utilizadas na preparação do meio basal para determinação da assimilação de fontes únicas de carbono .....	26
<b>Tabela 2.10.</b> Composição da solução de vitaminas e nucleótidos (Sharp e Williams, 1988) ....	26
<b>Tabela 2.11.</b> Compostos testados como fontes únicas de carbono.....	27
<b>Tabela 2.12.</b> Composição do reagente de detecção colorimétrica de nitrito .....	28
<b>Tabela 2.13.</b> Composição do meio 27 do DSMZ modificado, utilizado para testar a capacidade das estirpes de oxidação de tiosulfato de sódio em sulfato.....	30
<b>Tabela 2.14.</b> Composição da solução de oligoelementos SL-6 sem sulfatos, utilizada na preparação do meio 27 do DSMZ modificado.....	30
<b>Tabela 2.15.</b> Composição do reagente de Sörbo .....	31
<b>Tabela 2.16.</b> Composição do reagente Ba-PEG 8000 .....	32
<b>Tabela 2.17.</b> Constituição das soluções A e B utilizadas na preparação do corante azul de molibdênio-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , para revelação de fosfolípidos .....	38
<b>Tabela 2.18.</b> Constituição do reagente de ninidrina utilizado para revelar aminolípidos. ....	38
<b>Tabela 2.19.</b> Constituição do reagente $\alpha$ -naftol-ácido-sulfúrico utilizado para revelar glicolípidos.....	39

### Capítulo 3

**Tabela 3.1.** Características fenotípicas que permitem distinguir as estirpes F2-63<sup>T</sup>, F2-178, G6M-30<sup>T</sup>, G6-54 das estirpes tipo de *N. ramosa*<sup>T</sup>, *N. soli*<sup>T</sup> e *N. terrae*<sup>T</sup> ..... 52

**Tabela 3.2.** Percentagem relativa de ácidos gordos das estirpes F2-63<sup>T</sup>, F2-178, G6M-30<sup>T</sup>, G6-54, *N. ramosa*<sup>T</sup>, *N. soli*<sup>T</sup> cultivadas em meio R2A a 30 °C durante três dias; e da estirpe *N. terrae*<sup>T</sup> cultivada em meio R2A a 28°C durante dois dias (*Kim et al.*, 2011) ..... 57

## Abreviaturas

CAPSO	Ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfônico
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
D.O.	Densidade óptica
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DPG	Difosfatidilglicerol
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR</i>
HEPES	Ácido 2-(4-(2-hidróxi-1-piperazinil)-etanosulfônico
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão (do inglês <i>high pressure liquid chromatography</i> )
ICSP	International Committee on Systematics of Prokaryotes
IJSEM	International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology
KACC	Korean Agricultural Culture Collection
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfônico
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
rpm	Rotações por minuto
TAPS	Ácido N-(tris(hidroximetil)metil)-3-aminopropanosulfônico
TMPD	Dihidrocloreto de tetrametil-p-fenilenodiamina
VBNC	<i>Viable but nonculturable cells</i>



## ***CAPÍTULO 1***

### **Introdução Geral**

## 1.1. Água mineral natural

As águas minerais naturais são águas subterrâneas, que têm origem nas águas de superfície que se infiltram lentamente no solo até encontrarem a superfície de um estrato rochoso impermeável, preenchendo nessa zona todos os poros do solo (zona saturada). Quando é possível a extracção da água em condições económicas e em quantidade suficiente, para o seu aproveitamento com vista a um determinado uso, estamos na presença de um aquífero. A água num estrato saturado limitado no topo e na base por uma zona impermeável, encontra-se a uma pressão superior à pressão atmosférica (LNEG, 2010). A água mineral pode assim emergir à superfície em nascentes naturais ou ser captada através de furos artesianos que resultam de uma perfuração que intersecta o estrato saturado de água (Leclerc e da Costa, 2005). A subida da água até à superfície, observada nas nascentes naturais e nas captações, resulta das diferenças de pressão (artesianismo).

A comercialização de água mineral natural em Portugal encontra-se regulamentada na legislação Portuguesa e cumpre os requisitos fixados pela lei Europeia, de acordo com as Directivas Europeias 80/777/EEC, 96/70/EC, 2003/40/EC e 2009/54/CE (EC, 1980; EC, 1996; EC, 2003; EC, 2009). Esta legislação permite distinguir estas águas de outras águas de consumo. Nomeadamente, a sua origem encontra-se protegida da poluição (protecção e vigilância das zonas de recarga do aquífero e das zonas em volta das captações); existe manutenção da pureza bacteriológica original; o engarrafamento é realizado obrigatoriamente no local e a aplicação de qualquer tipo de tratamento químico é proibida. Os únicos tratamentos autorizados previamente ao engarrafamento consistem na eliminação e/ou (re)introdução de CO<sub>2</sub> e na separação de compostos instáveis como ferro, manganês, enxofre e arsénio. Deste modo, as águas minerais naturais são águas que apresentam a sua pureza original, sendo consideradas bacteriologicamente próprias para consumo e caracterizando-se por apresentarem uma composição físico-química estável. Estas águas apresentam uma composição característica em minerais e outros oligoelementos, da qual podem resultar efeitos benéficos para a saúde (EC, 2009). A composição química é determinada principalmente pela composição mineralógica do aquífero, no entanto, outros factores como a temperatura, concentração em CO<sub>2</sub> e reacções redox também influenciam a sua composição (Grošelj *et al.*, 2010).

As águas minerais naturais, tal como todas as águas subterrâneas, não estão isentas de microrganismos apresentando um microbiota autóctone (ver secção 1.2). Deste modo, a água engarrafada apresenta a composição química da água presente no aquífero e uma componente microbiológica constituída por microrganismos presentes na origem (microrganismos autóctones) e também por possíveis contaminantes introduzidos durante o processo de engarrafamento (microrganismos alóctones) (Leclerc e da Costa, 2005).

## 1.2. Comunidade microbiana autóctone das águas minerais naturais

Os principais microrganismos presentes nas águas minerais naturais são procariotas, embora também possam estar presentes baixas populações de fungos (Leclerc e da Costa, 2005). Como as águas subterrâneas consistem em ambientes desprovidos de luz, os microrganismos presentes são principalmente heterotróficos. O crescimento destes microrganismos encontra-se limitado pelas baixas concentrações de carbono orgânico dissolvidas e transportadas no fluxo hidrológico ou presentes nos sedimentos (Leclerc e da Costa, 2005). Microrganismos com um metabolismo quimiolitotrófico (fixação de CO<sub>2</sub> e oxidação de compostos inorgânicos para obtenção de energia), também podem constituir uma componente importante deste tipo de ambientes (Griebler e Lueders, 2009).

Os primeiros estudos de diversidade nestes ambientes baseavam-se apenas em métodos dependentes de cultura. Estes métodos resultam de uma adaptação dos métodos utilizados para contagem de bactérias heterotróficas, utilizados nas análises de controlo de qualidade da água (ver secção 1.3). As espécies autóctones mais frequentemente isoladas em cultura consistem em bastonetes Gram negativos aeróbios pertencendo às classes alfa, beta e gama do filo *Proteobacteria* e especialmente aos géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Alcaligenes*. Outras proteobactérias isoladas incluem representantes dos géneros *Comamonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas* e *Caulobacter*. Microrganismos pertencentes ao filo *Bacteroidetes* são também frequentemente isolados, principalmente dos géneros *Cytophaga*, *Flexibacter* e *Flavobacterium*. Algumas bactérias Gram positivas também foram isoladas, pertencendo aos géneros *Arthrobacter* e *Corynebacterium* do filo *Actinobacteria*. Os géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Micrococcus* também foram detectados, embora mais raramente (Bischofberger *et al.*, 1990; Gonzalez *et al.*, 1987; Leclerc e da Costa, 2005; Manaia *et al.*, 1990). No entanto, os métodos baseados em cultura não permitem analisar toda a diversidade microbiológica presente no ecossistema (ver secção 1.3). De facto, num estudo com base em métodos independentes de cultura, Loy *et al.* (2005) demonstraram que existia predominância de membros da ordem *Burkholderiales* da classe *Betaproteobacteria* (géneros *Hydrogenophaga*, *Aquabacterium*, *Polaromonas*, *Rhodopherax*, *Limnobacter*) nas águas minerais analisadas. Um outro estudo por Wilhartitz *et al.* também demonstrou que membros do domínio *Archaea* podem constituir uma importante fracção da comunidade microbiana de águas engarrafadas (Wilhartitz *et al.*, 2007).

A origem da comunidade microbiana não é conhecida, existindo, no entanto várias hipóteses. Uma dessas hipóteses considera que os microrganismos permaneceram nos sedimentos desde a sua colonização inicial, aquando do processo de deposição. Uma outra hipótese relaciona a sua origem com o transporte através do fluxo hidrológico e uma terceira hipótese sugere a colonização directa a partir da superfície aquando da perfuração para estabelecimento de furos (Leclerc e da Costa, 2005).

### **1.3. Estudo da diversidade da comunidade microbiana em águas subterrâneas e da dinâmica da população microbiana em água mineral engarrafada**

Como referido anteriormente, o estudo da diversidade microbiana em águas minerais com base em métodos de cultura têm-se focado na detecção de microrganismos heterotróficos. Um aspecto importante da aplicação de métodos dependentes de cultura consiste na escolha do meio de cultura, temperatura e tempos de incubação, uma vez que estes factores condicionam o tipo de microrganismos que é possível recuperar em cultura (Allen *et al.*, 2004). De modo a enumerar e recuperar um maior número de bactérias heterotróficas presentes nas amostras, é recomendada a utilização de meios com baixa concentração de nutrientes como o meio R2A (Reasoner e Geldreich, 1985), uma vez que se verificou permitir a obtenção de um maior número de contagens viáveis em comparação com outros meios. Por outro lado, a utilização de períodos longos de incubação (cerca de 21 dias) é importante dado que muitos microrganismos têm um crescimento lento. Em relação à temperatura de incubação é recomendado a utilização de temperaturas próximas da temperatura da fonte. Assim, a temperatura de 22 °C é recomendada pois permite uma maior recuperação de microrganismos autóctones presentes nas amostras de água. A temperatura de 37 °C é também aconselhável porque geralmente é diferente da temperatura da fonte de água e bactérias com crescimento a esta temperatura poderão ser possíveis contaminantes da água (Reasoner e Geldreich, 1985; Staley e Konopka, 1985).

No entanto, este método permite apenas enumerar e isolar bactérias heterotróficas aeróbias e aeróbias facultativas com capacidade de formação de colónias em meio sólido em condições experimentais específicas. De facto, a aplicação de métodos independentes de cultura para a contagem de células totais, como a microscopia de epifluorescência após marcação das células com laranja de acridina ou DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol), vieram demonstrar que as contagens em placa subestimavam o número real de bactérias nas amostras analisadas (Leclerc e da Costa, 2005). Verifica-se que menos de 1 % da população ambiental consegue ser cultivada. Este fenómeno foi designado por “*great plate anomaly*” (Staley e Konopka, 1985) e resulta da incapacidade de muitas bactérias presentes crescerem nas condições experimentais utilizadas. De facto, não é possível recuperar todas as bactérias viáveis nas amostras de água utilizando apenas um meio e condições experimentais específicas (Guyard *et al.*, 1999). Outro aspecto importante, está relacionado com a descoberta de que muitas dessas células, cuja cultura não é possível, embora se encontrem num estado viável e metabolicamente activo, perderam a sua capacidade de cultivo em meios em que geralmente conseguem crescer (VBNC, *viable but nonculturable cells*) (Leclerc e da Costa, 2005). A presença de células VBNC pode ser demonstrada através da aplicação de técnicas que permitem a investigação de actividades enzimáticas específicas, metabolismo celular, respiração endógena e integridade de membrana (Guyard *et al.*, 1999). Existem vários estudos que revelam que muitas bactérias entram no estado VBNC como resposta a condições

adversas, como é o caso de *stress* osmótico, pH, temperatura ou concentração limitante de nutrientes (Baker *et al.*, 1983; Xu *et al.*, 1982). Deste modo, nos últimos anos tem-se tornado muito importante, no estudo da diversidade microbiológica ambiental, a aplicação de métodos independentes de cultura, para uma análise mais completa da diversidade presente no ecossistema (ex. sequenciação de bibliotecas genómicas de clones do gene rRNA 16S amplificado a partir de DNA extraído do ambiente) (Dorigo *et al.*, 2005).

Um aspecto importante a considerar nos estudos de diversidade e análise da dinâmica populacional de água engarrafada está relacionado com uma avaliação com base em amostras de água recolhidas no momento de engarrafamento e, posteriormente, em vários pontos após o armazenamento à temperatura ambiente. Através desta abordagem, é possível estudar a dinâmica das populações autóctones presentes na água, permitindo determinar a variação do número de bactérias viáveis ao longo do tempo de armazenamento, se as mesmas populações autóctones se mantêm maioritárias durante esse período e se surgem populações diferentes, não detectadas inicialmente no momento de engarrafamento.

Em relação ao estudo da diversidade dos microrganismos isolados em cultura, a aplicação conjunta de técnicas de biologia molecular, como a amplificação e sequenciação do gene rRNA 16S, revelou-se uma grande vantagem. A análise filogenética com base na sequência do gene do rRNA 16S permite classificar os microrganismos isolados em cultura e seleccionar potenciais novas espécies que podem ser alvo de caracterização com base numa abordagem polifásica (ver secção 1.7).

#### **1.4. Oligotrofia e estratégias de sobrevivência**

As águas subterrâneas são ambientes oligotróficos caracterizadas pela presença de concentrações muito baixas de carbono orgânico, o que constitui um importante factor limitante ao crescimento. A disponibilidade de outros elementos como fosfato, sulfato e azoto e factores ambientais como os níveis de oxigénio, temperatura e pH, também condicionam o crescimento (Leclerc e da Costa, 2005).

As bactérias que vivem neste tipo de ambientes desenvolveram estratégias de sobrevivência face à disponibilidade limitada de nutrientes. Uma dessas estratégias consiste na capacidade de miniturização, através da formação de ultramicrocélulas ( $\pm 0,3 \mu\text{m}$ ). Estas resultam da ocorrência de divisão celular (fragmentação) sem crescimento e da diminuição de tamanho por degradação de macromoléculas internas como reservas de carbono, proteínas e ácidos nucleicos. A formação de ultramicrocélulas tem como vantagem permitir aumentar a razão superfície/volume, tornando a captação de nutrientes do meio mais eficiente, uma vez que a proporção de transportadores em relação ao volume citoplasmático aumenta. A degradação de proteínas e nucleótidos funciona como fonte de energia para os processos de resposta às

condições de *stress* a que as bactérias se encontram sujeitas. Por outro lado, algumas bactérias com capacidade de diferenciação podem ainda formar esporos ou cistos.

Uma outra estratégia de sobrevivência consiste numa resposta a níveis limitantes de um nutriente específico, através de dois processos: síntese de um sistema de transporte com maior afinidade para o nutriente preferencialmente utilizado e a expressão de sistemas de transporte e metabólicos para outros nutrientes alternativos que possam existir no meio. Em resultado do *stress* face à limitação de nutrientes, verifica-se ainda a ocorrência de síntese de proteínas que aumentam a resistência das bactérias a outros tipos de *stress*, como alterações de temperatura, *stress* oxidativo e osmótico (Leclerc, 2003; Leclerc e da Costa, 2005).

## **1.5. Sistemática e Taxonomia**

A sistemática é a disciplina que tem como objectivo o estudo da diversidade e das relações entre os organismos. A taxonomia é a área que se dedica à classificação dos organismos, sendo uma ferramenta indispensável da sistemática.

A taxonomia compreende três áreas que se inter-relacionam: classificação, nomenclatura e identificação (Brenner *et al.*, 2005). A classificação consiste no processo de agrupamento dos organismos em grupos (*taxa*) com base num conjunto de semelhanças e relações entre si. A nomenclatura consiste no processo de atribuição de nomes aos grupos taxonómicos de acordo com as regras estabelecidas pelo *Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana* (Lapage *et al.*, 1992). Por seu lado, a identificação é o processo pelo qual, através de um esquema de classificação é possível determinar se um organismo desconhecido pertence a um dos *taxa* previamente estabelecido, ou a um novo *taxon* que será colocado numa posição adequada na classificação estabelecida e designado de acordo com as regras de nomenclatura (Brenner *et al.*, 2005). Em relação ao Código de Nomenclatura, correcções ao mesmo são definidas pelo ICSP (International Committee on Systematics of Prokaryotes) e publicadas no IJSEM (International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology). A informação relevante é publicada no IJSEM e encontra-se disponível online em <http://www.bacterio.cict.fr>, um *website* estabelecido e mantido pelo Dr. Jean Euzéby da Universidade de Toulouse, França (Oren, 2008).

## **1.6. Evolução dos sistemas de classificação**

Os primeiros métodos de classificação tinham por base características morfológicas e, progressivamente, foram incluindo características fisiológicas e bioquímicas (Schleifer, 2009). Nos finais da década de 50 e início dos anos 60 do século XX, os avanços verificados na área da computação permitiram o desenvolvimento do conceito de taxonomia numérica (Sneath,

2005). Esta utiliza a informação de um extenso conjunto de características determinadas para as estirpes em estudo. A todas as características é atribuída a mesma relevância, o que permitiu um distanciamento das abordagens tradicionais subjectivas utilizadas até então. A informação é codificada, produzindo-se matrizes de semelhança, com o cálculo de coeficientes de similaridade e definição de grupos com base no maior grau de semelhança fenética entre os membros. Como principal resultado da análise numérica, é obtida uma estrutura em árvore (dendrograma/fenograma) que consiste na representação em duas dimensões do grau de semelhança ou distância entre diferentes estirpes em estudo. Nesse período, também surgiram novos métodos bioquímicos analíticos que permitiram o estudo da estrutura química de componentes celulares individuais e assim a obtenção de uma análise mais detalhada da composição química dos microrganismos. A aplicação deste novo tipo de dados designou-se por quimiotaixonomia. Importantes marcadores quimiotaixonómicos consistem na determinação da composição da parede celular, composição em lípidos polares, ácidos gordos e quinonas isoprenóides (Vandamme *et al.*, 1996). Ainda na década de 60, o aprofundamento do conhecimento dos ácidos nucleicos permitiu a aplicação de novas técnicas moleculares como a análise da composição em bases de DNA, expressa em percentagem molar do conteúdo de guanina e citosina (% mol G+C), e a determinação do grau de hibridação DNA-DNA. A este tipo de classificação, relacionada com a determinação da semelhança entre organismos, tendo por base a informação de natureza fenotípica e genotípica, quando esta última está disponível, designa-se por classificação fenética (Owen, 2004). No entanto, este tipo de classificação não fornece informação acerca das relações filogenéticas entre os organismos.

A análise filogenética tem por base a reconstrução das possíveis relações evolutivas entre os organismos, através da utilização de sequências de genes ou de proteínas conservadas, que funcionam como cronómetros moleculares (Owen, 2004). Desde a sua introdução por Carl Woese e colegas, nos finais dos anos 70 e início dos anos 80 do século XX, a determinação da sequência do gene do rRNA 16S em procariontes (rRNA 18S em eucariontes) e a sua utilização como cronómetro molecular revelou-se muito útil. O rRNA 16S é parte da estrutura da subunidade 30S do ribossoma. O gene do rRNA 16S preenche os critérios necessários para um bom cronómetro molecular: é um gene ortólogo presente em todos os organismos; o seu tamanho (~1500 nucleótidos) permite uma análise fácil; a estrutura primária consiste em zonas muito conservadas intercaladas por zonas variáveis e a sua transferência lateral é um evento muito raro (Stackebrandt, 2009). Actualmente, existem mais de 1.900.000 sequências do gene do rRNA 16S depositadas em bases de dados públicas, como os projectos Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>) (Cole *et al.*, 2009) ou SILVA (<http://www.arb-silva.de/>) (Pruesse *et al.*, 2007). A maior parte destas sequências foram obtidas por métodos independentes de cultura e correspondem a procariontes ainda não cultivados em laboratório. A análise comparativa das sequências do gene rRNA 16S permite estudar as relações filogenéticas entre os organismos e, juntamente com técnicas da filogenia molecular, permite representar as relações evolutivas entre os organismos na forma de uma árvore filogenética (Pace, 2009). A utilização da sequência do gene rRNA 16S tornou-se igualmente muito

importante no estudo da diversidade de microrganismos ambientais cujo cultivo em laboratório não é viável.

O gene do rRNA 16S apesar de ser útil na determinação de relações a níveis taxonómicos superiores, devido à sua natureza conservada, apresenta um baixo poder de resolução no estudo de relações ao nível da espécie, não permitindo distinguir entre espécies próximas (Rosselló-Mora e Amann, 2001). Actualmente, é aceite que uma classificação adequada, principalmente de níveis taxonómicos mais baixos, como o género e a espécie, deve ser baseada numa abordagem polifásica. Esta abordagem envolve uma combinação entre informação fenotípica, genética e filogenética (Rosselló-Mora e Amann, 2001; Vandamme *et al.*, 1996).

### **1.7. Definição de espécie segundo a abordagem polifásica**

A evolução do conceito de espécie bacteriana ao longo do tempo tem reflectido o avanço dos métodos utilizados para a sua definição assim como o conceito adoptado. É possível encontrar na literatura várias definições para espécie. A definição de taxoespécie refere-se a um grupo de organismos que partilham um elevado número de características fenotípicas e o conceito de espécie genómica refere-se a um grupo de organismos com elevados valores de hibridação DNA–DNA. No entanto, estas definições tendem a desaparecer com a tentativa de unificação de critérios de classificação pela aplicação de uma abordagem polifásica. Assim, actualmente, o conceito mais consensualmente aceite pelos taxonomistas é aquele que define espécie como um grupo de organismos individuais com origem monofilética e geneticamente semelhantes, que mostram ser idênticos entre si em várias características independentes (Rosselló-Mora e Amann, 2001).

Segundo a abordagem polifásica, no processo de definição do conceito de espécie existem três aspectos fundamentais. O primeiro aspecto está relacionado com o delineamento dos limites genómicos do grupo através da hibridação DNA–DNA e também da análise do conteúdo em G+C do DNA (Rosselló-Mora e Amann, 2001; Vandamme *et al.*, 1996). A utilização da hibridação DNA–DNA para a definição de espécie está relacionada com vários estudos realizados que permitiram demonstrar a existência de um elevado grau de correlação entre os valores de semelhança de DNA e a semelhança fenotípica, quimiotaxonómica e genómica (Stackebrandt e Goebel, 1994). De acordo com o recomendado em 1987 por um comité de especialistas na área (Wayne *et al.*, 1987), e recentemente revisto em 2002 (Stackebrandt *et al.*, 2002), estirpes que partilhem cerca de 70 % de semelhança de hibridação DNA–DNA e com 5 °C ou menos de  $\Delta T_m$ <sup>1</sup> consideram-se pertencentes à mesma espécie. A determinação do conteúdo G+C é também um dos parâmetros recomendado. Face a este parâmetro,

---

<sup>1</sup>  $\Delta T_m$  é a diferença entre a temperatura (a que 50 % do DNA está desnaturado) entre o DNA homólogo e o DNA heterólogo em condições experimentais controladas.

demonstrou-se empiricamente que estirpes que diferem em mais de 10 % não pertencem ao mesmo género e que uma espécie geralmente não contém estirpes que diferem em mais de 5 %. No entanto, valores de conteúdo em G+C próximos entre estirpes, não garantem que o genomas apresentem elevada semelhança DNA–DNA (Rosselló-Mora & Amann, 2001).

O segundo aspecto fundamental consiste na descrição do fenótipo do *taxon*. Através da determinação de características fenotípicas, quimiotaxonómicas e genótípicas, pretende-se estudar a diversidade interna do *taxon* e encontrar características que permitam diferenciá-lo de outros *taxa* próximos (Rosselló-Mora e Amann, 2001; Stackebrandt *et al.*, 2002).

O terceiro aspecto está relacionado com a análise e comparação das sequências do gene rRNA 16S. Esta análise permite indicar o padrão de ancestralidade do *taxon*, assim como reconhecer a natureza monofilética dos membros de uma espécie. Como anteriormente referido, a análise do gene rRNA 16S tem-se verificado útil para a definição de *taxa* acima do nível da espécie, por exemplo, um género pode ser definido por espécies que apresentem até 95 % de semelhança entre as sequências (Rosselló-Mora e Amann, 2001). No entanto, devido ao baixo poder de resolução ao nível da espécie, não é possível definir um valor de semelhança entre as sequências como limite para a definição de espécie.

No início da década de 90 do século XX, com a vasta quantidade de sequências do gene rRNA 16S que ficaram disponíveis, foi demonstrado que valores abaixo de 98,7 % de semelhança entre sequências correspondem a cerca de 70 % ou menos de hibridação DNA–DNA. Assim, foi sugerido que fossem realizadas apenas experiências de hibridação DNA–DNA para as estirpes que apresentam semelhança entre as sequências do gene rRNA 16S superior a 97 % (Stackebrandt e Goebel, 1994). A utilização deste valor, mais baixo do que o verificado, foi sugerido de um ponto de vista conservativo. Recentemente, o estudo da correlação entre estes dois parâmetros foi reavaliado, sendo proposto o intervalo de 98,5–99 % como *threshold* a partir do qual é necessário realizar hibridação DNA–DNA (Stackebrandt e Ebers, 2006). Um aspecto a reforçar é o de que qualquer esquema de classificação deve ter consistência fenotípica (Wayne *et al.*, 1987).

Assim, num primeiro passo no processo de descrição de organismos isolados em cultura pura, é importante o estudo da filogenia, que pode ser deduzida a partir da análise comparativa de sequências, como o rDNA 16S. Após determinação da sequência do gene rRNA 16S e análise comparativa com as sequências de rDNA 16S depositadas em bases de dados, essa informação é utilizada para a construção de uma árvore filogenética. Esta árvore permite inferir a posição filogenética dos novos isolados. A determinação do grau de semelhança com *taxa* próximos é importante para a decisão da necessidade de recorrer a métodos mais laboriosos como a hibridação DNA–DNA. O reconhecimento dos *taxa* próximos é útil, uma vez que a informação disponível na literatura pode ajudar, por exemplo, a definir estratégias de cultivo para os novos isolados. No processo de descrição, é importante a comparação com as estirpes

tipo filogeneticamente próximas, de modo a distinguir os novos isolados com base num conjunto de características fenotípicas, genotípicas e químiotaxonómicas.

Um aspecto importante a considerar é a definição de um dos isolados como a estirpe tipo. É obrigatório a deposição da estirpe tipo em duas colecções de cultura localizadas em países diferentes, de modo a estarem disponíveis para a comunidade científica para informação e comparação (Rosselló-Mora e Amann, 2001). A designação do nome da nova espécie deve seguir os critérios determinados pelo ICSP. Os nomes publicados só adquirem posição na nomenclatura, quando são incluídos nas listas de validação de nomes, publicadas periodicamente no IJSEM.

## 1.8. Filo *Proteobacteria*

O filo *Proteobacteria* é constituído por microrganismos que apresentam morfologia e fisiologia muito diversificada. O filo integra cinco classes: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Epsilonproteobacteria* (Kerstens *et al.*, 2006). Recentemente, foi proposta a existência de outra classe, a *Zetoproteobacteria*, que inclui apenas uma espécie isolada e vários clones ambientais de ambientes marinhos onde ocorre a oxidação de ferro mediada por microrganismos (McAllister *et al.*, 2011).

A elevada diversidade de mecanismos para obtenção de energia é característico das proteobactérias, encontrando-se neste grupo microrganismos químiorganotróficos, químiolitotróficos e fotoautotróficos. Apesar da elevada diversidade, a análise da sequência do gene rRNA 16S indica que todos os microrganismos se encontram filogeneticamente relacionados, o que vem demonstrar a importância da filogenia no esquema de classificação. Actualmente não estão definidas características para todo o filo *Proteobacteria* que permitam a sua diferenciação de outros filios do domínio *Bacteria* (Kerstens *et al.*, 2006).

No filo *Proteobacteria*, a classe *Gammaproteobacteria* inclui bactérias fotossintéticas púrpura sulfurosas (famílias *Chromatiaceae* e *Ectothiorhodospiraceae*), muitos organismos químiorganotróficos e alguns químiolitotróficos, principalmente bactérias com capacidade de oxidação de ferro e enxofre (ex. género *Beggiatoa*). Encontram-se presentes nesta classe importantes organismos patogénicos para humanos e animais (ex. alguns representantes das famílias *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* e *Pasteurellaceae*, entre outras) (Kerstens *et al.*, 2006).

### 1.8.1. Género *Nevskia*

O género *Nevskia* pertence ao filo *Proteobacteria*, à classe *Gammaproteobacteria* e ordem *Xanthomonadales*. Segundo a última edição do *Bergey's Manual of Bacterial Research*, o

gênero *Nevskia* encontrava-se incluído na família *Xanthomonadaceae*, a única família na ordem *Xanthomonadales*, descrita até à altura de redacção do manual (Saddler e Bradbury, 2005). Em 2008, Zhou *et al.* descreveram um novo género, o género *Sinobacter* e propuseram a criação de uma nova família, a família *Sinobacteraceae* (Zhou *et al.*, 2008). Actualmente, a ordem *Xanthomonadales* é constituída por duas famílias, *Xanthomonadaceae* e *Sinobacteraceae*. A criação desta nova família conduziu à transferência do género *Nevskia* e *Hydrocarboniphaga*, inicialmente na família *Xanthomonadaceae*, para a família *Sinobacteraceae*. Deste modo, actualmente a família *Sinobacteraceae* é constituída por seis géneros: *Alkanibacter* (Lipski e Friedricht, 2008), *Hydrocarboniphaga* (Palleroni *et al.*, 2004), *Nevskia* (Famintzin, 1892), *Singularimonas* (Lipski e Friedricht, 2008), *Sinobacter* (Zhou *et al.*, 2008) e *Steroidobacter* (Fahrbach *et al.*, 2008).

Existem três espécies descritas com nomes validados que se incluem no género *Nevskia*: *Nevskia ramosa* (Famintzin, 1892), *Nevskia soli* (Weon *et al.*, 2008) e *Nevskia terrae* (Kim *et al.*, 2011). A espécie *Nevskia ramosa* constitui a espécie tipo do género. Esta espécie foi observada pela primeira vez no final do século XIX por Famintzin (1892) em amostras recolhidas da superfície da água de um aquário. A *Nevskia ramosa* é um microrganismo neustonte, ou seja, é um habitante da interface ar-água de superfícies de água doce, localizando-se no “epineuston” (fase superior da interface ar/água). Esta espécie apresenta como característica típica a capacidade de formar um biofilme na ausência de azoto no meio. As células no biofilme formam microcolónias com forma de roseta. Esta forma típica resulta do facto de as células se dividirem por divisão binária e existir uma secreção lateral preferencial de polissacáridos. Stürmeyer *et al.* propuseram que a capacidade de formação de biofilmes na interface ar-água constitui uma estratégia de adaptação à ausência de azoto, uma vez que na sua presença as células crescem submersas (Stürmeyer *et al.*, 1998). Culturas puras de *N. ramosa* foram obtidas pela primeira vez apenas em 1998 por Stürmeyer *et al.*. A estirpe Soe1<sup>T</sup> foi isolada do lago Soelkensee nos arredores de Greifswald (Alemanha), enquanto a estirpe OL1 foi isolada de uma vala de água doce em Oldenburgo (Alemanha). A espécie *Nevskia soli* (estirpe GR15-1<sup>T</sup>) foi isolada de um solo cultivado com ginseng Coreano (*Panax giseng* C. A. Meyer) na região de Yeongju na Coreia do Sul (Weon *et al.*, 2008) e a espécie *Nevskia terrae* foi isolada a partir do solo, no decurso do estudo da diversidade bacteriana nas ilhas da Coreia do Sul (Kim *et al.*, 2011). As espécies do género *Nevskia* consistem em bastonetes Gram negativos. A quinona respiratória predominante do género é a ubiquinona com 8 unidades isoprénicas (Q-8) e C<sub>18:1</sub>ω7c constitui o ácido gordo maioritário, enquanto que o conteúdo G+C varia dentro do intervalo dos 64,1–67,8 %.

## 1.9. Objectivo

Este trabalho teve como objectivo a descrição taxonómica de duas novas espécies (estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 e estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54) isoladas no decurso de um estudo que pretende avaliar a diversidade microbiológica de uma água mineral natural na emergência e após engarrafamento. O processo de descrição seguiu uma abordagem polifásica. A análise filogenética efectuada com base na sequência do gene rRNA 16S indicou que os novos isolados F2-63<sup>T</sup>, F2-178 e G6M-30<sup>T</sup>, G6-54 constituem duas novas espécies do género *Nevskia*. Com base nesta informação, procedeu-se à caracterização morfológica, bioquímica, quimiotaxonómica e genética dos isolados e à sua comparação com os representantes dos *taxa* filogeneticamente próximos, de modo a propor as estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 como *Nevskia aquatilis* e as estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54 como *Nevskia persephonica*.

## ***CAPÍTULO 2***

### **Materiais e Métodos**

## 2.1. Origem e isolamento

As estirpes F2-63<sup>T</sup> (<sup>T</sup>- estirpe tipo) e F2-178 foram isoladas em 2009 de amostras de água de profundidade, recolhidas de um aquífero de água mineral natural, localizado na zona centro de Portugal Continental. Esta água de profundidade é utilizada para abastecimento de uma unidade fabril de engarrafamento de água mineral natural. As amostras foram obtidas a partir da cabeça de captação 2L (que encerra um furo artesiano com 75 metros de profundidade) onde a temperatura e pH da água apresentam valores estáveis de 28,5 °C e 5,7, respectivamente. As amostras de água foram mantidas a 4 °C até análise. Alíquotas de 250 a 1000 ml foram filtradas através de membranas de acetato de celulose (Gelman GN-6; poro 0,1 µm para F2-63<sup>T</sup> e poro 0,2 µm para F2-178).

As estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54 foram isoladas a partir de água engarrafada (garrafas de PVC com 1,5 l de capacidade), recolhida directamente da linha de enchimento. As garrafas foram armazenadas, protegidas da luz à temperatura ambiente (22 ± 2 °C), tendo-se isolado as estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54 a partir de garrafas de água com 180 e 6 dias de armazenamento, respectivamente. As amostras de água foram filtradas através de membranas de acetato de celulose (Gelman GN-6; poro 0,1 µm).

Os filtros foram colocados na superfície de meio sólido R2A (Difco) (Tabela 2.1), contendo ciclohexamida (10 mg/l) para inibir o crescimento de fungos. As placas foram revestidas com sacos de plástico, de modo a prevenir a evaporação, e incubadas a 22 °C, durante 21 dias. As culturas foram purificadas por sub-cultura e os isolados preservados a -70 °C em meio R2A líquido (Reasoner e Geldreich, 1985) suplementado com 15 % (p/v) glicerol.

As estirpes tipo, filogeneticamente relacionadas com as estirpes em estudo, *Nevskia ramosa*<sup>T</sup> (DSM 11499<sup>T</sup>), *Nevskia soli*<sup>T</sup> (DSM 19509<sup>T</sup>), *Hydrocarboniphaga effusa*<sup>T</sup> (DSM 16095<sup>T</sup>), foram obtidas a partir do banco de cultura DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). A estirpe tipo *Nevskia terrae* (KACC 12736<sup>T</sup>) foi obtida a partir do banco de cultura KACC (Korean Agricultural Culture Collection). Estas estirpes foram utilizadas para estudos de comparação.

**Tabela 2.1.** Composição do meio R2A utilizado no crescimento das estirpes F2-63<sup>T</sup>, F2-178, G6M-30<sup>T</sup>, G6-54 e das estirpes de referência (Reasoner e Geldreich, 1985).

<b>Componentes</b>	<b>g/l</b>
Extracto de levedura	0,5
Proteose peptona nº 3	0,5
Casaminoácidos	0,5
Glucose	0,5
Amido	0,5
Piruvato de sódio	0,3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1
Agar	20

## 2.2. Determinação das condições óptimas de crescimento

### 2.2.1. Cultura das estirpes bacterianas

As estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178, quando cultivadas em meio líquido R2A (Reasoner e Geldreich, 1985), formam agregados celulares. De modo a encontrar um meio que permitisse reduzir a formação destes agregados e melhorar o crescimento das estirpes, testaram-se vários meios de cultura líquidos: meio R2A 10x diluído, meio R2A suplementado com Tween 80, meio *nutrient broth* (0,5 % peptona; 0,3 % extracto de carne), meio *Thermus* (Williams e da Costa, 1992) e meio Degryse 162 (Degryse *et al.*, 1978). No entanto, verificou-se que as estirpes formam agregados em todos os meios testados. A presença destes agregados dificulta a leitura da turbidez por espectrofotometria para a determinação do crescimento. Utilizou-se um banho de sonicação (Branson 12, 50 kHz) para dispersar os agregados, mas não foi possível obter uma suspensão homogénea para registo da densidade óptica (D.O.). Assim, no processo da determinação da temperatura e pH óptimos de crescimento, optou-se por realizar os crescimentos em placas de meio R2A tal como descrito nas secções 2.2.2 e 2.2.3.

As estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54 crescem em meio R2A sólido e líquido, no entanto, com baixa produção de biomassa. De modo a melhorar o crescimento em meio líquido, testou-se meio líquido R2A 10x diluído, meio Degryse (Degryse *et al.*, 1978) e meio *Thermus* (Williams e da Costa, 1992). Após estes ensaios, optou-se por utilizar meio R2A para cultura dos isolados.

### 2.2.2. Determinação da temperatura óptima de crescimento

Para a determinação do intervalo de temperaturas de crescimento das estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 optou-se por realizar o crescimento em placas de meio R2A (Difco), com pH ajustado a 6,5. As placas foram inoculadas com gotas de uma suspensão celular com D.O. de 0,1; 0,05 e 0,025; e incubadas no intervalo de temperaturas entre 10–45 °C, com um aumento gradual de 5 °C. Os limites e a temperatura óptima foram determinados por observação visual do crescimento nas placas, ao 3º e 8º dia de incubação.

As estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54 foram cultivadas em Erlenmeyers de 300 ml contendo 100 ml de meio líquido R2A. Os meios foram inoculados com uma suspensão celular preparada a partir de culturas jovens em meio sólido. Utilizou-se um volume de suspensão celular de modo a começar o crescimento com uma D.O. inicial de 0,05 a 610 nm. Para determinar o intervalo de temperaturas de crescimento, as culturas foram incubadas entre 10–45 °C (com um aumento gradual de 5 °C) e agitação do tipo orbital (135 rpm), até atingirem o início da fase estacionária de crescimento. O crescimento foi acompanhado pela leitura da D.O. a 610 nm e a taxa específica de crescimento foi calculada para cada temperatura testada. A taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) corresponde ao declive da relação linear entre os valores de logaritmo neperiano da D.O. e o tempo de crescimento, de acordo com a equação,

$$\ln N_t = \ln N_0 + \mu (t-t_0)$$

com  $N_t$  e  $N_0$  correspondendo à densidade populacional, expressa pela D.O. no tempo  $t$  e  $t_0$ , respectivamente, ambos na fase exponencial de crescimento.

### 2.2.3. Determinação do pH óptimo de crescimento

Para a determinação do intervalo de pH de crescimento para as estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178, utilizaram-se placas de meio R2A (Difco) com pH ajustado entre 5–9. Preparou-se meio R2A, duas vezes concentrado, e ajustou-se o pH do meio ao valor pretendido, com soluções de HCl 1 M ou NaOH 1 M. Após esterilização no autoclave (121 °C, 15 min), de modo a garantir que o valor de pH pretendido se mantinha, adicionou-se um agente tamponizante (concentração final de 20 mM). Os tampões, duas vezes concentrados, foram esterilizados por filtração, através de membranas de acetato de celulose (Pall Corporation) com 0,2  $\mu$ m de poro. Após equilibrarem à temperatura de 55 °C, juntou-se o tampão ao meio. Os valores de pH 5,0 e 5,5 foram obtidos pela adição do tampão ácido cítrico–Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Os valores de pH 6,0 e 6,5 foram obtidos pela adição de MES [ácido 2-morfolinoetanosulfónico] (Sigma). Os valores de pH 7,0 e 7,5 foram obtidos pela adição de HEPES [ácido 2-(4-(2-hidróxi-etil)-1-piperazinil)-etanosulfónico] (Sigma). O valor de pH 8 foi obtido pela adição de TAPS [ácido N-(tris(hidroximetil)metil)-3-aminopropanosulfónico] (Sigma). O valor de pH 9 foi obtido pela adição de CAPSO [ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfónico] (Sigma). As placas foram inoculadas com gotas

de uma suspensão celular com D.O. de 0,1; 0,05 e 0,025 e incubadas à temperatura ótima de crescimento. Neste estudo, para cada agente tamponizante, utilizou-se uma placa controlo, na qual o valor de pH do meio foi ajustado a 6,5, incubada nas mesmas condições que as restantes. Este controlo teve como objectivo verificar se os agentes tamponizantes teriam algum efeito inibitório sobre o crescimento dos microrganismos. Os limites e o pH ótimo foram determinados por observação visual do crescimento nas placas ao 3º e 8º dia de incubação.

Para as estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54, o intervalo de pH de crescimento foi determinado em meio R2A líquido, tal como descrito na secção 2.2.2. Testou-se o crescimento a valores de pH num intervalo de 5–8. Para manter o valor de pH pretendido, adicionaram-se ao meio líquido, diferentes agentes tamponizantes (concentração final de 20 mM), tal como descrito anteriormente. Os meios de cultura foram esterilizados por filtração através de membranas com 0,2 µm de poro. Os Erlenmeyers foram incubados num banho com agitação do tipo orbital (135 rpm) à temperatura ótima de crescimento. Para cada agente tamponizante, utilizou-se um controlo, no qual o pH do meio foi ajustado a 6,5 e a cultura incubada nas mesmas condições que as restantes. O crescimento a cada valor de pH foi acompanhado pela leitura da D.O. a 610 nm e calculada a respectiva taxa específica de crescimento. Acompanhou-se igualmente o pH do meio ao longo do tempo de incubação.

#### **2.2.4. Determinação da tolerância a sal**

Para todas as estirpes em estudo, testou-se a tolerância a sal em tubos de ensaio, com 10 ml de meio R2A líquido, suplementado com 0, 1, 2 e 3 % de NaCl. Os tubos foram inoculados com uma suspensão celular, preparada a partir de culturas jovens em meio sólido. Os tubos foram incubados à temperatura ótima de crescimento, durante 5 dias.

### **2.3. Caracterização Morfológica**

#### **2.3.1. Morfologia das colónias**

A morfologia das colónias das estirpes em estudo foi descrita a partir de culturas em placa de meio R2A (Difco), repicadas, de modo a obter-se colónias isoladas. A observação da morfologia foi realizada à vista desarmada e com o auxílio de uma lupa (Nikon SMZ-2B). Registou-se a cor, contorno periférico, elevação e o diâmetro da colónia bacteriana.

### 2.3.2. Morfologia celular

A morfologia celular das estirpes em estudo foi descrita por observação de preparações de células, por microscopia óptica de contraste de fase (Leitz, Laborlux K), utilizando ampliação de 1000x. Para as preparações, utilizaram-se culturas em meio líquido R2A, após três dias de incubação. Registaram-se características como a forma, tamanho e agregação celular. A dimensão celular foi determinada utilizando uma ocular micrométrica.

### 2.3.3. Determinação da formação de biofilme na ausência de azoto

A espécie *Nevskia ramosa*, quando cultivada em meio líquido, sem fonte de azoto, forma um biofilme (Stürmeyer *et al.*, 1998). Para testar essa capacidade, preparou-se meio de cultura, como descrito por Stürmeyer *et al.* (1998) (Tabelas 2.2 e 2.3). Após esterilização no autoclave, durante 15 minutos, o meio foi suplementado com uma solução de vitaminas (Tabela 2.4). Distribuíram-se 10 ml de meio por tubos de vidro com tampa roscada e suplementou-se com uma fonte de carbono, previamente esterilizada por filtração. Testaram-se como fonte de carbono compostos que são geralmente utilizados por *Nevskia ramosa* e pelas estirpes em estudo (Tabela 2.5), numa concentração final de 2 g/L. Como controlo, utilizou-se meio suplementado com 50 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , para induzir crescimento em profundidade, tal como descrito por Stürmeyer *et al.* (1998). Os tubos foram incubados durante 10 dias à temperatura ótima de crescimento.

**Tabela 2.2.** Composição do meio utilizado para determinação de formação de biofilme na ausência de azoto Stürmeyer *et al.* (1998).

Componentes	Concentração
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	25 mM
Solução de oligoelementos SL-9	0,5 ml/l
Solução de vitaminas	0,5 ml/l

**Tabela 2.3.** Composição da solução de oligoelementos SL-9 (Tschech e Pfennig, 1984).

<b>Componentes</b>	<b>g/l</b>
Ácido nitrilotriacético	12,8
FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,19
MnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1
ZnCl <sub>2</sub>	0,07
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,006
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,024
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,002
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,036

**Tabela 2.4.** Composição da solução de vitaminas (Pfennig, 1978).

<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>
Vitamina B12	20 mg/l
Biotina	10 ng/ml
Ácido pantotênico	25 ng/ ml
Tiamina	50 ng/ ml
Ácido p-aminobenzóico	50 ng/ ml
Ácido nicotínico	100 ng/ ml
Piridoxamina	250 ng/ ml

**Tabela 2.5.** Fontes de carbono testadas para suplementar o meio de cultura <sup>a</sup>.

<b>F2-63<sup>T</sup> e F2-178</b>	<b>G6M-30<sup>T</sup> e G6-54</b>	<b><i>N. ramosa</i><sup>T</sup></b>	<b><i>N. soli</i><sup>T</sup></b>
Piruvato	Piruvato	Piruvato	Piruvato
Succinato	Succinato	Succinato	Succinato
Fumarato	Fumarato	Fumarato	
	Lactato	Lactato	

<sup>a</sup> As fontes utilizadas foram escolhidas após os resultados obtidos pela realização do ensaio para a determinação da assimilação de fontes de carbono descrito na secção 2.4.3.

### 2.3.4. Coloração de Gram

A coloração de Gram das estirpes em estudo foi realizada pelo método de Hucker, descrito de acordo com Doetsch (1981).

Os esfregaços foram preparados colocando uma gota de água estéril numa lâmina de vidro, sobre a qual se espalhou, com uma ansa, material celular de uma cultura jovem em meio sólido. Os esfregaços, após secarem ao ar, foram fixados passando 2–3 vezes pela chama.

No processo de coloração (Tabela 2.6), cobriu-se o esfregaço durante 1 minuto com violeta de cristal após o qual se removeu o excesso de corante e lavou-se com água desionizada. De seguida, aplicou-se durante 1 minuto soluto de Lugol. Os esfregaços foram lavados com água desionizada, e de seguida, com uma solução de etanol:acetona (1:1, v/v) e novamente, com água desionizada. As preparações foram de seguida imersas durante 1 minuto numa solução de contraste (safranina). O excesso de corante de contraste foi retirado com água desionizada e as lâminas foram secas ao ar.

As preparações foram observadas ao microscópio óptico de campo claro (Leitz, Laborlux K), utilizando ampliação de 1000x. As estirpes que apresentavam cor violeta foram consideradas como Gram-positivas e as que apresentavam cor avermelhada como Gram-negativas.

**Tabela 2.6.** Constituição das soluções de corantes utilizados na coloração de Gram.

<b>Solução de violeta de cristal <sup>a</sup></b>
2 g de violeta de cristal em 20 ml de etanol a 95 % (v/v)
0,8 g de oxalato de amónio em 80 ml de água desionizada
<b>Soluto de Lugol</b>
1 g iodo e 2 g de iodeto de potássio em 300 ml de água desionizada
<b>Corante de Contraste</b>
10 ml de uma solução de safranina 2,5 % (p/v) em etanol 95 %, em 100 ml de água desionizada

<sup>a</sup> A solução de violeta de cristal é preparada pela mistura das duas soluções na proporção de 1:1 (v/v). Após repousar 24 h filtrou-se antes de se utilizar.

### 2.3.5. Coloração de flagelos

A coloração de flagelos foi realizada segundo o método descrito por Heimbrook *et al.* (1989). Numa lâmina de vidro, colocou-se uma gota de cultura jovem em meio líquido R2A, cobriu-se a preparação com uma lamela e, numa das extremidades da lamela, colocaram-se duas gotas de corante de Ryu (Tabela 2.7). Com papel de filtro na extremidade oposta da lâmina onde se

colocou a gota de corante, arrastou-se a gota através da preparação. A lâmina foi observada ao microscópio óptico de campo claro (Leitz, Laborlux K), utilizando uma ampliação de 1000x.

**Tabela 2.7.** Constituição do corante de Ryu.

<b>Corante de Ryu <sup>a</sup></b>	
<b>Solução A</b>	
2,0 g de ácido tânico em fenol 5 % (v/v)	10 ml
Solução saturada de sulfato de potássio e alumínio dodecahidratado [KAl(SO <sub>4</sub> )·12H <sub>2</sub> O]	10 ml
<b>Solução B</b>	
Solução de violeta de cristal saturada em etanol a 95 %	

<sup>a</sup> O corante de Ryu é preparado pela mistura na proporção de 10:1 (v/v) da solução A e da solução B, respectivamente. A mistura é preparada imediatamente antes de usar o corante.

## 2.4. Caracterização Bioquímica

Na realização dos testes para a caracterização bioquímica todas as estirpes foram cultivadas ao pH ótimo em meio sólido R2A (Difco) ou meio R2A líquido (Reasoner e Geldreich, 1985), e todas as incubações foram efectuadas à temperatura ótima de crescimento das estirpes, excepto quando indicação em contrário.

### 2.4.1. Ensaio de degradação enzimática

#### 2.4.1.1. Presença de catalase

A presença da enzima catalase foi testada segundo o método descrito por Smibert e Krieg (1981). Numa lâmina, colocou-se uma gota de peróxido de hidrogénio a 3 % (v/v) e, com uma ansa, ressuspendeu-se material celular de uma cultura jovem em meio sólido. O resultado considerou-se positivo quando se observou efervescência.

#### 2.4.1.2. Presença de citocromo oxidase

A presença de citocromo oxidase foi testada segundo o método descrito por Smibert e Krieg (1981). Numa lâmina, colocou-se uma tira de papel de filtro sobre a qual se colocaram 2–3

gotas de uma solução aquosa de dihidroclorato de tetrametil-p-fenilenodiamina (TMPD, Sigma) a 1 % (p/v) em água destilada. Esta solução foi preparada imediatamente antes da sua utilização para evitar a rápida auto-oxidação do TMPD na presença de ar. A presença de citocromo oxidase é indicada pelo desenvolvimento de uma cor azul-violeta nos primeiros 10 segundos após adição do material celular de uma cultura jovem, proveniente de meio sólido, à solução de TMPD no papel de filtro.

#### **2.4.1.3. Presença de lipases**

A presença de lipases foi testada segundo o método descrito por Smibert e Krieg (1981). Preparou-se meio R2A suplementado com 0,1 g/L de cloreto de cálcio e, separadamente, detergentes não iónicos, Tween 20, 40, 60 e 80, esterilizados por autoclavagem. Após arrefecer até 55 °C, cada porção de meio foi suplementada com 1 % (v/v) de detergente. Os meios foram distribuídos por placas de Petri, que foram posteriormente inoculadas com culturas jovens, numa área de cerca de 1 cm<sup>2</sup> no centro da placa, e incubadas. Como controlo negativo, utilizou-se uma placa de Petri com meio de cultura não inoculado e incubado nas mesmas condições. Os resultados foram observados após 3–5 dias de incubação. A presença de lipases é indicada pela presença de pequenos grânulos (precipitação de cálcio pela presença de ácidos gordos livres) na zona de crescimento ou de um halo opaco à volta da zona de crescimento.

#### **2.4.1.4. Presença de DNase**

A presença de DNase(s) foi testada segundo o método descrito por Smibert e Krieg (1981). Preparou-se meio sólido duas vezes concentrado e uma solução de DNA de esperma de salmão a 0,4 % (p/v, Sigma), que foram esterilizados em separado por autoclavagem. Após arrefecerem a 55 °C, juntaram-se as duas soluções na proporção de 1:1 (v/v), de modo a obter-se meio sólido suplementado com 0,2 % de DNA. As placas com este meio foram inoculadas e incubadas, tal como descrito na secção 2.4.1.3. Como controlo negativo, utilizou-se uma placa de Petri com meio de cultura não inoculado, incubado nas mesmas condições. Os resultados foram observados após 5 dias de incubação. A ocorrência de degradação de DNA é detectada pela observação de uma zona translúcida no local de crescimento face ao resto da placa, após remoção do material celular e adição à placa de uma solução de HCl 1 M.

#### **2.4.1.5. Hidrólise de caseína**

A presença de proteases activas sobre a caseína foi testada, segundo o método descrito por Smibert e Krieg (1981). Preparou-se uma solução de leite desnatado (Skim Milk, Difco) a 10 %

(p/v), esterilizada por autoclavagem (a 115 °C, 10 minutos, em vez de 15 min, 121 °C). Preparou-se uma solução de agar a 3 % (p/v), esterilizada por autoclavagem. Após as duas soluções arrefecerem a 55 °C, adicionou-se a solução de agar à solução de leite, em volumes iguais, de modo a obter-se uma solução final com 5 % leite desnatado e 1,5 % agar. Esta solução foi posteriormente distribuída em sobrecamada, em placas com meio sólido. As placas com este meio foram inoculadas com culturas jovens, no centro, com um risco (cerca de 1,5 cm) e incubadas. Como controlo negativo, utilizou-se uma placa de Petri com meio de cultura não inoculado e incubado nas mesmas condições. Os resultados foram observados após 3 dias de incubação, considerando-se que a formação de um halo transparente em volta da zona de crescimento é um resultado positivo. Para confirmar este resultado, removeu-se o material celular e adicionou-se a cada placa uma solução de HCl a 1 M para precipitar a caseína existente na placa, tornando evidente a zona onde ocorreu hidrólise da mesma.

#### **2.4.1.6. Hidrólise de amido**

A presença de amilases foi detectada em meio sólido, preparado segundo a composição do meio Starch Agar (Difco). Este meio é constituído por 3 g/L extracto de carne, 10 g/l amido e 15 g/l agar. O meio foi esterilizado por autoclavagem. As placas com este meio foram inoculadas e incubadas tal como descrito na secção 2.4.1.3. Como controlo negativo, utilizou-se uma placa de Petri com meio de cultura não inoculado e incubado nas mesmas condições. Os resultados foram observados após 3–5 dias de incubação. A detecção da hidrólise de amido foi realizada por remoção do material celular e adição às placas de soluto de Lugol (Tabela 2.6). Após 1 minuto, retirou-se o excesso de soluto de Lugol com água corrente. A observação de uma zona translúcida na área de crescimento celular, contrastando com a cor azul da restante área da placa, indica um resultado positivo.

#### **2.4.1.7. Hidrólise de esculina**

O teste de hidrólise de esculina foi realizado em meio sólido suplementado com 0,01 % (p/v) de esculina (Sigma) e 0,05 % (p/v) de citrato de ferro, segundo o método descrito por Smibert e Krieg (1981). Preparou-se meio sólido duas vezes concentrado, suplementado com citrato de ferro e esterilizou-se no autoclave. Preparou-se uma solução de esculina a 0,02 % (p/v), num volume igual ao preparado de meio e esterilizou-se por filtração através de membranas com 0,2 µm de poro. A solução de esculina foi adicionada ao meio, após o mesmo arrefecer até 55 °C. As placas com este meio foram inoculadas e incubadas, tal como descrito na secção 2.4.1.3. Como controlo negativo utilizou-se uma placa de Petri com meio de cultura não inoculado, incubado nas mesmas condições. Os resultados foram observados após 3–5 dias de incubação, sendo o aparecimento de uma zona castanho escura em volta da zona de crescimento considerado um resultado positivo.

#### **2.4.1.8. Hidrólise de arbutina**

O teste de hidrólise de arbutina foi realizado em meio sólido suplementado com arbutina e citrato férrico amoniacal, segundo o método descrito por Smibert e Krieg (1981). Preparou-se uma solução de arbutina a 10 % (p/v) e uma solução de citrato férrico amoniacal a 1 % (p/v) e ambas foram esterilizadas por filtração através de membranas com 0,2  $\mu\text{m}$  de poro. O meio sólido foi esterilizado por autoclavagem. Após o meio arrefecer a 55 °C foi suplementado com a solução de arbutina e de citrato de férrico amoniacal, de modo a obter concentrações finais no meio de 5 g/l e 0,5 g/l, respectivamente. As placas com este meio foram inoculadas e incubadas tal como descrito na secção 2.4.1.3. Como controlo negativo utilizou-se uma placa de Petri com meio de cultura não inoculado, incubado nas mesmas condições. Os resultados foram observados após 3–5 dias de incubação, sendo a presença de uma cor castanha escura na zona onde ocorreu crescimento considerado um resultado positivo .

#### **2.4.1.9. Hidrólise de xilano**

A capacidade de hidrólise de xilano foi testada em meio sólido suplementado com 5 g/l de xilano (Sigma). As placas com este meio foram inoculadas e incubadas tal como descrito na secção 2.4.1.3. Como controlo negativo, utilizou-se uma placa de Petri com meio de cultura não inoculado, incubado nas mesmas condições. Os resultados foram observados após 3–5 dias de incubação. A degradação de xilano foi observada pelo aparecimento de um halo menos turvo em volta da zona de crescimento.

#### **2.4.1.10. Detecção de actividades enzimáticas usando o sistema API ZYM (bioMérieux)**

O sistema API ZYM (bioMérieux) permite testar a presença das seguintes enzimas: fosfatase alcalina, esterase (C4), esterase lipase (C8), lipase (C14), leucina arilamidase, valina arilamidase, cistina arilamidase, tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -manosidase e  $\alpha$ -fucosidase.

Distribuíram-se 5 ml de água destilada pelos alvéolos da caixa de incubação e colocou-se a galeria do sistema API ZYM na caixa. Preparou-se uma suspensão celular em água destilada estéril de modo a obter uma turbidez equivalente ao padrão nº 5 da escala MacFarland. Adicionaram-se 65  $\mu\text{l}$  desta suspensão celular em cada cúpula da galeria do sistema API ZYM. A caixa de incubação foi coberta com a tampa, de modo a criar uma atmosfera húmida e incubada, durante 5–6 horas. Após o período de incubação, adicionou-se a cada cúpula uma gota do reagente ZYM A (bioMérieux) e uma gota do reagente ZYM B (bioMérieux). Os resultados foram observados ao fim de 10 minutos. Os resultados positivos foram detectados através da mudança de cor nos poços, segundo o quadro de leitura do manual de instruções do fornecedor.

#### **2.4.2. Detecção da produção de indol, presença de L-arginina di-hidrolase, $\beta$ -galactosidase, urease e de hidrólise de gelatina usando o sistema API 20 NE (bioMérieux)**

A produção de indol, presença de L-arginina di-hidrolase,  $\beta$ -galactosidase e da degradação de gelatina foram determinadas pelo sistema API 20 NE (bioMérieux). Distribuíram-se 5 ml de água destilada pelos alvéolos da caixa de incubação e colocou-se a galeria do sistema API 20 NE na caixa. Preparou-se uma suspensão celular em água destilada estéril de modo a obter uma turbidez equivalente ao padrão nº 0,5 da escala MacFarland. Esta suspensão foi utilizada para inocular as cúpulas, segundo as instruções do fornecedor. O sistema foi incubado e observaram-se os resultados ao fim de 2–4 dias de incubação. Os resultados foram interpretados segundo o quadro de leitura do manual de instruções do fornecedor. Para a detecção da produção de indol, adicionou-se à cúpula uma gota de reagente de James (bioMérieux).

#### **2.4.3. Assimilação de fontes únicas de carbono**

A utilização de fontes de carbono foi testada em meio constituído apenas pelos micro e macro nutrientes do meio Degryse (Degryse *et al.*, 1978) (Tabelas 2.8 e 2.9), suplementado, após esterilização no autoclave, com 0,5 g/l de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,2 g/l extracto de levedura e solução de vitaminas e nucleótidos (Sharp e Williams, 1988) (Tabela 2.10). A alíquotas de 10 ml de meio foi adicionada a fonte de carbono a testar, de modo a obter uma concentração final de 2 g/l (Tabela 2.11). Para o estudo da assimilação de alcanos, estes foram adicionados ao meio de modo a obter-se uma concentração final de 1 g/l. As soluções de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , extracto de levedura, solução de vitaminas e as fontes de carbono foram esterilizadas por filtração em membranas com 0,2  $\mu\text{m}$  de poro. Os meios foram inoculados com uma suspensão concentrada de células em água estéril, provenientes de uma cultura jovem em meio sólido, de modo a obter uma densidade óptica inicial de 0,05 a 610 nm. O controlo negativo consistiu em meio mínimo, com extracto de levedura, fonte de azoto e inoculado com a suspensão celular. No caso das estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178, pelo facto de ocorrer floculação em meio líquido, comparou-se apenas visualmente o crescimento face ao controlo negativo, após 8 dias incubação. Para as estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54 registaram-se os valores de turbidez após 8 dias de incubação, considerando-se um resultado positivo quando o valor da turbidez a 610 nm foi igual ou superior ao dobro do valor da turbidez obtida no controlo negativo. A assimilação de alcanos foi acompanhada a 5, 10 e 20 dias de incubação.

**Tabela 2.8.** Composição do meio mínimo Degryse utilizado para determinação da assimilação de fontes únicas de carbono (Degryse *et al.*, 1978).

Componentes	ml/l
Solução de macronutrientes (10x)	100
Solução de micronutrientes (100x)	5
Citrato de Ferro 0,01 M	0,5
Solução de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O 0,2 M	15
Solução de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 M	10

**Tabela 2.9.** Composição das soluções de macro e micro nutrientes utilizadas na preparação do meio basal para determinação da assimilação de fontes únicas de carbono.

Solução de macronutrientes (10x concentrada)	g/l
Ácido nitrilotriacético	1
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,4
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2
Solução de micronutrientes (100x concentrada)	g/l
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,22
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,05
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0046

**Tabela 2.10.** Composição da solução de vitaminas e nucleótidos (Sharp e Williams, 1988).

Vitaminas (4 µg/ml cada)		Nucleótidos (4 µg/ml cada)	
Tiamina	Inositol	Adenina	Citosina
Riboflavina	Ácido nicotínico	Timidina	Guanina
Piridoxina	Ácido pantoténico	Citidina	Inosina
Biotina	Ácido p-aminobenzóico	Uracilo	
Ácido fólico	Vitamina B12		

**Tabela 2.11.** Compostos testados como fontes únicas de carbono.

<b>Açúcares</b>	<b>Ácidos orgânicos</b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>Álcoois</b>	<b>Alcanos</b>
D-celobiose	$\alpha$ -cetogluturato	DL-metionina	D-arabitol	Hexano
D-galactose	Acetato	Glutamato	D-manitol	Heptano
D-frutose	Benzoato	Glutamina	D-sorbitol	Octano
D-maltose	Citrato	L-alanina	Etanol	Decano
D-manose	Formato	L-arginina	Glicerol	Dodecano
D-rafinose	Fumarato	L-asparagina	L-arabitol	Tetradecano
D-xilose	Gluconato	L-fenilalanina	Metanol	Hexadecano
D-glucose	Lactato	L-serina	Myo-inositol	Octadecano
Glicogénio(de fígado de bovino)	Malato	L-triptofano	Ribitol	Eicosano
L-arabinose	Piruvato	L-glicina	Xilitol	
D-ribose	Succinato	L-histidina		
D-lactose		L-lisina		
L-fucose		L-prolina		
L-sorbose		L-valina		
D-trealose		Isoleucina		
L-ramnose				

#### 2.4.4. Determinação da produção de ácido usando o sistema API 50 CH

O sistema API 50 CH (bioMérieux) permite identificar a fermentação dos seguintes substratos: glicerol, eritritol, D-arabinose, L-arabinose, D-ribose, D-xilose, L-xilose, D-adonitol, metil- $\beta$ -xilopiranosido, D-galactose, D-frutose, D-manose, L-sorbose, D-ramnose, ducitol, inositol, D-manitol, D-sorbitol, metil- $\alpha$ D-manopiranosido, metil- $\alpha$ D-glucopiranosido, N-acetil-glucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, D-celobiose, D-maltose, D-lactose, D-melibiose, D-sacarose, D-trealose, inulina, D-melezitose, D-rafinose, amido, glicogénio, xilitol, gentiobiose, D-turanose, D-lixose, D-tagatose, D-fucose, D-arabitol, L-arabitol, gluconato de potássio, 2-cetogluconato de potássio e 5-cetogluconato de potássio.

Distribuíram-se 10 ml de água desmineralizada pelos alvéolos da caixa de incubação e colocaram-se as galerias do sistema API 50 CH na caixa. Preparou-se meio Degryse mínimo

(Tabela 2.8) suplementado com 0,5 g/l de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 0,05 g/l de indicador de pH azul de bromotimol. Os tubos dos testes foram inoculados segundo as instruções do fabricante e cúpulas preenchidas com parafina estéril. As galerias foram incubadas e os resultados observados após 5 a 8 dias de incubação. A alteração de cor do meio de verde para amarelo indica que ocorreu produção de ácido a partir da respectiva fonte de carbono.

#### **2.4.5. Redução de nitrato**

A capacidade de redução de nitrato em nitrito foi determinada segundo a metodologia descrita por Smibert & Krieg (1981). Preparou-se meio R2A líquido (Reasoner e Geldreich, 1985) suplementado com 1 g/l de  $\text{KNO}_3$  e com 2,5 g/L de agar, de modo a aumentar a viscosidade do meio, reduzindo a quantidade de oxigénio presente. Após esterilização no autoclave, distribuíram-se 5 ml de meio por frascos de vidro estéreis e com tampa roscada. Os frascos foram inoculados em profundidade com uma ansa de material celular proveniente de cultura jovem em meio sólido. Como controlo negativo, utilizou-se meio sem nitrato. Os frascos foram incubados numa estufa à temperatura óptima de crescimento e os resultados foram observados após 3, 5 e 7 dias de incubação. Para a detecção de redução de nitrato, as culturas foram homogeneizadas no vortex e transferiram-se 100  $\mu\text{l}$  de amostra para um tubo de ensaio. A cada tubo adicionaram-se 1,9 ml água Milli-Q e 2 ml de reagente para detecção colorimétrica de nitrito (Tabela 2.12). Após adicionar o reagente, agitou-se a mistura e esperou-se 15 minutos. Após esse tempo, considerou-se como resultado positivo o desenvolvimento da cor rosa, o que indica a presença de nitrito. No caso das amostras que não desenvolveram cor, adicionaram-se, com uma ansa de 1  $\mu\text{l}$ , pó de zinco. Se após a adição de zinco, o meio permanecer incolor, significa que ocorreu redução de nitrato em azoto que se liberta para a atmosfera. No entanto, se após a adição de zinco o meio ficar rosa significa que a estirpe não reduziu o nitrato presente no meio de cultura.

**Tabela 2.12.** Composição do reagente de detecção colorimétrica de nitrito.

<b>Reagente de quantificação de nitrito <sup>a</sup></b>
<b>Solução A</b>
0,02 g de N-(dihidrocloro-1-naftiletlenodiamina) em 100 ml de HCl 1,5 M
<b>Solução B</b>
1 g de ácido sulfanílico em 100 ml de HCl 1,5 M

<sup>a</sup> O reagente foi preparado por mistura das duas soluções na proporção de 1:1 (v/v).

#### **2.4.6. Crescimento em anaerobiose**

Para testar a capacidade de crescimento das estirpes em anaerobiose, preparou-se meio líquido R2A suplementado com 1 g/l de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ); meio líquido R2A suplementado com 1 g/l sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e meio líquido R2A que funciona como controlo negativo. Os meios foram esterelizados no autoclave e foram distribuídos 5 ml por tubos de ensaio estéreis. Antes de inocular os tubos, estes foram fervidos num banho de água e arrefecidos rapidamente de seguida, de forma a libertar o oxigénio dissolvido no meio. Os tubos foram inoculados com uma suspensão celular obtida a partir de culturas jovens em meio sólido. Os tubos inoculados foram introduzidos numa câmara de anaerobiose com atmosfera de  $\text{CO}_2/\text{H}_2$  (Gas Generating Kit, bioMérieux) e incubados numa estufa à temperatura óptima de crescimento. Utilizaram-se ainda como controlos, tubos com o mesmo meio de cultura inoculados e incubados em aerobiose e tubos não inoculados incubados em anaerobiose. Após 8 dias de incubação, comparou-se o crescimento nos tubos com meio R2A suplementado com  $\text{KNO}_3$  ou  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , face ao controlo negativo (tubos com meio R2A líquido não suplementado e em anaerobiose) através da leitura da D.O. das culturas a 610 nm.

#### **2.4.7. Crescimento químiolitoheterotrófico por utilização de tiosulfato**

A capacidade de crescimento químiolitoheterotrófico por utilização de tiosulfato de sódio foi testada em condições aeróbias em meio 27 do DSMZ modificado (Tabelas 2.13 e 2.14). O meio de cultura foi suplementado com 0,5 g/L de tiosulfato de sódio. Inoculou-se os meios de cultura com uma suspensão celular em água estéril com material de culturas jovens em meio sólido, de modo a obter uma D.O. inicial de 0,05. As culturas foram incubadas, com agitação do tipo orbital (135 rpm). Acompanhou-se o crescimento por leitura da D.O. a 610 nm até as culturas atingirem a fase estacionária. No caso das estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178, devido à ocorrência de floculação, a leitura da D.O., apesar de não traduzir o verdadeiro crescimento das estirpes, permitiu ter uma noção qualitativa de quando as culturas atingiram a fase estacionária. Ao longo do tempo de incubação, recolheram-se amostras de 4 ml que foram centrifugadas a 4000 rpm, durante 30 minutos, numa centrífuga de bancada (Eppendorf 5810R). Recolheu-se o sobrenadante e guardou-se a -20 °C até análise, em frascos de vidro previamente lavados com água Milli-Q. Para determinar a capacidade de oxidação de tiosulfato em sulfato procedeu-se à quantificação dos níveis de sulfato e de tiosulfato no meio ao longo do tempo (secção 2.4.7.1 e 2.4.7.2).

**Tabela 2.13.** Composição do meio 27 do DSMZ modificado, utilizado para testar a capacidade das estirpes de oxidação de tiosulfato em sulfato.

<b>Componentes</b>	<b>por litro</b>
Extracto de levedura	1 g
Succinato de sódio	1 g
Acetato de amónia	0,5 g
Solução de citrato de Ferro (III) (0,1% em água)	5 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,4 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,05 g
Solução de oligoelementos SL-6 sem sulfato	0,05 g

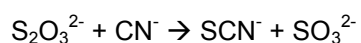
**Tabela 2.14.** Composição da solução de oligoelementos SL-6 sem sulfatos <sup>a</sup>, utilizada na preparação do meio 27 do DSMZ modificado.

<b>Componentes</b>	<b>g/l</b>
ZnCl <sub>2</sub>	0,06
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,03
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,2
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,01
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,02
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,03

<sup>a</sup> Substituição de sulfato de zinco por cloreto de zinco.

#### 2.4.7.1. Quantificação de tiosulfato

A quantificação da utilização de tiosulfato foi realizada segundo o método colorimétrico descrito por Westley (1987). Este método tem por base a produção de tiocianato de ferro a partir de tiosulfato, na presença de Cu<sup>2+</sup> e CN<sup>-</sup>, segundo a reacção:



Para a construção da recta-padrão, a partir de uma solução *stock* de tiosulfato de sódio a 0,01 M, prepararam-se alíquotas num gradiente de concentração de 0,1 a 1  $\mu\text{mol}$  em 1,8 ml de água Milli-Q. Para a quantificação do tiosulfato nas amostras, utilizaram-se 200  $\mu\text{l}$  de amostra e completou-se o volume até 1,8 ml com água Milli-Q.

A cada alíquota de padrão/amostras, adicionaram-se 100  $\mu\text{l}$  de KCN 0,25 M e agitou-se no vortex. De seguida, adicionaram-se 100  $\mu\text{l}$   $\text{CuSO}_4$  0,2 M e agitou-se no vortex. A cada tubo adicionou-se 1 ml de reagente de Sörbo (Tabela 2.15). Após a adição deste reagente formou-se um precipitado branco que se dissolveu progressivamente, à medida que se desenvolveu a cor vermelha do tiocianato de ferro. Cinco minutos após a adição do reagente leu-se a absorvância a 460 nm. A calibração do zero de absorvância foi realizada com 1,8 ml de água Milli-Q tratada da mesma forma que os padrões e amostras. A recta-padrão foi construída com os valores da absorvância dos padrões em função da concentração, permitindo posteriormente calcular a concentração de tiosulfato nas amostras.

**Tabela 2.15.** Composição do reagente de Sörbo.

<b>Componentes</b>	<b>por litro</b>
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	100 g
$\text{HNO}_3$ 65 %	200 ml
$\text{H}_2\text{O}$ Milli-Q	800 ml

#### 2.4.7.2. Quantificação de sulfato

A quantificação de sulfato foi realizada segundo o método turbidimétrico descrito por Sörbo (1987). Este método tem por base a precipitação de sulfato com iões de bário.

Para a construção da recta-padrão, a partir de uma solução de sulfato de sódio a 0,05 M, prepararam-se alíquotas num gradiente de concentração de 0,5 a 2,5  $\mu\text{mol}$  em 3 ml de água Milli-Q. Para a quantificação do sulfato nas amostras utilizou-se um volume variável de amostra, perfazendo-se o volume até 3 ml com água Milli-Q.

A cada alíquota de padrão/amostras, adicionou-se 1 ml HCl 0,5 M e agitou-se no vortex. De seguida, adicionou-se 1 ml de uma solução de Ba-PEG 8000 (Tabela 2.16) e agitou-se no vortex. Após cinco minutos da adição de Ba-PEG 8000, leu-se a absorvância a 600 nm.

A calibração do zero de absorvância foi realizada com 3 ml de água Milli-Q tratada da mesma forma que os padrões e amostras. A recta-padrão foi construída com os valores da absorvância dos padrões em função da concentração, permitindo calcular a concentração de sulfato nas amostras.

**Tabela 2.16.** Composição do reagente Ba-PEG 8000 <sup>a</sup>.

Componentes	por 250 ml
BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,44 g
Polietilenoglicol 8000 (PEG-8000)	37,5 g
H <sub>2</sub> O Milli-Q	250 ml

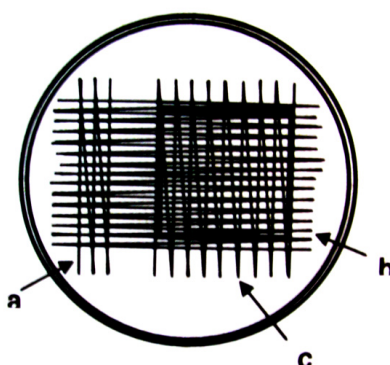
<sup>a</sup> O reagente é preparado dissolvendo o cloreto de bário e PEG 8000 em água com a adição gota-a-gota, sob agitação forte, de 500 µl de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM. Este reagente é estável apenas durante uma semana.

## 2.5. Caracterização quimiotaxonómica

### 2.5.1. Análise da composição em ácidos gordos

#### 2.5.1.1. Cultura das estirpes bacterianas e recolha das células

O material celular para análise de ácidos gordos segundo o método MIS-MIDI (Microbial Identification System, Microbial ID Inc.) foi obtido por cultivo das estirpes bacterianas em placas de meio R2A. A repicagem do material celular nas placas foi realizada em direcções específicas (Figura 2.1). Inicialmente, espalhou-se o material celular numa direcção, ao longo de algumas linhas, rodou-se a placa 90° e espalhou-se o material de forma contínua por toda a superfície da placa numa direcção perpendicular à primeira. Por fim, rodou-se novamente 90° e espalhou-se o material numa terceira direcção, perpendicular à segunda, formando-se deste modo uma zona de sobreposição. As placas foram revestidas por sacos de plástico e incubadas num banho a 30 °C durante 3 dias.



**Figura 2.1.** Representação esquemática do modo de repicagem efectuado para cultivo das células para extracção de ácidos gordos. As setas indicam a primeira (a), segunda (b) e terceira (c) direcções de espalhamento. A zona rodeada pelo quadrado (□) indica a área de crescimento utilizada para recolha de células.

As células foram recolhidas da zona onde ocorreu sobreposição de espalhamento, de modo a assegurar que se encontravam na mesma fase de crescimento. Recolheu-se com uma ansa de 10 µl o material celular e colocou-se no fundo de um tubo de vidro (13 x 100 mm) com tampa roscada e vedante de teflon.

#### **2.5.1.2. Extração de ésteres metílicos de ácidos gordos**

O processo de extração de ésteres metílicos de ácidos gordos foi realizado segundo o método descrito por Kuykendall *et al.* (1988) que se baseia na saponificação, metilação e recuperação dos ácidos gordos numa fase orgânica.

No passo de saponificação, adicionou-se 1 ml de reagente de saponificação (45 g NaOH em 150 ml metanol e 150 ml água destilada) aos tubos com o material celular; homogeneizou-se a suspensão no vortex, durante 5 segundos, e incubou-se num banho a 100 °C. Após 5 minutos, agitaram-se as suspensões e incubaram-se novamente no banho a 100 °C, durante 25 minutos. Neste processo, as células foram lisadas e os ácidos gordos separados dos componentes celulares.

Após os tubos arrefecerem, promoveu-se a metilação dos ácidos gordos por adição de 2 ml de reagente de metilação (HCl 6 N : metanol, 325:275, v/v). Homogeneizou-se a mistura num vortex, durante 5 segundos, e incubou-se num banho a 80 °C, durante 10 minutos, após os quais se arrefeceu rapidamente os tubos. Este processo conduz à produção dos ésteres metílicos dos ácidos gordos.

Os ácidos gordos metilados foram recuperados adicionando 1,25 ml reagente de extração (*n*-hexano : *tert*-butil-metil éter, 1:1, v/v). Os tubos foram agitados suavemente do topo à base num oscilador (SpeciMix, Thermolyne). Ao fim de 10 minutos, colocou-se os tubos num suporte até ocorrer separação de fases. Removeu-se a fase inferior (aquosa) e descartou-se. À fase orgânica que permaneceu nos tubos adicionaram-se 3 ml de reagente de lavagem (10,8 g NaOH em 900 ml água destilada). Agitaram-se no oscilador durante 5 minutos e deixaram-se repousar até ocorrer a separação de fases. Este processo foi facilitado pela adição de algumas gotas de uma solução saturada de NaCl. Removeram-se 2/3 da fase superior para tubos de vidro de 2 ml, que foram selados com cápsulas próprias. Os tubos foram guardados a -20 °C até análise cromatográfica.

#### **2.5.1.3. Análise e identificação dos ésteres metílicos de ácidos gordos por cromatografia de gás**

Os ésteres metílicos de ácidos gordos foram analisados através do Sistema de Identificação Microbiana MIS-MIDI (Hewlett Packard). Este sistema é constituído por um cromatógrafo de gás (5890 Dimension<sup>TM</sup>, Series II plus, Hewlett Packard), equipado com um detector de

ionização de chama, uma coluna capilar Ultra 2 (0,2 mm diâmetro x 25 m comprimento) revestida com 5 % de fenilmetil silicone, um integrador modelo 3392, um sistema de injeção automática de amostras (7673, Hewlett Packard) e um computador (Hewlett Packard). Na análise, utilizou-se uma mistura de calibração (Microbial ID, Inc.) contendo uma mistura de ácidos gordos de composição conhecida que é analisada no início de cada ensaio e após a leitura de cada 11 amostras.

Injectaram-se na coluna 2 µl de amostra para análise. Durante as análises, o injetor foi mantido à temperatura de 250 °C e o detector a 300 °C. A coluna foi eluída com hidrogénio a um fluxo de 30 ml/min, utilizando uma rampa de temperaturas de 170 até 270 °C, com uma taxa de aumento de 5 °C/min, seguindo-se uma segunda rampa de temperaturas de 270 a 310 °C, com uma taxa de aumento de 40 °C/min, para limpeza da coluna. A temperatura voltou a re-equilibrar a 170 °C, retomando-se o ciclo com a injeção da amostra seguinte. No processo de separação, utilizaram-se como gases auxiliares, azoto, a um fluxo de 30 ml/min, e ar a um fluxo de 400 ml/min, para alimentar a chama do detector. Neste processo, obtiveram-se dois tipos de resultados: um registo cromatográfico e um registo MIS. O cromatograma obtém-se pela visualização do sinal electrónico produzido pelo detector à medida que os ácidos gordos são eluídos da coluna. O registo MIS fornece a análise detalhada dos dados do cromatograma. Neste registo, entre outros parâmetros, estão incluídos os tempos de retenção, os valores de ECL (“Equivalent chain length”), a identificação de cada pico quando possível e a percentagem de cada ácido gordo presente, em relação ao total dos ácidos gordos identificados.

A identificação dos ácidos gordos da amostra foi realizada com base nos valores de ECL. O valor de ECL consiste numa extrapolação linear do tempo de retenção de cada pico entre dois picos da mistura de calibração. O valor de ECL obtido para cada pico é então comparado pelo *software* com os valores esperados de ECL de ácidos gordos incluídos na base de dados do sistema.

## **2.5.2. Composição em lipoquinonas respiratórias**

### **2.5.2.1. Cultura e recolha de células**

O material celular para extracção de lipoquinonas foi obtido por cultivo das estirpes bacterianas em placas de meio R2A. O material celular foi recolhido para tubos de vidro escuro de 15 ml com tampa roscada e vedante de teflon, previamente pesados. Adicionou-se 1 ml de água Milli-Q às amostras, congelou-se a -80 °C e liofilizou-se num liofilizador (Flexi-Dry TM MP Inc., Freeze Dryer, USA) acoplado a uma bomba de vácuo (Trivac D4C, USA).

### **2.5.2.2. Extração das lipoquinonas respiratórias**

A extração de lipoquinonas foi realizada segundo o método descrito por Tindall (1989). O processo foi realizado na ausência de luz e sob atmosfera de azoto, para evitar foto-oxidação das quinonas. Todo o material utilizado no processo de extração foi lavado com n-hexano.

A cerca de 80-100 mg de células liofilizadas adicionaram-se 3 ml de n-hexano:metanol (1:2, v/v) e homogeneizou-se a suspensão, num agitador magnético durante 30 minutos. De seguida, colocaram-se os tubos em gelo durante 15 minutos para promover a separação de fases e adicionaram-se 3 ml de hexano frio e 2 ml de NaCl 0,3 %. Os tubos foram centrifugados a 2500 rpm durante 5 minutos. Recolheu-se a fase superior para um novo tubo e concentrou-se até à secura, sob um jacto de azoto. Guardou-se a -20 °C até continuação da análise.

### **2.5.2.3. Separação e purificação das lipoquinonas respiratórias**

As lipoquinonas foram separadas por cromatografia monodimensional em camada fina (TLC), utilizando placas de sílica gel G (10 x 10 cm com 0,25 mm de espessura, Merck 5735). As amostras foram ressuspendidas em 400 µl de dietil-éter e aplicadas com uma microseringa na placa, ao longo de uma linha de 3 cm, e à distância de 1 cm do bordo inferior e dos lados da placa. As placas foram colocadas numa tina previamente saturada com 80 ml do solvente hexano:dietil-éter (85:15, v/v). Após eluição do solvente até ao topo da placa, deixaram-se secar as placas à temperatura ambiente. As placas foram visualizadas sob luz ultra-violeta (254 nm) e marcaram-se as zonas castanhas que correspondem às lipoquinonas. Removeu-se a sílica correspondente à área marcada e colocou-se numa coluna de filtração, constituída por uma pipeta de Pasteur vedada com lã de vidro. As lipoquinonas foram eluídas da sílica com 1 ml de hexano:metanol (1:2, v/v) e recuperadas em tubos de vidro aos quais se adicionaram 0,3 ml de hexano frio e 3–4 gotas de NaCl 0,3 %. De modo a promover a separação de fases, colocaram-se os tubos em gelo, durante 15 minutos. A fase superior foi transferida para um novo tubo, evaporada até à secura e mantida a -20 °C até continuação da análise.

### **2.5.2.4. Identificação das lipoquinonas respiratórias**

As lipoquinonas foram identificadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), num cromatógrafo acoplado a uma bomba de sucção (Gilson 305 Master), módulo manométrico (Gilson, Model 205) e com uma coluna de fase reversa octadecilsílica (Spherisorb S5 ODS2, Phase Sep) de 25 cm x 4,6 mm, a qual foi mantida à temperatura de 37 °C por um forno (7960 Series Block Heater, Jones Chromatography). A fase móvel consistiu no solvente metanol:heptano (10:2, v/v) a um fluxo de 2 ml/min durante a análise. O solvente foi previamente filtrado através de um filtro hidrofóbico de poro 0,22 µm (Schleicher & Schuel) e

desgaseificado durante 30 minutos sob vácuo com agitação magnética. As amostras foram ressuspensas em 200 µl de metanol:heptano (10:2, v/v) e injectado um volume de 20 µl.

As lipoquinonas foram detectadas a um comprimento de onda de 269 nm, através de um detector de ultra-violeta (Gilson 115 Variable Wavelength U.V. Detector). Os resultados foram integrados pelo programa JCL 6000 Data System para HPLC (Jones Chromatography, USA). A identificação das lipoquinonas respiratórias foi realizada através da comparação dos seus tempos de retenção com os dos padrões obtidos de bactérias de referência.

### **2.5.3. Análise de lípidos polares**

#### **2.5.3.1. Cultura e recolha de células**

O material celular para extracção de lípidos foi obtido como descrito na secção 2.5.2.1.

#### **2.5.3.2. Extracção de lípidos polares**

O processo de extracção de lípidos polares foi realizado segundo descrito em Ross *et al.* (1985). Todo o material utilizado na extracção foi previamente lavado com uma solução de clorofórmio:metanol (1:1). Às células liofilizadas (100-150 mg), adicionaram-se 2,75 ml de metanol-NaCl aquoso 0,3 % (p/v) (100:10, v/v) e agitou-se a solução durante 5 minutos. De seguida, os tubos foram fervidos a 100 °C durante 5 minutos. Após arrefecimento, adicionaram-se 0,75 ml de NaCl aquoso (0,3 %, p/v) e 1,25 ml de clorofórmio. Esta mistura foi agitada durante 2–3 horas à temperatura ambiente, e depois centrifugada, durante 2 minutos, à velocidade máxima numa centrifuga de bancada. O sobrenadante foi removido cuidadosamente com uma pipeta de Pasteur para outro tubo de vidro. Ao *pellet* adicionaram-se 2 ml de uma solução de clorofórmio:metanol:NaCl aquoso (50:100:40, v/v/v) e agitou-se durante 15 minutos, após os quais se centrifugou, tal como descrito acima. Juntaram-se os dois sobrenadantes num mesmo tubo e adicionaram-se 0,75 ml NaCl aquoso e 1,75 ml de clorofórmio. Após agitar manualmente esta mistura, formaram-se duas fases que foram separadas por centrifugação, durante 5 minutos, à velocidade máxima. Removeu-se a fase superior, que se descartou, e a fase inferior, que contém os lípidos polares, foi evaporada até à secura sob um jacto de azoto e conservada a -20 °C até análise.

### **2.5.3.3. Separação de lípidos polares por cromatografia monodimensional e bidimensional em camada fina**

A separação e revelação dos lípidos polares foi realizada segundo o método descrito em da Costa *et al.* (2006).

#### **2.5.3.3.1. Cromatografia monodimensional em camada fina**

A análise de lípidos polares foi realizada por cromatografia monodimensional em camada fina utilizando placas de sílica gel 60 (10 x 10 com 0,25 mm de espessura, Merck No 6526). Após ressuspende o extracto de lípidos polares em clorofórmio metanol (1:1, v/v), aplicou-se uma porção do extracto de cada amostra em 3 placas, ao longo de uma linha a 1 cm do bordo inferior da placa. As placas foram colocadas numa tina previamente saturada com o solvente clorofórmio:ácido acético:metanol:água (80:15:12:4, v/v/v/v). Após eluição do solvente até ao topo da placa, deixou-se secar e revelou-se posteriormente tal como descrito na secção 2.5.3.4. Na placa para revelação de lípidos totais aplicaram-se também padrões de lípidos polares.

#### **2.5.3.3.2. Cromatografia bidimensional em camada fina**

A realização de cromatografia bidimensional em camada fina permitiu determinar o número total de lípidos. Para a cromatografia bidimensional em camada fina utilizaram-se placas de sílica gel 60 (10 x 10 com 0,25 mm de espessura, Merck No 6526). Após ressuspende o extracto de lípidos polares com clorofórmio metanol (1:1, v/v), colocou-se com uma microseringa, em 3 placas, uma porção de extracto num ponto situado no canto inferior direito à distância de 1 cm do bordo inferior e do direito. As placas foram colocadas na tina da 1ª direcção previamente saturada com o solvente clorofórmio:metanol:água (65:25:4, v/v/v). De seguida, retiraram-se as placas e acelerou-se o processo de evaporação do solvente com um secador a frio. Após o solvente evaporar, rodaram-se as placas 90° para a esquerda e colocaram-se na tina da 2ª direcção previamente saturada com o solvente clorofórmio:ácido acético:metanol:água (80:15:12:4, v/v/v/v). Após eluição do solvente até ao topo retiraram-se as placas da tina e deixou-se evaporar o solvente. Os lípidos nas placas foram revelados após pulverização com corantes específicos tal como descrito na secção 2.5.3.4.

#### 2.5.3.4. Revelação dos lípidos polares com corantes específicos

##### 2.5.3.4.1. Revelação de fosfolípidos (reagente azul de molibdénio-ácido sulfúrico)

Os grupos fosfato dos fosfolípidos foram identificados por pulverização de uma placa com o reagente de azul de molibdénio- $H_2SO_4$  (Tabela 2.17). A revelação é imediata, correspondendo o desenvolvimento de manchas azuis à presença de fosfolípidos.

**Tabela 2.17.** Constituição das soluções A e B utilizadas na preparação do corante azul de molibdénio- $H_2SO_4$ , para revelação de fosfolípidos.

<b>Reagente azul de molibdénio-ácido sulfúrico <sup>a</sup></b>	
<b>Solução A <sup>b</sup></b>	
Trióxido de molibdénio ( $MoO_3$ )	10,03 g
Ácido sulfúrico 12,5 M	250 ml
<b>Solução B <sup>c</sup></b>	
Molibdénio (Mo)	400 mg
Solução A	112,5 ml

<sup>a</sup> O corante é preparado adicionando um volume da solução A, um volume da solução B, mais três a quatro volumes de água até a solução ficar com cor verde de azeitona.

<sup>b</sup> A solução A é preparada fervendo até dissolução do óxido.

<sup>c</sup> A solução B é preparada fervendo moderadamente durante 15 minutos.

##### 2.5.3.4.2. Revelação de aminolípidos (reagente de ninidrina)

Para a identificação dos lípidos com grupos amina livres, pulverizou-se uma segunda placa com o reagente de ninidrina (Tabela 2.18) e colocou-se a placa numa estufa a 120 °C, durante 5 minutos. Os aminolípidos aparecem como manchas rosa.

**Tabela 2.18.** Constituição do reagente de ninidrina utilizado para revelar aminolípidos.

<b>Reagente de ninidrina</b>	
200 mg ninidrina em 100 ml de 1-butanol:ácido acético glacial (95:5, v/v)	
Ácido acético 0,5 %	

#### 2.5.3.4.3. Revelação de glicolípidos (reagente de $\alpha$ -naftol-ácido-sulfúrico)

Após a revelação dos aminolípidos com o reagente de ninidrina, pulverizou-se a mesma placa com o reagente de  $\alpha$ -naftol-ácido-sulfúrico (Tabela 2.19) para revelação de glicolípidos. Colocou-se a placa numa estufa a 120 °C, durante 5 minutos. Os glicolídipos surgem como manchas violeta.

**Tabela 2.19.** Constituição do reagente  $\alpha$ -naftol-ácido-sulfúrico utilizado para revelar glicolípidos.

<b>Reagente de <math>\alpha</math>-naftol-ácido-sulfúrico</b>	
Solução de 15 % de $\alpha$ -naftol em etanol absoluto	10,5 ml
Ácido sulfúrico concentrado	6,5 ml
Etanol absoluto	40,5 ml
Água	4 ml

#### 2.5.3.4.4. Revelação de lípidos polares totais (reagente de ácido molibdofosfórico)

A terceira placa foi utilizada para revelação dos lípidos totais por pulverização com o reagente de ácido molibdofosfórico (solução de ácido molibdofosfórico a 5 % em etanol absoluto) até a placa ficar amarela. A placa foi colocada numa estufa a 160 °C, durante 20–30 minutos. Os lípidos totais correspondem às manchas cinzentas que surgem num fundo amarelo. Para retirar a cor do fundo, colocou-se a placa numa tina sobre vapores de amónia a 25 %, durante 2 minutos.

## 2.6. Caracterização genética

### 2.6.1. Determinação do conteúdo em guanina e citosina

#### 2.6.1.1. Extração e purificação do DNA

O processo de extração e purificação do DNA foi realizado segundo o método descrito por Nielsen *et al.* (1995). Recolheu-se uma ansa de material celular de culturas jovens em meio sólido e ressuspendeu-se em 1 ml de tampão de lavagem TES (Tris 50 mM; EDTA 5 mM; sacarose 2,5 %), num eppendorf de 2 ml. Centrifugou-se durante 10 minutos a 10 000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensou em 100 µl de tampão TES. Adicionaram-se 390 µl de uma solução de lisozima (20 mg/ml), homogeneizou-se e incubou-se durante 1 hora, num banho a 37 °C. De seguida, adicionaram-se 300 µl de tampão de lise GES (EDTA 0,5 M, pH 8; guanidina 60 %; N-laurilsarcosina 1 %) e colocou-se no gelo durante 10 minutos. Adicionaram-se 11 µl de RNase pancreática (10 mg/ml), homogeneizou-se cuidadosamente e incubou-se durante 1 hora, num banho a 37 °C. Após incubação, adicionaram-se 3,5 µl de proteinase K (20 mg/ml), homogeneizou-se com cuidado e incubou-se durante 50 minutos, num banho a 37 °C. Adicionaram-se 250 µl de acetato de amónia 7,5 M, agitou-se com cuidado e colocou-se 10 minutos em gelo. De seguida, adicionaram-se 100 µl de CTAB/NaCl (1 % de brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB); NaCl 0,7 M) e incubou-se a 65 °C durante 20 minutos. Adicionaram-se às amostras 800 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) e agitou-se vigorosamente de modo a obter uma solução homogénea. Centrifugou-se a 10 000 rpm durante 15 minutos e recolheu-se a fase aquosa (fase superior) para um novo tubo, ao qual se adicionou 2-propanol (0,54 x volume total, ± 500 µl) de modo a precipitar o DNA. Centrifugou-se durante 2 minutos a 13 000 rpm e lavou-se o DNA duas vezes com 500 µl de etanol a 70 %, centrifugando durante 2 minutos a 13 000 rpm entre cada lavagem. Após lavagem, deixou-se evaporar o etanol e ressuspendeu-se o DNA em 200 µl de água Milli-Q estéril.

#### 2.6.1.2. Degradação do DNA

Colocaram-se 25 µl de DNA em estudo num eppendorf e 8 µl de DNA do bacteriófago lambda (475 µg/ml, Promega) em outro *eppendorf*. Ferveram-se os tubos durante 5 minutos, e arrefeceram-se, de seguida, rapidamente, em gelo. Adicionou-se, sucessivamente, 50 µl de tampão acetato de sódio 30 mM (pH 5,3), 5 µl de ZnSO<sub>4</sub> 20 mM e 3 µl de nuclease P1 (1 mg/ml) e incubou-se a 37 °C durante 2 horas. Paralelamente, prepararam-se 4 tubos com 25 µl de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (0,1 mM, Promega), respectivamente, aos quais se adicionou 50 µl de tampão acetato de sódio (pH 5,3) e 5 µl de ZnSO<sub>4</sub> 20 mM. De seguida, juntam-se aos *eppendorfs* com os DNAs e dNTPs, 5 µl de tampão glicina-NaOH 0,1 M (pH 10,4) e 5 µl de fosfatase alcalina (200 U/ml, Promega). Os *eppendorfs* foram incubados a 37 °C durante 6

horas, após as quais se centrifugou durante 4 minutos a 10 000 rpm e guardou-se a -20 °C até análise.

### 2.6.1.3. Quantificação do conteúdo G+C por HPLC

Para análise do conteúdo em G+C utilizou-se o mesmo sistema descrito na secção 2.5.2.4, com a modificação do comprimento de onda no detector para 254 nm, o solvente de corrida e o fluxo para 1 ml/min, durante a análise. O solvente de corrida consistiu numa mistura de uma solução de trietilamina 0,5 M (com pH ajustado a 5,1 com ácido fosfórico):metanol:água Milli-Q (20:60:360, v/v/v). O cálculo do conteúdo G+C foi realizado segundo o método descrito por Mesbah *et al.* (1989):

$$\% G + C = M \times 100$$

sendo que,

$$M = \left[ 1 + Y \left( \frac{zT}{wG} \right) \right]^{-1}$$

em que  $zT$  e  $wG$  são as áreas dos picos de timina e guanina, respectivamente e  $Y$  é uma constante calculada usando o DNA do padrão bacteriófago lambda,

$$Y = \left( \frac{wG}{zT} \right) \times 1,006$$

### 2.6.2. Determinação da sequência do gene do rRNA 16S e análise filogenética

A extracção e purificação do DNA genómico foi realizada segundo o método descrito por Nielsen *et al.* (1995) tal como descrito na secção 2.6.1.1. A amplificação do gene do rRNA 16S foi realizada segundo o método descrito por Rainey *et al.* (1996). Utilizaram-se os *primers* 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1525r (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3') e o programa de PCR: 3 min 95 °C; 30 ciclos: 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C e 1,5 min 72 °C; 7 min a 72 °C). Confirmou-se a qualidade e a presença da banda correspondente ao gene do rRNA 16S amplificado (cerca de 1500 bp), por comparação com o marcador NZYDNA Ladder III (NZYTech), num gel de agarose a 1 % com 0,5 µg/ml de brometo de etídio e tampão TAE 1x (40 mM Tris-Acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0). O gene do rRNA 16S amplificado foi purificado utilizando o sistema JETquick Spin Column Technique-PCR Purification Spin Kit (Genomed) e submetido à MacroGen para sequenciação. A sequenciação foi realizada utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e análise por electroforese capilar num ABI3730XL Analyzer.

A qualidade do cromatograma obtido foi analisada na ferramenta Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems) e as sequências determinadas foram editadas manualmente no programa BioEdit (Hall, 1999). Utilizou-se a ferramenta de BLAST do EzTaxon (Chun *et al.*, 2007) para encontrar as estirpes filogeneticamente próximas das estirpes em estudo com base na sequência do gene do rRNA 16S. As sequências foram alinhadas com a ferramenta SINA Sequence Alignment (Pruesse *et al.*, 2007). A análise filogenética foi realizada utilizando o software MEGA versão 5 (Tamura *et al.*, 2011). As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o método *neighbour-joining* (Saitou e Nei, 1987) e método *maximum-likelihood* (Fitch, 1971). As distâncias evolutivas foram calculadas com a correção de Jukes e Cantor (Jukes e Cantor, 1969) e a topologia da árvore foi avaliada por análise de *bootstrap* de 1000 réplicas.

### **2.6.3. Análise das estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54 por RAPD-PCR e ERIC-PCR**

A extracção e purificação do DNA genómico foi realizada segundo o método descrito por Nielsen *et al* (1995), tal como descrito na secção 2.6.1.1. A análise do perfil genómico por RAPD-PCR foi realizada segundo o método descrito em Tiago *et al.* 2004 (Tiago *et al.*, 2004). Utilizou-se o primer OPA3 (3'-AGTCAGCCAC-5') e o programa de PCR: 3 min a 94 °C; 45 ciclos: 1 min a 94 °C, 1 min a 45 °C, 2 min a 72 °C; 8 min a 72 °C. A análise do perfil genómico por ERIC-PCR foi realizada segundo o método descrito em Versalovic *et al.* (Versalovic *et al.*, 1991). Utilizaram-se os *primers* ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') e o programa de PCR: 4 min a 94 °C; 30 ciclos: 30 s a 94 °C, 1 min a 52 °C, 8 min a 65 °C; 16 min a 65 °C). A reacção de RAPD foi analisada por electroforese num gel de agarose a 2 % com 0,5 µl de brometo de etídio e tampão TAE 1x, enquanto que a reacção de ERIC-PCR foi analisada num gel de agarose a 1 %.

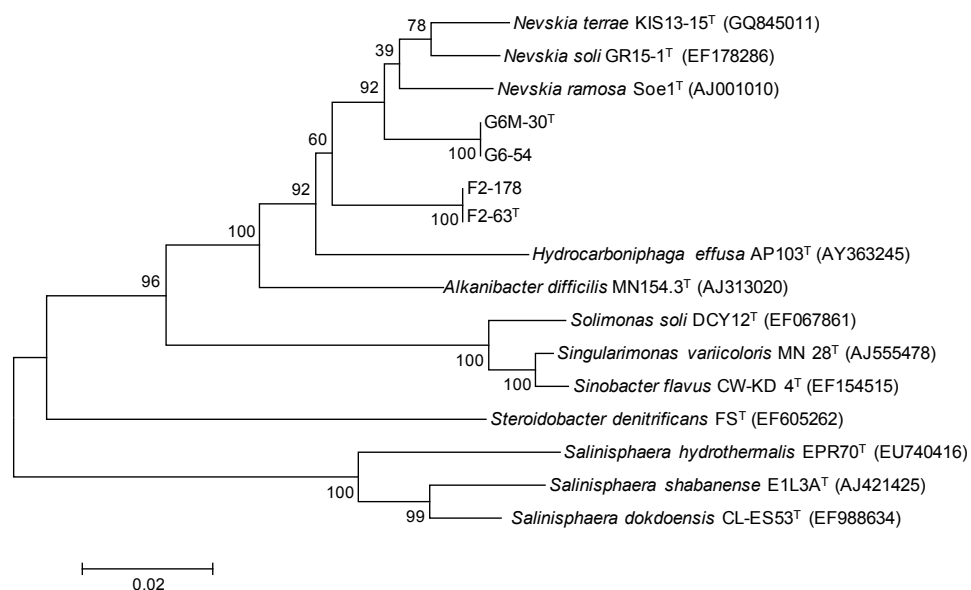
## ***CAPÍTULO 3***

# **Resultados**

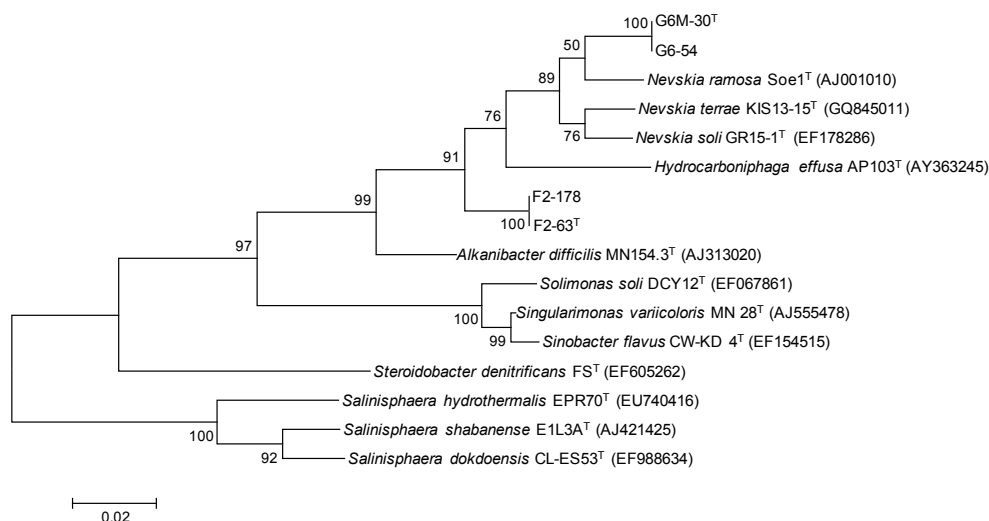
### 3.1. Sequenciação do gene do rRNA 16S e análise filogenética

A análise filogenética com base na sequência do gene rRNA 16S indicou que os novos isolados provenientes de uma água mineral natural (F2-63<sup>T</sup>, F2-178, G6M-30<sup>T</sup> e G6-54) pertencem à família *Sinobacteriaceae* do Filo *Gammaproteobacteria* e agrupam com espécies do género *Nevskia* (Figuras 3.1 e 3.2). As sequências do gene rRNA 16S das estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 são idênticas entre si ao longo de 1324 nucleótidos e têm maior similaridade com a sequência da estirpe tipo de *Nevskia ramosa* (95,5 %). Em relação às estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54, estas também apresentam total homologia ao longo da sequência do gene rRNA 16S e apresentam maior similaridade com a sequência da estirpe tipo de *Nevskia ramosa* (97,1 %). As estirpes F2-63<sup>T</sup>/F2-178 e G6M-30<sup>T</sup>/G6-54 apresentam entre si 96,0% de similaridade. Deste modo, a análise filogenética sugere que as estirpes F2-63<sup>T</sup>/F2-178 e as estirpes G6M-30<sup>T</sup>/G6-54 pertencem ao género *Nevskia*, constituindo duas potenciais novas espécies.

O dendrograma filogenético (cujas distâncias evolutivas foram determinadas pelo método de *maximum-likelihood*) indica também que a estirpe tipo de *Hydrocarboniphaga effusa* agrupa com os novos isolados e as espécies tipo do género *Nevskia* (Figura 3.2).



**Figura 3.1.** Dendrograma filogenético com base na comparação das sequências do gene rRNA 16S das estirpes F2-63<sup>T</sup>, F2-178, G6M-30<sup>T</sup> e G6-54 com as estirpes tipo dos géneros da família *Sinobacteriaceae*. As distâncias evolutivas representadas foram determinadas usando o método de *neighbour-joining*. Os números indicados nos nodos indicam a percentagem de *bootstrap*, resultante de 1000 réplicas. A escala indica 20 substituições de nucleótidos inferidas em 100.



**Figura 3.2.** Dendrograma filogenético com base na comparação das sequências do gene rRNA 16S das estirpes F2-63<sup>T</sup>, F2-178, G6M-30<sup>T</sup> e G6-54 com as estirpes tipo dos gêneros da família *Sinobacteriaceae*. As distâncias evolutivas representadas foram determinadas usando o método de *maximum-likelihood*. Os números indicados nos nodos indicam a percentagem de *bootstrap*, resultante de 1000 réplicas. A escala indica 20 substituições de nucleótidos inferidas em 100.

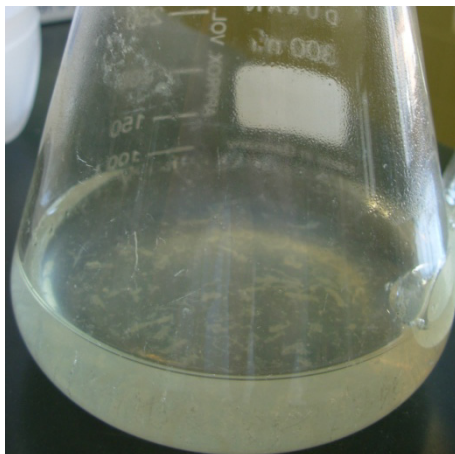
Os resultados da análise filogenética indicaram que os novos isolados poderiam constituir duas novas espécies no género *Nevskia*. Deste modo, as estirpes tipo de *Nevskia ramosa*<sup>T</sup> (DSM 11499<sup>T</sup>) e *Nevskia soli*<sup>T</sup> (DSM 19509<sup>T</sup>) foram utilizadas para estudos de comparação. No entanto, não foi possível realizar os testes para a estirpe tipo de *Nevskia terrae*<sup>T</sup> (KACC 12736<sup>T</sup>), uma vez que a estirpe fornecida pelo banco de cultura não se encontrava pura. Deste modo, os resultados apresentados para comparação com as estirpes em estudo referem-se aos dados presentes no artigo de descrição de *N. terrae*<sup>T</sup> por Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2011).

Uma vez que as espécies descritas do género *Nevskia* e os novos isolados agrupam próximo do género *Hydrocarboniphaga effusa*, cujas espécies descritas se caracterizam por assimilarem alcanos, testou-se para os novos isolados e para *Nevskia ramosa*<sup>T</sup> e *Nevskia soli*<sup>T</sup>, a assimilação de alcanos de C<sub>6</sub>–C<sub>20</sub>. Este estudo também foi realizado, paralelamente, para a estirpe *Hydrocarboniphaga effusa*<sup>T</sup>.

## 3.2. Determinação das condições ótimas de crescimento

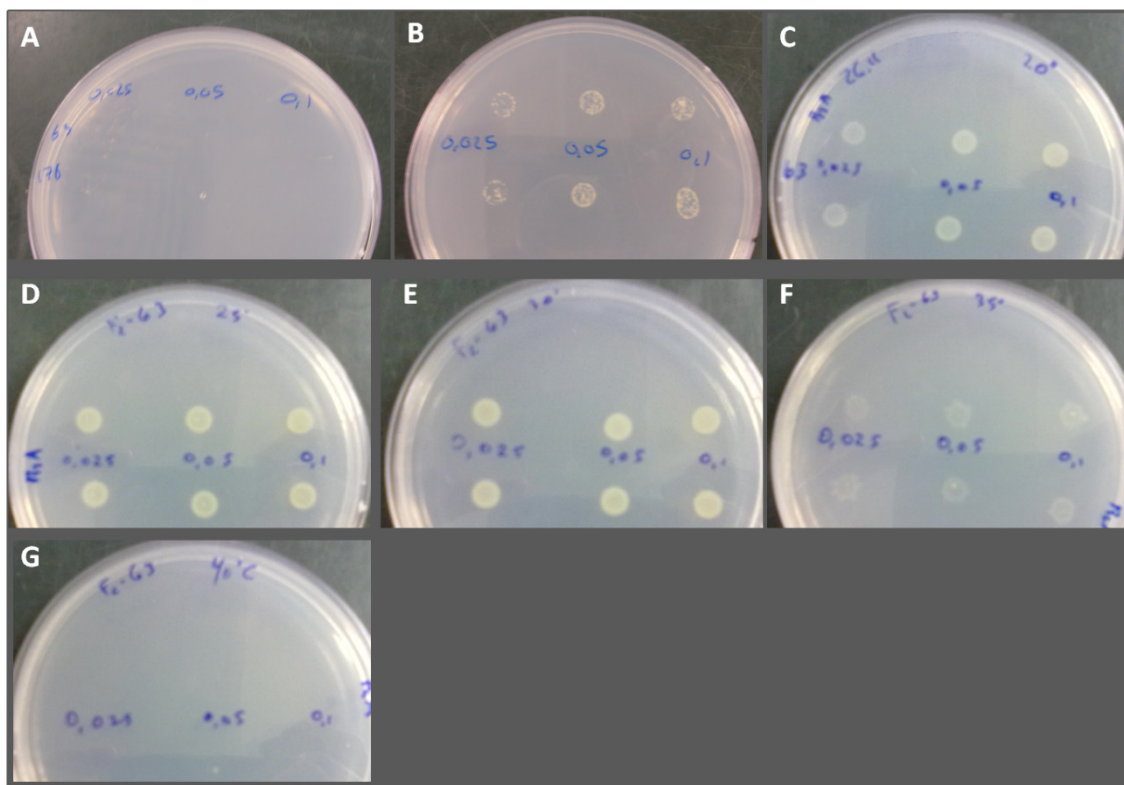
### 3.2.1. Estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178

As estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 formaram agregados de células (Figura 3.3) em todos os meios líquidos testados. A ocorrência de floculação em meio líquido é única para estas estirpes, não se verificando para as estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54, nem para as estirpes tipo de *N. ramosa*, *N. soli* e *N. terrae*. Assim, para a determinação do intervalo e valor ótimo de temperatura e pH para o crescimento das estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 optou-se por utilizar placas de meio R2A.

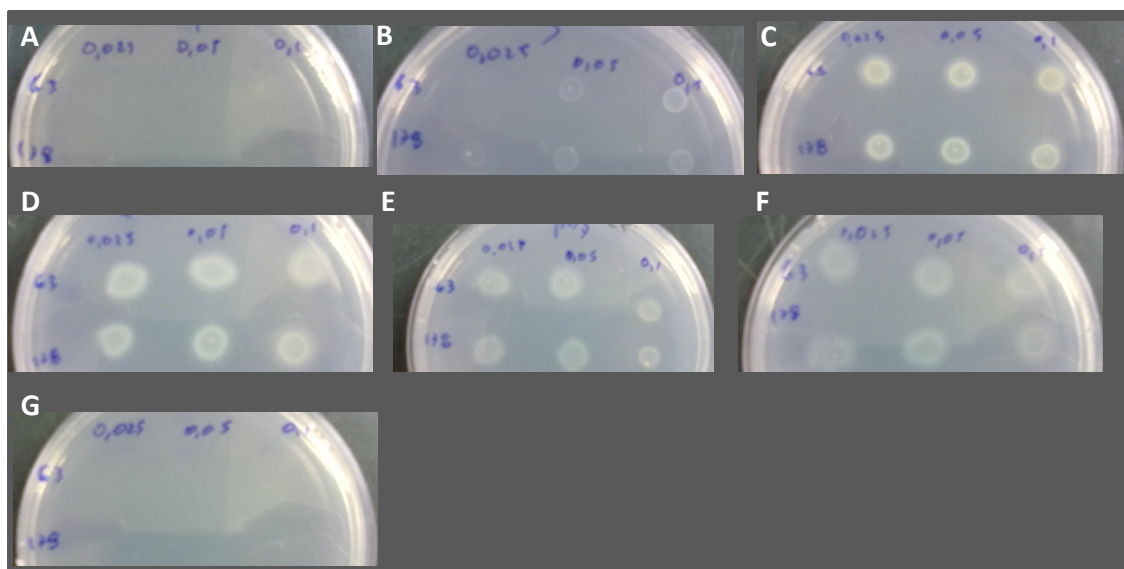


**Figura 3.3.** Formação de agregados de células da estirpe F2-63<sup>T</sup>, cultivada em meio líquido R2A após três dias de incubação a 30 °C.

Por observação visual, nos 3º e 8º dias de incubação verificou-se que as estirpes crescem num intervalo de 15 a 35 °C (Figura 3.4), sendo a temperatura ótima de 25–30 °C. O intervalo de pH para o crescimento é de 5,5–7,5 (Figura 3.5), com pH ótimo entre 6–6,5. Observou-se igualmente que as estirpes não crescem na presença de NaCl.



**Figura 3.4.** Placas de meio R2A inoculadas com gotas de uma suspensão celular da estirpe F2-63<sup>T</sup> com D.O. a 0,025; 0,05 e 0,1; observadas após 8 dias de incubação à respectiva temperatura: 10 °C (A), 15 °C (B), 20 °C (C), 25 °C (D), 30 °C (E), 35 °C (F) e 40 °C (G).

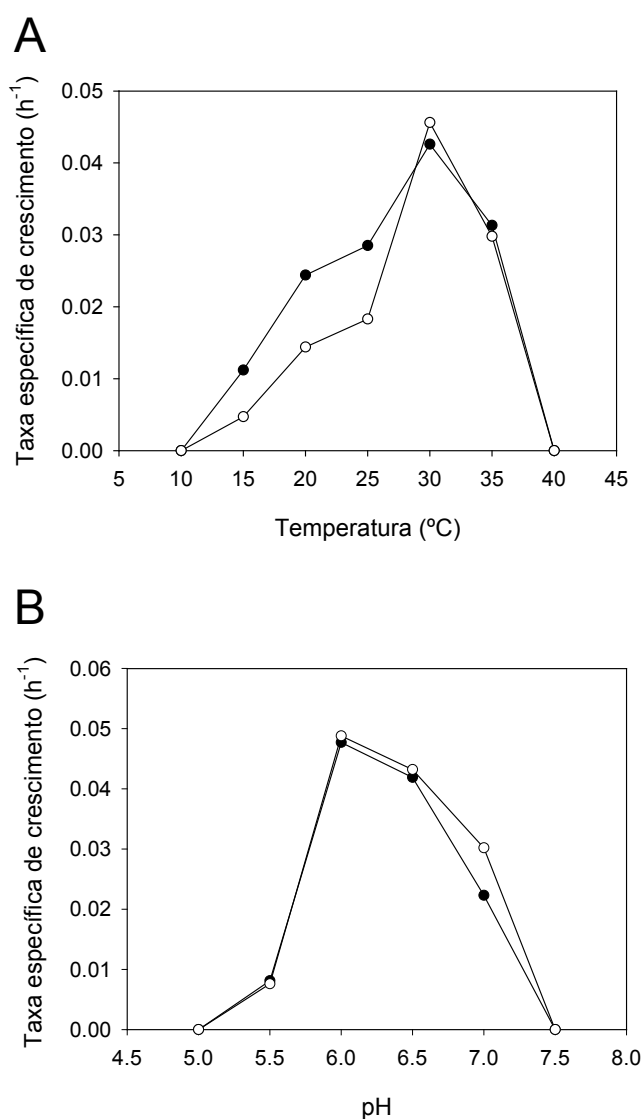


**Figura 3.5.** Placas de meio R2A com pH ajustado no intervalo de 5–9, inoculadas com gotas de uma suspensão celular das estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 com D.O. a 0,025; 0,05 e 0,1, observadas após 8 dias de incubação a 30°C. pH 5 (A), pH 5,5 (B), pH 6 (C), pH 6,5 (D), pH 7 (E), pH 7,5 (F) e pH 8 (G).

### 3.2.2. Estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54

Para as estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54, não se verificou crescimento nos meios *Thermus* e Degryse, registando-se crescimento apenas nos meios R2A e R2A 10x diluído, com baixa produção de biomassa. Observou-se também que as estirpes não crescem na presença de NaCl.

Através da determinação da taxa específica de crescimento verificou-se que as duas estirpes crescem num intervalo de 15 a 35 °C (Figura 3.6A), com temperatura óptima de crescimento a 30 °C. As estirpes crescem num intervalo de pH de 5,5 a 7 (Figura 3.6B), com pH óptimo a 6-6,5.

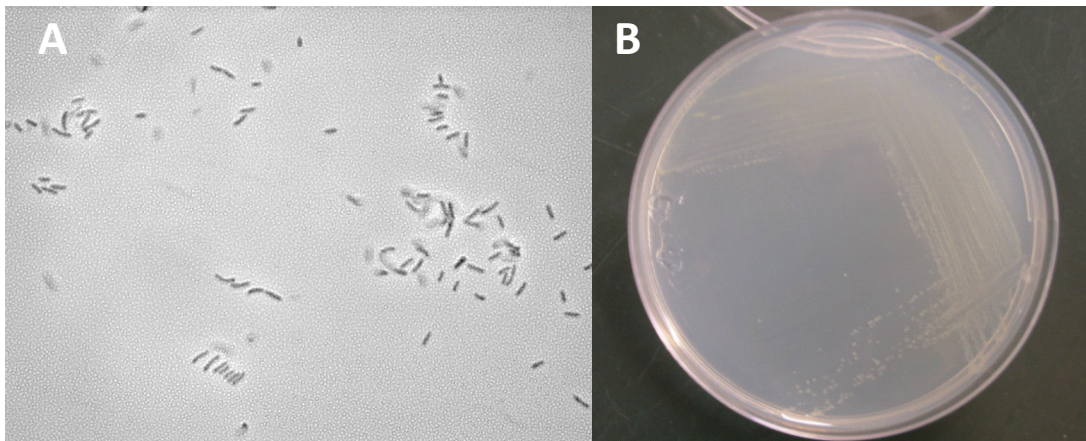


**Figura 3.6.** Variação da taxa específica de crescimento para as estirpes G6M-30<sup>T</sup> (●) e G6-54 (○) em função da temperatura (**A**) e do pH (**B**).

### 3.3. Caracterização morfológica e fenotípica

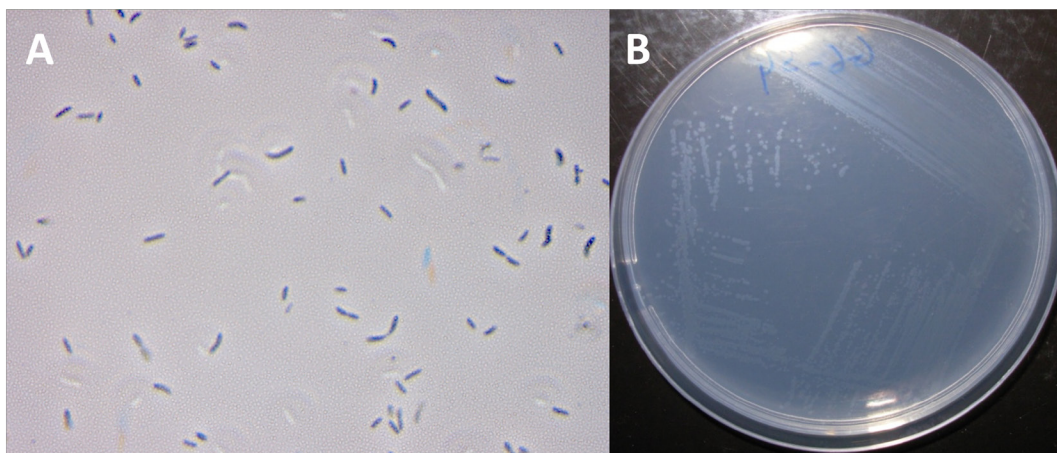
#### 3.3.1. Morfologia celular e colonial

As estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 apresentam células com a forma de bastonete com comprimento de 1–1,5  $\mu\text{m}$  e largura de 0,5–1  $\mu\text{m}$ , após 3 dias de incubação em meio R2A (Figura 3.7A). As células podem encontrar-se isoladas, em pares ou agregados, são Gram negativas e não apresentam mobilidade. As estirpes formam colônias pequenas, circulares, com diâmetro de 0,5–1 mm, convexas, e com pigmentação amarela (Figura 3.7B).



**Figura 3.7.** (A) Morfologia celular das estirpe F2-63<sup>T</sup> observada por microscopia óptica de contraste de fase, utilizando ampliação de 1000x. (B) Morfologia das colônias da estirpe F2-63<sup>T</sup> em meio R2A. A estirpe F2-178 apresenta a mesma morfologia celular e colonial que a estirpe F2-63<sup>T</sup>.

As estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54 apresentam células com a forma de bastonete com comprimento de 1,5–2  $\mu\text{m}$  e largura de 1–1,  $\mu\text{m}$  após três dias de incubação em meio R2A (Figura 3.8A). As células são Gram negativas e apresentam mobilidade através da presença de um flagelo polar. As células podem encontrar-se isoladas ou em pares, formam colônias brancas, circulares, lisas e com 1–1,5 mm de diâmetro após quatro dias de incubação em meio R2A (Figura 3.8B).



**Figura 3.8 (A)** Morfologia celular das estirpe G6M-30<sup>T</sup> observadas por microscópio óptico de contraste de fase, utilizando uma ampliação de 1000x. **(B)** Morfologia das colónias da estirpe G6M-30<sup>T</sup> em meio R2A, após quatro dias de incubação. A estirpe tipo G6-54 apresenta a mesma morfologia celular e colonial que a estirpe G6M-30<sup>T</sup>.

### 3.3.2. Capacidade de formação de biofilme na ausência de azoto

Foi avaliada a capacidade de formação de biofilme na ausência de fonte de azoto nos novos isolados e nas estirpes tipo de *N. ramosa*<sup>T</sup> e *N. soli*<sup>T</sup>, verificando-se que apenas a estirpe *N. ramosa*<sup>T</sup> tem capacidade de formação de um biofilme hidrofóbico na superfície da interface ar-água.

### 3.3.3. Crescimento em anaerobiose

As estirpes F2-63<sup>T</sup>, F2-178, G6M-30<sup>T</sup>, G6-54, *N. ramosa*<sup>T</sup> e *N. soli*<sup>T</sup> não crescem em anaerobiose na presença dos receptores de electrões testados (nitrato e sulfato), apresentando também um resultado negativo para o teste de redução de nitrato a nitrito.

### 3.3.4. Detecção de actividades enzimáticas, da capacidade de assimilação de fontes únicas de carbono e da produção de ácido a partir das fontes de carbono do sistema API 50 CH

No teste de detecção da presença da enzima catalase, registou-se um resultado positivo para todas as estirpes em estudo, pela observação de efervescência, resultante da libertação de oxigénio da reacção de decomposição de peróxido de hidrogénio pela enzima. O teste de detecção da presença de citocromo oxidase também apresentou um resultado positivo para todas as estirpes. Em relação à detecção da presença de outras enzimas, verificou-se para todos os isolados, um resultado positivo para a presença de leucina arilamilase, fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase e um resultado negativo para a presença de cistina arilamidase,

tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -manosidase,  $\alpha$ -fucosidase, arginina dihidrolase e urease (API ZYM e API 20NE). As estirpes apresentam diferenças entre si na presença de algumas enzimas como identificado na Tabela 3.1. Observou-se que todas as estirpes apresentam capacidade de degradação de Tween 20, 40, 60 e 80 (indicação da presença de lipases), mostrando-se incapazes de degradar arbutina e xilano. Foi possível observar diferenças entre as estirpes na sua capacidade para a degradação de caseína, amido, esculina, DNA e gelatina (Tabela 3.1). Também se verificou que nenhuma das estirpes tem capacidade de produção de indol.

Em relação ao teste para avaliar a capacidade de utilização de vários compostos como fontes únicas de carbono, identificaram-se diferenças entre as estirpes, ao nível da sua capacidade de assimilação de alguns açúcares, aminoácidos, álcoois e ácidos orgânicos, tal como apresentado na Tabela 3.1. Nenhuma das estirpes testadas utiliza como fonte de carbono benzoato, citrato, D-arabitol, D-metionina, D-manose, D-ribose, D-xilose, D-galactose, D-maltose, D-manitol, D-rafinose, D-sorbitol, formato, glicogénio, gluconato, lactose, L-alanina, L-arabinose, L-asparagina, L-fenilalanina, L-fucose, L-glicina, L-serina, L-arabitol, L-arginina, L-aspartato, L-histidina, L-lisina, L-sorbose, myo-inositol, ribitol, sacarose, trealose, treonina e xilitol; e todas as estirpes assimilam glucose, piruvato e succinato.

O estudo da capacidade de os organismos pertencentes às espécies do género *Nevskia* assimilarem alcanos como fonte única de carbono, foi pela primeira vez realizado, no contexto do presente trabalho. Verificou-se que as estirpes F2-63<sup>T</sup>, F2-178, G6M-30<sup>T</sup>, G6-54, *N. ramosa*<sup>T</sup> e *N. soli*<sup>T</sup> apresentam capacidade de assimilação de decano, dodecano, tetradecano, hexadecano, octadecano e eicosano. Nenhuma das estirpes assimila hexano ou heptano. A capacidade de assimilação de octano foi apenas observada nas estirpes *N. ramosa*<sup>T</sup>, *N. soli*<sup>T</sup> e G6-54. O estudo da assimilação de alcanos foi também realizado para a estirpe tipo *Hydrocarboniphaga effusa*<sup>T</sup>, que, tal como descrito por *Palleroni et al.* (Palleroni et al., 2004), se caracteriza pela sua capacidade de assimilação deste tipo de compostos. *Hydrocarboniphaga effusa*<sup>T</sup> apresentou capacidade de assimilação de alcanos de C<sub>7</sub> a C<sub>20</sub>.

A utilização do sistema API 50 CH permitiu o estudo da capacidade de fermentação de vários compostos. As estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 apresentaram produção de ácido a partir de potássio-5-gluconato e D-ribose. Por sua vez, as estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54 utilizam D-arabinose, D-lixose, glicerol, L-fucose e potássio-5-gluconato. A estirpe *N. ramosa*<sup>T</sup> consegue produzir ácido a partir de D-frutose e glicerol e a estirpe *N. soli*<sup>T</sup> apenas utiliza D-ramnose. Para os restantes compostos na galeria API 50 CH, obteve-se um resultado negativo para todas as estirpes em estudo.

**Tabela 3.1.** Características fenotípicas que permitem distinguir as estirpes F2-63<sup>T</sup>, F2-178, G6M-30<sup>T</sup>, G6-54 das estirpes tipo de *N. ramosa*<sup>T</sup>, *N. soli*<sup>T</sup> e *N. terrae*<sup>T</sup>.

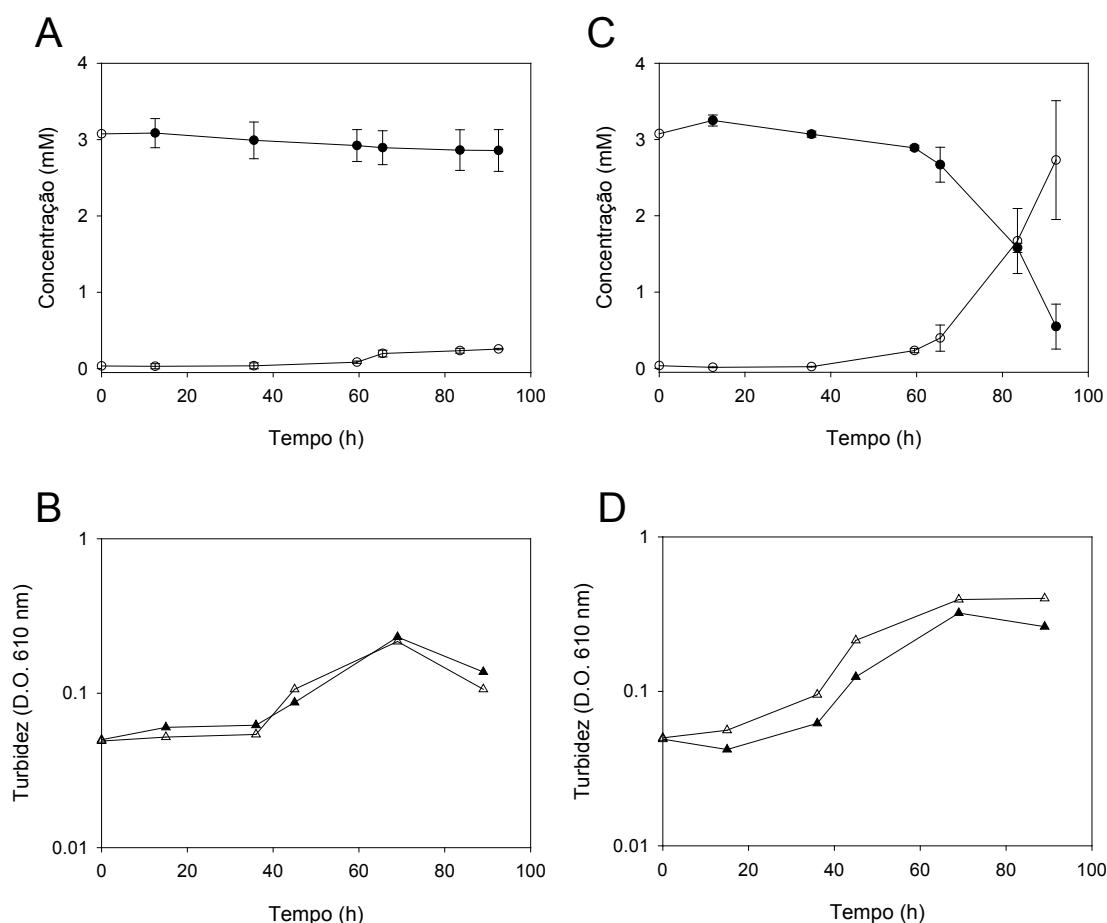
Características	Estirpes				
	F2-63 <sup>T</sup> / F2-178	G6M-30 <sup>T</sup> / G6-54	<i>N. ramosa</i> <sup>T</sup>	<i>N. soli</i> <sup>T</sup>	<i>N. terrae</i> <sup>T c</sup>
<b>Temperatura de crescimento (°C)</b>					
Intervalo	15–35	15–35	nd	15–30 <sup>b</sup>	15–35
Ótima	25–30	30	20–25 <sup>a</sup>	25–28 <sup>b</sup>	28–30
<b>pH de crescimento</b>					
Intervalo	5,5 - 7,5	5,5 - 7	nd	4 - 7 <sup>b</sup>	5 - 7
Ótimo	6 - 6,5	6 - 6,5	7 <sup>a</sup>	6 - 7 <sup>b</sup>	6 - 7
<b>Presença de</b>					
Citocromo oxidase	+	+	+	+	-
Fosfatase alcalina	+	+	+	+	-
Esterase (C4)	+	- / +	+	+	+
Esterase (C8)	-	-	-	-	+
Lipase (C14)	+	-	-	-	-
Valina arilamilase	+	+	+	+	-
<b>Degradação de</b>					
Amido	-	-	-	+	+
Caseína	+	-	+	-	-
DNA	+	-	+	-	-
Esculina	+	-	+	-	-
Gelatina	+	+	-	-	-
<b>Assimilação de</b>					
Celobiose	-	-	-	+	nd
D-frutose	-	-	+	-	nd
D-glucose	+	+	+	+	-
L-ramnose	-	-	-	+	+
α-cetoglutarato	+	-	+	-	nd
Acetato	-	+	-	-	+
DL-lactato	-	+	+	-	+
Fumarato	+	+	+	-	nd
Glutamato	-	+	-	+	nd
Malato	+	+	+	-	+
Glutamina	-	+	+	+	nd
L-isoleucina	+	-	+	+	nd
L-prolina	-	-	-	+	+
L-valina	-	-	-	+	nd
Etanol	-	+	+	+	nd
Glicerol	-	+	+	+	nd
Metanol	-	-	+	-	nd
Octano	-	- / +	+	+	nd
<b>Produção de ácido</b>					
D-arabinose	-	+	-	-	-
D-frutose	-	-	+	-	nd
D-lixose	-	+	-	-	nd
Glicerol	-	+	+	-	nd
L-fucose	-	+	-	-	nd
L-ramnose	-	-	-	+	-
Potássio 5-gluconato	+	+	-	-	nd
D-ribose	+	-	-	-	nd

-, negativo; +, positivo; nd, não determinado

<sup>a</sup> Resultados de Strümeyer *et al.*, 1998<sup>b</sup> Resultados de Weon *et al.*, 2008<sup>c</sup> Resultados de Kim *et al.*, 2011

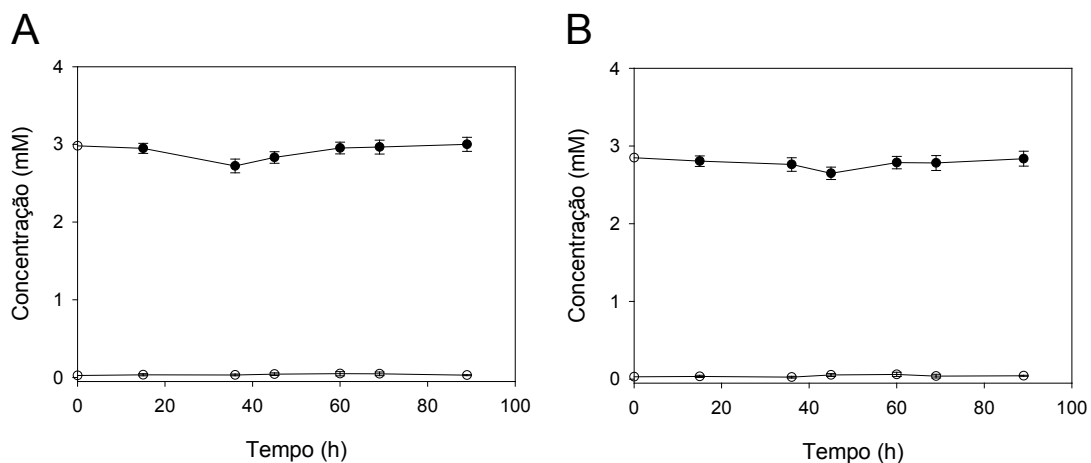
### 3.3.5. Quantificação do consumo de tiosulfato e produção de sulfato

A capacidade de oxidação de tiosulfato e crescimento químiolitoheterotrófico foi testada utilizando o meio 27 do DSMZ modificado. Este estudo mostrou que a estirpe G6-54 tem capacidade de oxidação de tiosulfato em sulfato, o que se verificou pela diminuição, ao longo do tempo, da concentração de tiosulfato no meio e por um aumento da concentração de sulfato (Figura 3.9C). No entanto, a capacidade de oxidação de tiosulfato não foi observada para estirpe G6M-30<sup>T</sup> (Figura 3.9A). A Figura 3.9 apresenta igualmente o crescimento das estirpes G6M-30<sup>T</sup> (Figura 3.9B) e G6-54 (Figura 3.9D), não se verificando diferenças significativas ao nível do crescimento em meio suplementado e não suplementado com tiosulfato de sódio.



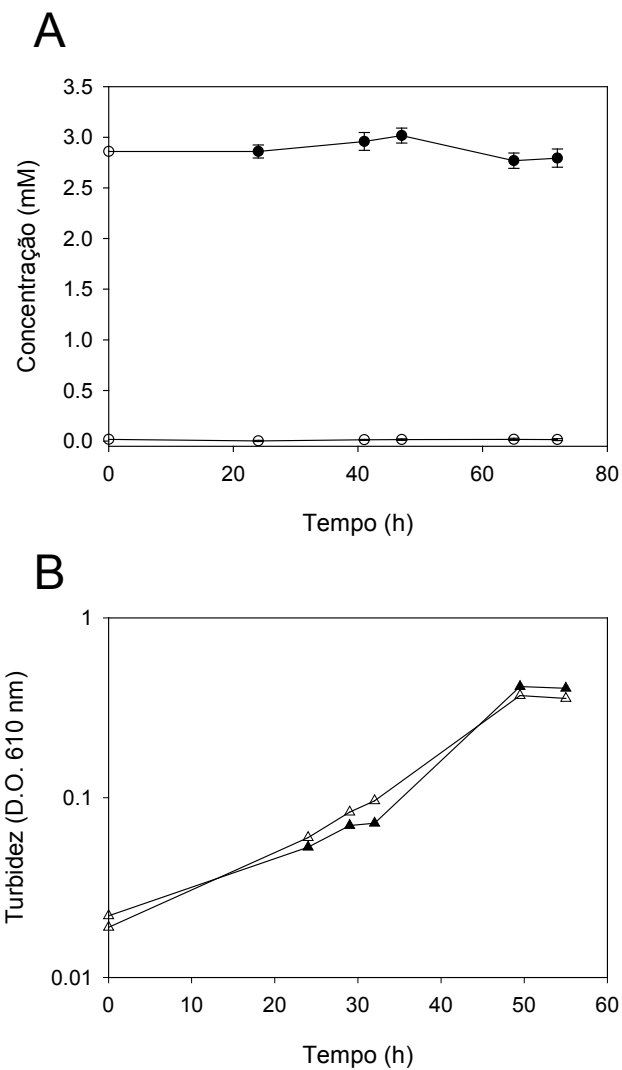
**Figura 3.9.** Quantificação do consumo de tiosulfato (●) e produção de sulfato (○) pelas estirpes G6M-30<sup>T</sup> (A) e G6-54 (C), cultivadas em condições aeróbias em meio 27 do DSMZ modificado e suplementado com 0,5 g/l de tiosulfato de sódio, e respectiva avaliação da capacidade de crescimento químiolitoheterotrófico na ausência (▲) e presença de 0,5 g/l de tiosulfato de sódio (△) para as estirpes G6M-30<sup>T</sup> (B) e G6-54 (D).

A quantificação dos níveis de tiosulfato e produção de sulfato no meio para as estirpes F2-63<sup>T</sup> (Figura 3.10A) e F2-178 (Figura 3.10B) revelou que estas não têm capacidade de oxidação de tiosulfato. Devido ao facto destas estirpes formarem agregados em meio líquido, não foi possível acompanhar o crescimento por leitura da densidade óptica.



**Figura 3.10.** Quantificação do consumo de tiosulfato (●) e produção de sulfato (○) pelas estirpes F2-63<sup>T</sup> (A) e F2-178 (B) cultivadas em meio 27 do DSMZ modificado, e suplementado com 0,5 g/l de tiosulfato de sódio.

A estirpe *N. soli*<sup>T</sup> também apresentou um resultado negativo para a oxidação de tiosulfato em sulfato (Figura 3.11A), verificando-se também que a adição de tiosulfato não influencia o crescimento (Figura 3.11B). Em relação à estirpe *N. ramosa*<sup>T</sup> não foi possível obter resultados para este teste, uma vez que não foi possível a sua cultura no meio utilizado.



**Figura 3.11. (A)** Quantificação do consumo de tiosulfato (●) e produção de sulfato (○) pela estirpe *N. soli*<sup>T</sup>. **(B)** Comparação do crescimento da estirpe *N. soli*<sup>T</sup> cultivada em meio 27 do DSMZ na ausência (▲) e presença de 0,5 g/l de tiosulfato de sódio (△).

### 3.4. Caracterização quimiotaxonómica

#### 3.4.1. Composição em quinonas isoprenóides

A partir da análise por HPLC detectou-se que as estirpes F2-63<sup>T</sup>, F2-178, G6M-30<sup>T</sup>, G6-54 têm, como quinoma maioritária, a ubiquinona 8 (Q8), a mesma apresentada por *N. ramosa*<sup>T</sup>, *N. soli*<sup>T</sup> e *N. terrae*<sup>T</sup>, tal como descrito anteriormente por Stümeier *et al.*, (1998), Weon *et al.* (2008) e Kim *et al.* (2011), respectivamente.

#### 3.4.2. Análise da composição em ácidos gordos

O ácido gordo *Sum Feature 8* (C<sub>18:1</sub>ω7c/ C<sub>18:1</sub>ω6c) apresenta-se como maioritário para os novos isolados e para todas as espécies do género *Nevskia* (Tabela 2). A designação *Sum Feature* indica a presença de um ácido gordo que não é possível separar por este método. As estirpes F2-63<sup>T</sup>/F2-178, *N. soli*<sup>T</sup>, *N. terrae*<sup>T</sup> (Kim *et al.* 2011) também apresentaram C<sub>16:0</sub> como ácido gordo maioritário. As estirpes F2-63<sup>T</sup>/F2-178 apresentam uma percentagem menor em *Summed feature 3* (C<sub>16:1</sub>ω7c/ C<sub>16:1</sub>ω6c) (1,7 %) face às estirpes G6M-30<sup>T</sup>/G6-54, *N. ramosa*<sup>T</sup> e *N. soli*<sup>T</sup> (27,0, 17,3 e 4,0 %, respectivamente). As estirpes F2-63<sup>T</sup>/F2-178 caracterizam-se igualmente por apresentarem uma maior percentagem do ácido gordo C<sub>18:1</sub> 2-OH face às outras espécies do género e verificou-se a ausência deste ácido gordo nas estirpes G6M-30<sup>T</sup>/G6-54. É igualmente possível distinguir F2-63<sup>T</sup>/F2-178 de *N. ramosa*<sup>T</sup> e *N. soli*<sup>T</sup> com base em diferenças nas percentagens relativas de ácidos gordos minoritários (Tabela 3.2).

Por sua vez, as estirpes G6M-30<sup>T</sup>/G6-54 apresentam como ácidos gordos maioritários *Sum Feature 8* (C<sub>18:1</sub>ω7c/ C<sub>18:1</sub>ω6c) (29,7 %) e *Summed feature 3* (C<sub>16:1</sub>ω7c/ C<sub>16:1</sub>ω6c) (27,0 %), verificando-se que estes também se apresentam maioritários em *N. ramosa*<sup>T</sup> (33,5 e 17,3 %, respectivamente). No entanto, as estirpes G6M-30<sup>T</sup>/G6-54 apresentam uma menor percentagem em C<sub>12:0</sub> (3,2 %) em relação à percentagem apresentada por *N. ramosa*<sup>T</sup> (8,1 %) e também pelas estirpes F2-63<sup>T</sup>/F2-178 e *N. soli*<sup>T</sup> (6,9 e 7,3 %, respectivamente). É também possível distinguir as estirpes G6M-30<sup>T</sup>/G6-54 das restantes espécies do género e das estirpes F2-63<sup>T</sup>/F2-178 com base em diferenças nas percentagens relativas de ácidos gordos minoritários (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2.** Percentagem relativa de ácidos gordos das estirpes F2-63<sup>T</sup>, F2-178, G6M-30<sup>T</sup>, G6-54, *N. ramosa*<sup>T</sup>, *N. soli*<sup>T</sup> cultivadas em meio R2A a 30 °C durante três dias; e da estirpe *N. terrae*<sup>T</sup> cultivada em meio R2A a 28°C durante dois dias (Kim *et al.*, 2011).

Ácidos gordos	F2-63 <sup>T</sup> /F2-178	G6M-30 <sup>T</sup> /G6-54	<i>N. ramosa</i> <sup>T</sup>	<i>N. soli</i> <sup>T</sup>	<i>N. terrae</i> <sup>T</sup> <sup>e</sup>
<b>12:0</b>	6,9 ± 1,6	3,2 ± 0,3	8,1 ± 1,4	7,3 ± 0,3	8,1
<b>12:0 3-OH</b>	-	-	3,8 ± 0,8	-	-
<b>14:0</b>	8,2 ± 1,2	11,5 ± 0,4	9,8 ± 2,1	4,7 ± 0,3	8,5
<b>14:0 2-OH</b>	-	3,6 ± 0,2	4,9 ± 1,1	1,0 ± 0,2	-
<b>Summed Feature 2<sup>a</sup></b>	8,1 ± 1,9	2,4 ± 0,5	2,8 ± 0,7	8,7 ± 0,4	8,7
<b>16:0 N OH</b>	-	1,0 ± 1,4	tr	tr	-
<b>16:0 iso</b>	0,7 ± 0,1	tr	tr	3,6 ± 0,2	1,3
<b>Summed Feature 3<sup>b</sup></b>	1,7 ± 0,1	27,0 ± 1,3	17,3 ± 4,0	4,0 ± 0,9	8,7
<b>16:00</b>	16,4 ± 1,6	14,8 ± 0,5	9,7 ± 1,4	19,5 ± 0,7	12,4
<b>17:0 ciclo</b>	0,6 ± 0,1	tr	-	11,2 ± 1,0	-
<b>17:0 10 metil</b>	-	0,8 ± 1,1	tr	tr	-
<b>16:0 3-OH</b>	5,1 ± 0,8	-	0,6 ± 0,5	1,9 ± 0,2	1,7
<b>18:1 ω9c</b>	-	1,3 ± 0,1	-	-	-
<b>Summed Feature 8<sup>c</sup></b>	29,4 ± 4,7	29,7 ± 0,5	33,5 ± 1,7	21,6 ± 1,4	40,6
<b>18:00</b>	tr	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,3 ± 0,2	-
<b>19:0 ciclo ω8c</b>	5,4 ± 1,7	0,5 ± 0,6	-	11,6 ± 2,2	3,2
<b>18:1 2-OH</b>	10,1 ± 2,4	-	2,9 ± 0,5	tr	2,8
<b>UN 19.601<sup>d</sup></b>	4,0 ± 0,4	1,2 ± 0,2	3,2 ± 2,7	tr	-

± SD; os resultados são a média mais o desvio-padrão de duas a três análises; tr (do inglês *trace*), ácidos gordos que representam <0,5 % do total de ácidos gordos; -, não detectado.

<sup>a</sup> *Summed Feature 2* (16:1-iso I; 14:0 3-OH), ácidos gordos não separados por este método.

<sup>b</sup> *Summed Feature 3* (16:1ω7c/16:1ω6c), ácidos gordos não separados por este método.

<sup>c</sup> *Summed Feature 8* (18:1ω7c/18:1ω6c), ácidos gordos não separados por este método.

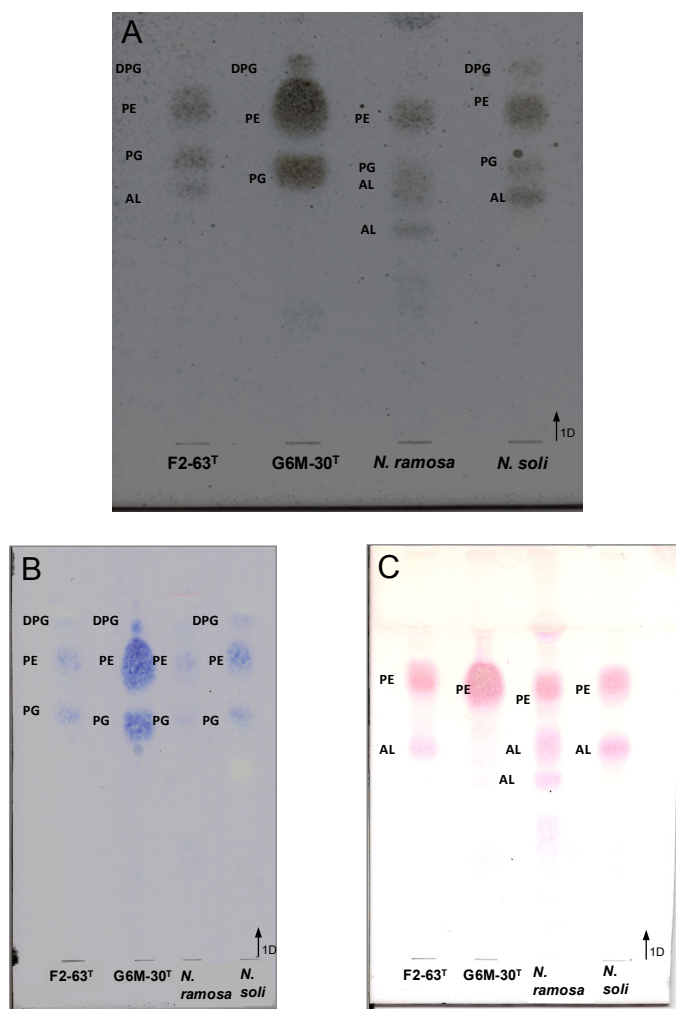
<sup>d</sup> Ácido gordo desconhecido com comprimento da cadeia equivalente (ECL) 19.601.

<sup>e</sup> Resultados de Kim *et al.*, 2011

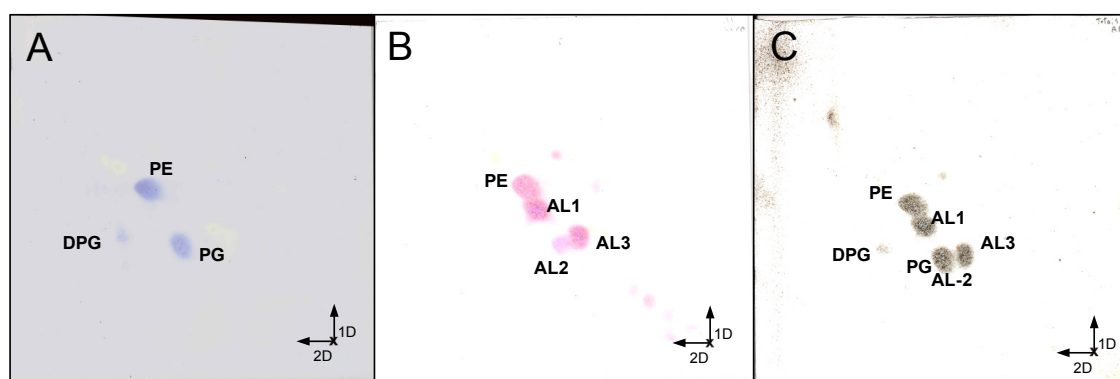
### 3.4.3. Análise de lípidos polares

A identificação do perfil de lípidos polares das estirpes em estudo resultou da comparação conjunta dos resultados da cromatografia monodimensional e bidimensional (Figuras 3.12–3.16). As estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 apresentam um perfil lipídico idêntico entre si (dados não apresentados). No caso das estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54, estas também apresentam entre si o mesmo perfil em lípidos polares (dados não apresentados).

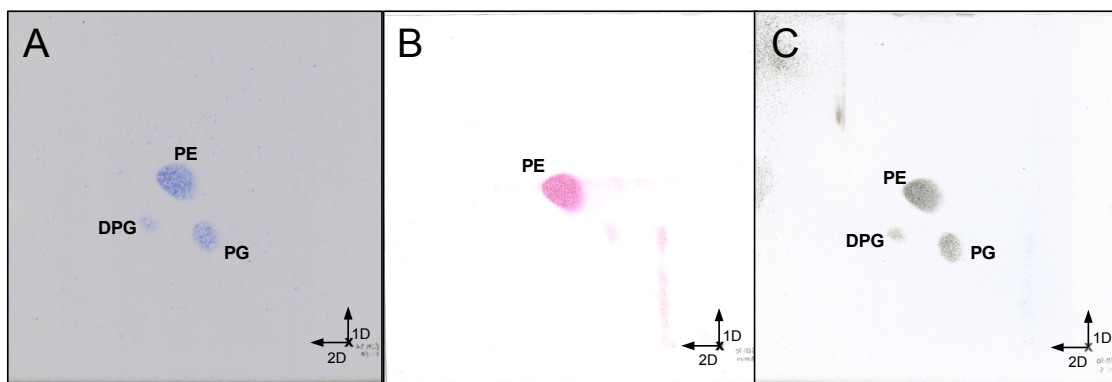
A comparação dos perfis de lípidos das estirpes F2-63<sup>T</sup>/F2-178 e das estirpes G6M-30<sup>T</sup>/G6-54 entre si e com as estirpes tipo de *N. ramosa*<sup>T</sup> e *N. soli*<sup>T</sup> revelou que todas as estirpes apresentam fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) e três aminolípidos não identificados (AL1-3), com a exceção das estirpes G6M-30<sup>T</sup>/G6-54 que não apresentam nenhum aminolípido. O *spot* designado AL2 sobrepõe-se com o *spot* identificado como PG. No entanto, foi possível considerar a presença destes dois lípidos uma vez que o *spot* foi revelado com o corante para grupos fosfato e localiza-se na posição correspondente ao padrão PG. Contudo, o mesmo *spot* apresenta sinal com o corante de grupos amina. Todas as outras estirpes distinguem-se de *N. ramosa*<sup>T</sup>, por esta apresentar mais um aminolípido (AL4). Verificou-se igualmente que nenhuma estirpe apresenta glicolípidos, uma vez que a revelação com o corante específico deu resultado negativo.



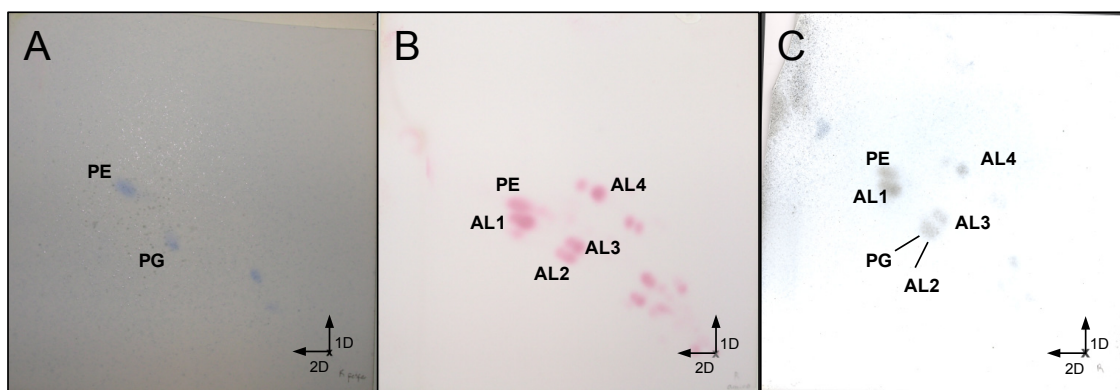
**Figura 3.12.** Cromatografia monodimensional de camada fina dos lípidos polares de F2-63<sup>T</sup>, G6M-30<sup>T</sup>, *N. ramosa*<sup>T</sup> e *N. soli*<sup>T</sup>. A placa foi revelada com corante específico para observação de lípidos totais (A), de grupos fosfato (B) e de grupos amina (C). DPG, difosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; AL, aminolípido.



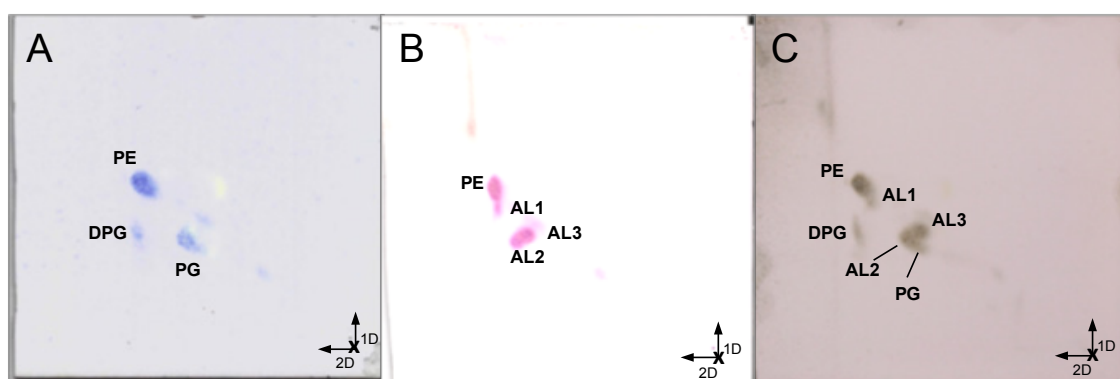
**Figura 3.13.** Cromatografia bidimensional de camada fina dos lípidos polares de F2-63<sup>T</sup> revelados com corantes específicos para detecção de fosfolípidos (A), aminolípidos (B) e lípidos totais (C). DPG, difosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; AL, aminolípido.



**Figura 3.14.** Cromatografia bidimensional de camada fina dos lípidos polares de G6M-30<sup>T</sup> revelados com corantes específicos para detecção de fosfolípidos (A), aminolípidos (B) e lípidos totais (C). DPG, difosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; AL, aminolípidos.



**Figura 3.15.** Cromatografia bidimensional de camada fina dos lípidos polares de *N. ramosa*<sup>T</sup> revelados com corantes específicos para detecção de fosfolípidos (A), aminolípidos (B) e lípidos totais (C). DPG, difosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; AL, aminolípidos.



**Figura 3.16.** Cromatografia bidimensional de camada fina dos lípidos polares de *N. soli*<sup>T</sup> revelados com corantes específicos para detecção de fosfolípidos (A), aminolípidos (B) e lípidos totais (C). DPG, difosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; AL, aminolípidos.

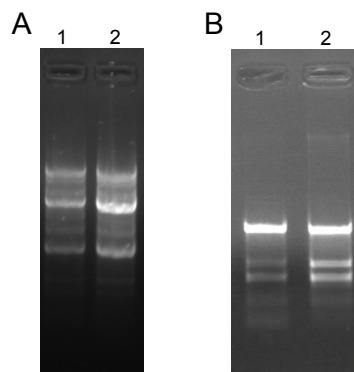
### 3.5. Caracterização genotípica

#### 3.5.1. Análise do conteúdo em guanina e citosina (G+C) do DNA

A percentagem molar do conteúdo em guanina e citosina do DNA genómico das estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 foi de 66,8 e 67 %, respectivamente. As estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54 apresentaram uma percentagem de 66,0 e 67,0 %, respectivamente. A determinação do conteúdo em G+C foi também realizada para as estirpes *N. ramosa*<sup>T</sup>, que apresentaram um valor de 62,9 %, mais baixo que o valor de 67,8 %, inicialmente indicado por Strümeyer *et al.* (Stürmeyer *et al.*, 1998). A estirpe *N. soli*<sup>T</sup> apresentou um valor de conteúdo em G+C de 64,1 %, valor este semelhante ao indicado por Weon *et al.* (Weon *et al.*, 2008).

#### 3.5.2. RAPD e ERIC-PCR das estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54

Os perfis de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR*) analisados para as estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54 (Figura 3.17), mostraram-se idênticos.



**Figura 3.17.** Avaliação do perfil de RAPD (A) e ERIC-PCR (B) para as estirpes G6M-30<sup>T</sup> (1) e G6-54 (2).



## ***CAPÍTULO 4***

### **Discussão**

O estudo da diversidade microbiológica de uma água mineral natural com origem num aquífero localizado na zona centro de Portugal Continental, permitiu o isolamento das estirpes F2-63<sup>T</sup>, F2-178, G6M-30<sup>T</sup> e G6-54. Esta água de profundidade caracteriza-se por apresentar valores de temperatura (28,5 °C) e pH (5,7) estáveis e consiste num meio oligotrófico. As estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 foram isoladas a partir de água na origem de um furo artesiano com 75 metros de profundidade, que abastece a unidade fabril de engarrafamento de água mineral, enquanto que a estirpe G6M-30<sup>T</sup> foi isolada a partir de água mineral engarrafada com 180 dias de armazenamento, e a estirpe G6-54 a partir de água mineral engarrafada com 6 dias de armazenamento. Estes isolados apresentam-se como constituintes do microbiota autóctone do aquífero, uma vez que a sua presença manteve-se constante ao longo do tempo de análise da diversidade neste ecossistema (dados não publicados). Assim, é relevante a caracterização deste organismos, de modo a obter conhecimento acerca das características morfológicas e fisiológicas apresentada por microrganismos adaptados a este tipo de ambiente.

A análise filogenética dos novos isolados revelou que estes pertencem ao género *Nevskia* na família *Sinobacteraceae* do filo *Gammaproteobacteria*, apresentando valores de similaridade da sequência do gene do rRNA 16S superior a 95 % face às estirpes deste género (entre 95,2-95,5 % para F2-63<sup>T</sup>/F2-178 e 96,3-97,1 % para G6M-30<sup>T</sup>/G6-54). Estes valores estão de acordo com o critério actualmente aceite de que um género pode ser definido por espécies que apresentem 95 % ou mais de similaridade ao nível da análise comparativa das sequências do gene rRNA 16S (Rosselló-Mora e Amann, 2001).

A análise da sequência do gene rRNA 16S mostrou ainda que as estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 apresentam sequências idênticas entre si e que apresentam maior similaridade com a sequência de *Nevskia ramosa*<sup>T</sup>, com a qual partilham 95,5 % de similaridade. As estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54, por sua vez também apresentam sequências idênticas entre si e apresentam igualmente uma maior similaridade com a sequência de *Nevskia ramosa*<sup>T</sup> (97,1 %).

Considera-se que estirpes que apresentem um valor de hibridação DNA-DNA superior a 70 % e com 5 °C ou menos de  $\Delta T_m$ , como pertencentes à mesma espécie (Stackebrandt *et al.*, 2002; Wayne *et al.*, 1987). Tal como foi demonstrado por Stackebrandt e Goebel no início da década de 90 do século XX, valores de hibridação superiores a 70 % correspondem a valores de similaridade de sequência do gene rRNA 16S superiores a 97 % (Stackebrandt e Goebel, 1994). Assim o valor de 97 % de similaridade foi proposto como o limite a partir do qual seria necessário realizar uma hibridação DNA-DNA, para provar se as estirpes constituem de facto espécies diferentes. No entanto, recentemente com base na extensa análise da informação referente à descrição de novas espécies, publicadas no volume 55 do ISJEM (2005), Stackebrandt *et al.* definem um novo valor para o limite de espécies, 98,7-99,0 % de similaridade entre sequências do gene rRNA 16S (Stackebrandt e Ebers, 2006). Deste modo, o valor de similaridade entre a sequência do gene rRNA 16S entre as estirpes F2-63<sup>T</sup>/F2-178 com a estirpe tipo de *Nevskia ramosa* (95,5 %); e o valor de similaridade entre a sequência das

estirpes G6M-30<sup>T</sup>/G6-54 com a estirpe tipo de *Nevskia ramosa* (97,1 %), encontra-se abaixo desse limite, indicando a possibilidade destes novos isolados constituírem, respectivamente, duas novas espécies no género *Nevskia*. Desta forma, com vista à classificação dos novos isolados utilizou-se uma abordagem polifásica, com base na aplicação de diferentes metodologias que permitiu integrar informação de natureza fenotípica, quimiotaxonómica e genética a qual conduziu à caracterização dos novos isolados e diferenciação destes face às estirpes filogeneticamente mais próximas.

Ao nível das condições de crescimento, os novos isolados apresentam intervalos e valores óptimos de temperatura e pH próximos dos descritos para as espécies filogeneticamente relacionadas (temperatura óptima de cerca de 30 °C e pH óptimo de cerca de 6,5), com a excepção de *Nevskia ramosa*<sup>T</sup> que apresenta um melhor crescimento num intervalo de temperatura de 20–25 °C. Embora na literatura se encontre indicado um valor de pH 7 para cultivo desta espécie, esta apresenta um nível de crescimento idêntico em meios com pH ajustado a 6,5.

No ensaio para a determinação da capacidade de formação de biofilme na ausência de azoto no meio, apenas a *N. ramosa*<sup>T</sup>, apresenta esta característica, o que permite distingui-la das restantes.

O estudo da degradação enzimática de vários substratos e a detecção enzimática através do sistema API ZYM e API 20NE, permitiu identificar diferenças entre os novos isolados e as estirpes tipo das espécies do género *Nevskia*. Foi possível diferenciar as estirpes F2-63<sup>T</sup>/F2-178 das estirpes G6M-30<sup>T</sup>/G6-54 (pela presença de lipase C14 e degradação de DNA, caseína e esculina); da estirpe *N. ramosa*<sup>T</sup> (pela presença de lipase C14 e degradação de gelatina); da estirpe *N. soli*<sup>T</sup> (pela presença de lipase C14, degradação de caseína, DNA, esculina e gelatina e ausência de degradação de amido); e da estirpe *N. terrae*<sup>T</sup> (pela presença de citocromo oxidase, fosfatase alcalina, lipase C14, valina arilamilase; ausência de esterase C8; pela degradação de caseína, DNA, esculina, gelatina e ausência de degradação de amido).

Em relação às estirpes G6M-30<sup>T</sup>/G6-54 face ao perfil de degradação enzimática foi possível diferenciá-las da estirpe *N. ramosa*<sup>T</sup> (pela degradação de gelatina e ausência de degradação de caseína, DNA e esculina); da estirpes *N. soli*<sup>T</sup> (pela degradação de gelatina e ausência de degradação de amido); e da estirpe *N. terrae*<sup>T</sup> (pela presença de citocromo oxidase, fosfatase alcalina e valina arilamilase e ausência de esterase C8; pela degradação de gelatina e ausência de degradação de amido).

Pela avaliação da capacidade de assimilação de fontes únicas de carbono, foi possível verificar que as estirpes F2-63<sup>T</sup>/F2-178 assimilam um menor número de fontes de carbono (apenas D-glucose,  $\alpha$ -cetoglutarato, fumarato e L-isoleucina) face às restantes estirpes. As estirpes F2-63<sup>T</sup>/F2-178, diferenciam-se de todas as outras, pela ausência de assimilação de glutamina, etanol e glicerol; enquanto que as estirpes G6M-30<sup>T</sup>/G6-54, diferenciam-se de F2-63<sup>T</sup>/F2-178,

*N. ramosa*<sup>T</sup> e *N. soli*<sup>T</sup> pela assimilação de acetato e pela ausência de assimilação de L-isoleucina.

Neste estudo foi avaliada pela primeira vez a capacidade de assimilação de alcanos para as espécies em estudo do género *Nevskia*. Os resultados indicaram que os novos isolados e as estirpes *N. ramosa*<sup>T</sup> e *N. soli*<sup>T</sup> apresentam capacidade de assimilação deste tipo de compostos. Todas as estirpes têm capacidade de assimilação de alcanos de C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>, verificando-se que as estirpes G6-54, *N. ramosa*<sup>T</sup> e *N. soli*<sup>T</sup> também conseguem assimilar octano. Estes resultados indicam que na família *Sinobacteriaceae*, para além das espécies do género *Hydrocarbophilphaga* e *Alkanibacter* (Lipski e Friedrich, 2008; Liu *et al.*, 2011; Palleroni *et al.*, 2004), o género *Nevskia* também apresenta espécies com capacidade de assimilação deste tipo de compostos. Este tipo de metabolismo comum entre as espécies destes dois géneros, reflecte possivelmente a sua proximidade filogenética, tal como indicado pela sua posição nos dendrogramas filogenéticos cujas distâncias evolutivas foram calculadas pelo método *neighbour-joining* e *maximum-likelihood*. Verifica-se ainda que o dendrograma filogenético segundo o método *maximum-likelihood*, agrupa a estirpe tipo de *H. effusa* no *cluster* formado pelos novos isolados e pelas espécies de *Nevskia*. Esta observação sugere uma hipótese interessante de que possivelmente as espécies do género *Hydrocarboniphaga* podem ser incluídas no género *Nevskia*. No entanto, para testar esta hipótese será necessário estudar a capacidade de assimilação de alcanos para a espécie *N. terrae*, de modo a provar se a capacidade de assimilação de alcanos é uma característica comum a todas as espécies do género. Será também necessário realizar alguns dos testes nas condições descritas no presente trabalho (ex. composição em ácidos gordos e lípidos polares, assimilações de fontes de carbono), para as estirpes tipo das espécies do género *Hydrocarboniphaga*, de modo a justificar se ao nível de outras características existe informação suficiente para justificar a sua inclusão no género *Nevskia*.

Em relação ao estudo da capacidade de produção de ácido a partir de alguns açúcares, polióis, ácidos orgânicos, aminoácidos e amidas, verificou-se que todas as estirpes apresentam baixa capacidade fermentativa. As estirpes F2-63<sup>T</sup>/F2-178 são as únicas com capacidade de produção de ácido a partir de D-ribose, enquanto que as estirpes de G6M-30<sup>T</sup>/G6-54 diferenciam-se das restantes por serem as únicas com capacidade de produção de ácido a partir de D-arabinose, D-lixose e D-fucose.

Nenhuma das estirpes analisadas apresenta capacidade de crescimento em anaerobiose, usando nitrato e sulfato como aceitador de electrões. Em relação, à capacidade de oxidação tiosulfato em sulfato, na presença de compostos orgânicos no meio, verificou-se que apenas a estirpe G6-54 apresenta essa capacidade, apesar de a oxidação de tiosulfato não se traduzir numa melhoria significativa do crescimento, e deste modo a estirpe não apresenta um metabolismo do tipo químiolitoheterotrófico.

As quinonas isoprenóides consistem num tipo de lípidos presentes nas membranas celulares e que desempenham um papel importante como transportadores de electrões. A identificação de lipoquinonas no processo de caracterização de bactérias está associado à identificação do tipo de quinona (menaquinona, ubiquinona ou derivados), no tamanho da cadeia lateral isoprenóide e no número de unidades isoprenóides saturadas. A vantagem da utilização do perfil de quinonas em taxonomia, está relacionada com o facto de geralmente existir um tipo quinona maioritária comum para a espécie ou género (Collins e Jones, 1981; Hess *et al.*, 1979). A análise da composição em quinonas, revelou que as estirpes F2-63<sup>T</sup>, F2-178, G6M-30<sup>T</sup> e G6-54 apresentam a ubiquinona 8, característica esta que é partilhada por todas as espécies do género *Nevskia*.

Os lípidos polares consistem em moléculas anfipáticas e constituem o principal componente das membranas. A análise do perfil em lípidos polares é uma ferramenta importante em taxonomia (Vandamme, 1996). A análise da composição em lípidos polares por cromatografia monodimensional em camada fina foi acompanhada pela análise de padrões para alguns lípidos polares comuns em bactérias (PE-fosfatidiletanolamina, PG-fosfatidilglicerol, DPG-difosfatidilglicerol, PC-fosfatidilcolina) (Busse *et al.*, 1996). Desta análise foi possível identificar a presença de PE e PG em todas as estirpes e a presença de DPG em todas as estirpes, excepto em *N. ramosa*<sup>T</sup>. A revelação com corante específico para grupos amina permitiu ainda identificar a presença de aminolípidos nas estirpes F2-63<sup>T</sup>/F2-178, *N. ramosa*<sup>T</sup> e *N. soli*<sup>T</sup>.

Uma vez que a cromatografia monodimensional não permite resolver lípidos com migração próxima, não é possível determinar por esta técnica o número total de lípidos. Assim, realizou-se uma cromatografia bidimensional, que permitiu uma melhor resolução do perfil em lípidos polares. Deste modo, analisando conjuntamente a informação obtida pelas duas cromatografias observou-se que as estirpes F2-63<sup>T</sup>/F2-178 apresentam entre si o mesmo perfil em lípidos polares, o qual é semelhante ao apresentado pela estirpe *N. soli*<sup>T</sup>. Este perfil consiste na presença de fosfatidiletanolamina (PE), difosfoglicerol (DPG), fosfoglicerol (PG) conjuntamente com mais três aminolípidos não identificados (AL1, AL2, AL3). A estirpe *N. ramosa*<sup>T</sup> também tem idêntica composição em lípidos polares, sendo no entanto possível distingui-la das restantes, pela presença de um aminolípido adicional (AL4). A análise de lípidos polares para as estirpes G6M-30<sup>T</sup>/G6-54 revelou que ambas têm a mesma composição lípida entre si, observando-se a presença de PE, DPG e PG. O perfil lípidico observado para estas estirpes permite diferencia-las das restantes, uma vez que não se detectou a presença de aminolípidos (AL1–4).

Os ácidos gordos são os principais constituintes dos lípidos e lipopolisacáridos. Diferenças ao nível da composição em ácidos gordos têm-se revelado um importante marcador quimiotaxonómico para distinguir entre os *taxa*, uma vez que estas moléculas apresentam elevada diversidade estrutural, por exemplo ao nível do comprimento da cadeia, posição das cadeias duplas e grupos de substituição. No entanto, de modo a garantir que diferenças observadas ao nível da composição em ácidos gordos consistem em diferenças reais entre os

organismos, é necessário estabelecer um conjunto controlado de condições de cultura das estirpes, uma vez que a composição em ácidos gordos depende da temperatura, do meio e tempo de incubação (Vandamme *et al.*, 1996). Por este motivo, dado as condições de cultivo de *N. terrae*<sup>T</sup> (Kim *et al.* 2011) terem sido ligeiramente diferentes das condições utilizadas neste estudo, apenas se comparou os novos isolados com esta estirpe, ao nível da composição em ácidos gordos maioritários.

As estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 apresentam como ácidos gordos maioritários, *Summed feature 8* (C<sub>18:1</sub>ω7c/18:1ω6c) (29,4 %) e C<sub>16:0</sub> (16,4 %). Estes ácidos gordos também se apresentam como maioritários nas estirpes *N. soli*<sup>T</sup> (21,6 e 16,2 %, respectivamente) e *N. terrae*<sup>T</sup> (40,6 % e 12,4 %, respectivamente). Estes novos isolados apresentam uma percentagem baixa em *Summed feature 3* (16:1ω7c/16:1ω6c) (1,7 %) o que permite distingui-los das estirpes G6M-30<sup>T</sup>/G6-54 e *N. ramosa*<sup>T</sup>, que apresentam este ácido gordo como maioritário (27 e 17,3 %, respectivamente). As estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 distinguem-se ainda da estirpe *N. ramosa*<sup>T</sup> pela ausência dos ácidos gordos minoritários C<sub>12:0</sub> 3-OH e C<sub>14:0</sub> 2-OH; po apresentarem o ácido gordo C<sub>19:0</sub> ciclo ω8c; e por ter uma maior percentagem nos ácidos gordos *Summed feature 2* (C<sub>16:1</sub> iso I; C<sub>14:0</sub> 3-OH), C<sub>16:0</sub> 3-OH e C<sub>18:1</sub> 2-OH. Em relação à estirpe *N. soli*<sup>T</sup> é possível distinguir os novos isolados com base na composição em ácidos gordos minoritários, como é o caso de uma maior percentagem em C<sub>18:1</sub> 2-OH e uma menor percentagem em C<sub>14:0</sub>, C<sub>16:0</sub> iso, C<sub>17:0</sub> ciclo e C<sub>19:0</sub> ciclo ω8c.

As estirpes G6M-30<sup>T</sup>/G6-54 apresentam como ácido gordo maioritário *Summed feature 8* (C<sub>18:1</sub>ω7c/18:1ω6c) (29,7 %), que tal como referido anteriormente é o ácido gordo maioritário de todas as espécies do género. Estes novos isolados também apresentam como maioritário o ácido gordo *Summed feature 3* (16:1ω7c/16:1ω6c) (27 %). O perfil de composição em ácidos gordos destas estirpes é semelhante ao de *N. ramosa*<sup>T</sup>, possivelmente devido à sua relação filogenética próxima. No entanto, é possível distinguir as estirpes com base em alguns ácidos gordos minoritários e pelo facto das estirpes G6M-30<sup>T</sup>/G6-54 apresentarem uma percentagem relativa em C<sub>12:0</sub> muito baixa (3,2 %), relativamente à apresentada por *N. ramosa*<sup>T</sup> (8,1 %). A composição de C<sub>12:0</sub> constitui também um aspecto importante na distinção entre estas estirpes e as estirpes F2-63<sup>T</sup>/F2-178, *N. soli*<sup>T</sup> e *N. terrae*<sup>T</sup>, uma vez que estas últimas apresentam uma maior percentagem relativa neste ácido gordo (6,9, 8,1 e 7,3 %, respectivamente). Também é possível distinguir os novos isolados em relação a *N. soli*<sup>T</sup> com base nas percentagens mais elevadas em C<sub>18:1</sub> 2-OH e C<sub>16:0</sub> iso; e percentagens mais baixas de *Summed feature 2* (C<sub>16:1</sub> iso I; C<sub>14:0</sub> 3-OH), *Summed feature 3* (C<sub>16:1</sub>ω7c/C<sub>16:1</sub>ω6c), C<sub>17:0</sub> ciclo e C<sub>19:0</sub> ciclo ω8c.

A análise da similitude ao nível da sequência do rRNA 16S têm um baixo poder de resolução ao nível da espécie, principalmente na distinção de espécies que divergiram recentemente. Existem casos na literatura de espécies cuja distinção é possível ao nível bioquímico e de homologia de DNA, mas que apresentam mais de >99,5 % de similaridade entre a sequência do gene rRNA 16S (Fox *et al.*, 1992; Janda e Abbott, 2007). Em relação às

estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54, ambas apresentam a sequência do gene rRNA 16S idêntica entre si, o que indicou constituírem a mesma espécie. Verificou-se no entanto que estas estirpes apresentam algumas diferenças entre si, nomeadamente ao nível da sua capacidade de assimilação de octano, oxidação de tiosulfato e presença de esterase (C4). No entanto, estas características não são suficientes para que se justifique tratarem-se de espécies diferentes, já que apresentam resultados idênticos para as condições de crescimento, morfologia celular e de colónias, ensaios enzimáticos, assimilação de fontes de carbono e produção de ácido. Além disso, estas estirpes apresentam também um conteúdo GC dentro do limite estabelecido para se considerar a mesma espécie (< 5 % de diferença), perfil de lípidos polares idêntico e percentagens relativas em ácidos gordos semelhantes. O perfil genómico pelas técnicas de RAPD e ERIC-PCR também se apresentam idênticos entre as duas estirpes.

Através da aplicação de uma abordagem polifásica para a caracterização dos novos isolados, verifica-se que as estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178 apresentam várias características distintivas das restantes espécies do género *Nevskia*, ao nível de fenótipo enzimático, assimilação de fontes de carbono, fermentação de fontes únicas de carbono, composição em ácidos gordos e ao nível da similaridade da sequência do gene rRNA 16S, o que nos levou a propor uma nova espécie para as estas estirpes, *Nevskia aquatilis*.

Por sua vez, as estirpes G6M-30<sup>T</sup> e G6-54, também apresentam várias características distintivas das restantes espécies do género *Nevskia* e das estirpes F2-63<sup>T</sup> e F2-178, ao nível de fenótipo enzimático, assimilação de fontes de carbono, fermentação de fontes únicas de carbono, perfil em lípidos polares, composição em ácidos gordos e a diferença na similaridade da sequência do gene rRNA 16S, o que nos levou a propor uma nova espécie para as estas estirpes, *Nevskia persephonica*.

#### **Descrição de *Nevskia aquatilis* sp. nov.**

*Nevskia aquatilis* (a.qua'ti.lis. L. fem. adj. *aquatilis*, aquática, viver, crescer, ou encontrada, em ou perto de água). *Nevskia aquatilis* forma células em bastonete, Gram negativas, sem mobilidade, com comprimento de 1–1,5 µm e largura de 0,5–1 µm, que se apresentam isoladas em pares ou agregados celulares e floculam em meio líquido. A estirpe F2-63<sup>T</sup> forma colónias amarelas com 1–1,5 mm de diâmetro em meio R2A. A temperatura óptima de crescimento situa-se nos 25–30 °C, sendo a temperatura mínima de crescimento 15 °C e a máxima 35 °C. O pH óptimo de crescimento situa-se a pH 6,0–6,5, ocorrendo crescimento a pH 5,5–7,5. A estirpe tipo não cresce em anaerobiose e não têm capacidade de oxidação de tiosulfato em condições aeróbias na presença de compostos orgânicos. Os ácidos gordos predominantes são os *Summed feature 8* (C<sub>18:1</sub>ω7c/C<sub>18:1</sub>ω6c) e C<sub>16:0</sub>. Apresenta como lípidos polares, fosfatidiletanolamina, difosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol e três aminolípidos (AL1, AL2, AL3). A uniuquinona 8 é a quinona isoprenóide maioritária. Detectou-se a presença das enzimas

citocromo oxidase, catalase, leucina arilamilase, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, fosfatase alcalina, esterase C4, lipase C14 e valina arilamilase. As estirpes apresentam capacidade de degradação de Tween 20, 40, 60 e 80; caseína, DNA, esculina e gelatina. A estirpe tipo assimila piruvato, succinato, D-glucose, alfa-cetoglutarato, fumarato, malato, L-isoleucina, e alcanos de C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>. Ocorre produção de ácido a partir de potássio-5-gluconato e D-ribose. A percentagem molar do conteúdo do DNA em guanina e citosina da estirpe F2-63<sup>T</sup> é de 66,8 %. A estirpe tipo F2-63<sup>T</sup> foi depositada na colecção de cultura LMG (Laboratorium voor Microbiologie, Universitet Gent, Gent, Bélgica), com o número de LMG 26345 e na colecção CECT (Colección Española De Cultivos Tipo, Paterna, Espanha), com o número CECT 7897.

#### **Descrição de *Nevskia persephonica* sp. nov.**

*Nevskia persephonica* (per.se.pho'ni.ca., L. n. *Persephone* -es, L. fem. suff. -ica, sufixo utilizado no sentido de pertencer a; N.L. fem. adj. *persephonica*, pertencer a Persephone, deusa Grega do Submundo, i.e. um aquífero profundo). *Nevskia persephonica* forma células em bastonete, Gram negativas, com um flagelo polar, com comprimento de 1,5–2 µm e largura de 0,5–1 µm, que se apresentam isoladas ou em pares. A estirpes G6M-30<sup>T</sup> formam colónias brancas com 1–2 mm de diâmetro em meio R2A. A temperatura óptima de crescimento situa-se nos 30 °C, sendo a temperatura mínima de crescimento 15 °C e a máxima 35 °C. O pH óptimo de crescimento situa-se a pH 6,0-6,5, ocorrendo crescimento a pH 5,5-7. A estirpe tipo não cresce em anaerobiose e não apresenta capacidade de oxidação de tiosulfato em sulfato. Os ácidos gordos predominantes são os *Summed feature 8* (C<sub>18:1</sub>ω7c/18:1ω6c) e *Summed feature 3* (C<sub>16:1</sub>ω7c/C<sub>16:1</sub>ω6c). Apresenta como lípidos polares, fosfatidiletanolamina, difosfatidilglicerol e fosfatidilglicerol. A ubiquinona 8 é a quinona isoprenóide maioritária. Detectou-se a presença das enzimas citocromo oxidase, catalase, leucina arilamilase, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, fosfatase alcalina e valina arilamilase. A estirpe tipo apresenta capacidade de degradação de Tween 20, 40, 60 e 80 e gelatina. As estirpe tipo consegue assimilar piruvato, succinato, D-glucose, acetato, DL-lactato, fumarato, malato, glutamina, etanol, glicerol e alcanos de C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>. A percentagem molar do conteúdo do DNA em guanina e citosina da estirpes G6M-30<sup>T</sup> é de 66,0 %. A estirpe tipo G6M-30<sup>T</sup> foi depositada na colecção de cultura DSMZ com o número de DSM 24897 e na colecção de cultura CECT, aguardando atribuição de número de acesso.

## ***CAPÍTULO 5***

### **Referências Bibliográficas**

- Allen, M.J., Edberg, S.C. e Reasoner, D.J. 2004. Heterotrophic plate count bacteria: what is their significance in drinking water? *International Journal of Food Microbiology* 92: 265-274.
- Baker, R.M., Singleton, F.L. e Hood, M.A. 1983. Effects of nutrient deprivation on *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 930-940.
- Bischofberger, T., Cha, S.K., Schmitt, R., Konig, B. e Schmidt-Lorenz, W. 1990. The bacterial flora of non-carbonated, natural mineral water from the springs to reservoir and glass and plastic bottles. *International Journal of Food Microbiology* 11: 51-71.
- Brenner, D.J., Staley, J.T. e Krieg, N.R. 2005. Classification of Prokaryotic Organisms and the Concept of Bacterial Speciation. *In* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley e G.M. Garrity eds), pp 27-32, Springer, New York.
- Busse, H.J., Denner, E.B. e Lubitz, W. 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology* 47: 3-38.
- Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K. e Lim, Y.-W. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2259-2261.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M. e Tiedje, J.M. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 37: D141-D145.
- Collins, M.D. e Jones, D. 1981. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiological Reviews* 45: 316-354.
- da Costa, M.S., Nobre, M.F. e Wait, R. 2006. Analysis of lipids from extremophilic bacteria. *In* *Methods in Microbiology* (F.A. Rainey e A. Oren eds), pp 127-159, Elsevier.
- Degryse, E., Glansdorff, N. e Pierard, A. 1978. A comparative analysis of extreme thermophilic bacteria belonging to the genus *Thermus*. *Archives of Microbiology* 117: 189-196.
- Doetsch, R.N. 1981. Determinative methods of light microscopy. *In* *Manual Methods for General Bacteriology* (P. Gerhardt, R.G.E. Murray, R.N.E.W. Costilow, W. Nester, A. Wood, N.R. Krieg e G.B. Philips eds), pp 21-33, American Society for Microbiology, Washington.
- Dorigo, U., Volatier, L. e Humbert, J.-F. 2005. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research* 39: 2207-2218.
- EC 1980. Council Directive of 15 July 1980 on the approximation of the laws of the Member States relating to the exploitation and marketing of natural mineral waters. *Official Journal of the European Communities*: N° L229/221-210.
- EC 1996. Directive 96/70/EC of the European Parliament and of the Council of 28 October 1996 amending Council Directive 80/777/EEC on the approximation of the laws of the

- Member States relating to the exploitation and marketing of natural mineral waters  
Official Journal of the European Communities: N° L229/226-228.
- EC 2003. Commission Directive 2003/40/EC of 16 May 2003 establishing the list, concentration limits and labelling requirements for the constituents of natural mineral waters and the conditions for using ozone-enriched air for the treatment of natural mineral waters and spring waters. Official Journal of the European Communities: N° L126/134-139.
- EC 2009. Directive 2009/54/EC of The European Parliament and of the Council of 18 June 2009 on the exploitation and marketing of natural mineral waters. Official Journal of the European Communities: N° L164/145-158.
- Fahrbach, M., Kuever, J., Remesch, M., Huber, B.E., Kampfer, P., Dott, W. e Hollender, J. 2008. *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 2215-2223.
- Famintzin, A. 1892. Eine neue Bakterienform: *Nevskia ramosa*. Bulletin of the Academy of Science St. Petersburg New Series 2 34: 481–468.
- Fitch, W.M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. Systematic Zoology 20: 406–416.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D. e Jurtshuk, P. 1992. How Close Is Close - 16s Ribosomal-RNA Sequence Identity May Not Be Sufficient to Guarantee Species Identity. International Journal of Systematic Bacteriology 42: 166-170.
- Gonzalez, C., Gutierrez, C. e Grande, T. 1987. Bacterial flora in bottled uncarbonated mineral drinking water. Canadian Journal of Microbiology 33: 1120-1125.
- Griebler, C. e Lueders, T. 2009. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. Freshwater Biology 54: 649-677.
- Grošelj, N., van der Veer, G., Tušar, M., Vračko, M. e Novič, M. 2010. Verification of the geological origin of bottled mineral water using artificial neural networks. Food Chemistry 118: 941-947.
- Guyard, S., Mary, P., Defives, C. e Hornez, J.P. 1999. Enumeration and characterization of bacteria in mineral water by improved direct viable count method. Journal of Applied Microbiology 86: 841-850.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
- Heimbrook, M.E., Wang, W.L. e Campbell, G. 1989. Staining bacterial flagella easily. Journal of Clinical Microbiology 27: 2612-2615.
- Hess, A., Holländer, R. e Mannheim, W. 1979. Lipoquinones of some Spore-forming Rods, Lactic-acid Bacteria and Actinomycetes. Journal of General Microbiology 115: 247-252.
- Janda, J.M. e Abbott, S.L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. Journal of Clinical Microbiology 45: 2761-2764.

- Jukes, T.H. e Cantor, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. *In* Mammalian Protein Metabolism (H.N. Munro ed, pp 21–132, Academic Press, New York).
- Kerstens, K., Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P. e Stackebrandt, E. 2006. Introduction to the Proteobacteria. *In* The Prokaryotes (M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer e E. Stackebrandt eds), pp 3-37, Springer, New York.
- Kim, S.J., Weon, H.Y., Kim, Y.S., Park, I.C., Son, J.A. e Kwon, S.W. 2011. *Nevskia terrae* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 1226-1229.
- Kuykendall, L.D., Roy, M.A., O'Neill, J.J. e Devine, T.E. 1988. Fatty Acids, Antibiotic Resistance, and Deoxyribonucleic Acid Homology Groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38: 358-361.
- Lapage, S.P., Sneath, P.H.A., Lessel, E.F., Skerman, V.B.D., Seeliger, H.P.R. e Clark, W.A. 1992. *International Code of Nomenclature of Bacteria* (1990 revision). American Society for Microbiology, Washington (DC).
- Leclerc, H. 2003. Relationships between common water bacteria and pathogens in drinking-water. *In* Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety: The Significance of HPCs for Water Quality and Human Health (J. Bartram, J. Cotruvo, M. Exner, C. Fricker e A. Glasmacher eds), pp 80-118, World Health Organization
- Leclerc, H. e da Costa, M.S. 2005. Microbiology of Natural Mineral Waters. *In* Technology of Bottled Water (D. Senior e N. Dege eds), pp 325-387, Blackwell Publishing Ltd., Bodmin.
- Lipski, A. e Friedrich, M.M. 2008. *Alkanibacter difficilis* gen. nov., sp nov and *Singularimonas variicoloris* gen. nov., sp nov., hexane-degrading bacteria isolated from a hexane-treated biofilter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2324-2329.
- Liu, Z.P., Liu, Y., Song, X.F., Jiang, J.T., Liu, Y.H., Xu, C.J. e Li, H. 2011. *Hydrocarboniphaga daqingensis* sp. nov., isolated from a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 408-411.
- LNEG 2010. geoPortal: Hidrolex. Léxico de Termos Hidrogeológicos. Version 8 Setembro 2011.  
[http://geoportal.lneg.pt/index.php?option=com\\_content&view=article&id=54&Itemid=4&lg=pt](http://geoportal.lneg.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=54&Itemid=4&lg=pt) in LNEG, <http://geoportal.lneg.pt/index.php>.
- Loy, A., Beisker, W. e Meier, H. 2005. Diversity of bacteria growing in natural mineral water after bottling. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3624-3632.
- Manaia, C.M., Nunes, O.C., Morais, P.V. e da Costa, M.S. 1990. Heterotrophic plate counts and the isolation of bacteria from mineral waters on selective and enrichment media. *The Journal of Applied Bacteriology* 69: 871-876.
- McAllister, S.M., Davis, R.E., McBeth, J.M., Tebo, B.M., Emerson, D. e Moyer, C.L. 2011. Biodiversity and Emerging Biogeography of the Neutrophilic Iron-Oxidizing Zetaproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 5445-5457.

- Mesbah, M., Premachandran, U. e Whitman, W.B. 1989. Precise Measurement of the G+C Content of Deoxyribonucleic Acid by High-Performance Liquid Chromatography. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 159-167.
- Nielsen, P., Fritze, D. e Priest, F.G. 1995. Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiology* 141: 1745-1761.
- Oren, A. 2008. Prokaryote Nomenclature. *In* Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
- Owen, R.J. 2004. Bacterial Taxonomics. *In* Genomics, Proteomics, and Clinical Bacteriology: Methods and Reviews (N. Woodford e A.P. Johnson eds), pp 353-383, Humana Press, New Jersey.
- Pace, N.R. 2009. Mapping the tree of life: progress and prospects. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73: 565-576.
- Palleroni, N.J., Port, A.M., Chang, H.K. e Zylstra, G.J. 2004. *Hydrocarboniphaga effusa* gen. nov., sp nov., a novel member of the *g-Proteobacteria* active in alkane and aromatic hydrocarbon degradation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1203-1207.
- Pfennig, N. 1978. *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. and sp. nov., a Ring-Shaped, Vitamin B12- Requiring Member of the Family *Rhodospirillaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 28: 283-288.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J. e Glöckner, F.O. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* 35: 7188-7196.
- Rainey, F.A., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R.M. e Stackebrandt, E. 1996. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 1088-1092.
- Reasoner, D.J. e Geldreich, E.E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 1-7.
- Ross, H.N.M., Grant, W.D. e Harris, J.E. 1985. Lipids in archaebacterial taxonomy. *In* Chemical Methods in Bacterial Systematics (M. Goodfellow e D.E. Minnikin eds), pp 289-299, Academic Press, New York.
- Rosselló-Móra, R. e Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 39-67.
- Saddler, G.S. e Bradbury, J.F. 2005. *Xanthomonadales* ord. nov. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria (D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity, D.R. Boone, P. Vos, M. Goodfellow, F.A. Rainey e K.-H. Schleifer eds), pp 63-122, Springer, New York.
- Saitou, N. e Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

- Schleifer, K.H. 2009. Classification of *Bacteria* and *Archaea*: past, present and future. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 533-542.
- Sharp, R.J. e Williams, R.A. 1988. Properties of *Thermus ruber* Strains Isolated from Icelandic Hot Springs and DNA:DNA Homology of *Thermus ruber* and *Thermus aquaticus*. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 2049-2053.
- Smibert, R.M. e Krieg, N.R. 1981. General Characterization. *In* Manual of Methods for General Bacteriology (P. Gerhardt, R.G.E. Murray, R.N.E.W. Costilow, W. Nester, A. Wood, N.R. Krieg e G.B. Philips eds), pp 407-450, American Society for Microbiology, Washington DC.
- Sneath, P.H.A. 2005. Numerical Taxonomy. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley e G.M. Garrity eds), pp 39-42, Springer, New York.
- Sörbo, B. 1987. Sulfate: Turbidimetric and nephelometric methods. *In* Methods in Enzymology (W. B., O. Jakoby e W. Griffith eds), pp 3-6, Academic Press.
- Stackebrandt, E. e Goebel, B.M. 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44: 846-849.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kampfer, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C. e Whitman, W.B. 2002. Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1043-1047.
- Stackebrandt, E. e Ebers, J. 2006. Taxonomic parameters revised: tarnished gold standards. *Microbiology Today* 5: 152-155.
- Stackebrandt, E. 2009. Phylogeny Based on 16S rRNA/DNA. *In* Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
- Staley, J.T. e Konopka, A. 1985. Measurement of *in situ* Activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. *Annual Review of Microbiology* 39: 321-346.
- Stürmeyer, H., Overmann, J., Babenzien, H.D. e Cypionka, H. 1998. Ecophysiological and phylogenetic studies of *Nevskia ramosa* in pure culture. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1890-1894.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. e Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tiago, I., Chung, A.P. e Verissimo, A. 2004. Bacterial diversity in a nonsaline alkaline environment: heterotrophic aerobic populations. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 7378-7387.

- Tindall, B.J. 1989. Fully saturated menaquinones in the archaebacterium *Pyrobaculum islandicum*. FEMS Microbiology Letters 60: 251-253.
- Tschech, A. e Pfennig, N. 1984. Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. Archives of Microbiology 137: 163-167.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. e Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiological Reviews 60: 407-438.
- Versalovic, J., Koeuth, T. e Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research 19: 6823-6831.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. e Truper, H.G. 1987. Report of the *Ad Hoc* Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. International Journal of Systematic Bacteriology 37: 463-464.
- Weon, H.Y., Kim, B.Y., Son, J.A., Song, M.H., Kwon, S.W., Go, S.J. e Stackebrandt, E. 2008. *Nevskia soli* sp. nov., isolated from soil cultivated with Korean ginseng. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 578-580.
- Westley, J. 1987. Thiocyanate and thiosulfate. In Methods in Enzymology (W. B., O. Jakoby e W. Griffith eds), pp 22-25, Academic Press.
- Wilhartitz, I., Mach, R.L., Teira, E., Reinthaler, T., Herndl, G.J. e Farnleitner, A.H. 2007. Prokaryotic community analysis with CARD-FISH in comparison with FISH in ultra-oligotrophic ground- and drinking water. Journal of Applied Microbiology 103: 871-881.
- Williams, R.A. e da Costa, M.S. 1992. The genus *Thermus* and related microorganisms. In The Prokaryotes (A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder e K.H. Schleifer eds), 2 ed., pp 3745-3753., Springer, New York.
- Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J. e Colwell, R.R. 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. Microbial Ecology 8: 313-323.
- Zhou, Y., Zhang, Y.Q., Zhi, X.Y., Wang, X., Dong, J., Chen, Y., Lai, R. e Li, W.J. 2008. Description of *Sinobacter flavus* gen. nov., sp. nov., and proposal of *Sinobacteraceae* fam. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 184-189.