PATRÍCIA LOCOSQUE RAMOS

TAXONOMIA DO GÊNERO *STENOTROPHOMONAS* ATRAVÉS DE *MULTI LOCUS SEQUENCE ANALYSIS* (MLSA).

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades
em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

São Paulo
2007

TAXONOMIA DO GÊNERO *STENOTROPHOMONAS* ATRAVÉS DE *MULTI LOCUS SEQUENCE ANALYSIS* (MLSA).

PATRÍCIA LOCOSQUE RAMOS

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades
em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Moreira-Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Fabiano Lopes Thompson

São Paulo
2007

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ramos, Patrícia Locosque.
Taxonomia do gênero *Stenotrophomonas* através de Multi Locus Sequence Analysis (MLSA) / Patrícia Locosque Ramos. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Carlos Alberto Moreira Filho.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia EP/IPT/ICB/Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Taxonomia Molecular.

Versão do título para o inglês: Taxonomy of *Stenotrophomonas* genus by means of Multi Locus Sequence Analysis (MLSA).

Descritores: 1. Taxonomia 2. MLSA 3. Genes Housekeeping 4. *Stenotrophomonas* 5. PCR 6. Árvore filogenética I. Moreira Filho, Carlos Alberto II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB161/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Patrícia Locosque Ramos.

Título da Tese: Taxonomia do gênero *Stenotrophomonas* através de Multi Locus Sequence Analysis (MLSA) .

Orientador(a): Carlos Alberto Moreira Filho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Dedico este trabalho aos meus pais José e Darci pelo apoio, incentivo e amor. Vocês são os melhores pais do mundo!!!

Dedico também ao meu marido Rafael, pela paciência, companheirismo, dedicação e por colocar minhas idéias em ordem. Você é muito especial e por isso te amo.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Moreira-Filho, pelas portas sempre abertas, pelo incentivo constante, pelas oportunidades e principalmente por sua amizade. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Fabiano Lopes Thompson, pelas valiosas discussões, pelas idéias e por seu perfeccionismo que muito me ensinou.

À amiga Beatriz Alves, pela ajuda diária, pela honra de sua amizade e por todos os cafés que nos mantém acordadas.

Aos amigos do laboratório de Genômica Funcional, Beatriz Corradine, Luiz André Barreta, Patrícia Lino, Rubia Rodrigues e Vinícius Cerezer.

Ao Dr. Jacyr Pasternak pela disponibilização de isolados clínicos de sua coleção.

À Dra. Heloiza Ramos Barbosa, por toda sua atenção.

À amiga Danielle Renzoni, pela amizade e pela ajuda sempre que solicitada.

Ao Dr. Thiago Trovati Maciel, pela prontidão e ajuda.

À amiga Luciane Chimetto, pela amizade e conversas intermináveis.

À amiga Cristiane Thompson, por sua gentileza e importantes discussões.

Aos colegas do laboratório de Pesquisa Experimental do Instituto de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEP).

Aos colegas do laboratório de Recursos Microbianos do CPQBA-UNICAMP, em especial as amigas Karen Simioni, Maria Fernanda e Milena Binatti, vocês fizeram tudo parecer um pouco menos difícil.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia de Microrganismos, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Carlos F.M Menck, pelos seqüenciamentos no ABI.

Aos funcionários do programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia pela competência e atenção, em especial Eliane Gouveia e Fábia.

Às minhas irmãs Sara e Fernanda, vocês são muito especiais e a vida continua cada vez melhor tendo vocês por perto.

À Elizabeth Algaba Navarro, por cuidar tão bem de pessoas que amo.

Aos meus sogros Joaquim e Dilá, pelas palavras de incentivo e carinho.

Aos meus amigos que mesmo a distância sempre farão parte da minha vida. Patrícia Pieri, Mauricio Nascimento, Gabriela Nogueira, Beatriz Botelho, Silvia Yumi, Ane Giovanaz e Cilene Giacometti.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão de bolsa de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho. Muito obrigada.

Resumo

As *Stenotrophomonas* são comumente encontradas no trato respiratório de pacientes com doenças pulmonares crônicas e também na rizosfera de plantas. Esse gênero apresenta resistência a diversos antibióticos, promove o crescimento de plantas e algumas espécies apresentam a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico.

O *Multi Locus Sequence Analysis* (MLSA) é uma metodologia baseada em genes constitutivos para definição e alocação taxonômica de novas espécies. O objetivo geral do presente trabalho foi caracterizar taxonomicamente uma coleção ampla de *Stenotrophomonas* composta por isolados endófitos, linhagens-tipo e de referência. Para tanto, foi estabelecido um sistema de classificação e identificação de *Stenotrophomonas* por meio de MLSA.

Foi possível através da metodologia de MLSA definir 9 novas espécies, detectar a presença de um novo gênero e estabelecer um sistema *online* de taxonomia para *Stenotrophomonas*.

Palavras-chave: *Stenotrophomonas*, MLSA, genes housekeeping, taxonomia, PCR, árvore filogenética

Abstract

The genus *Stenotrophomonas* is found in the respiratory treatment of patients with chronic pulmonary and also in the rizhosfera of plants. It presents resistance to several antibiotics, promotes the growth of plants and some species present the ability to fix atmospheric nitrogen.

The Multi Locus Sequence Analysis (MLSA) is a methodology based on constitutive genes for definition and taxonomic allocation of new species. The general objective of the present work was to characterize a wide collection constituted by *Stenotrophomonas* from isolated endophytic, type and reference strains. In such a way, a system of classification and identification of *Stenotrophomonas* by means of MLSA was established. It was possible through the MLSA methodology to define 9 new species, to detect the presence of a new genus and to establish an online system for *Stenotrophomonas* taxonomy.

Key-words: *Stenotrophomonas*, MLSA, housekeeping genes, taxonomy, PCR, phylogenetic tree.

LISTA DE FIGURAS

Pág

Figura 1: Classificação filogenética de *Stenotrophomonas* e grupos próximos..... 23

Figura 2: Relações filogenéticas entre isolados diversos de *Stenotrophomonas* sp., baseadas na análise filogenética de seqüências de 16S rDNA..... 24

Figura 3: Gêneros de bactérias encontrados em gramíneas de importância econômica..... 35

Figura 4: Estratégia adotada no presente estudo para esclarecimento da taxonomia do gênero *Stenotrophomonas*..... 40

Figura 5: Árvore filogenética gerada através de seqüências do gene *rpo*A baseada no método de máxima parcimônia, utilizando os vizinhos filogenéticos próximos de *Stenotrophomonas*..... 41

Figura 6: Amplificação dos fragmentos dos genes constitutivos para MLSA..... 54

Figura 7: Cromatograma extraído de seqüenciamento realizado em equipamento MEGABACE 1000..... 55

Figura 8: Árvore filogenética gerada a partir de seqüências do gene *atp*A construída pelo método de Neighbour-Joining utilizando distância p..... 59

Figura 9: Árvore filogenética gerada a partir de seqüências do gene *rec*A construída pelo método de Neighbour-Joining utilizando distância p..... 62

Figura 10: Árvore filogenética gerada a partir de seqüências do gene *rpo*A construída pelo método de Neighbour-Joining utilizando distância p..... 65

Figura 11: Árvore filogenética gerada a partir de seqüências do gene *uvrB* construída pelo método de Neighbour-Joining utilizando distância p..... 69

Figura 12: Árvore filogenética gerada a partir de seqüências de todos os genes concatenados construída pelo método de Neighbour-Joining utilizando distância p..... 72

Figura 13: Teste fenotípico API 20E com atividades diferentes para as duas amostras apresentadas..... 73

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1: *Primers* desenhados utilizando programa Kodon para estudo dos genes constitutivos (housekeeping)..... 42

Tabela 2: Resultados fenotípicos e microbiológicos dos grupos MLSA.... 79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*

FC – Fibrose Cística

HDD – Hibridização DNA-DNA

H_2S – ácido sulfídrico

LB - Luria Broth

MEGA – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

$MgCl_2$ – Cloreto de Magnésio

MLSA – *Multi Locus Sequence Analysis*

MLST – *Multi Locus Sequence Typing*

MP – Máxima Parcimônia

NaCl – Cloreto de Sódio

N_2 - nitrogênio

NJ – *Neighbour-Joining*

PCR – reação de polimerase em cadeia

pH – potência de hidrogênio

PHA - Polihidroxialcanoato

RAPD - *Randomly Amplified Polimorphic DNA*

REP - PCR - *Repetitive Extragenic Palindromic*

RFLP - *Restriction Fragment Lenght Polymorphism*

TSA – Tryptica Soy Agar

TSB – Tryptica Soy Broth

UV – ultra violeta

SUMÁRIO

Pág

1. Introdução..... 13
1.1 Ocorrência e importância do gênero *Stenotrophomonas*..... 15
1.1.1 Importância ambiental 15
1.1.2 Importância clínica..... 16
1.1.3 Aplicações biotecnológica..... 18
1.2 Classificação de *Stenotrophomonas*..... 20
1.2.1 Características morfológicas de *Stenotrophomonas*..... 24
1.2.2 Características bioquímicas, metabólicas e fisiológicas..... 25
1.3 Identificação e tipagem de *Stenotrophomonas*..... 27
1.3.1 Hibridização de DNA-DNA..... 27
1.3.2 *Restriction Fragment Lenght Polymorphism* (RFLP)..... 28
1.3.3 *Randomly Amplified Polimorphic DNA* (RAPD) 29
1.3.4 *Amplified Fragment Lenght Polymorphism* (AFLP) 29
1.3.5 *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) e *Multi Locus Sequence Analysis* (MLSA) 30
1.3.5.1 Seleção de genes para estudos de MLSA..... 31
1.3.6 PCR tempo real..... 33
1.3.7 Meios seletivos para detecção de *Stenotrophomonas*..... 34
1.4 Estratégia do presente estudo..... 34
2. Objetivos..... 36
3. Material e Métodos..... 38
3.1 Linhagens..... 39
3.2 Estratégia do estudo..... 39
3.3 Extração do DNA genômico..... 40
3.4 Escolha dos *primers* para estudo de MLSA..... 40
3.5 Amplificação dos fragmentos dos genes constitutivos..... 43
3.6 Amplificação e purificação dos fragmentos de 16S rDNA..... 43
3.7 Reação de sequenciamento dos genes constitutivos e 16S rDNA..... 44
3.8 Clonagem dos produtos de PCR..... 46
3.9 Análises filogenéticas..... 47
3.10 Análises fenotípicas..... 48
3.11 Testes de temperatura, pH, salinidade, motilidade, catalase, oxidase e Tween 80..... 48
3.12 Análise dos testes fenotípicos e microbiológicos..... 49
3.13 Análise de recombinação..... 50
4. Resultados e Discussão..... 51
4.1 Crescimento bacteriano..... 52
4.2 Padronização da metodologia de MLSA 52
4.3 Sequenciamento do produto dos genes amplificados..... 54
4.4 Análise filogenética..... 55
4.4.1 Análises de distâncias..... 56
4.4.2 Construção das árvores filogenéticas..... 56
4.5 Resultados de análise fenotípica..... 73
4.6 Análise de recombinação..... 81
4.7 Taxonomia *online* de *Stenotrophomonas*..... 81
5. Conclusões e Perspectivas..... 82
6. Referências Bibliográficas..... 85
7. Anexos..... 98

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A primeira descrição do gênero *Stenotrophomonas* foi feita por Hugh e Ryschenko (1961) que caracterizou a fisiologia de uma coleção de isolados de *S. (Pseudomonas) maltophilia*. O gênero *Stenotrophomonas* foi descrito por Palleroni e Bradbury (1993) a fim de acomodar linhagens patogênicas humanas de *Xanthomonas maltophilia.* Estes autores perceberam que *S. maltophilia* era menos versátil nutricionalmente do que outras espécies aeróbias de *Pseudomonas*. Por isto, foi proposto o nome *Stenotrophomonas* (Gr.adj. *stenus* estreito; Gr.n. *trophus* o que se alimenta; Gr.n. *monas* um, unidade, monad; *Stenotrophomonas* "um que se alimenta de poucos substratos").

Estudos recentes revelaram que *Stenotrophomonas* ocorre nos mais variados nichos, usualmente em associação com plantas, tais como gramíneas de importância econômica, incluindo o arroz, milho, trigo e cana-de-açúcar. Além disto, *Stenotrophomonas* se tornou um importante patógeno em infecções nosocomiais, sendo mais freqüente em infecções respiratórias. Um dos principais problemas com estes patógenos é que muitas linhagens apresentam resistência a uma ampla variedade de antibióticos comumente usados na medicina humana. Mais recentemente, ficou claro que determinadas linhagens de *Stenotrophomonas* têm um imenso potencial na biorremediação e biotecnologia. Porém, até hoje a taxonomia do gênero *Stenotrophomon as* não está bem resolvida, pois trata-se de um grupo com alta diversidade genética, sobre a qual relativamente poucos estudos taxonômicos têm sido feitos.

1.1. Ocorrência e importância do gênero *Stenotrophomonas*

1.1.1 Importância ambiental

Bactérias dos gêneros *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas, Ralstonia, Staphylococcus* e *Stenotrophomonas* são abundantes nas raízes e podem desempenhar um papel importante como simbiontes (BERG *et al*., 2002; BERG *et al*., 2005). As *Stenotrophomonas* são freqüentemente membros dominantes da comunidade microbiana da rizosfera de plantas. Diferentes linhagens de *Stenotrophomonas* têm sido empregadas na promoção de crescimento de plantas e no controle biológico de fitopatógenos, particularmente como antifúngicos (BERG, 1994; NAKAYAMA *et al*., 1999; BERG *et al.*, 2005). Além disto, alguns isolados de *Stenotrophomonas nitritireducens* têm a capacidade de fixar N_2 atmosférico (FINKMANN *et al.,* 2000).

Demonstrou-se que isolados de *S. maltophilia* funcionam como promotores do crescimento de plantas. Recentemente, foi detectada a presença de *Stenotrophomonas* endofíticas em orquídeas (TSAVKELOVA *et al*., 2007; WILKINSON *et al*., 1994). *Stenotrophomonas* colonizam a rizosfera de chicória, trigo (DEBETTE e BLONDEAUS, 1980; JUHNKE *et al*., 1987), beterraba (LAMBERT *et al*., 1990), girassol (FAGES e ARSAC, 1991), milho (LAMBERT *et al*., 1990) e arroz (IIZUKA e KOMAGATA, 1963).

1.1.2 Importância clínica

As *Stenotrophomonas* são comumente encontradas no trato respiratório de pacientes com doenças pulmonares crônicas (PATHMANATHAN e WATERER, 2005). Isolados ambientais e clínicos de *Stenotrophomonas* têm características genéticas distintas como já foi determinado por diferentes métodos de tipagem de DNA (BERG *et al.,* 1999). A espécie *S. maltophilia* tem sido alvo de uma série de estudos sobre a resistência a múltiplas drogas, já que este organismo está associado a vários casos de óbito devido a bacteremias, endocardites e infecções do trato respiratório, principalmente em pacientes gravemente debilitados, imunodeprimidos ou com fibrose cística (DENTON e KERR, 1998).

A utilização de antibióticos no tratamento de doenças infecciosas tem levado a uma importante mudança na estrutura de populações de bactérias patogênicas. Alguns antibióticos têm sido utilizados para modificar a resposta imune do hospedeiro. Essas infecções causadas por *Stenotrophomonas maltophilia* são frequentemente difíceis de tratar devido a multi-resistência a esses antibióticos comumente utilizados na clínica médica (AL-JASSER, 2006, ALONSO *et al*., 2004, VICKERS e SMIKLE, 2006).

A maioria dos isolados clínicos de *S. maltophilia* apresenta resistência múltipla a antibióticos comumente empregados, tais como cloranfenicol, kanamicina, tetraciclina e eritromicina (ARPI *et al*., 1996; BERG *et al.*, 1999; VAN DEN MOOTER e SWINGS 1990). Alguns isolados de *S. maltophilia* apresentam resistência a β-lactâmicos (SANSCHAGRIN e LEVESQUE., 2005). Os aminoglicosídeos e quinolonas não são eficazes no combate de *Stenotrophomonas* (ZHANG *et al*., 2000).

As bacteremias causadas por *Stenotrophomonas maltophilia* têm grande importância na mortalidade em crianças imunodeprimidas e de pacientes submetidos à terapia intensiva (WU *et al*., 2006). De acordo com Safdar *et al.* (2006), houve um aumento de 10 % (6% em 1998 para 16% em 2004) no número de casos relatados em pacientes nessas condições.

De acordo com Lambiase *et al.* (2006), foi observado um aumento de bactérias Gram negativas, incluindo *Stenotrophomonas*, em pacientes com fibrose cística (FC). Eles também observaram aumento de resistência a antibióticos. Beta-lactâmicos são raramente eficazes, com exceção de ceftazidima, o qual se mostra mais eficaz para as linhagens multi-resistentes.

As *Stenotrophomonas* estão associadas à alta taxa de mortalidade em pacientes com câncer e a infecção ocorre após a hospitalização (AISENBERG *et al*., 2007). Nas infecções por *Stenotrophomonas maltophilia* em pacientes com câncer, as contaminações ocorrem através de cateter venoso central ou devido a neutropenia prolongada (APISARNTHANARAK *et al*., 2003; AISENBERG *et al*., 2007).

De acordo com Aisenberg *et al.* (2007), as taxas de mortalidade por infecção associada em pacientes com câncer e neutropenia grave são maiores do que em pacientes sem fator de risco para infecção. Esses pacientes com câncer, submetidos à terapia tornam-se mais sensíveis à bactéria devido ao rompimento das barreiras de defesa da mucosa respiratória podendo, desta forma, facilitar a invasão da bactéria.

De acordo com Figueirêdo *et al.* (2006), isolados de *Stenotrophomonas maltophilia* apresentaram atividade hemolítica. Os sobrenadantes de cultura de *S. maltophilia* apresentam atividades hemolítica e enzimática, causando

endocitose e agregação de células HeLa e Vero. As linhagens de *S. maltophilia* podem causar sérias infecções sistêmicas, dificultando o tratamento (CHERIF *et al*., 2003).

De acordo com Mancini *et al*. (2005), é comum a co-infecção entre vírus influenza e *Stenotrophomonas maltophilia*. Neste caso, a tripsina é necessária na ativação da clivagem do vírus influenza A *in vitro*. As bactérias presentes no trato respiratório são fontes de proteases que podem contribuir na replicação do vírus influenza *in vivo*. A elastase, secretada pela *Stenotrophomonas maltophilia*, desenvolve papel decisivo na potencialização da infecção por esse vírus. Através da ação de proteases, há aumento da inflamação ou destruição dos inibidores celulares de proteases endógenas nos hospedeiros susceptíveis à influenza. Durante os últimos anos, o número de infecções humanas causadas por tais patógenos aumentou dramaticamente.

1.1.3. Aplicações biotecnológicas

As *Stenotrophomonas* também possuem a capacidade de produzir diversas substâncias bioativas, tais como hormônios promotores de crescimento de plantas, antibióticos (JAKOBI *et al.*, 1996) e sideróforos (BERG *et al.*, 1996).

Além disso, alguns isolados deste gênero são de interesse biotecnológico pela sua capacidade de utilizar fontes incomuns de carbono, tais como a cocaína (BRITT *et al.*, 1992), queratina (YAMAMURA *et al.*, 2002), explosivo RDX (BINKS *et al.*, 1995) e outros produtos químicos altamente tóxicos. De acordo com Dungan *et al*. (2003), as *Stenotrophomonas* são capazes de reduzir selenato (SeO_4^{2-}) e selenito (SeO_3^{2-}) para uma forma amorfa de selênio. O selênio é um metalóide que ocorre naturalmente e que exerce

efeitos benéficos nos sistemas biológicos, funcionando como um elemento traço (SHAMBERGER, 1983). A linhagem de *S.maltophilia* tem a capacidade de acumular trealose, enquanto *S. rhizophila* tem a característica de produzir adicionalmente a trealose glucosilglicerol (GG), mostrando diferenças em relação à tolerância de sais de acordo com a espécie. Em *S. rhizophila*, essa característica pode oferecer um alto potencial para a produção biotecnológica de GG (RODER *et al.,* 2005).

De acordo com Kim *et al.* (2002), *Stenotrophomonas* isoladas de solo são capazes de degradar poliidroxialcanoatos (PHA) de cadeia média. Em outro estudo, foi isolado *Stenotrophomonas* de ambiente marinho que apresentou a capacidade de degradar os PHAs de cadeia média (KIM *et al*., 2002).

Algumas linhagens de *S. maltophilia* são capazes de degradar componentes sulfônicos-aromáticos, o herbicida Dicamba (ácido 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic) (YANG *et al*., 1994; WANG *et al*., 1997), tolueno, xileno e benzoato. Linhagens de *S. maltophilia* também foram isoladas a partir de enriquecimentos com querosene e óleo cru e inoculadas em solo de petróleo no Japão. Estes isolados utilizaram os hidrocarbonetos como fonte de carbono e rapidamente perderam essa capacidade em condições laboratoriais (IIZUKA e KOMAGATA, 1964).

A caracterização taxonômica de *Stenotrophomonas* é um pré-requisito básico para a utilização destes microrganismos na biotecnologia e na recuperação de ambientes impactados por poluentes (BERG *et al.*, 1999).

Uma outra aplicação pode ser empregada na indústria farmacêutica, pois algumas linhagens de *S. maltophilia* produzem antibióticos lactâmicos

macrocíclicos: a alteramida A e maltophilina (JACOBI *et al*., 1996).

1.2. Classificação de *Stenotrophomonas*

O gênero *Stenotrophomonas* faz parte da família *Xanthomonadaceae*, juntamente com *Xanthomonas* e *Xylella* (Figura 1). De acordo com LaSala *et al.* (2007), os membros da família *Xanthomonadaceae* são tipicamente caracterizados como organismos ambientais, exceto *Stenotrophomonas maltophilia* que é um patógeno para seres humanos. O gênero *Stenotrophomonas* compreende 8 espécies formalmente descritas:

- *S. acidaminiphila* Assih *et al.* (2002);
- *S. maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni e Bradbury (1993);
- *S. nitritireducens* Finkmann *et al.* (2000);
- *S. rhizophila* Wolf *et al.* (2002);
- *S. koreensis* Yang *et al.* (2006);
- *S. dokdonensis* Yoon *et al.* (2006);
- *S. terrae* Heylen *et al.* (2007), e
- *S. humi* Heylen *et al.* (2007).

Vale notar que a maioria das espécies foi descrita nos últimos cinco anos. A espécie-tipo do gênero é *Stenotrophomonas maltophilia* (HUGH e RHYSCENKO, 1961; PALLERONI e BRADBURY 1993). É importante ressaltar que esta espécie compreende pelo menos 10 grupos genômicos delineados com base em resultados de hibridização de DNA-DNA e *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) descritos por Hauben *et al*. (1999), os quais não são claramente determinados.

Stenotrophomonas maltophilia (HUGH e RHYSCENKO, 1961; PALLERONI e BRADBURY, 1993) é a espécie mais bem estudada. Ela é comumente encontrada em ambientes hospitalares e descrita na literatura como patógeno humano oportunista, causadora de diversos tipos de infecção hospitalar (SWINGS, 1999). Hauben *et al.* (1999) verificaram uma alta diversidade em *Stenotrophomonas* provenientes de amostras ambientais e de material clínicos, verificando a existência de pelo menos 10 grupos filogenômicos distintos (Figura 2). Estes grupos apresentam similaridade DNA-DNA que justifica a alocação dos mesmos em novas espécies do gênero. Porém, um maior refinamento na taxonomia de *Stenotrophomonas* ainda não foi feito.

Stenotrophomonas nitritireducens (FINKMANN *et al.,* 2000) foi isolada inicialmente de sistemas de filtração de água (Figura 1). A espécie também é encontrada no solo e em associação com plantas. Essa espécie reduz nitrito a óxido nitroso (N_2O).

Stenotrophomonas rhizophila *(*WOLF *et al.,* 2002) foi isolada da rizosfera de plantas de canola e batata, e apresenta colonização endofítica. Isolados desta espécie apresentam atividade inibidora contra fungos filamentosos e leveduras (BERG *et al*., 1994) e são também empregados na biorremediação de solos contaminados, devido à sua capacidade de degradação de compostos xenobióticos (BINKS *et al*., 1995). Esta espécie apresenta atividade antifúngica contra *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum,* e *Candida albicans*.

Stenotrophomonas acidaminiphila (ASSIH *et al.,* 2002) foi isolada em um reator de biofermentação que era utilizado para análise de água de indústria petroquímica. Para essa espécie, os testes de catalase, oxidase, hidrólise de

esculina, Tween 80 e redução de nitrito e nitrato foram positivas. O ácido casamino é necessário para o crescimento dessa espécie. É suscetível aos antibióticos amikacina, ceftazidima, ciprofloxacina, colistina, gentamicina, netilmicina, oftoxacina, piperacilina, ticarcilina, trimetropime e tobramicina.

Stenotrophomonas koreensis (YANG *et al.*, 2006) foi isolada de um composto entre palha de arroz e esterco de vaca, na cidade de Daejeon (Coréia do Sul). Aparentemente, esta espécie não é capaz de degradar xileno, quitina e celulose, que são características de outras espécies de *Stenotrophomonas*.

Stenotrophomonas dokdonensis (YOON *et al.,* 2006), foi isolada de amostra de solo da ilha de Dokdo (Coréia do Sul), é sensível a polimixina B, cloranfenicol, cefalotina, carbenicilina e oleandomicina. O crescimento ideal ocorre em 3 dias a 30ºC, podendo crescer a temperaturas de 10 e 40ºC, mas incapaz de crescer em 4 ou 41ºC. O pH ideal de crescimento é de 6.0 a 7.0, podendo ocorrer crescimento de 5.5 a 8.5. Não ocorre crescimento em pH 5.0 ou 9.0. Apresenta catalase positiva, urease negativa, Tween 20, 40 e 60 são hidrolisados. H_2S e indol não são produzidos. Arginina diidrolase, lisina decarboxilase, ornitina decarboxilase e triptofano deaminase são ausentes.

Stenotrophomonas africana A linhagem MGB^T foi isolada em Ruanda de paciente com HIV (DRANCOURT *et al.*, 1997). Esta linhagem é resistente a vários antibióticos, incluindo ácido ticarcilina-clavulanico, cefoperazona e emipenem.

Stenotrophomonas terrae e ***Stenotrophomonas humi*** foram isoladas recentemente do solo em Gent, Bélgica, por Heylen *et al* (2007) e têm a capacidade de reduzir nitrato. As características que as diferenciam são: *S.*

terrae é positiva para leucina arilamidase, pretease, glicose e negativa para *N*-acetil-*β*-glucosamina e *S. humi* tem capacidade de assimilar malato.

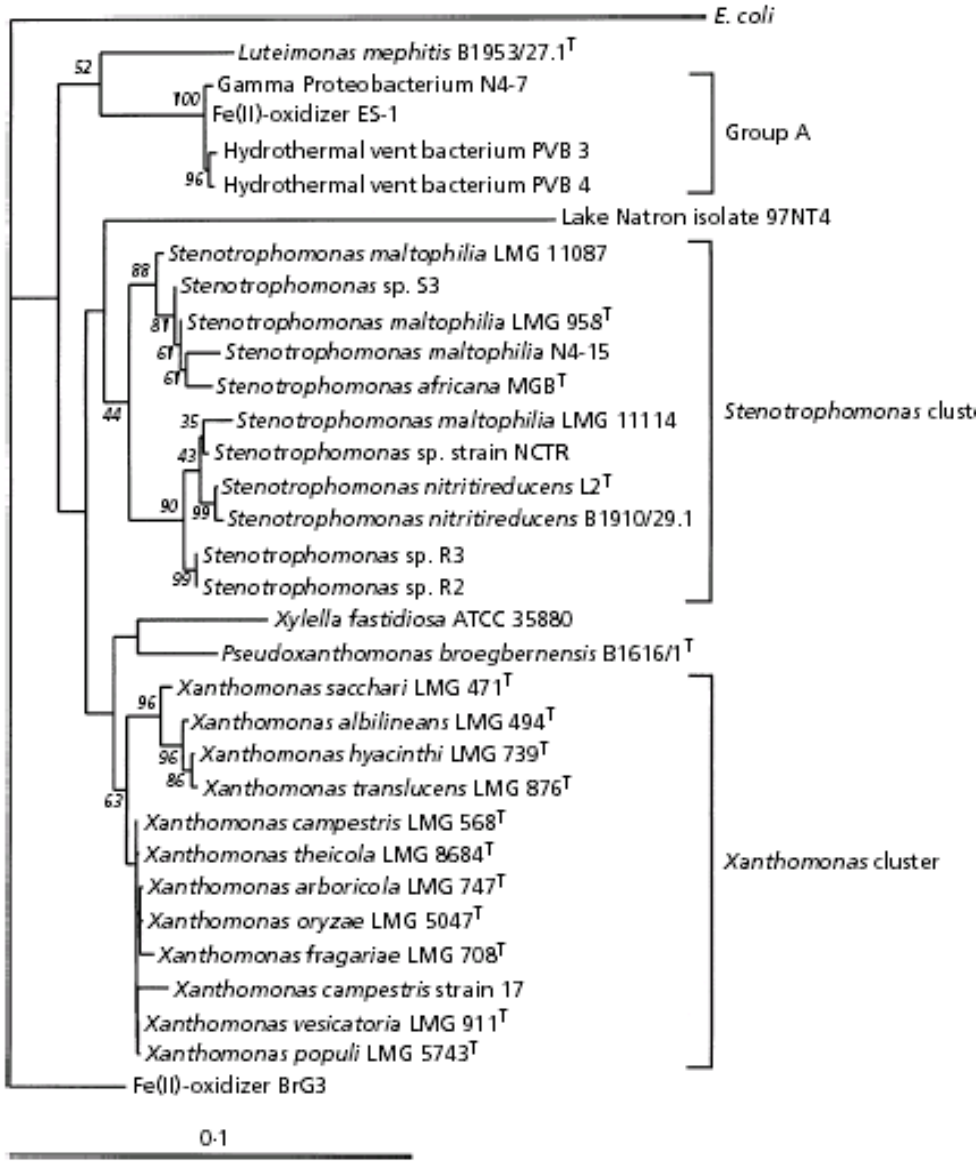

Figura 1. Classificação filogenética de *Stenotrophomonas* spp. e grupos próximos (Fonte: Finkmann *et al.,* 2000).

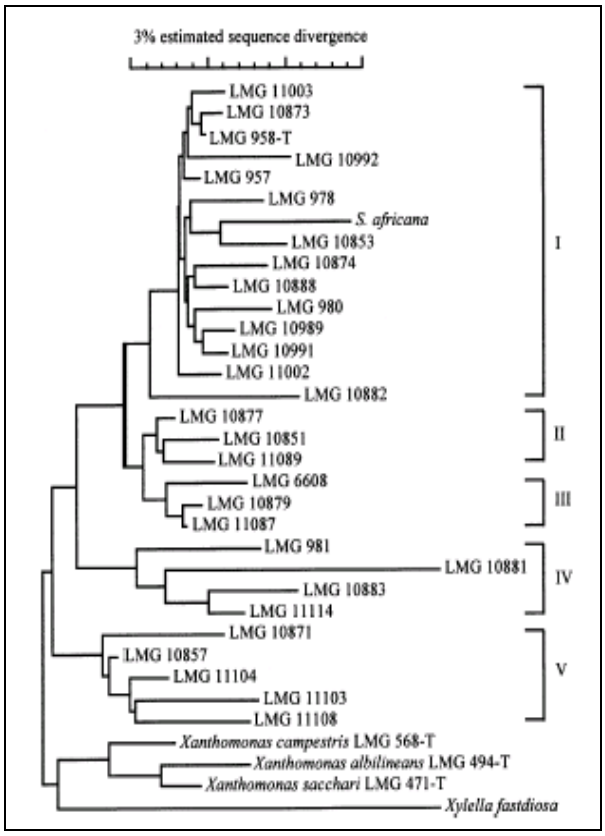

Figura 2. Relações filogenéticas entre isolados diversos de *Stenotrophomonas* sp., baseadas na análise filogenética de seqüências de rDNA 16S (Fonte: Hauben *et al.,* 1999). Nesta figura aparecem apenas cinco grupos filogenômicos.

1.2.1. Características morfológicas *Stenotrophomonas*

As colônias de *Stenotrophomonas* formadas em meio de cultura Triptic Soy Agar (TSA) são amarelas, esverdeadas ou cinzas. As colônias amarelas, são as mais comuns, não têm carotenóides ou xantomonadinas e podem se tornar marrom-escuras com o passar do tempo (Manual Bergey de Sistemática bacteriana, 2002). As células de *Stenotrophomonas* têm estrutura reta ou levemente curvada, de 0,5 x 1,5 µm, ocorrendo sozinhas ou aos pares. *Stenotrophomonas* não acumulam grânulos de poly-β-hidroxibutirato como material de reserva intracelular.

As *Stenotrophomonas* são bactérias flageladas, Gram-negativas, não esporuladas, estritamente aeróbias, e produzem fímbrias. As *Stenotrophomonas* apresentam um ou mais flagelos polares, enquanto as

Xanthomonas apresentam apenas um flagelo polar por célula. Uma flagelina de peso molecular de 33 kDa foi isolada por Montie e Stover (1983). A fimbria polar ocorre em *S. maltophilia* como em outras pseudomonadaceas (FUERST e HAYWARD, 1969). Esse elemento pode ser necessário para a célula hospedeira e outras superfícies sólidas, e também está envolvida na motilidade das *Stenotrophomonas* (HENRICHSEN, 1975).

1.2.2 - Características bioquímicas, metabólicas e fisiológicas

A espécie *S. maltophilia* é resistente ao tratamento com EDTA, enquanto linhagens do gênero *Pseudomonas*, vizinho filogenético próximo, são sensíveis ao mesmo tratamento (WILKINSON, 1973). Em relação à composição lipídica, as *S. maltophilia* são claramente diferentes dos outros gêneros de *Pseudomonadaceae* (MOSS, 1972, 1973). Isso está em concordância com as relações taxonômicas obtidas por hibridização rRNA-DNA (PALLERONI *et al*., 1973).

Tanto *Stenotrophomonas* como *Xanthomonas* apresentam um lipídio A constituído por glucosamina (HASE e RIETSCHEL, 1976), que possui alta similaridade na composição de lipopolissacarídeos (LPS). Um dado interessante para LPS de *Stenotrophomonas* é a presença de uma pentose derivada, identificada como 3-*O*-methil-L-xilose, que também é encontrada em espécies como *Rhosopseudomonas viridis* (WECKESSER *et al*., 1974).

Linhagens de *Stenotrophomonas* são capazes de produzir polissacarídeos extracelulares, crescendo entre 28ºC a 35ºC. *Stenotrophomonas* reduzem nitrato a nitrito (exceto *Stenotrophomonas koreensis*), produzem quinona Q8 e xantomonadina, além de metabolizarem

uma ampla gama de compostos de carbono. Estas bactérias são oxidase-negativas, positivas para gelatinase e catalase, têm atividade lipolítica forte, como analisada através de hidrólise por Tween 80.

As linhagens de *Stenotrophomonas* são oxidase negativas, o que está relacionado com uma falha de citocromo c (STEINER *et al*., 1996). As *S. maltophilia* usam lactose no crescimento, uma propriedade incomum em outras bactérias das famílias *Xanthomonadaceae* e *Pseudomonadaceae*. Algumas linhagens de *Stenotrophomonas* necessitam de adição de fatores de crescimento como metionina ou cistina mais glicina para o crescimento em meios de cultura definidos quimicamente (IIZUKA e KOMAGATA, 1964b; HUGH e GILARDI, 1980).

As *Stenotrophomonas* são capazes de reduzir nitrato, embora esse ânion não seja uma fonte de nitrogênio para o crescimento destes microrganismos (Manual Bergey de Sistemática bacteriana, 2002). Uma outra característica é um forte odor de amônia que surge depois do crescimento destes microrganismos em meio Agar sangue (HUGH e GILARDI, 1980). Essa característica não é observada para *S. africana* (DRANCOURT *et al*., 1997). De acordo com Hugh e Ryschenkow (1961); Stainer *et al.* (1996) e Drancourt *et al.* (1997), tanto *S. maltophilia* quanto *S. africana* utilizam alguns dissacarídeos como única fonte de carbono e energia (maltose, celobiose, e lactose). Estes substratos são raramente utilizados por outros membros da mesma família.

1.3. Identificação e tipagem de *Stenotrophomonas*

Os principais avanços no estudo da diversidade, taxonomia, e epidemiologia de *Stenotrophomonas* ocorreram com o advento das técnicas moleculares, tais como a hibridização de DNA-DNA, técnicas de tipagem (como por exemplo, o AFLP), e o seqüenciamento de DNA. Porém, é evidente que o número de estudos enfocando estas temáticas em *Stenotrophomonas* ainda é muito reduzido. Por exemplo, até o presente momento os 10 grupos filogenômicos delineados por Hauben *et al*. (1999) ainda não foram formalmente descritos como espécies novas.

1.3.1. Hibridização de DNA-DNA

A hibridização DNA-DNA (HDD) é baseada nas propriedades físico-químicas do DNA. Esta técnica foi fundamental para o estabelecimento dos fundamentos da taxonomia de diferentes grupos taxonômicos de procariontes e ainda é a técnica considerada *gold-standard*, sendo utilizada para a classificação e identificação de espécies (GEVERS *et al*., 2005; STACKEBRANDT *et al.*, 2002). A técnica de HDD é muito demorada, sendo desenvolvida apenas em poucos laboratórios de referência. As linhagens-tipo devem ser incluídas em cada novo experimento e são necessárias grandes quantidades de DNA com alta pureza e integridade. Hauben *et al.* (1999) definiram 10 grupos genômicos com base em uma série de experimentos de HDD. Estes grupos apresentam congruência com análises de AFLP. Aparentemente, não existem características fenotípicas diagnósticas para grupo genômico e por esta razão Hauben *et al*. (1999) não descreveram os diferentes grupos filogenômicos como diferentes espécies.

Matriz de similaridade entre linhagens tipo

linhagens	958T	22072T	22073T	22074T	22075T	DSMZ17805T	CIP108839T
958T	**100**		-	34-38	48-52	25	-
22072T	70	**100**	-	-	-	-	-
22073T	-	-	**100**	65.8	-	-	-
22074T	34-38	-	-	**100**	-	42	-
22075T	48-52	-	-	30	**100**	**25**	-
DSMZ17805T	25	-	40	42	25	**100**	-
CIP108839T	-	-	-	-	-	-	-

S.maltophilia (958^T); *S.africana* (22072^T); *S.acidaminiphila* (22073^T); *S.nitritireducens* (22074^T); *S.rhizophila* (22075^T); *S.koreensis* (DSMZ17805^T); *S.dokdonensis* (CIP108839^T).(-) teste não apresentado. Níveis de hibridização de DNA-DNA (%) entre as linhagens de *Stenotrophomonas*, obtidos a partir dos resultados de descrição de novas espécies (YANG *et al*. 2006).

1.3.2. *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)

A partir da década de 90, surgiram alternativas à hibridização de DNA. *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP*) é um dessas alternativas. A metodologia de RFLP consiste na digestão enzimática de fragmentos de genes amplificados por PCR com enzimas de restrição e análise do produto digerido por eletroforese em gel de agarose. Coenye *et al*. (2004) realizaram a análise por RFLP do gene *gyr*B para o gênero de *Stenotrophomonas* e obtiveram resultados compatíveis com os de hibridização DNA-DNA e AFLP (HAUBEN *et al*., 1999).

De acordo com Coenye *et al* (2004), a grande importância deste estudo foi a validação no uso de RFLP a partir do gene *gyr*B para distinguir os grupos genômicos de *S.maltophilia* isolados de pacientes com fibrose cística (FC). Os testes realizados por ele foram concordantes com os dados encontrados por Hauben *et al* (1999), exceto pelas linhagens LMG 10882 e LMG 10883, onde Hauben *et al* (1999) observaram valores de hibridização DNA-DNA (HDD) de 6%, enquanto Coenye *et al* (2004) encontraram valores de similaridade de 83% em HDD.

1.3.3. *Randomly Amplified Polimorphic DNA* (RAPD)

A metodologia *Randomly Amplified Polimorphic DNA* foi utilizada por Yao *et al* (1995) em isolados de *Stenotrophomonas maltophilia* na discriminação e diferenciação em investigações epidemiológicas e erupções nosocomiais. Esses autores concluíram que o RAPD por gerar fragmentos menores e, quando comparado com *Pulsed Field Gel Eletrophoresis* (PFGE) pode resultar em dados mais coesos, sendo mais discriminatórios para estudos epidemiológicos. Essa metodologia revelou-se rápida e menos trabalhosa na tipagem molecular quando comparada à técnica de PFGE. Há uma boa correlação entre as duas metodologias embora RAPD apresente um perfil mais variado de bandas, com alta reprodutibilidade entre laboratórios na diferenciação de isolados clínicos.

A técnica de RAPD foi usada por Krzewinski *et al* (2001) para diferenciar isolados originais de *Stenotrophomonas maltophilia* em pacientes com fibrose cística (FC). Ribbeck-Busch *et al.* (2005) utilizaram RFLP do 16S rDNA para discriminar linhagens clínicas e ambientais de *Stenotrophomonas*. A metodologia foi adequada na detecção das bactérias, mas não foi eficiente para diferenciar linhagens patogênicas das não-patogênicas.

1.3.4. *Amplified Fragment Lenght Polimorphism* (AFLP)

Técnicas baseadas em PCR como *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e *Repetitive Extragenic Palindromic* (REP - PCR) foram utilizadas para verificar a correlação entre linhagens de *Xanthomonas* por Rademaker *et al* (2000). Essas técnicas de *fingerprinting* complementaram um estudo preliminar de homologia DNA-DNA. Usando essas técnicas, verificou-se

uma alta correlação com os resultados de DNA-DNA. Isso sugere que as técnicas de *fingerprinting* permitem relacionar organismos tanto pelo aspecto genético quanto filogenético. Essas metodologias são rápidas e possuem alta precisão na determinação da diversidade taxonômica e estrutura filogenética em populações bacterianas.

O AFLP é uma das ferramentas taxonômicas mais robustas. A técnica envolve a digestão de DNA com duas enzimas de restrição, ligações dos fragmentos digeridos a adaptadores e utilização destes fragmentos ligados como *templates* de PCR. Os adaptadores complementam as seqüências do sítio de restrição e servem como sítios de ancoragem para os *primers* durante o PCR. Esta técnica delimita espécies claramente (RADEMAKER *et al*., 2000). Linhagens com mais de 60 % de similaridade entre seus perfis de AFLP pertencem à mesma espécie. A principal limitação desta técnica é a dificuldade de disponibilizar os perfis de AFLP em bancos de dados de acesso público devido à baixa reprodutibilidade entre laboratórios.

1.3.5. Multilocus sequence typing (MLST) e Multilocus sequence analysis (MLSA)

O *Multilocus Sequence Typing* (MLST) foi descrito por Maiden *et al* (1998) e baseia-se no seqüenciamento e análise de fragmentos de 3 a 7 genes constitutivos (*housekeeping*) O MLST foi desenvolvido para tipagem de espécies de patógenos e estudos epidemiológicos. É utilizado para agrupar linhagens relacionadas em complexos clonais (isto é, linhagens com seqüências gênicas idênticas em pelo menos 5 de 7 genes).

Foi desenvolvido recentemente um sistema de MLST para *Xylella*

fastidiosa com base em 25 linhagens (SCALLY *et al*., 2005). Os dados gerados por MLST têm também sido usados para estimar a contribuição relativa de mutação e recombinação na evolução dos complexos clonais (FEIL *et al*., 1999; 2000, 2003; FEIL e SPRATT, 2001; SARKAR e GUTMAN, 2004).

O MLSA, por sua vez, foi desenvolvido para analisar gêneros e famílias de procariontes. O principal objetivo da técnica é a identificação de espécies. Alguns pesquisadores sugerem que a definição de espécie seja baseada em seqüências gênicas obtidas a partir do MLSA (GEVERS *et al*., 2005). A partir de 2005, vários trabalhos demonstraram a grande utilidade de MLSA para estudos envolvendo grupos taxonômicos heterogêneos com um alto número de espécies (NASER *et al*., 2005; THOMPSON *et al*., 2005). Porém, é importante notar que todos os esquemas de MLSA desenvolvidos até o presente foram realizados em grupos taxonômicos onde havia vários genomas completos.

1.3.5.1. Seleção de genes para estudos de MLSA

Os genes selecionados devem ser cópias únicas no genoma, moderadamente conservados, essenciais para o metabolismo bacteriano e ter correlação com a similaridade de genomas calculada *in silico* (ZEIGLER, 2003). Genes que evoluem lentamente são ideais para estudos taxonômicos. Dados de MLSA obtidos com o estudo desses genes possibilitam um melhor entendimento sobre a biodiversidade, evolução, e epidemiologia de procariontes em nível de gênero, família e ordem (COHAN, 2002; FEIL e SPRATT, 2001; FEIL *et al*., 2003; MAIDEN *et al.*, 1998; THOMPSON *et al*., 2004).

Os genes *atpA*, *rec*A, *rpo*A, e *uvr*B são excelentes exemplos de genes

selecionáveis para MSLA (ZEIGLER, 2003). O gene *atp*A codifica a subunidade α da proteína ATP sintase, tendo sido utilizado como ferramenta na identificação microbiana (ZEIGLER, 2003; SANTOS e OCHMAN, 2004). De acordo com Ventura *et al.* (2004), o operon *atp* é altamente conservado e desta forma considerado um marcador molecular alternativo como o gene 16S rDNA. Os genes atp estão incluídos na categoria de genes constitutivos. De fato, a presença desses genes no genoma bacteriano é considerada essencial para a sobrevivência dos microrganismos.

O gene *uvr*B codifica a subunidade β de uma enzima que corta e remove o segmento de uma fita de DNA que apresenta alteração, estando relacionado com os reparos por excisão e sendo expressos rapidamente quando ocorre lesões do DNA. No reparo por excisão, as enzimas codificadas pelo gene atuam juntas para reconhecer as bases "erradas" e iniciam o processo de excisão (TRUGLIO *et al*., 2004). De acordo com Crowley *et al* (2006), no caso de exposição a componentes ultra-violeta (UV) provenientes da luz solar que causam danos, o complexo uvr tem como função o reconhecimento e remoção dos DNAs danificados.

O gene *rec*A está relacionado com atividades de recombinação e é diretamente ligado a resposta SOS. Essa resposta ocorre, por exemplo, quando bactérias são expostas a luz ultra-violeta (UV). A proteína RecA atua na remoção dos dímeros de pirimidinas induzidos pela radiação.

O gene *rpo*A codifica a subunidade alfa da RNA polimerase, enzima responsável pela transcrição gênica. A RNA polimerase participa da iniciação e liga-se a seqüências reguladoras. As RNAs polimerases são enzimas geralmente formadas por muitas cadeias polipeptídicas e que catalisam toda

transcrição do DNA. Em procariotos, existe um tipo de RNA polimerase, enquanto que nos eucariotos existem três. Essas enzimas são capazes de catalisar a ligação entre a extremidade 3´OH de um nucleotídeo com a extremidade 5´fosfato do nucleotídeo seguinte, realizando a catálise no sentido de 5´ para 3´utilizando como molde uma das fitas de DNA.

1.3.6. PCR tempo-real

Wellinghausen *et al.* (2004), desenvolveram um teste de PCR em tempo real, com o objetivo de uma rápida detecção das bactérias mais comuns e clinicamente relevantes encontradas em culturas de sangue, o que inclui as *Stenotrophomonas*. Essas análises foram baseadas em algorítimos confrontando com dados de microscopia de cultura de sangue. Este estudo propiciou a produção de *primers* capazes de identificar rapidamente vários gêneros bacterianos envolvidos em bacteremias e septicemia, incluindo *Stenotrophomonas*.

A metodologia de PCR em tempo real também foi empregada no estudo de resistência a várias drogas. Assim, foi possível validar e quantificar a expressão do gene *Sme,* relacionado ao sistema de efluxo encontrado em *Stenotrophomonas,* e, desta forma, detectar a alta expressão deste gene em parte dos isolados estudados, característica de resistência a várias drogas (CHANG *et al*., 2004).

1.3.7. Meios seletivos para detecção de *Stenotrophomonas*

A detecção presuntiva de *Stenotrophomonas* pode ser realizada através de meios de cultura simples, de forma rápida, funcionando como testes diagnósticos para *Burkholderia* e *Stenotrophomonas* (VANLAERE *et al.*, 2006). Porém, estes métodos devem ser usados com cautela. De acordo com Kerr *et al*. (1996), foi determinado um meio seletivo para *Stenotrophomonas* chamado VIA agar, contendo vancomicina, imipenem e anfotericina B como agente seletivo e adicionado manitol/azul de bromotimol. Comparado com o meio seletivo para *Xanthomonas* (XMSM), VIA agar é menos inibitório para *Stenotrophomonas* e mais seletivo do que XMSM em relação ao crescimento. Denton *et al.* (1998) selecionaram isolados de *Stenotrophomonas* através de meios seletivos de cultura, entre eles o VIA agar (KERR *et al*., 1996), MacConkey agar e agar sangue. O meio de cultura Via agar foi menos inibitório para *S. maltophila* e mais seletivo do que o meio XMSM. Neste estudo, o meio de cultura Via agar foi utilizado para determinar no trato gastrointestinal a presença de *Stenotrophomonas* em pacientes com fibrose cística. A confirmação na diferenciação de *S.maltophilia* foi facilmente determinada por esse meio de cultura devido à fermentação de manitol.

1.4. Estratégia do presente estudo

O presente estudo originou-se a partir dos resultados provenientes da dissertação de mestrado "*Caracterização Molecular de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Associadas a Gramíneas de Importância Econômica"* (Ramos, 2003). Neste trabalho, ficou evidente, a partir das análises de seqüências de 16S rDNA, que o grupo das *Stenotrophomonas* é dominante na microbiota de

endófitos. Possivelmente, estas bactérias têm um papel importante na fixação biológica do nitrogênio (N_2) em gramíneas de relevância econômica, tais como arroz, milho, trigo e cana-de-açúcar. A opção pelo estudo de *Stenotrophomonas* deveu-se ao fato de que esse gênero está presente em muitas espécies de plantas economicamente importantes e sua taxonomia era pouco explorada (Figura 3).

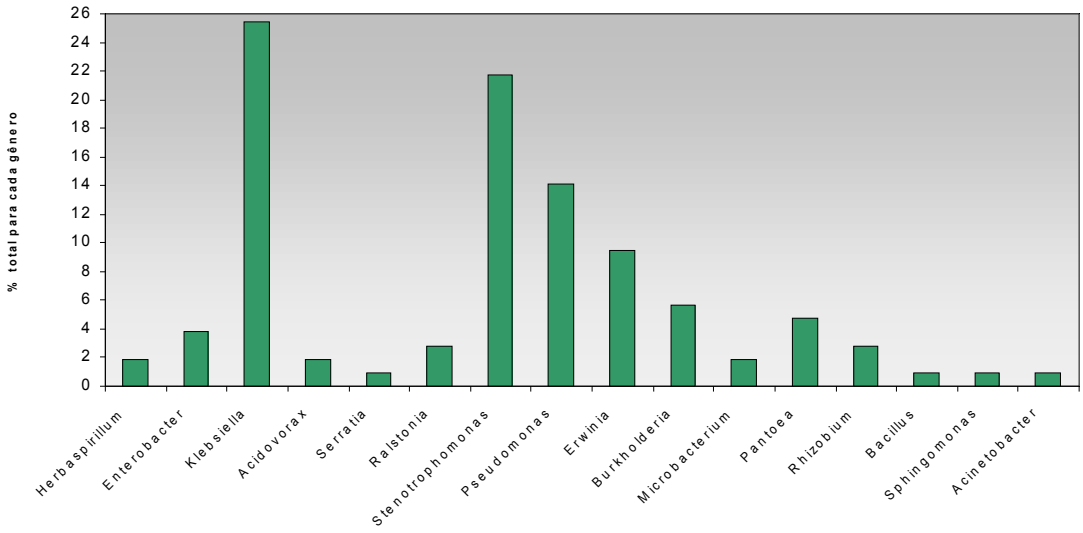

Figura 3. Gêneros de bactérias encontrados em gramíneas de importância econômica numa análise de 106 isolados bacterianos de diferentes gramíneas (Ramos, 2003).

OBJETIVOS

2. Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho foi caracterizar taxonomicamente uma coleção ampla de *Stenotrophomonas* composta por isolados endófitos e linhagens-tipo e de referência. Para tanto, foi estabelecido um sistema de classificação e identificação de *Stenotrophomonas* por meio de MLSA.

Objetivos específicos:

1) Estabelecer e padronizar a metodologia de MLSA para o gênero *Stenotrophomonas*;

2) Caracterizar o gênero *Stenotrophomonas*, compreendendo linhagens-tipo e de referência, bem como isolados endofíticos por meio de seqüências dos genes *atp*A, *rec*A, *rpo*A e *uvr*B.

3) Estabelecer um banco de referencia para a classificação e identificação de *Stenotrophomonas* com base nas seqüências gênicas,

4) Descrever as espécies novas de *Stenotrophomonas* por meio da taxonomia polifásica.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1 Linhagens

Foram analisadas sete linhagens-tipo *(Type Strain),* das quais 5 são provenientes da coleção de cultura BCCM/LMG (*Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms/ Laboratorium voor Microbiologie of Universiteit Gent* - Ghent, Bélgica), 30 linhagens de referência também pertencentes à coleção de cultura belga, uma linhagem proveniente da coleção de cultura alemã DSMZ *(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*) e outra da coleção francesa do Instituto Pasteur. Outros 12 isolados ambientais foram obtidos de arroz, trigo e cana-de-açúcar (Ramos, 2003).

3.2 Estratégia do estudo

Primeiramente, foi constituída uma coleção de linhagens (N=49) representativa da diversidade de *Stenotrophomonas*. Estas linhagens foram autenticadas por meio de seqüências do 16S rDNA. Em seguida, foram desenhados *primers* degenerados para os genes *atp*A*, rec*A*, rpo*A, e *uvr*B a partir do genoma de bactérias da família *Pseudomonadaceae* e famílias vizinhas. Uma coleção de *primers* foi testada a fim de se obter um par que amplificasse todas as linhagens da coleção. A partir destes *primers*, foram obtidas seqüências de DNA utilizadas para a construção de árvores filogenéticas. Os grupos obtidos a partir das análises filogenéticas foram caracterizados fenotipicamente a fim de se determinar se os mesmos representariam espécies novas. Foram delineadas 9 espécies novas. As etapas adotadas no presente estudo são descritas na figura 4.

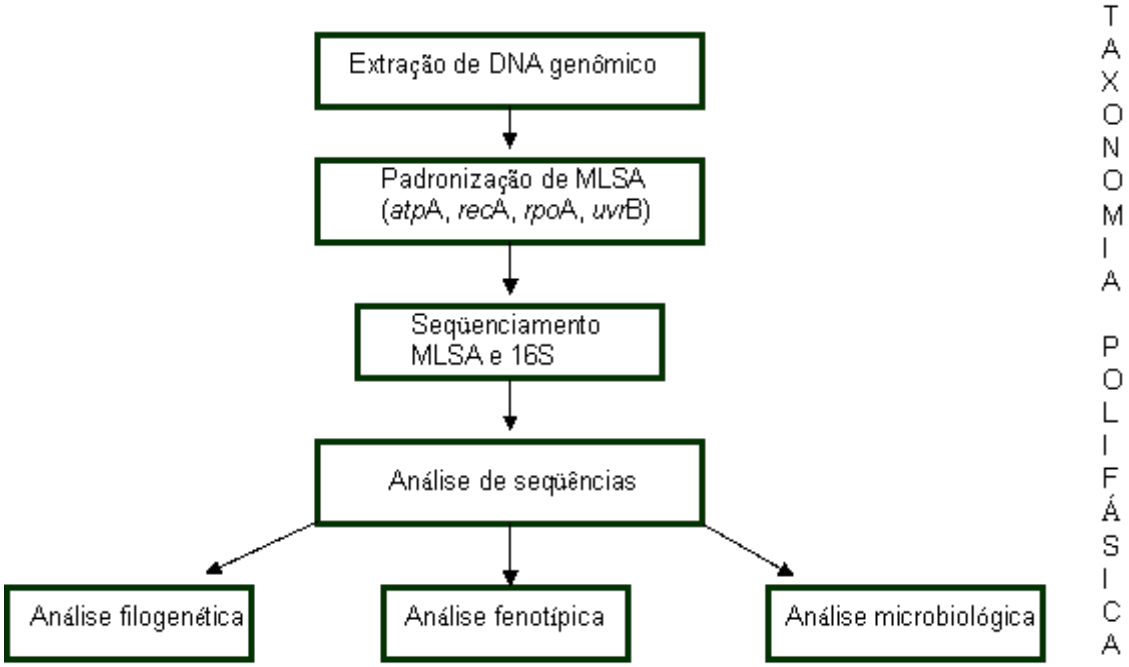

Figura 4: Estratégia adotada no presente estudo para esclarecimento da taxonomia do gênero *Stenotrophomonas*.

3.3 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído utilizando o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (catálogo número # A1120, Promega), seguindo as instruções do fabricante. Esse kit se baseia na extração de DNA por guanidina e sarcosina. A qualidade e a concentração do DNA foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio e visualizadas em luz UV.

3.4 Escolha dos *primers* para estudos de Multi Locus Sequence Analysis (MLSA)

Os *primers* para MLSA são específicos para amplificação dos genes *rec*A, *rpo*A, *atp*A e *uvr*B. Estes *primers* foram desenhados a partir de

seqüências do genoma de bactérias próximas ao gênero *Stenotrophomonas*, já que não há genomas de *S. maltophilia* disponíveis até o presente momento. Os vizinhos filogenéticos próximos (Figura 5) utilizados foram *Xanthomonas axonopodis* pv_306, *Xanthomonas campestris* pv_atcc33913, *Xylella fastidiosa* 9a5c, *Xylella fastidiosa* temecula1, *Pseudomonas aeruginosa* pao1, *Pseudomonas putida* kt2440, *Pseudomonas syringae* pv_dc3000, *Mesorhizobium loti* maff303099, *Sinorhizobium meliloti* 1021, *Brucella melitensis* 16m, *Brucella suis* 1330, *Ralstonia solanacearum* gmi1000, *Agrobacterium tumefaciens* str_c58_cereon, and *Agrobacterium tumefaciens* str_c58.

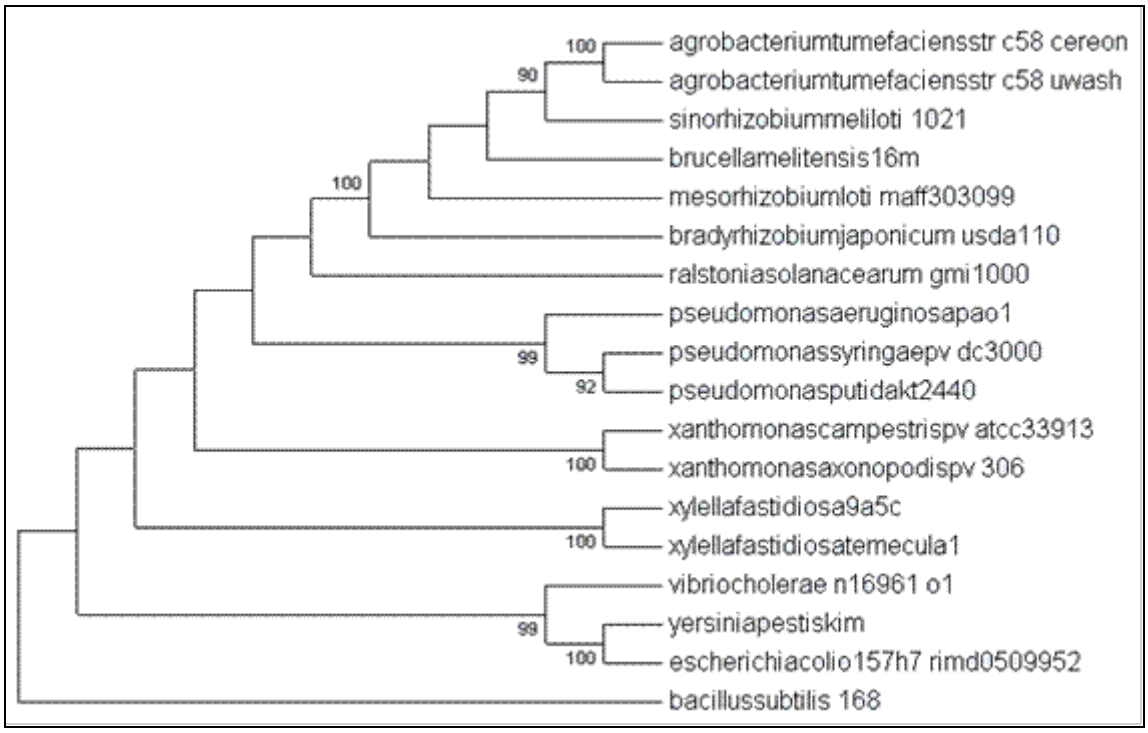

Figura 5. Árvore filogenética gerada através de seqüências do gene *rpo*A baseada no método de Máxima Parcimônia, utilizando os vizinhos filogenéticos próximos de *Stenotrophomonas*.

Devido a este fato, a etapa de padronização foi muito demorada, a cada momento surgiam bandas inespecíficas, já que os *primers* haviam sido desenhados para outros organismos, o que dificultou bastante esta etapa.

A escolha dos *primers* (tabela 1) iniciou-se pela etapa de amplificação dos genes através de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para os isolados de *Stenotrophomonas*. Dentre estes isolados, estão as linhagens tipo 1) *Stenotrophomonas maltophilia* LMG 958^T; 2) *Stenotrophomonas africana* LMG 22072^T; 3) *Stenotrophomonas acidaminiphila* LMG 22073^T; 4) *Stenotrophomonas nitritireducens* LMG 22074^T e 5) *Stenotrophomonas rhizophila* LMG 22075^T.

Tabela 1: *Primers* desenhados utilizando o programa Kodon para estudo dos genes constitutivos (*housekeeping)*

Nome	Seqüência	Posição	% GC
01*atp*A	CTSAAYCCYTCCGARATHAG	13	49,2
*atp*A-F-1	CGCATCCTKGAAGTKCCG	283	61,1
02 *atp*A	GGYGCVGTKRTVCTGGG	220	69,6
*atp*A-F-2	GCATCCTKGAAGTKCCGGT	284	57,8
03F *atp*A	**CGCATCCTBGARGTKCCG**	**283**	**64,8**
*atp*A-F-3	GATGCGATGATCCCKATCG	466	55,2
04 *atp*A F	CCRGGCGACGTRTTCTA	865	58,8
05 *atp*A R	TAGAAYACGTCGCCYGG	865	58,8
06 *atp*A F	CGYYTGCTSGAGCGYGC	892	73,5
07R *atp*A	**GCRCGCTCSAGCARRCG**	**892**	**73,5**
08 *atp*A R	CGTCRCCRGCYTGBGTYTC	997	66,7
09 *atp*A R	GCTTSAKCAGYTCRGTVACRCG	1282	57,6
*rec*A01 F	GGBRTHGGYGGYYTGCC	346	70,6
*rec*A02 F	TTCRTBGAYGCBGARCA	466	52,0
*rec*A03 R	TRCGRCGRATRTCSARRCG	862	57,9
*rec*A04 R	TTSAGNGCRTTRCCVCC	829	59,8
***rec*A05 F**	**GGYGAGATGGGMGAYCAG**	**466**	**63,9**
*rec*A06 F	GCBCGHTTGATGAGCCAGGC	499	65,0
***rec*A07 R**	**TTKCCYTGSCCGATSCGCTC**	**889**	**65,0**
*rec*A08 R	CCARCTTGGCYTCCACGC	836	66,7
*rpo*A01F	TCGAWGGBBTDCAGGAAGA	215	50,9
***rpo*A-F-1**	**TKAAGGATGTGGCRATCC**	**254**	**52,6**
*rpo*A-F-2	TGAARATYGAGCGTGGTTTTG	428	42,8
*rpo*A02R	GTRCGYTGYTCDACRCG	571	60,8
*rpo*A03R	GGCGGCCARTTVTCSAR	958	60,8
*rpo*A-R-3	TTRGCMGAACGCACSGTC	782	57,8
***rpo*A-R-4**	**GGCCARTTCTCCARCTTCA**	**944**	**55,0**
***uvr*B01F**	**GARYAYATYGARCARATGCG**	**381**	**45,0**
***uvr*B02R**	**CCYTCYTTRTCDGCRTC**	**1600**	**54,9**
*uvr*B-2-R	CCYTCYTTRTCDGCR	1602	55,5
*uvr*B03F	TWYGGBTTYCGBYTRCC	1126	54,9
*uvr*B04F	TTYCGBGTDCGBGGYGA	610	62,7
*uvr*B05R	GGYARVCGRAAVCCRWA	1126	54,9

Em negrito estão os *primers* selecionados durante a padronização da metodologia de MLSA como os padrões para amplificação dos genes estudados

3.5 Amplificação dos fragmentos dos genes constitutivos (*housekeeping*).

As condições iniciais de amplificação para todos os genes foram: 1X do tampão da enzima, 100 µM de dNTP´s, 10 µM dos *primers forward* e *reverse*, 1,5 µL de $MgCl_2$, 2 U de Taq polimerase, água para ajustar o volume final da reação e a concentração de DNA variando de 50 a 100 ng/µL.

Posteriormente, essas condições de reações de PCR, incluindo a concentração de $MgCl_2$, temperatura de anelamento e concentrações de *primers* e DNA foram estabelecidas para todos os genes através de testes de gradiente de temperatura.

3.6 Amplificação e purificação dos fragmentos de 16S rDNA

Todas as linhagens ambientais estudadas neste projeto já tinham seu 16S rDNA amplificados e seqüenciados durante a dissertação de mestrado. Novas reações foram realizadas para mais análises dessas seqüências. As reações de amplificação foram realizadas com o uso dos *primers* 27F (5 ´AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3´) e 1401R (5´CGGTGTGTACAAGACCC 3´). O volume final da reação foi de 50 µL, contendo Tris-HCl, (pH 8,4; 20 mM), KCl (50 mM), $MgCl_2$ (1,5 mM), dNTP´s (200 µM), DNA genômico (30 a 50 ng), *primers* (0,3 µM) e *Taq* polimerase (2U). O programa de PCR foi constituído de 30 ciclos: desnaturação 94°C por 2 minutos, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos. Após os 30 ciclos, foi adicionado um passo de extensão por 10 minutos à 72ºC.

Os produtos amplificados foram purificados com o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (catálogo nº 27-9602-01, GE *Healthcare)*, seguindo

instruções do fabricante.

3.7 Reação de Seqüenciamento dos genes *housekeeping* e 16S rDNA.

Os produtos de PCR purificados com o kit GFX™ foram submetidos à reação de seqüenciamento. Os fragmentos do gene 16S rDNA foram seqüenciados com os *primers* 27F, 782R e 1401R para os 12 isolados ambientais.

As reações de seqüenciamento foram realizadas seguindo o protocolo do kit *DYEnamic™ ET dye terminator kit* para MegaBACE™ (catálogo nºUS81090 *Amersham Biosciences/GE Healthcare*). As reações de seqüenciamento seguiram as seguintes etapas: 1 µL de *primer*; 4 µL de DYE ET. A concentração do produto amplificado utilizado na reação de seqüenciamento variou de acordo com o tamanho do fragmento. Por exemplo, para o gene *atp*A, foram utilizados em média 60 ng. As temperaturas para a reação de seqüenciamento foram de 95ºC por 20 segundos; 50-55ºC por 15 segundos e 60ºC por 1 minuto. Os ciclos são repetidos por 30 vezes.

Também foi realizado seqüenciamento no equipamento ABI seguindo o protocolo para o seqüenciador elaborado pelo laboratório do Prof. Dr. Carlos F. Menck, Depto. de Microbiologia do ICB-USP. Foram utilizados de 100 a 200 ng de produto de PCR purificado, 6 µL de *Save money* (200 µL de Tris-HCl 1M – pH 9.0; 5 µL de $MgCl_2$ 1M; 795 µL de água milli-Q), *primer* (concentração de 3,2 pmoles) e 2 µL de Big Dye.

A reação foi realizada seguindo o programa de ciclagem de 96ºC por 10 segundos, 52ºC por 20 segundos, 60ºC por 4 minutos; essas etapas foram repetidas 40 vezes e finalmente.

Os produtos das reações de seqüenciamento foram purificados na etapa de precipitação, após esta etapa, o mesmo foi aplicado nos seqüenciadores ABI e MEGABACE. O protocolo de precipitação realizada para o equipamento MegaBace 1000 da *Amersham Bioscience* foi realizado em uma centrífuga de placa *Eppendorf*, modelo 5810 R e as condições foram 1 µL de acetato de amônio (7,5M), 27,5 µL de etanol absoluto, a placa foi agitada em vórtex e centrifugada a 3220 rcf por 40 minutos a 20ºC. O material foi descartado por inversão e acrescentou-se 150 µL de etanol 70%, nesta etapa foi realizada centrifugação a 3220 rcf por 10 minutos, novamente o material foi descartado e centrifugado invertido por 10 segundos a 18 rcf. Depois que o etanol restante evaporou, foram acrescentados 10 µL de *Loading solution*.

No caso do seqüenciamento realizado no equipamento ABI, a etapa de precipitação também foi realizada na centrífuga de placa da *Eppendorf*, modelo 5810 R, da seguinte forma: Adicionou-se 100 µL de isopropanol 75% e a placa foi centrifugada a 3220 rcf por 50 minutos a 20ºC, a placa foi centrifugada invertida a 50 rcf por 10 segundos, depois foram adicionados 150 µL de etanol 70% e centrifugado a 3220 rcf por 10 minutos a 20ºC. A placa secou durante 30 minutos e adicionou-se 20 µL de formamida HiDi. As amostras foram desnaturadas a 96ºC por 4 minutos e acondicionadas em gelo imediatamente.

3.8 Clonagem dos produtos de PCR

As seqüências obtidas para os isolados ICB 89, ICB 129 (*rpo*A), LMG10853 (*rec*A), LMG 957, LMG 11004, LMG 10851 (*atp*A), ICB 133, ICB 207 e LMG 980 (*uvr*B) não apresentaram boa qualidade, por isso houve a necessidade em fazer a clonagem do produto de PCR.

A clonagem foi realizada utilizando o kit *TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing, Version F* (Invitrogen, cat. no. K4575-01), segundo instruções do fabricante.

As bactérias transformadas foram inicialmente cultivadas em placas seletivas a 37ºC, *overnight* (1 % Triptona; 0,5 % Extrato de Levedo; 1 % NaCl; 1,5 % Agar; 0,1 % Ampicilina). Após este período de incubação, colônias foram selecionadas da placa e cultivadas em 3,0 mL de meio LB líquido (1 % Triptona; 0,5 % Extrato de Levedo; 1 % NaCl; 0,1 % Ampicilina), a 37ºC, por 12 horas.

A extração de plasmídio dos clones selecionados (Mini-Prep) foi realizada utilizando-se o kit *Wizard® Plus SV Minipreps, DNA Purification System* (Promega, cat. no. A1460), segundo as instruções do fabricante. Para confirmar o processo de clonagem, 5 µL do plasmídio extraído foram digeridos por 1h30min, 37ºC, com 10 U da enzima de restrição *Eco RI*. O vetor pCR® 4-TOPO™ apresenta um sítio de corte desta enzima em cada lado do ponto de ligação do inserto, de forma que, após a digestão, obtém-se a liberação do inserto e linearização do vetor. A digestão dos clones foi visualizada após corrida eletroforética em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Além da confirmação por digestão com enzima de restrição, a clonagem também foi confirmada por PCR, com a amplificação do clone com os *primers*

que originaram o inserto, nas mesmas condições utilizadas para amplificação de DNA. Após a reação e subseqüente corrida eletroforética, um fragmento do tamanho do inserto foi visualizado em gel de agarose 1%.

Após o processo de digestão, os clones que continham o inserto foram purificados utilizando-se o kit *Wizard® SV and PCR Clean-Up System*, cat. Nº A9281 (Promega), seguindo instruções do fabricante.

3.9 Análises Filogenéticas

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Mega 4). Os dados brutos das seqüências foram capturados e a análise de qualidade de seqüência e obtenção das seqüências consenso foi realizada utilizando o programa *Chromas Pro Current Version* 1:34.

Após obtenção das seqüências consenso, as linhagens foram exportadas em formato FASTA, formatação utilizada para inferência filogenética a partir do programa MEGA. Após o alinhamento Das seqüências dos 49 isolados utilizando o programa Clustal*W* (ALTSCHUL *et al*., 1990), foi realizada a análise filogenética.

A partir do alinhamento, foi possível observar quais genes eram mais conservados ou menos conservados de acordo com as diferenças entre um isolado e outro através da visualização de diferenças nucleotídicas e análise de distâncias, as quais foram geradas pelo método de *Neighbour-Joining* e modelo de distância p.

As árvores filogenéticas foram construídas pelo método da Máxima Parcimônia e de *Neighbour-Joining* com teste de *bootstrap* em 1000 réplicas para calcular a confiabilidade da árvore. No caso do método de *Neighbour-Joining,* foi utilizado o modelo de distância *p* para comparação de topologia.

3.10 Análises Fenotípicas

Os testes fenotípicos foram realizados com a utilização dos kits API 20E (número de referência 20 100), API ZYM (número de referência 25 200) e API 50CH (número de referência 50 300), de acordo com as instruções do fabricante bioMérieux ® SA.

Foi utilizado o kit *McFarland Standard* (número de referência 70 900) para obtenção do padrão ideal de suspensão microbiana a ser utilizado em cada teste fenotípico, seguindo as instruções do fabricante bioMérieux ® SA.

3.11 Testes de temperatura, pH, salinidade e motilidade, catalase, oxidase e Tween 80.

Todos os testes foram realizados em placas de TSA, exceto o teste de motilidade, que foi realizado em meio semi sólido Cystine Triptic Agar.

● **Temperatura**: Foram utilizadas placas de TSA em temperaturas que variavam de 4 a 45°C em período de 24 a 72 horas.

● **pH**: Os testes foram realizados em meio sólido TSA e o pH estudado variou entre 3 e 14.

● **Salinidade**: Para este teste, realizou-se experimento em meio TSA em concentrações que variaram de 0,7 a 5 % de NaCl presente no meio de cultura no período de 24 a 72 horas.

● **Motilidade**: Foram utilizados 5 mL de meio semi-sólido em tubos de ensaio e com uma alça, foi cultivada uma cultura pura, anteriormente crescida em placa de TSA na posição vertical.

Os isolados foram incubados durante 24-48 horas para os testes de pH, salinidade e motilidade.

● **Catalase**, **Oxidase** e **Tween 80** – Esses três testes foram realizados no Departamento de Microbiologia – ICB II - Laboratório de Fisiologia de Microrganismos sob orientação da Profa. Heloíza Ramos Barbosa e da técnica Irís Takako. O teste de catalase foi feito com 3% de água oxigenada (H_2O_2) e os controles utilizados foram: *Staphylococcus* (controle positivo) e *Streptococcus* (controle negativo). O resultado foi obtido em um período não superior a 5 minutos. O teste de oxidase foi realizado com tiras para reação de oxidase (código número 570661, Laborclin) com os seguintes controles: *E.coli* (controle negativo) e *P. aeruginosa* (controle positivo).

3.12 Análise dos testes fenotípicos e microbiológicos.

As diferenças entre cada uma das linhagens estudadas para os testes fenotípicos e microbiológicos foram analisadas individualmente e comparadas com os dados de literatura para as espécies descritas e os novos isolados.

3.13 Análise de recombinação.

Os alelos foram gerados através do site www.mlst.net. O conteúdo de GC, taxas de substituições sinônimas e não sinônimas e testes de recombinação foram calculados usando o *software* START 1.0.5 (http://pubmlst.org/software/analysis/start/; Jolley *et al*., 2001).

RESULTADOS e DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

A etapa mais laboriosa e demorada do presente trabalho foi à padronização das análises de MLSA. Foram realizados testes com diferentes temperaturas de anelamento, diferentes concentrações dos primers e do DNA-alvo. Obviamente este desafio foi devido a falta de pelo menos um genoma de Stenotrophomonas, a partir do qual pudessem ser desenhados primers. As análises fenotípicas realizadas neste trabalho foram bastante tradicionais, mas serviram para mostrar que os grupos MLSA representando espécies são coesos fenotipicamente e diferentes uns dos outros e das espécies conhecidas.

4.1 Crescimento bacteriano

Inicialmente, foram determinadas as condições ideais de cultivo de todos os microrganismos**.** A maioria dos isolados foi cultivada à temperatura de 30ºC. Os isolados ambientais (Anexo 1) apresentaram crescimento ótimo nas placas de cultura após 12 horas de incubação e as linhagens referência apresentaram esse crescimento a partir de 16-24 horas. A linhagem LMG 10881 apresentou crescimento ótimo a partir de 48 horas à temperatura de 20ºC (ambiente) e a linhagem tipo *S. dokdonensis* CIP 108839^{T} teve crescimento ótimo a 30ºC após 72 horas de incubação. Todos os isolados foram submetidos ao teste de Gram.

4.2 Padronização da metodologia de MLSA

Para padronizar a metodologia de MLSA, foram estudadas inicialmente duas amostras controle-positivo, *Xanthomonas* e *Xylella*, e todas as linhagens tipo de *Stenotrophomonas* relatadas anteriormente. Os genes testados foram *atp*A, *rpo*A, *uvr*B e *rec*A, em diferentes temperaturas de anelamento. Nessa

fase, foram selecionados os *primers* e temperaturas de anelamento que apresentavam melhores resultados em se tratando de bandas específicas.

Para análise do gene *rec*A, a melhor combinação de *primers* foi *rec*A 05F e *rec*A 07R (423 pb) na concentração de 2,5 µM na reação. A concentração ideal de DNA para amplificação foi de 20 ng/µL e a temperatura de anelamento de 60°C, por 40 ciclos.

Na análise do gene *rpo*A a melhor combinação de *primers* foi *rpo*A-F-1 e *rpo*A-R-4 (690 pb). As concentrações dos *primers* e do DNA genômico foram iguais ao gene *rec*A, porém com temperatura ideal de anelamento de 62°C, por 30 ciclos.

Para os fragmentos dos genes *atp*A e *uvr*B, os melhores *primers* para amplificação foram *atp*A 03F e *atp*A 07R (609 pb) e *uvr*B 01F e *uvr*B 02R (1219 pb) respectivamente, na concentração de 5 µM e o DNA genômico na concentração de 70 a 100 ng/µL. Para o gene *atp*A, a temperatura ideal de anelamento foi de 68°C em 35 ciclos e para o gene *uvr*B a temperatura de anelamento ideal foi de 58°C em 45 ciclos. O gene 16S rDNA foi amplificado e submetido a reação de seqüenciamento. A amplificação deste fragmento já havia sido padronizada anteriormente (Ramos, 2003). Os resultados de padronização para amplificação dos genes *housekeeping* são apresentados na Figura 6.

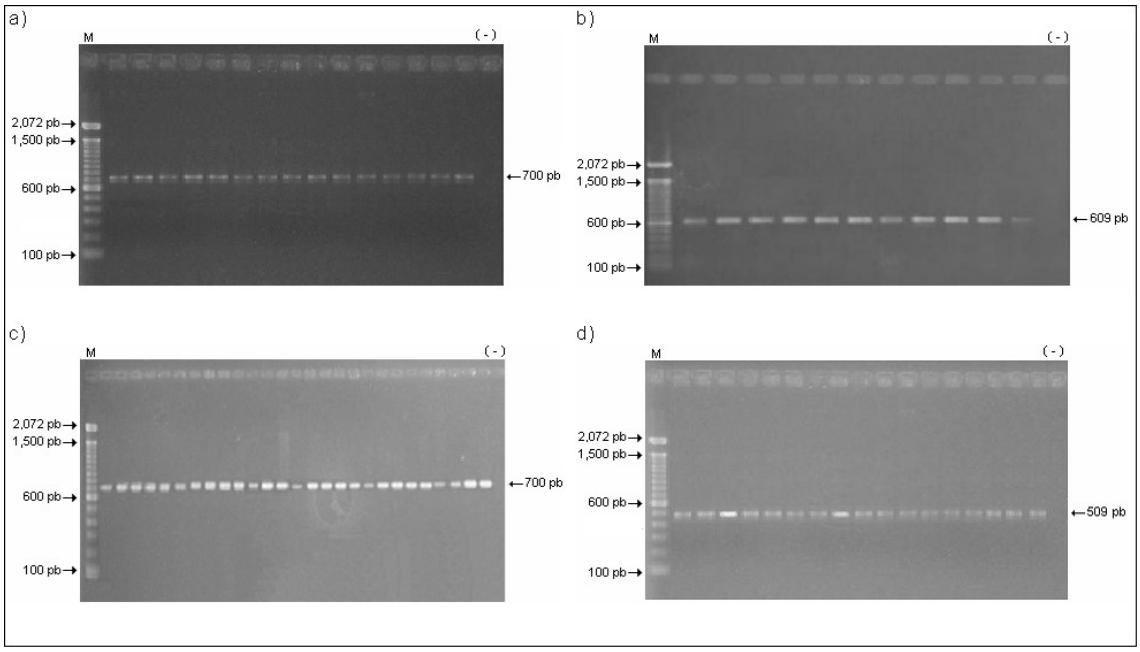

Figura 6. (a) amplificação do fragmento de *rpo*A com 700 pb, (M) = marcador de peso molecular 100 pb e (-) controle negativo da reação. (b) amplificação do fragmento de *atp*A com 609 pb, (M) = marcador de peso molecular 100 pb e (-) controle negativo da reação. (c) amplificação do fragmento de *uvr*B com 700 pb, (M) = marcador de peso molecular 100 pb e (-) controle negativo da reação. (d) amplificação do fragmento de *rec*A com 509 pb, (M) = marcador de peso molecular 100 pb e (-) controle negativo da reação.

4.3 Seqüenciamento do produto dos genes amplificados.

Foram realizadas as reações de seqüenciamento em um termociclador modelo Eppendorf Mastercycle Gradient. Os seqüenciamentos foram feitos em seqüenciador automático MegaBace 1000 (GE HealthCare). Alguns isolados apresentaram qualidade de seqüência baixa com aparente excesso de bases T. Esses isolados foram novamente seqüenciados em seqüenciador ABI Prism (Applied Biosystem), eliminando-se esse artefato. Outros isolados foram submetidos à clonagem e posteriormente seqüenciados com *primers* do vetor M13 *forward* e M13 *reverse*. Os isolados e respectivos genes submetidos à clonagem foram: ICB 89 e ICB 129 para o gene *rpo*A; ICB 207, ICB 133 e LMG 980 para o gene *uvr*B; LMG 10883 para o gene *rec*A e LMG 957, LMG 11004 e LMG 10851 para o gene *atp*A. Na figura 7 pode-se observar um trecho de seqüência de boa qualidade.

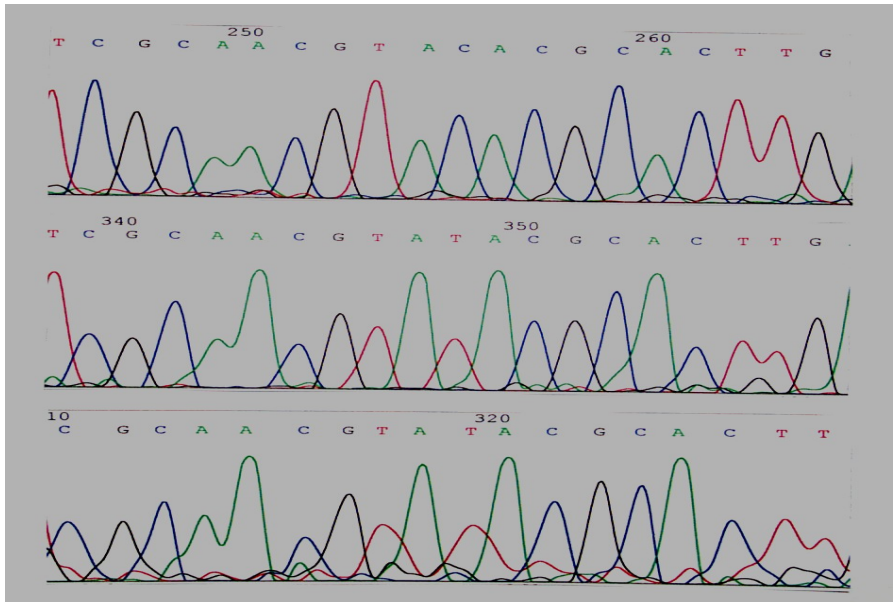

Figura 7: Cromatograma extraído de seqüenciamento realizado em equipamento MegaBace 1000.

4.4 Análise Filogenética.

A partir da análise filogenética dos 5 genes estudados, foi possível verificar de acordo com os alinhamentos que alguns genes apresentam maior quantidade de variações entre amostras do que outros, sendo esses menos conservados. Esse é o caso dos genes *uvr*B e *atp*A que, após alinhamento, apresentaram grande quantidade de diferenças nucleotídicas entre as amostras. De acordo com o gene *uvr*B, a variação é grande entre todos os isolados, ou seja, ambientais, clínicos e linhagens tipo. Já no caso do gene *atp*A, a diferença é maior entre os isolados ambientais quando comparados com as linhagens tipo e outras linhagens referência.

Essa análise realizada para o gene *rec*A indica que há uma alteração de bases no meio do gene. Entretanto, isso acontece para todas as amostras de

forma geral. Dos quatro genes analisados neste estudo, o gene *rpo*A foi o que apresentou menor variação nucleotídica.

4.4.1 Análises de distâncias

Através da análise de matriz de similaridade utilizando o modelo de distância *p* para cada um dos genes estudados, foi possível determinar qual a distância entre os organismos estudados em relação a cada linhagem tipo (Anexo 2).

4.4.2 Construção das árvores filogenéticas

As árvores filogenéticas foram geradas através dos métodos de *Neighbour-Joining* (NJ) e Máxima Parcimônia (MP) para os genes *atp*A, *rec*A, *rpo*A e *uvr*B e apresentaram grupos congruentes e que estão de acordo com estudos taxonômicos prévios (HAUBEN *et al*., 1999, COENYE *et al*., 2003). Entre os genes estudados, o gene com maior variabilidade foi *uvr*B, seguido de *atp*A e *rec*A. O gene que apresentou menor variação foi *rpo*A.

A análise das árvores filogenéticas mostrou que algumas linhagens e isolados mantiveram-se em grupos coesos, considerando-se os quatro genes estudados. Outras linhagens mudaram de posição nas árvores de acordo com a variação dos genes estudados em determinadas amostras. Os valores de similaridade podem ser observados nas tabelas das matrizes (ver Anexo 2).

Gene *atp*A

As árvores de *Neighbour-Joining* e Máxima Parcimômia apresentaram congruência em suas topologias. A árvore apresentada neste trabalho foi

gerada por *Neighbour-Joining* e distância p (Figura 8). As linhagens LMG 11004, LMG 10996, LMG 11111, LMG 11000, LMG 10991, LMG 10888 e a linhagem tipo *S. maltophilia* (LMG 958^T) apresentaram similaridade acima de 98%. A linhagem LMG 11111 e a espécie *S. maltophilia* apresentaram 100% de similaridade entre elas. Tais observações indicam que estas linhagens analisadas para este gene estão muito próximas filogeneticamente.

O grupo constituído pelas espécies *S.nitritireducens* (LMG 22074^T) *S. rhizophila* (LMG 22075^T) e pela linhagem LMG 10992 apresentou 100% de similaridade. Os isolados ambientais ICB 194 e ICB 91, também presentes a este grupo, apresentaram similaridade maior que 98% com ambas as linhagens tipo (LMG 22075^T e LMG 22074^T) e 100% entre elas. As linhagens tipo *S. nitritireducens* e *S. rhizophila* apresentaram-se agrupadas somente quanto a análise realizada para o gene *atp*A. A proximidade entre estas espécies não se verificou em relação aos outros genes analisados neste trabalho. De acordo com Coenye *et al* (2004), a espécie *S.rhizophila* está diretamente ligada às espécies *S.maltophilia* e *S.africana*. Esse resultado reforça os dados encontrados neste trabalho para os genes *rpo*A, *rec*A e *uvr*B.

As linhagens LMG 10887, ICB 130, LMG 10878, LMG 10874 e o isolado ambiental ICB 134 agruparam-se com a linhagem tipo *S. africana* (LMG 22072^T) apresentando 100% de similaridade. *S. africana* apresentou 99.4 % de similaridade com *S. maltophilia*, que aparece alocada em outro grupo. É importante destacar que a espécie *S. africana* é considerada sinônimo de *S. maltophilia,* com 70 % de similaridade em experimento de hibridização DNA-DNA (COENYE *et al.,* 2004). Essa informação revela que todas as linhagens e isolados comentados anteriormente, pertencentes aos agrupamentos de *S.*

maltophilia e *S. africana*, estão fortemente relacionados entre elas para análises do gene *atp*A.

A linhagem tipo *S. acidaminiphila* (LMG 22073^{T}) agrupou com as linhagens LMG 10883, LMG 10882 e LMG 10881. A linhagem mais próxima da espécie *S. acidaminiphila* foi LMG 10883 com 97% de similaridade.

Alguns microrganismos não se agruparam com nenhuma linhagem tipo. Dentre eles: ICB 209, ICB 128, ICB 89, LMG 10853, LMG 980, LMG 957, LMG 11114 e LMG 11002. O isolado ambiental ICB 209 apresentou 100% de similaridade no agrupamento com LMG 10853. Os isolados ambientais ICB 128 e ICB 89 tiveram 100% de similaridade com a linhagem LMG 11114. As linhagens LMG 11002, LMG 980 e LMG 957 apareceram agrupadas, sendo que LMG 980 e LMG 957 apresentaram 100% de identidade entre elas e 95% com LMG 11002.

Outro agrupamento foi composto por três subgrupos: (1) LMG 10989, LMG 10877 e LMG 1108, (2) ICB141 e ICB 133 e (3) LMG 978, LMG10851 e ICB129. O isolado ambiental ICB 129 tem aproximadamente 100% de similaridade com a linhagem clinica LMG 10851. Os isolados ambientais ICB 141 e ICB 133 estão entre estes subgrupos e apresentam 100% de similaridade entre eles. A similaridade dentro deste ramo foi maior que 98,8 % entre todos os microrganismos analisados.

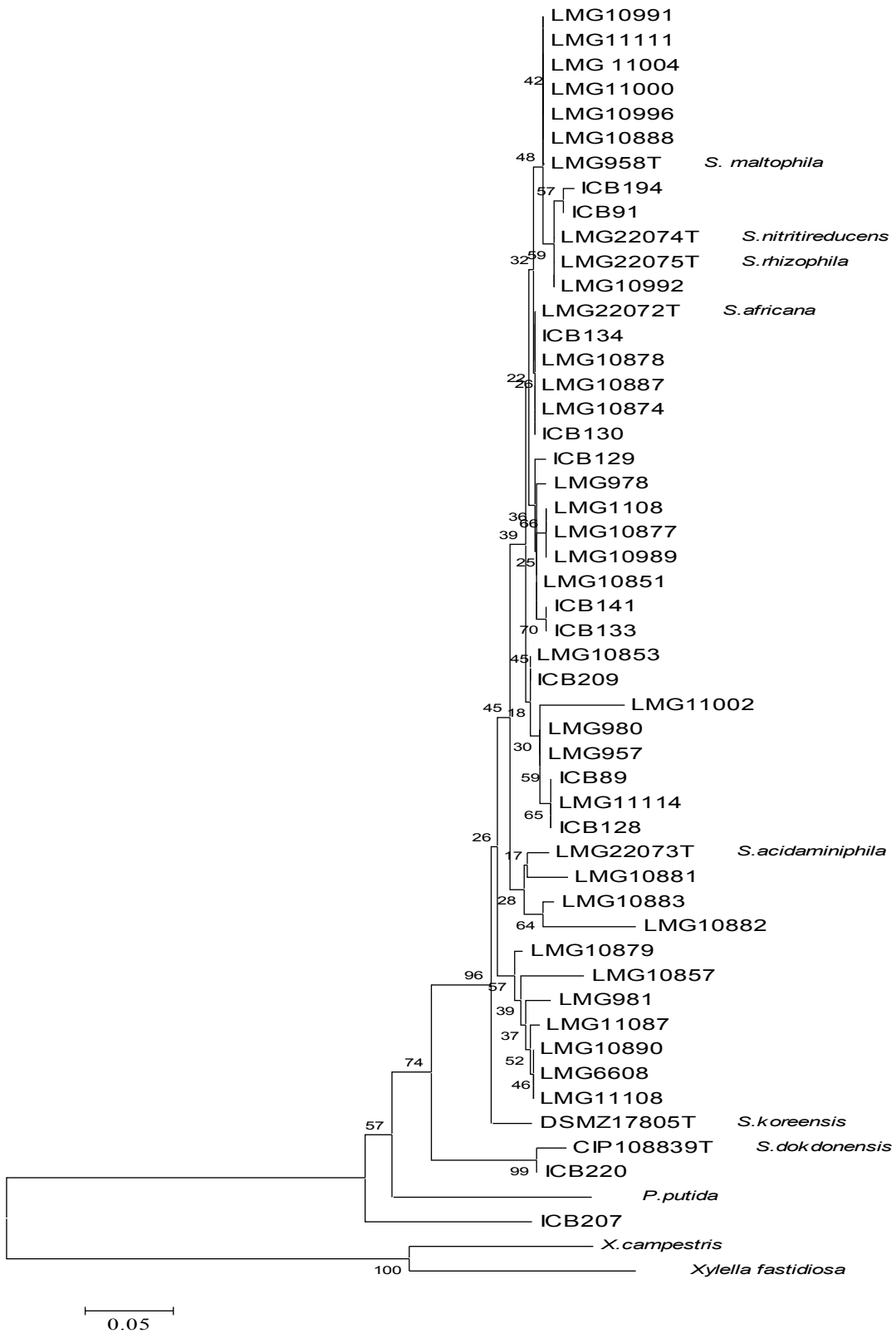

Figura 8: Árvore filogenética gerada a partir de seqüências do gene *atp*A construída pelo método de *Neighbour-Joining* utilizando distancia p. Escala de 0.05 substituições por nucleotídeo. Valores de *bootstrap* expressado como percentagem de 1000 réplicas.

Gene *rec*A

Para análise do gene *rec*A, as linhagens LMG 10991, LMG 10996, LMG 11004, LMG 11111, LMG 11000, LMG 10992, LMG 11002 e as espécies *S. maltophilia* (LMG 958^T), *S. rhizophila* (LMG 22075^T) e *S. africana* (LMG 22072^T) apresentaram similaridade de 100%. Um segundo grupo constituído pelas linhagens LMG 980, LMG 10857, LMG 11108, LMG 978, LMG 11114 e pelos isolados ICB 89 e ICB 128 também se localiza próximo às linhagens analisadas acima. Comparando estes dois grupos, observou-se uma similaridade de 86 % entre eles. Este agrupamento não se evidencia a presença de nenhuma linhagem tipo e a similaridade variou entre 95-100% (Figura 9).

Também foi observado um outro agrupamento formado por 10 linhagens e 6 isolados. Este agrupamento apresentou um grupo grande dividido em 3 agrupamentos menores. O primeiro deles foi constituído pelas linhagens LMG 10878, LMG 10874, *S.nitritireducens* (LMG 22074^T), LMG 10888, LMG 10887 e pelo isolado ICB 209. O isolado ICB 209 apresentou similaridade de 95% com as linhagens LMG 10878 e LMG 10874. A linhagem tipo *S. nitritireducens* apresentou similaridade de 99% com as linhagens LMG 10888 e LMG 10887. No segundo pequeno agrupamento, observou-se ainda que as linhagens clínicas LMG 10851 e LMG 10877 e ambientais LMG 1108 e LMG981 apresentaram um grupo coeso com similaridade de 100%; o agrupamento de LMG 981, LMG1108 e LMG 10851 apresentou valor de *bootstrap* de 79%.

O terceiro pequeno agrupamento que foi formado somente por amostras ambientais e apresentou os seguintes isolados ambientais: ICB 134, ICB 130, ICB 133 e ICB 141 e as duas linhagens referência: LMG 10879 e LMG 11087. Estes microrganismos apresentaram similaridade de 100%. Mesmo havendo a

formação de 3 pequenos agrupamentos neste *cluster*, a similaridade entre eles variou de 90-100%. Outro grupo observado na árvore foi constituído pela espécie *S. koreensis* (DSMZ 17805^{T}) e linhagens e isolados ambientais (LMG 6608, LMG 10890, LMG 10989, ICB 91 e ICB 194). As linhagens LMG 6608 e LMG 10890 apresentaram similaridade de 96%, com valores altos de *bootstrap* (70%) e as mesmas comparadas com a espécie *S. koreensis* apresentaram similaridade de 91%. Os isolados ambientais ICB 91 e ICB 194 apresentaram similaridade de 100% com a linhagem LMG 10989, com valor de *bootstrap* em 98%.

As linhagens LMG 10881, LMG 10882, LMG 10883 e os isolados ICB 207 e ICB 220 formaram outro agrupamento. Os isolados ambientais ICB 207 e ICB 220 apresentaram 100% de similaridade e as linhagens LMG 10882 e LMG 10883 também apresentaram 100% de similaridade entre elas. Já a linhagem LMG 10881 apresentou similaridade de 96% com as linhagens LMG 10882 e LMG 10883. De uma forma geral, este agrupamento apresentou similaridades que variaram entre 95 e 100%.

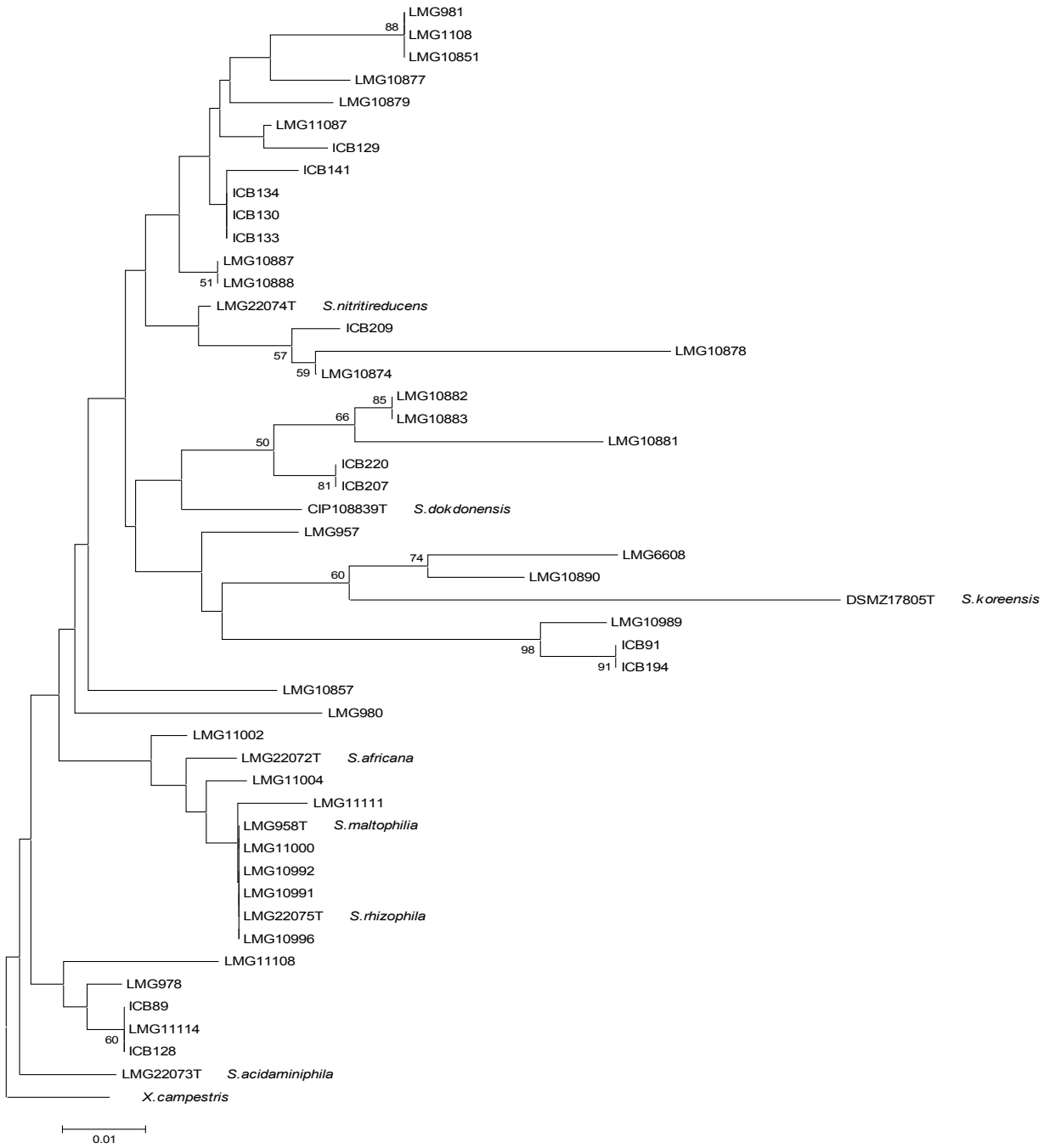

Figura 9. Árvore filogenética gerada a partir de seqüências do gene *rec*A construída pelo método de *Neighbour-Joining* utilizando distancia p. Escala de 0.01 substituições por nucleotídeo. Valores de *bootstrap* expressado como percentagem de 1000 réplicas a partir de 50%.

Gene *rpo*A

Através da análise de seqüências do gene *rpo*A, foi possível observar um número maior de linhagens agrupadas, pois este gene é mais conservado quando comparado com os outros.

O primeiro agrupamento analisado pelos dados do gene *rpo*A foi constituído pelas linhagens LMG 11004, LMG 10992, LMG10991, LMG 10996, por isolados ambientais ICB130 e ICB 134 e pelas espécies *S. maltophilia* (LMG958^T), *S. africana* (LMG 22072^T) e *S. rhizophila* (LMG 22075^T). As linhagens tipo apresentaram similaridade acima de 97%. Este mesmo agrupamento apresentou um subgrupo constituído por três isolados ambientais, sendo eles ICB 129, ICB 141 e ICB 133, com similaridade de 99% entre eles e 97% com as espécies tipo anteriormente referidas.

Foi observado também outro grande agrupamento formado pelas linhagens LMG 10887, LMG 11002, LMG 10878, LMG 10874, LMG 10989, LMG 978, LMG 980, LMG 10851, LMG 10877 e pelos isolados ICB 194 e ICB 91. A variação da similaridade neste grupo não foi inferior a 99%, com exceção da linhagem LMG 10989 que apresentou similaridade de 98,3% com os outros organismos referidos. Esse ramo constituiu-se por linhagens ambientais e clínicas.

As linhagens ambientais LMG 10890, LMG 6608, LMG 10879 e LMG 11087 formaram um agrupamento. As linhagens LMG 10890 e LMG 6608 apresentaram similaridade de 98% e as linhagens LMG 10879 e LMG 11087, de 100%. A variação de similaridade entre elas foi de 93-100%.

Outro agrupamento foi constituído por isolados ambientais (ICB 89, ICB 128 e ICB 207) e linhagens clínicas (LMG 11114 e LMG 957). O isolado

ambiental ICB 128 apresentou similaridade de 98,7% com a linhagem clínica LMG 11114; já o isolado ambiental ICB 89 apresentou similaridade de 100% com a linhagem clínica LMG 957. O isolado ICB 207 apresentou similaridade maior do que 97% com esses dois grupos relacionados. O agrupamento constituído pela espécie *S. dokdonensis* (CIP 108839^T) e pelo isolado ambiental ICB 220 apresentou 100% de similaridade.

As três linhagens tipo *S. koreensis* (DSMZ 17805^T), *S. acidaminiphila* (LMG 22073^T) e *S. nitritireducens* (LMG 22074^T) formaram um pequeno *cluster*. Nele foi possível observar que, para este gene, existe uma maior similaridade entre as espécies *S. acidaminiphila* e *S. nitritireducens* (97%) quando comparado com a espécie *S. koreensis*, a qual apresentou similaridade de 93% com as outras duas espécies citadas.

Observou-se no grupo formado somente por linhagens ambientais (LMG 10881, LMG 981, LMG 10883, LMG 10888 e LMG 10882) o surgimento de dois subgrupos. A linhagem LMG 10881 está, aparentemente, mais relacionada com a linhagem LMG 981, enquanto que as linhagens LMG 10882, LMG 10883 e LMG 10888 formaram um outro agrupamento. Porém, a porcentagem de similaridade é maior entre as linhagens LMG 10881, LMG 10882, LMG 10883 e LMG 10888 (> 97%) do que com a linhagem LMG 981 (96%). As linhagens LMG 10882, LMG 10883 e LMG 10888 apresentaram similaridade de 100% entre elas. Esse grupo apareceu constantemente em todos os genes analisados. O grupo seqüente formado pelas duas linhagens LMG 10857 (clínica) e LMG 11108 (ambiental) apresentou 99% de similaridade entre eles (Figura 10).

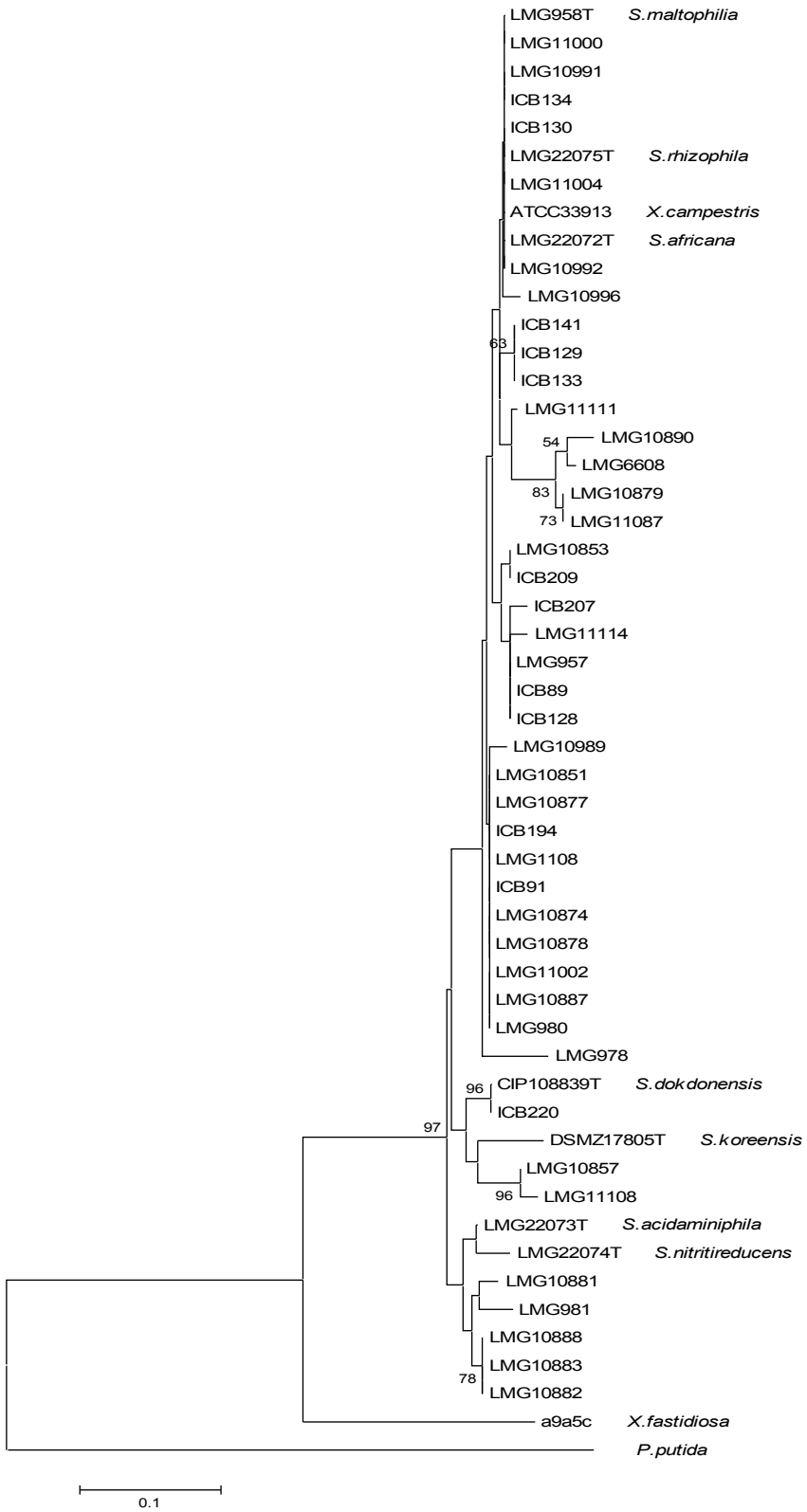

Figura 10. Árvore filogenética gerada a partir de seqüências do gene *rpo*A construída pelo método de *Neighbour-Joining* utilizando distância p. Escala de 0,1 substituições por nucleotídeo. Valores de *bootstrap* expressado como percentagem de 1000 réplicas a partir de 70%.

Gene *uvr*B

A árvore filogenética gerada para os dados do gene *uvr*B (Figura 11) apresentou agrupamentos constituídos pelas linhagens ambientais LMG 10879, 10890 e 11087 que aparecem agrupadas no gene *uvr*B, onde LMG 10879 e LMG 10890 são idênticas, enquanto LMG 11087 apresentou similaridade de 97% com as linhagens referidas. Dentro deste ramo, observou-se outro grupo composto por apenas linhagens clínicas LMG 1108, LMG 10851 e LMG 10877 com similaridade que varia de 92-94%. Os isolados de trigo ICB 129 e ICB 141 (100% de similaridade) aparecem entre os grupos referidos anteriormente, com apenas 91% de similaridade.

O próximo agrupamento foi constituído pelas linhagens LMG 957, ICB 209, LMG 6608, LMG 10991 e LMG 10887 que formaram um grupo com similaridade que variava de 87-96%. O isolado ambiental ICB 209 apresentou similaridade de 95% com a linhagem clínica LMG 957. As linhagens clínicas e ambientais apareceram juntas neste grupo.

Os isolados ambientais ICB 130 e ICB 134 formaram um grupo com similaridade de 95%. Este mesmo grupo foi constituído por linhagens ambientais LMG10888 e LMG980 e uma linhagem clínica LMG 10878 com similaridade em torno de 90%. Os isolados ambientais ICB 130 e ICB 134, comparados com as linhagens LMG10888, LMG980 e LMG 10878 têm apenas 87% de similaridade.

Composto pelas linhagens tipo *S. africana* (LMG22072^T), *S. maltophilia* (LMG 958^T), *S. rhizophila* (LMG 22075^T) e LMG 10992 apresentaram similaridade de 100% entre elas. Os isolados ambientais ICB 194 e ICB 128 juntamente com a linhagem clínica LMG 11114 formaram outro grupo dentro

deste ramo com similaridade de 87-90%. A similaridade entre estes 2 grupos referidos foi no máximo de 12%.

Outro agrupamento foi composto pelo isolado ambiental ICB 220 e pelas linhagens LMG 11002, LMG 978, LMG 11111, LMG 10874, LMG 11000, LMG 10996 e LMG 11004. O isolado ambiental ICB 220 tem similaridade de 97% com a linhagem LMG 11002 e 6% com a linhagem LMG 978. O agrupamento formado pelas linhagens LMG 11111, LMG 10874, LMG 11000, LMG 10996 e LMG 11004 apresentaram similaridade que variou de 96-100%.

Um agrupamento constituído pelos isolados ambientais ICB91 e ICB 89 e pela linhagem LMG 10989 apresentou similaridade de 70-80%, seguido do grupo formado pelos isolados ambientais ICB 133 e ICB 207 com similaridade de 47%. Esse agrupamento entre esses isolados só foi observado nas análises do gene *uvr*B. A linhagem ambiental LMG 11108 e as linhagens clínicas LMG 10853 e LMG 10857 formaram um agrupamento. Este agrupamento também foi observado nas análises do gene *rec*A, porém com similaridades mais baixas.

As duas linhagens clínicas apresentaram similaridade de 100%; quando comparadas com a linhagem ambiental, esta similaridade foi de 94%. Nas árvores geradas para os genes *rpo*A e *atp*A, a linhagem LMG 10853 agrupou-se com o isolado ambiental ICB 209. As linhagens tipo *S. acidaminiphila* (LMG 22073^T), *S. nitritireducens* (LMG 22074^T), *S. koreensis* (DSMZ 17805^T) e *S. dokdonensis* (CIP 108839^T) estão agrupadas em um mesmo *cluster*. As espécies *S. acidaminiphila* e *S. nitritireducens* apresentaram similaridade de 97%, enquanto que as linhagens *S. koreensis* e *S. dokdonensis* apresentaram similaridade de 90%. Comparando as 4 linhagens, a similaridade variou entre

87 e 88%. *S. acidaminiphila* e *S. nitritireducens* apresentaram agrupamento com 97% de similaridade para o gene *rpo*A.

O último grupo formado com os dados obtidos do gene *uvr*B foi constituído pelas linhagens LMG 10882 e LMG 10883, que apresentaram similaridade de 95%. De posse dos resultados apresentados acima, pode-se inferir que o gene estudado apresentou maior variação na estrutura da topologia da árvore em grande parte dos isolados estudados, quando comparados com resultados dos genes *atp*A e *rec*A.

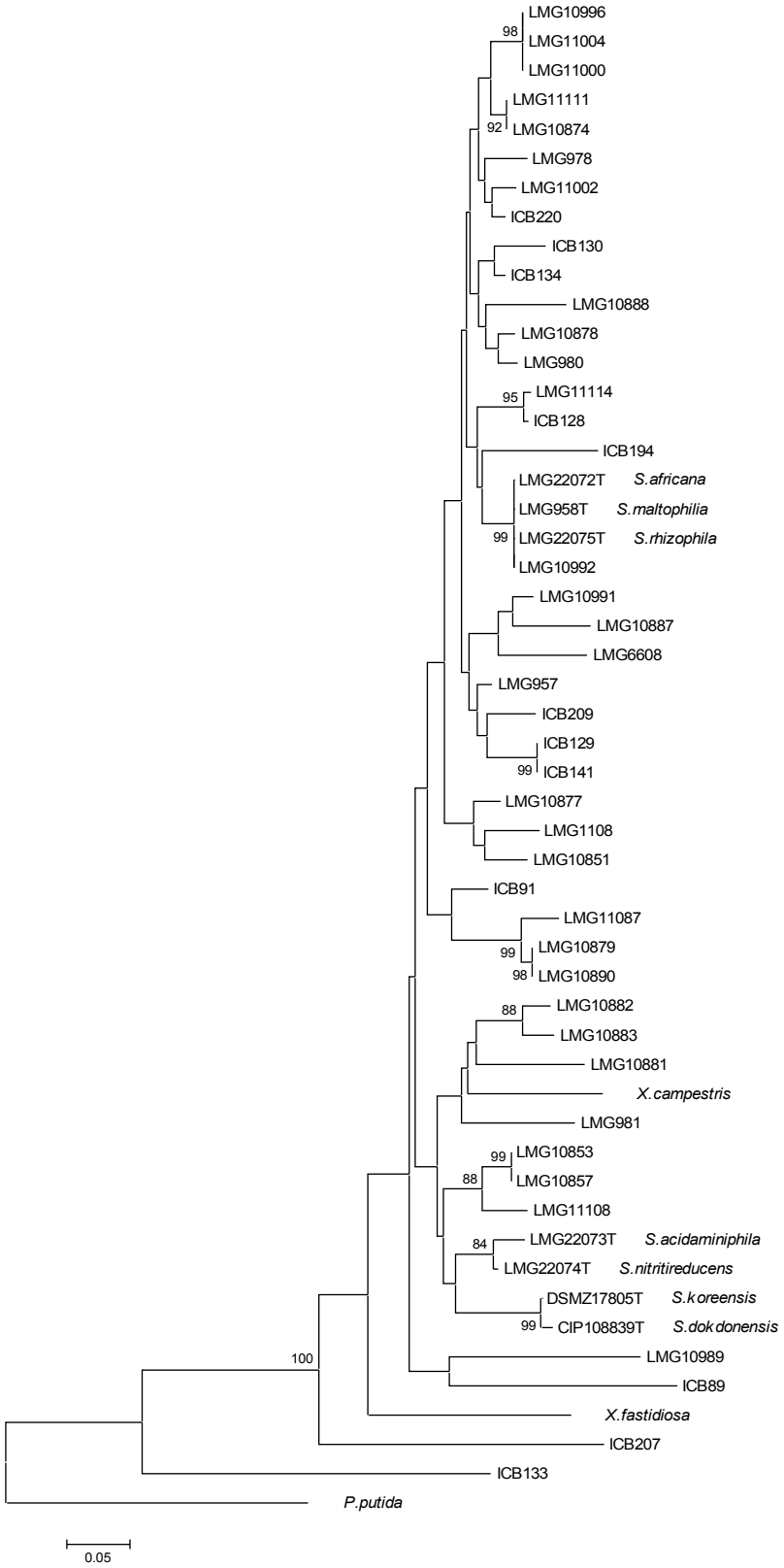

Figura 11. Árvore filogenética gerada a partir de seqüências do gene *uvr*B construída pelo método de *Neighbour-Joining* utilizando distancia p. Escala de 0.05 substituições por nucleotídeo. Valores de *bootstrap* expressado como percentagem de 1000 réplicas a partir de 70%.

Genes concatenados.

Após as seqüências dos genes serem concatenadas, os grupos ficaram mais bem estabelecidos. Observou-se claramente a presença de 12 grupos por MLSA (Figura 12). Esses grupos mostraram-se freqüentes nos genes quando analisados individualmente; entretanto, algumas linhagens mudaram de posição de acordo com o gene estudado. Isso ocorreu devido à variação de polimorfismos existente em cada um dos genes. Dentre os genes estudados, as seqüências de *rpo*A foram as que se apresentaram mais conservadas, seguido por *rec*A, *atp*A e as seqüências menos conservadas para o gene *uvr*B.

O grupo 1 de MLSA mostra-se bastante diversificado para os isolados ambientais e clínicos. As linhagens LMG 980 com LMG 11002 e LMG 10874 com 10878 apresentaram 68 e 80% de similaridade respectivamente nos testes de hibridização DNA-DNA (HDD) encontrados em estudo realizado por Hauben *et al* (1999). Desta forma os dados encontrados em literatura corroboram com os resultados encontrados neste trabalho.

No grupo MLSA 2, após o concatenamento dos genes, não foi observada a presença de nenhuma linhagem tipo. O resultado indica a presença de nova espécie neste agrupamento.

O grupo 3 de MLSA foi constituído por *Stenotrophomonas malthophilia, S. africana* e *S. rhizophila*, porém com diferenças entre as espécies. A espécie *S. africana* foi considerada e determinada como um sinônimo de *S. malthophilia* de acordo com Coenye *et al*. (2004). As linhagens *S. malthophilia* LMG 958^{T} e LMG 10992 apresentaram 75% de homologia na HDD, o que corresponde ao grupo genômico 6 determinado por Hauben *et al* (1999).

Os grupos MLSA 5 e MLSA 7 que correspondem aos grupos genômicos 5 e 9, respectivamente, previamente descritos por Hauben *et al* (1999). Os agrupamentos MLSA 6 e MLSA 8 são formados por isolados ambientais provenientes de gramíneas de importância econômica. Esses agrupamentos indicam mais duas espécies novas a serem descritas. A partir dos nossos resultados, há a confirmação da relação entre *S. acidaminiphila* (LMG 22073^T) e *S. nitritireducens* (LMG 22074^T). Essas duas espécies apresentaram valores de similaridade de HDD próximo de 70 % e com fenótipo não distinguível (ASSIH *et al*., 2002).

O grupo MLSA 10 é formado pelas linhagens LMG 10881, LMG 10882 e LMG 10883, as quais não se agrupam em nenhum grupo com linhagens tipo presentes; essas linhagens também são novas espécies a serem descritas formalmente. Os isolados ICB 89, ICB 133, ICB 207, e ICB 220 apresentaram mais de 95% de similaridade no 16S rDNA, porém são diferentes na análise de MLSA.

O isolado ICB 207 representa, provavelmente, um novo gênero, devido ao fato de não se encontrar dentro de nenhum agrupamento dos vizinhos filogenéticos mais próximos. Este isolado foi selecionado para estudo, pois apresentou o mesmo perfil de restrição por PCR-RFLP e 16S rDNA, com as amostras identificadas como *Stenotrophomonas*. Com a análise de MLSA, porém, foi possível verificar que o PCR-RFLP e o 16S rDNA não foram suficientemente informativos para este isolado, mostrando assim a fragilidade do PCR-RFLP quando se trata de inferir posição taxonômica.

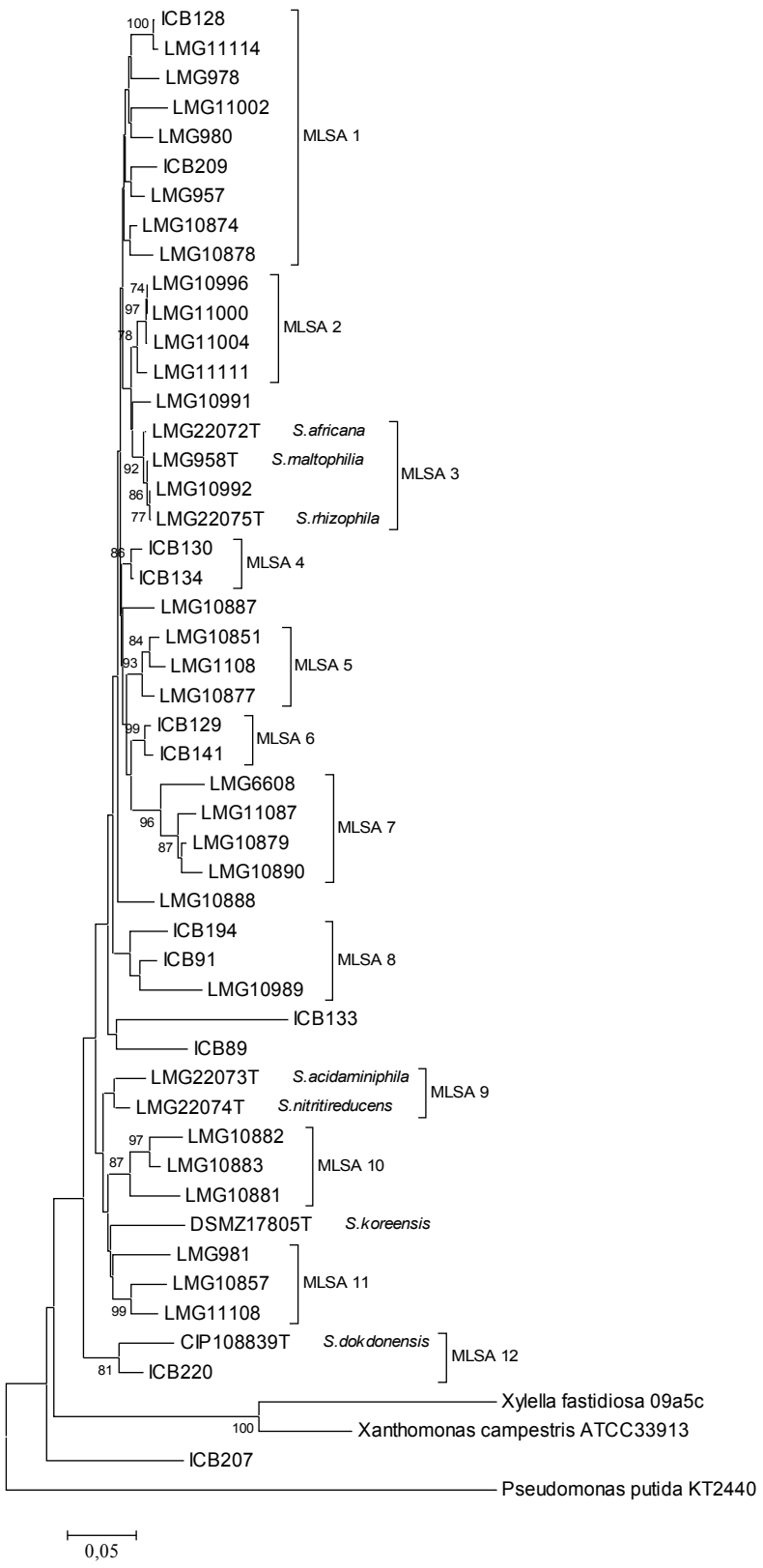

Figura 12. Árvore filogenética gerada a partir das seqüências de todos os genes concatenados construída pelo método de *Neighbour-Joining* utilizando distancia p. Escala de 0.05 substituições por nucleotídeo. Valores de *bootstrap* expressado como percentagem de 1000 réplicas a partir de 70%.

4.5 Resultados de análise fenotípica

Os resultados das análises fenotípicas foram analisados de acordo com o protocolo padrão do fabricante do Kit API 20E e estão apresentados na tabela 2. Abaixo se observa a figura do teste API 20E com duas amostras de padrão fenotípico distinto, colocadas em duas bandejas distinstas (Figura 13). Nesta figura, é possível observar a hidrólise de gelatinase - canaleta indicada pela seta na bandeja inferior - o que não se verifica na canaleta correspondente da bandeja superior. Pode-se também verificar a assimilação de alguns substratos como glicose e manitol na bandeja superior (canaletas amarelas).

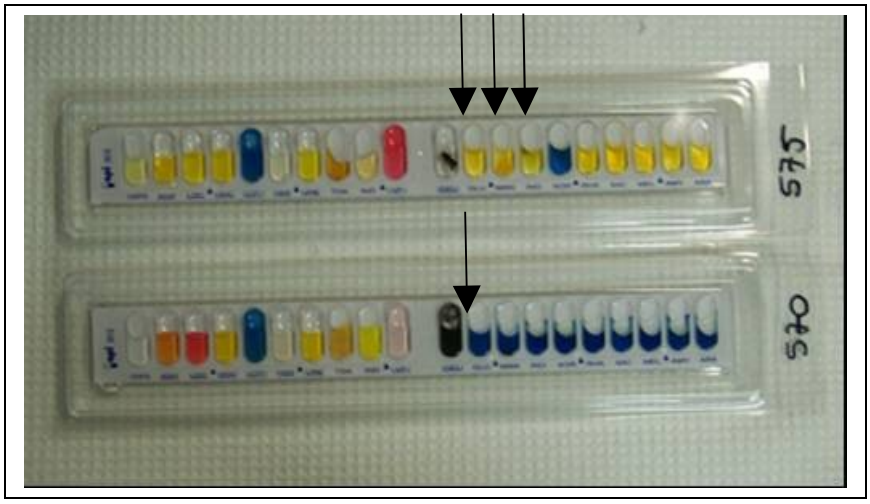

Figura 13. Teste fenotípico API 20E com atividades diferentes para as duas amostras apresentadas.

Através dos resultados dos testes fenotípicos API 20E, API 50 CH e API ZYM, foi possível verificar diferenças entre os isolados ambientais, linhagens referência e as linhagens tipo. Alguns isolados ambientais como ICB 207 e ICB 220 apresentaram características únicas quando comparadas com as outras linhagens. Essas características ajudam a reforçar a existência de novas espécies de *Stenotrophomonas*. Entre elas, pode ser citada a positividade

desses dois isolados no teste API 20E para glicose, manitol, inositol, ramnose, sacarose, melibiose, amigdalina e arabinose. ICB 220 apresenta uma característica positiva a mais neste teste para ornitina descarboxilase. No teste API ZYM, os isolados ICB 209, ICB 194, ICB 91 e LMG 6608 são positivos para lipase. Essa característica não foi encontrada em nenhuma das linhagens tipo nos respectivos trabalhos de descrição de espécies. ICB 220 e LMG 10881 são positivas para ß-galactosidase. Desta forma, considerando os resultados de fenotipagem, pode-se verificar as diferenças existentes dos isolados ambientais presentes nesse estudo quando comparados com as linhagens tipo, indicando assim a confirmação de novas espécies.

Temperatura – as temperaturas estudadas variaram de 4ºC a 45ºC (tabela 2). Todos os isolados ambientais e linhagens-tipo apresentaram capacidade de crescimento em temperaturas de 20ºC a 37ºC; as linhagens LMG 981, 10857, 10881, 10882, 10883, 10890, 6608, 10879 e 11087 não apresentam crescimento a 37ºC. A linhagem LMG 22075^T foi capaz de crescer a 4ºC e a linhagem LMG 22073^T, a 40ºC. A linhagem LMG10881 cresceu apenas quando cultivada a 20ºC (temperatura ambiente).

Salinidade – Os testes de salinidade (tabela 2) foram realizados na presença de 0,7% a 6% de NaCl no meio de cultura. Todas as amostras submetidas ao teste cresceram na presença de 0,7 e 1% de NaCl, exceto as linhagens LMG 10857 e LMG 10879, que não apresentaram crescimento a partir de 1% de NaCl no meio. A partir do teste em 3% de salinidade, outras 3 linhagens também não apresentaram crescimento (DSMZ 17805^T, LMG 22074^T, LMG 22073^T). Quando testadas na presença de 4,5%, somente as linhagens LMG 958^T, LMG 22072^T, LMG 22075^T, CIP 108839^T e os isolados

ICB 207 e ICB 220 foram capazes de crescer nesta condição. E finalmente, quando cultivadas em 5 e 6% de NaCl no meio de cultura, somente a linhagem tipo *S. dokdonensis* (CIP108839^T) cresceu. O período de incubação para este experimento foi de 5 dias (tabela 2).

pH – Também foi avaliado o comportamento de cada um dos isolados quando submetidos a diferentes pHs. Todos os isolados estudados apresentaram crescimento em pH na faixa compreendida entre 5 e 10. Para o pH 4, somente os isolados ICB 91, ICB 207, ICB 220 cresceram. Já para o pH 11, os isolados ICB 89, ICB 91, ICB 128, ICB 130, ICB 133, ICB 134, ICB 141, ICB 194, ICB 207, ICB 209, ICB 220, LMG 10857, LMG 10890, LMG 10879, LMG 6608, LMG 11087 apresentaram crescimento. Quando o meio sólido foi ajustado para o pH 12, apenas os isolados ambientais ICB 89, ICB 91, ICB 128, ICB 130, ICB 134, ICB 194 e ICB 209 foram capazes de crescer. Nenhum isolado apresentou crescimento nos pHs 13 e 14. O período de incubação para essa análise foi de 5 dias e a temperatura foi de 30ºC, exceto para a linhagem LMG10881, que é capaz de crescer somente quando cultivada em temperatura ambiente. Esses resultados são apresentados na tabela 2.

Motilidade – Para este teste, foi utilizado o meio Cisteína. Não se observou motilidade em nenhum isolado estudado.

Oxidase – Foi observado que, com exceção dos isolados ICB 129 (MLSA 6) e ICB 220 (MLSA 12) , o teste de oxidase foi negativo para todos os isolados ambientais. Entre as linhagens-referência, somente a linhagem LMG 10857 (MLSA 11) apresenta-se positiva para o teste. O padrão para positividade do teste é a coloração azul na tira de reação para oxidase e incolor quando o resultado é negativo.

Catalase – Todos os isolados ambientais são positivos para o teste; entre as linhagens-referência, apenas LMG 10890 (MLSA 7) e LMG 10879 (MLSA 7) são negativas.

Tween 80 e DNase – Foram estudadas para todas as amostras a capacidade de hidrolisar tween 80 e DNase. Com exceção das linhagens-tipo *S. nitritireducens*^{T} e *S. acidaminiphila*^{T} (MLSA 9), todos os isolados ambientais e linhagens-tipo apresentam-se positivos.

Abaixo segue dados positivos para os testes de fenotipagem (API ZYM, API 20E e API 50 CH) juntamente com resultados de pH, temperatura, salinidade, catalase, oxidase, Tween 80 e DNase, referentes aos grupos de MLSA. Esses resultados também estão apresentados na Tabela 2,

MLSA 1 – esterease, lípase, valina arilaminase, tripsina, ß-glucosidase, lisina descarboxilase, citrato, triptofano desaminase, gelatinase e aesculina. Todas as linhagens pertencentes a este grupo apresentaram crescimento em temperatura de 20-37ºC, crescem em presença de NaCl na faixa de 0,7-1%. Apresentaram crescimento em pH de 5 a 10. Os isolados ambientais ICB 209 e ICB 128 apresentaram crescimento em pH 11 e 12.

MLSA 2 – α-glucosidase, esterease, valina arilaminase, tripsina, arginina dihidrolase, ornitina descarboxilase, urease, acetoina, esculina.

MLSA 3 – lisina descarboxilase, citrato, acetoina, triptofano desaminase, gelatinase, glicerol, eritritol, D-arabinose, L-arabinose, D-ribose, L-xilose, D-adonitol, metil-ßD-xilopiranoside, D-galactose, aesculina, D-maltose, D-lactose, D-melibiose, D-sacarose, L-arabitol, gluconato de potássio, 2-cetogluconato de potássio e 5-cetogluconato. Das linhagens estudades no grupo MLSA 3, somente a espécie S.rizophila aparesentou crescimento a temperatura de 4ºC.

Quanto ao teste de salinidade, *S.maltophilia*, *S.africana* e *S.rizophila* apresentaram crescimento na presença de 4,5% de NaCl.

MLSA 4 – esterease, vaina arilaminase, tripsina, ß-glucosidase, lisina descarboxilase, citrato, triptofano desaminase, gelatinase e aesculina. Os isolados ambientais ICB 130 e ICB 134 apresentaram crescimento em pH 11 e 12.

MLSA 5 – α-glucosidase, esterease, valina arilaminase, tripsina, arginina dihidrolase, ornitina descarboxilase, uréase, acetoina, esculina.

MLSA 6 – esterease, tripsina, ß-galactosidase, citrato, triptofano desaminase, gelatinase, amigdalina e aesculina. No grupo MLSA 6, o isolado ICB 141 apresentou crescimento em pH 11 e o isolado ICB 129 apresentou positividade para o teste de oxidase.

MLSA 7 – esterease, tripsina, ß-glucosidase, triptofano desaminase, gelatinase e aesculina. As linhagens pertencentes a este grupo não apresentaram crescimento em temperatura de 37ºC. A linhagem LMG 10879 não apresentou crescimento na presença de 1% de NaCl e todas elas apresentaram crescimento em pH 11. As linhagens LMG 10890 e LMG 10879 são negativas para o teste de catalase.

MLSA 8 – esterease, lípase, valina arilaminase, ß-glucosidase, ß-galactosidase, arginina dihidrolase, lisina descarboxilase, citrato, triptofano desaminase, gelatinase, aesculina e D-maltose. O isolado ICB 91 apresentou crescimento em pH 4, 11 e 12, já o isolado ICB 194 não apresentou crescimento em pH 4.

MLSA 9 – esterease, valina arilaminase, tripsina, *N*-acetil- ß-glucosaminidase, triptofano desaminase, acetoina e aesculina. A espécie *S. acidaminiphila*

apresentou crescimento em temperatura de 40ºC, o que não foi observado para a espécie S. nitritireducens. Não cresceram na presença de 3% de NaCl e são negativas para os testes de Tween 80 e DNase.

MLSA 10 – esterease, tripsina e aesculina. Não apresentaram crescimento a temperatura de 37ºC.

MLSA 11 - esterease, valina arilaminase, triptofano desaminase e aesculina. A linhagem LMG 10857 não apresentou crescimento na presença de 1% de NaCl. Essa mesma linhagem cresce em pH 11 e é positiva para o teste de oxidase.

MLSA 12 – triptofano desaminase, valina arilaminase, tripsina, ß-glucosidase, *N*-acetil- ß-glucosaminidase, ß-galactosidase, acetoina, gelatinase, D-xilose, D-glicose, D-manose, aesculina, D-celobiose, D-maltose e D-trehalose.

Na tabela 2, foram apresentados apenas os testes com diferenças fenotípicas e microbiológicas entre as amostras. Os testes que apresentaram resultados positivos para todas as amostras estudadas foram fosfatase alcalina, leucina arilamidase, fosfatase ácida, esterease lípase e naftol-AS-BI-fosfohidrolase para API ZYM. Os resultados negativos foram observados para α-fucosidase, manosidase, ß-glucoronidase e α-galactosidase no teste fenotípico de API ZYM e H_2S e sorbitol para o teste fenotípico API 20E.

Tabela 2. Resultados fenotípicos e microbiológicos dos grupos MLSA.

	MLSA1	MLSA1	MLSA2	MLSA3	MLSA3	MLSA3	MLSA4	MLSA4	MLSA5	MLSA6	MLSA6	MLSA7	MLSA7	MLSA7	MLSA7
pH	ICB128	ICB209	LMG10996	*S. maltophilia*	*S.africana*	*S.rhizophila*	ICB130	ICB134	LMG10851	ICB129	ICB141	LMG6608	LMG11087	LMG10879	LMG10890
4	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
11	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
12	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Temperatura															
4ºC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30ºC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37ºC	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
40ºC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salinidade															
1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
2%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
3%	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
4,50%	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
APIZYM															
esterease	+	+	f	+	+	+	+	+	f	+	+	+	+	+	+
lipase	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	f	f
valina arilaminase	+	+	f	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
cistina arilaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tripsina	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-quimotripsina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-glucosidase	-	-	f	-	-	-	-	-	f	-	-	-	-	-	-
β-glucosidase	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
N-acetil-β-glucosaminidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	f	f
API 20E															
β-galactosidase	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
arginina dihidrolase	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
lisina descarboxilase	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
ornitina descarboxilase	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
citrato	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
urease	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
triptofano desaminase	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
acetoina	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
gelatinase	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
amigdalina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
API 50CH															
glicerol	-	-	-	+	+	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
eritritol	-	-	-	+	+	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d-arabinose	-	-	-	+	+	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
l-arabinose	-	-	-	+	+	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d-ribose	-	-	-	+	+	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d-xilose	-	-	-	-	-	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
l-xilose	-	-	-	+	+	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d-adonitol	-	-	-	+	+	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
metil-βD-xilopiranoside	-	-	-	+	+	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galactose	-	-	-	+	+	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glicose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-frutose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-manose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-ramnose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dulcitol	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-manitol	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-sorbitol	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
metil-αD-manopiranoside	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
metil-αD-glicopiranoside	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetilglicosamina	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
amigdalina	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
arbutina	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
salicina	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D-celobiose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-maltose	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D-lactose	-	-	-	+	+	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melibiose	-	-	-	+	+	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-sacarose	-	-	-	+	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-trehalose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
inulina	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melezitose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-rafinose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
amido	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
glicogenio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
xilitol	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gentiobiose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-turanose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-lixose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-fucose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fucose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	+	+	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gluconato de postássio	-	-	-	+	+	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-cetogluconato de potássio	-	-	-	+	+	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-cetogluconato de potássio	-	-	-	+	+	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-

continua

pH	MLSA8 ICB91	MLSA8 ICB194	MLSA9 *S.acidaminiphila*	MLSA9 *S.nitritireducens*	MLSA10 LMG10881	MLSA10 LMG10882	MLSA10 LMG10883	MLSA11 LMG981	MLSA11 LMG10857	MLSA12 *S. dokdonensis*	MLSA12 ICB220	MLSAn.d. ICB89	MLSAn.d. ICB133	MLSAn.d. *S. koreensis*	MLSAn.d. ICB207
4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
11	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
12	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Temperatura															
4ºC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30ºC	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37ºC	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
40ºC	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Salinidade															
1%	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
2%	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
3%	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
4,50%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
6%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
APIZYM															
esterease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
lipase	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
valina arilaminase	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
cistina arilaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
tripsina	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
α-quimotripsina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	f	-	-	-	-
β-galactosidase	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
α-glucosidase	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-glucosidase	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
N-acetil-β-glucosaminidase	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
API 20E															
β-galactosidase	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
arginina dihidrolase	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
lisina descarboxilase	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
ornitina descarboxilase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
citrato	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
urease	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
triptofano desaminase	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
acetoina	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
gelatinase	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
amigdalina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
API 50CH															
glicerol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	+	-	-	n.d.	+
eritritol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	+
d-arabinose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	+
l-arabinose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	+	-	-	n.d.	+
d-ribose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	+	-	-	n.d.	+
d-xilose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
l-xilose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	+
d-adonitol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	+
metil-βD-xilopiranoside	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	+
D-galactose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	+	-	-	n.d.	+
D-glicose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
D-frutose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	+	-	-	-	+
D-manose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
L-sorbose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	+
L-ramnose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	+
dulcitol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	+
inositol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	-	+
D-manitol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	+	-	-	n.d.	+
D-sorbitol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	+
metil-αD-manopiranoside	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	+
metil-αD-glicopiranoside	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	+
N-acetilglicosamina	-	+	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	+	-	-	-	+
amigdalina	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
arbutina	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
salicina	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-celobiose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
D-maltose	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
D-lactose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-melibiose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-sacarose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
D-trehalose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
inulina	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	+
D-melezitose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	-
D-rafinose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	+	n.d.	-
amido	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	n.d.	-
glicogenio	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
xilitol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	-
gentiobiose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	+	-	-	-	+
D-turanose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-lixose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	n.d.	+
D-tagatose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	+
D-fucose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	+
L-fucose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	+
D-arabitol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	+	-	-	n.d.	+
L-arabitol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	+
gluconato de postássio	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	-
2-cetogluconato de potássio	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	-
5-cetogluconato de potássio	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	-

n.d. não determinado;

4.6 Análise de recombinação

Os testes de recombinação foram realizados para os 49 isolados estudados e os 3 genes mais variados, já que o objetivo deste teste foi verificar os sítios polimórficos para cada um dos genes.

A partir dos dados de freqüência alélica, observou-se que o gene mais variado para este teste foi *uvr*B. Após análise dos testes de recombinação, foi possível concluir que o gene *uvr*B apresentou maior quantidade de sítios polimórficos, com 41 alelos e 65 sítios polimórficos, quando comparado com os genes *atp*A e *rec*A (27 alelos e 44 sítios polimórficos; 34 alelos e 30 sítios polimórficos, respectivamente). Este resultado confirma a análise filogenética, uma vez que o gene *uvr*B apresentou maior variação na topologia de sua árvore, favorecendo a mudança de posição para determinadas amostras, fato este que não ocorreu nos dados gerados para os outros genes (Anexo 3).

4.7 Taxonomia *online* de *Stenotrophomonas*

A partir dos dados de MLSA se estabeleceu o primeiro sistema *online* de taxonomia para o gênero *Stenotrophomonas* e bactérias vizinhas filogenéticas, tais como *Xanthomonas* e *Xyllela*. Este banco de dados está localizado fisicamente no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC). O presente sistema pode ser acessado através do endereço http://www.steno.lncc.br. Pesquisadores poderão acessar este sistema e identicar os seus isolados por meio da internet.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5. Conclusões e Perspectivas Futuras

1. O MLSA é uma ferramenta robusta, reprodutível e altamente discriminatória para inferências taxonômicas, filogenéticas, e de estrutura de populações de *Stenotrophomonas*.

2. Isolados de *Stenotrophomonas* podem ser identificados e classificados por meio de MLSA.

3. O grupo das *Stenotrophomonas* ainda necessita de estudos taxonômicos adicionais a fim de se descrever formalmente o novo gênero e as nove espécies novas delineadas neste trabalho.

4. O MLSA é uma alternativa real ao AFLP e HDD na taxonomia de *Stenotrophomonas*.

5. Os dados fenotípicos corroboraram os grupos obtidos no MLSA. A partir destes testes, observaram-se características únicas para grupos que serão diagnósticas para a identificação dos mesmos.

6. Os dados fenotípicos e de MLSA também revelaram que *S. acidaminiphila* é um sinônimo de *S. nitritireducens* enquanto que *S. rhizophila* é um sinônimo de *S. malthophilia*.

Este trabalho abriu novas perspectivas para o estudo da biodiversidade e taxonomia de *Stenotrophomonas* e bactérias vizinhas filogenéticas por meio da

internet. Experimentos de hibridização DNA-DNA são necessários para acessar a similaridade genética entre os grupos MLSA e para descrever as espécies novas. O esquema de MLSA será expandido com a inclusão de novos isolados clínicos e ambientais. Estudos comparativos por meio do MLSA com isolados clínicos provenientes do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE) estão em andamento. Por fim, pretende-se selecionar isolados representativos dos grupos de MLSA para a realização do seqüenciamento completo dos seus genomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

AISENBERG G, ROLSTON KV, DICKEY BF, KONTOYIANNIS DP, RAAD II, SAFDAR A. *Stenotrophomonas maltophilia* pneumonia in cancer patients without traditional risk factors for infection, 1997-2004. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2007 Jan;26(1):13-20.

AL-JASSER AM. *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole: an increasing problem. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**. 2006 Sep 18;5:23.

ALONSO A, MORALES G, ESCALANTE R, CAMPANARIO E, SASTRE L, MARTINEZ JL. Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas* maltophilia physiology. **J Antimicrob Chemother**. 2004 Mar;53(3):432-4. Epub 2004 Jan 22.

APISARNTHANARAK A, FRASER VJ, DUNNE WM, LITTLE JR, HOPPE-BAUER J, MAYFIELD JL, POLISH LB. *Stenotrophomonas maltophilia* intestinal colonization in hospitalized oncology patients with diarrhea. **Clin Infect Dis**. 2003 Oct 15;37(8):1131-5. Epub 2003 Sep 18.

ARPI M, VICTOR MA, MORTENSEN I, GOTTSCHAU A, BRUUN B. In vitro susceptibility of 124 *Xanthomonas maltophilia* (*Stenotrophomonas maltophilia*) isolates: comparison of the agar dilution method with the E-test and two agar diffusion methods. **APMIS**. 1996 Feb;104(2):108-14.

ASSIH EA, OUATTARA AS, THIERRY S, CAYOL JL, LABAT M, MACARIE H. *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **Int J Syst Evol Microbiol.** 2002 Mar;52(Pt 2):559-68.

BERG G, EBERL L, HARTMANN A The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environ Microbiol**. 2005 Nov;7(11):1673-85. Review.

BERG G, ROSKOT N, SMALLA K. Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. **J Clin Microbiol**. 1999 Nov;37(11):3594-600.

BERG JP, REE AH, SANDVIK JA, TASKEN K, LANDMARK BF, TORJESEN PA, HAUG E. 1,25-dihydroxyvitamin D3 alters the effect of cAMP in thyroid cells by increasing the regulatory subunit type II beta of the cAMP-dependent protein kinase. **J Biol Chem**. 1994 Dec 23;269(51):32233-8.

BINKS PR, NICKLIN S, BRUCE NC. Degradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) by *Stenotrophomonas maltophilia* PB1. **Appl Environ Microbiol.** 1995 Apr;61(4):1318-22

BRITT, A. J., N. C. BRUCE, AND C. R. LOWE. 1992. Identification of a cocaine esterase in a strain of *Pseudomonas maltophilia*. **J. Bacteriol**. 174:2087-2094.

CHANG LL, CHEN HF, CHANG CY, LEE TM, WU WJ. Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. **J Antimicrob Chemother.** 2004 Mar;53(3):518-21. Epub 2004 Jan 28.

CHERIF H, KRONVALL G, BJÖRKHOLM M, KALIN M. Bacteraemia in hospitalised patients with malignant blood disorders: a retrospective study of causative agents and their resistance profiles during a 14-year period without antibacterial prophylaxis**. Hematol J.** 2003;4(6):420-6.

COENYE, T., VANLAERE, E., LIPUMA, J. J. & VANDAMME, P. (2004). Identification of genomic groups in the genus *Stenotrophomonas* using gyrB RFLP analysis. **FEMS Immunol Med Microbiol**. 40, 181–185.

COHAN FM. What are bacterial species? **Annu Rev Microbiol.** 2002;56:457-87. Epub 2002 Jan 30. Review

CROWLEY DJ, BOUBRIAK I, BERQUIST BR, CLARK M, RICHARD E, SULLIVAN L, DASSARMA S, MCCREADY S. The uvrA, uvrB and uvrC genes are required for repair of ultraviolet light induced DNA photoproducts in Halobacterium sp. NRC-1. **Saline Systems**. 2006 Sep 13;2:11.

DEBETTE J, BLONDEAU R. Presence of *Pseudomonas maltophilia* in the rhizosphere of several cultivated plants 1980 Apr;26(4):460-3. **Can J Microbiol.**

DENTON M, KERR KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with*Stenotrophomonas maltophilia*. **Clin Microbiol Rev**. 1998 Jan;11(1):57-80. Review.

DENTON M, TODD NJ, KERR KG, HAWKEY PM, LITTLEWOOD JM. Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. **J Clin Microbiol**. 1998 Jul;36(7):1953-8.

DRANCOURT, M., BOLLET, C. & RAOULT, D. (1997). *Stenotrophomonas africana* sp. nov., an opportunistic human pathogen in Africa. **Int J Syst Bacteriol** 47, 160–163.

DUNGAN RS, YATES SR, FRANKENBERGER WT JR. Transformations of selenate and selenite by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from a seleniferous agricultural drainage pond sediment. **Environ Microbiol.** 2003 Apr;5(4):287-95.

FAGES, J. & ARSAC, J.F. Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other plant growth promoting rhizobacteria. **Plant and Soil**, v.137, p.87-90, 1991.

FEIL EJ, MAIDEN MC, ACHTMAN M, SPRATT BG. The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of Neisseria meningitidis. **Mol Biol Evol.** 1999 Nov;16(11):1496-502.

FEIL EJ, SMITH JM, ENRIGHT MC, SPRATT BG. Estimating recombinational parameters in Streptococcus pneumoniae from multilocus sequence typing data. **Genetics.** 2000 Apr;154(4):1439-50.

FEIL EJ, SPRATT BG. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. **Annu Rev Microbiol**. 2001;55:561-90. Review

FEIL EJ, COOPER JE, GRUNDMANN H, ROBINSON DA, ENRIGHT MC, BERENDT T, PEACOCK SJ, SMITH JM, MURPHY M, SPRATT BG, MOORE CE, DAY NP. How clonal is Staphylococcus aureus? **J Bacteriol**. 2003 Jun;185(11):3307-16.

FIGUEIRÊDO PM, FURUMURA MT, SANTOS AM, SOUSA AC, KOTA DJ, LEVY CE, YANO T. Cytotoxic activity of clinical *Stenotrophomonas maltophilia*. **Lett Appl Microbiol.** 2006 Oct;43(4):443-9

FINKMANN W, ALTENDORF K, STACKEBRANDT E, LIPSKI A. Characterization of N2O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2000 Jan;50 Pt 1:273-82.

FUERST JA, HAYWARD AC. The sheathed flagellum of *Pseudomonas stizolobii*. **J Gen Microbiol**. 1969 Oct;58(2):239-45.

GEVERS D, COHAN FM, LAWRENCE JG, SPRATT BG, COENYE T, FEIL EJ, STACKEBRANDT E, VAN DE PEER Y, VANDAMME P, THOMPSON FL, SWINGS J. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. **Nat Rev Microbiol**. 2005 Sep;3(9):733-9. Review.

HASE S, RIETSCHEL ET. Isolation and analysis of the lipid A backbone. Lipid A structure of lipopolysaccharides from various bacterial groups. **Eur J Biochem**. 1976 Mar 16;63(1):101-7.

HAUBEN, L., VAUTERIN, L., MOORE, E. R. B., HOSTE, B. & SWINGS, J. (1999). Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. **Int J Syst Bacteriol** 49, 1749–1760.

HENRICHSEN J. The occurrence of twitching motility among gram-negative bacteria. **Acta Pathol Microbiol Scand** [B]. 1975 Jun;83(3):171-8.

HEYLEN K, VANPARYS B, PEIRSEGAELE F, LEBBE L, DE VOS P. *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. **Int J Syst Evol Microbiol.** 2007 Sep;57(Pt 9):2056-61

HUGH R, & RYSCHENKOW E. *Pseudomonas maltophilia*, an alcaligenes-like species. **J Gen Microbiol**. 1961 Sep;26:123-32.

HUGH R. & GILARDI GL. Pseudomona. In: Lennette EH, Balows A, Hausler W Jr, Truant JP (ed.), **Manual of clinical microbiology**, 3rd ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1980. p. 288-317.

HUGH, R. (1981). Pseudomonas maltophilia sp. nov., nom. rev. **Int J Syst Bacteriol** 31, 195.

IIZUKA, H. & KOMAGATA, K. (1963b). Taxonomy of genus *Pseudomonas* with special reference to their modes of metabolism of carbon compounds. **J Gen Appl Microbiol** 9, 83±95.

IIZUKA, H. & KOMAGATA, K. (1964). Microbiological studies on petroleum and natural gas. I. Determination of hydrocarbonutilizing bacteria**. J Gen Appl Microbiol** 10, 207–221.

JAKOBI M, WINKELMANN G, KAISER D, KEMPLER C, JUNG G, BERG G, BAHL H. Maltophilin: a new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089. **J Antibiot** (Tokyo). 1996 Nov;49(11):1101-4.

JOLLEY KA, FEIL EJ, CHAN MS, MAIDEN MC. Sequence type analysis and recombinational tests (START). **Bioinformatics.** 2001 Dec;17(12):1230-1.

JUHNKE ME, MATHRE DE, SANDS DC. Identification and Characterization of Rhizosphere-Competent Bacteria of Wheat. **Appl Environ Microbiol.** 1987 Dec;53(12):2793-2799.

KERR KG, DENTON M, TODD N, CORPS CM, KUMARI P, HAWKEY PM. A new selective differential medium for isolation of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 1996 Jul;15(7):607-10.

KIM DY, NAM JS, RHEE YH. Characterization of an extracellular medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase from *Pseudomonas alcaligenes* LB19. **Biomacromolecules**. 2002 Mar-Apr;3(2):291-6.

LAMBERT CR, THERON HD, PEPINE CJ. Effects of intracoronary ergonovine on the contralateral coronary artery in patients with atypical chest pain. **Am J Cardiol**. 1990 Dec 1;66(19):1383-5.

LAMBIASE A, RAIA V, DEL PEZZO M, SEPE A, CARNOVALE V, ROSSANO F. Microbiology of airway disease in a cohort of patients with cystic fibrosis. **BMC Infect Dis.** 2006 Jan 11;6:4.

LIU.XW. catena-Poly[di-l3-benzoato-tetra-l2-benzoatodipyrroletricadmium (II). **Acta Cryst.** (2005). E61, m662–m663

LASALA PR, SEGAL J, HAN FS, TARRAND JJ, HAN XY. First reported infections caused by three newly described genera in the family *Xanthomonadaceae.* **J Clin Microbiol**. 2007 Feb;45(2):641-4. Epub 2006 Nov 22.

MAIDEN MC, BYGRAVES JA, FEIL E, MORELLI G, RUSSELL JE, URWIN R, ZHANG Q, ZHOU J, ZURTH K, CAUGANT DA, FEAVERS IM, ACHTMAN M, SPRATT BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the

identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc Natl Acad Sci** U S A. 1998 Mar 17;95(6):3140-5.

MANCINI DA, MENDONCA RM, DIAS AL, MENDONCA RZ, PINTO JR. Co-infection between influenza virus and flagellated bacteria. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 2005 Sep-Oct;47(5):275-80. Epub 2005 Nov 16.

MINKWITZ A, BERG G. Comparison of antifungal activities and 16S ribosomal DNA sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. **J Clin Microbiol**. 2001 Jan;39(1):139-45.

MIKKAT S, GALINSKI EA, BERG G, MINKWITZ A, SCHOOR A. Salt adaptation in pseudomonads: characterization of glucosylglycerol-synthesizing isolates from brackish coastal waters and the rhizosphere. **Syst Appl Microbiol**. 2000 Apr;23(1):31-40.

MONTIE TC, STOVER GB. Isolation and characterization of flagellar preparations from *Pseudomonas* species. **J Clin Microbiol**. 1983 Sep;18(3):452-6.

MOSS, G.I. New methods of crops thinning for citrus. In: Congresso Mundial De Citricultura, 1., 1973, Murcia. Anales... Murcia: **International Society Citriculture**, 1973. v.12, p.243-247.

MOSS, G.I. Promoting fruit-set and yield in sweet orange. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, Melbourn, v.114, p.96-102, 1972.

NAKAYAMA T, HOMMA Y, HASHIDOKO Y, MIZUTANI J, TAHARA S. Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. **Appl. Environ. Microbiol**, 1999 Oct; 65 (10): 4334-9.

NASER SM, THOMPSON FL, HOSTE B, GEVERS D, DAWYNDT P, VANCANNEYT M, SWINGS J. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of Enterococcus species based on rpoA and pheS genes. **Microbiology.** 2005 Jul;151(Pt7):2141-50.

PATHMANATHAN A, WATERER GW. Significance of positive *Stenotrophomonas maltophilia* culture in acute respiratory tract infection. **Eur Respir J**. 2005 May;25(5):911-4.

PALLERONNI, N. J.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDOROFF, M. 1973. Nucleic-acid homologies in genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology** 23:623-627.

PALLERONI NJ, BRADBURY JF. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. **Int J Syst Bacteriol**. 1993 Jul;43(3):606-9.

RADEMAKER JL, HOSTE B, LOUWS FJ, KERSTERS K, SWINGS J, VAUTERIN L, VAUTERIN P, DE BRUIJN FJ. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: Xanthomonas as a model system. **Int J Syst Evol Microbiol.** 2000 Mar;50 Pt 2:665-77.

RAMOS, P.L. **Caracterização molecular de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a gramíneas de importância econômica**. 2003, 78f (Dissertação de Mestrado) USP-2003

RIBBECK-BUSCH K, RODER A, HASSE D, DE BOER W, MARTINEZ JL, HAGEMANN M, BERG G. A molecular biological protocol to distinguish potentially human pathogenic *Stenotrophomonas maltophilia* from plant-associated *Stenotrophomonas rhizophila*. **Environ Microbiol**. 2005 Nov;7(11):1853-8.

RODER A, HOFFMANN E, HAGEMANN M, BERG G Synthesis of the compatible solutes glucosylglycerol and trehalose by salt-stressed cells of *Stenotrophomonas* strains. **FEMS Microbiol Lett**. 2005 Feb 1;243(1):219-26.

SAFDAR A, RODRIGUEZ GH, BALAKRISHNAN M, TARRAND JJ, ROLSTON KV. Changing trends in etiology of bacteremia in patients with cancer. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2006 Aug;25(8):522-6.

SANTOS SR, OCHMAN H. Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. **Environ Microbiol.** 2004 Jul;6(7):754-9.

SARKAR SF, GUTTMAN DS. Evolution of the core genome of Pseudomonas syringae, a highly clonal, endemic plant pathogen. **Appl Environ Microbiol.** 2004 Apr;70(4):1999-2012.

SCALLY M, SCHUENZEL EL, STOUTHAMER R, NUNNEY L. Multilocus sequence type system for the plant pathogen Xylella fastidiosa and relative contributions of recombination and point mutation to clonal diversity. **Appl Environ Microbiol.** 2005 Dec;71(12):8491-9.

SHAMBERGER RJ. Effects of blood and urine on lead analyzed by flameless atomic absorption. **J Clin Chem Clin Biochem**. 1983 Feb;21(2):107-11.

SANSCHAGRIN F, LEVESQUE RC. A specific peptide inhibitor of the class B metallo-beta-lactamase L-1 from *Stenotrophomonas maltophilia* identified using phage display. **J Antimicrob Chemother**. 2005 Feb;55(2):252-5. Epub 2005 Jan 19.

SANSCHAGRIN F, DUFRESNE J, LEVESQUE RC Molecular heterogeneity of the L-1 metallo-beta-lactamase family from *Stenotrophomonas maltophilia*. **Antimicrob Agents Chemother**. 1998 May;42(5):1245-8.

STACKEBRANDT E, FREDERIKSEN W, GARRITY GM, GRIMONT PA, KAMPFER P, MAIDEN MC, NESME X, ROSSELLO-MORA R, SWINGS J, TRUPER HG, VAUTERIN L, WARD AC, WHITMAN WB. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2002 May;52(Pt 3):1043-7.

STEINER H, KISPAL G, ZOLLNER A, HAID A, NEUPERT W, LILL R. Heme binding to a conserved Cys-Pro-Val motif is crucial for the catalytic function of mitochondrial heme lyases. **J Biol Chem**. 1996 Dec 20;271(51):32605-11.

THOMPSON CC, THOMPSON FL, VANDEMEULEBROECKE K, HOSTE B, DAWYNDT P, SWINGS J. Use of recA as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. **Int J Syst Evol Microbiol.** 2004 May;54(Pt 3):919-24.

THOMPSON FL, GEVERS D, THOMPSON CC, DAWYNDT P, NASER S, HOSTE B, MUNN CB, SWINGS J. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. **Appl Environ Microbiol**. 2005 Sep;71(9):5107-15.

TRUGLIO JJ, CROTEAU DL, SKORVAGA M, DELLAVECCHIA MJ, THEIS K, MANDAVILLI BS, VAN HOUTEN B, KISKER C. Interactions between UvrA and UvrB: the role of UvrB's domain 2 in nucleotide excision repair. **EMBO J.** 2004 Jul 7;23(13):2498-509. Epub 2004 Jun 10.

TSAVKELOVA EA, CHERDYNTSEVA TA, BOTINA SG, NETRUSOV AI. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiol Res**. 2007;162(1):69-76. Epub 2006 Nov 30.

VAN DEN MOOTER M, SWINGS J. Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. **Int J Syst Bacteriol**. 1990 Oct;40(4):348-69.

VANLAERE E, HANSRAJ F, VANDAMME PA, GOVAN JR. Growth in Stewart's medium is a simple, rapid and inexpensive screening tool for the identification of

Burkholderia cepacia complex. **J Cyst Fibros**. 2006 May;5(2):137-9. Epub 2006 Jan 4.

VICKERS IE, SMIKLE MF. The immunomodulatory effect of antibiotics on the secretion of tumour necrosis factor alpha by peripheral blood mononuclear cells in response to *Stenotrophomonas maltophilia* stimulation. **West Indian Med J**. 2006 Jun;55(3):138-41.

WECKESSER J, KATZ A, DREWS G, MAYER H, FROMME I. Lipopolysaccharide containing L-acofriose in the filamentous blue-green alga Anabaena variabilis. **J Bacteriol.** 1974 Nov;120(2):672-8.

WELLINGHAUSEN N, WIRTHS B, FRANZ AR, KAROLYI L, MARRE R, REISCHL U. Algorithm for the identification of bacterial pathogens in positive blood cultures by real-time LightCycler polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific probes. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2004 Apr;48(4):229-41.

WILKINSON GT. The in vitro activity of nitroxoline against organisms isolated from dogs and cats. **Vet Rec**. 1973 Jan 27;92(4):93-4

WILKINSON, K.G.; DIXON, K.W.; SIVASITHAMPARAM, K. & GHISALBERTI, E.L. Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. **Plant Soil**, 159:291-295, 1994

WOLF A, FRITZE A, HAGEMANN M, BERG G. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2002 Nov;52(Pt 6):1937-44.

WU PS, LU CY, CHANG LY, HSUEH PR, LEE PI, CHEN JM, LEE CY, CHAN PC, CHANG PY, YANG TT, HUANG LM. *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in pediatric patients a 10-year analysis. **J Microbiol Immunol Infect**. 2006 Apr;39(2):144-9.

YAMAMURA S, MORITA Y, HASAN Q, YOKOYAMA K, TAMIYA E. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. **Biochem Biophys Res Commun**. 2002 Jun 28;294(5):1138-43.

YANG B, HALL CL, YANG BL, SAVANI RC, TURLEY EA. Identification of a novel heparin binding domain in RHAMM and evidence that it modifies HA mediated locomotion of ras-transformedcells. **J Cell Biochem**. 1994 Dec;56(4):455-68

YANG HC, IM WT, KANG MS, SHIN DY, LEE ST. *Stenotrophomonas koreensis* sp. nov., isolated from compost in South Korea. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2006 Jan;56(Pt 1):81-4.

YAO JDC, CONLY JM, KRAJDEN M. Molecular typing of *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* by DNA macrorestriction analysis and random amplified polymorphic DNA analysis. **J Clin Microbiol** 1995;33(8):2195-8.

YOON JH, KANG SJ, OH HW, OH TK. *Stenotrophomonas dokdonensis* sp. nov., isolated from soil. **Int J Syst Evol Microbiol.** 2006 Jun;56(Pt 6):1363-7.

ZEIGLER DR. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. Int **J Syst Evol Microbiol**. 2003 Nov;53(Pt 6):1893-900.

ZHANG L, LI XZ, POOLE K. Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: involvement of a multidrug efflux system.**Antimicrob Agents Chemother**. 2000 Feb;44(2):287-93.

ANEXOS

7. Anexos

Anexo 1

Isolados bacterianos

Linhagens e isolados estudados no presente trabalho, origem e grupos genômicos.

Linhagens	Origem	Grupo genômico
LMG 957	Cultura de sangue humano	(ND)*
LMG 958^T	Paciente com cancer oral	(6) *
LMG 978	Planta	(ND) *
LMG 980	*Hibiscus rosa-sinensis*	(ND) *
LMG 981	Solo	(ND) *
LMG 1108	Brânquias de peixe	(5) *
LMG 6608	Rizosfera	(9) *
LMG 10851	Cultura de sangue humano	(5) *
LMG 10853	Secreção traqueal	(3) *
LMG 10857	Cultura de sangue humano	(10) *
LMG 10874	Cultura de sangue humano	(4) *
LMG 10877	Paciente com sinusite	(5) *
LMG 10878	Paciente com sinusite	(4) *
LMG 10879	Arroz	(9) *
LMG 10881	Peixe	(ND*)
LMG 10882	Esgoto	(ND) *
LMG 10883	Fruta congelada	(1) *
LMG 10887	Mar contaminado com óleo	(ND) *
LMG 10888	Mar contaminado com óleo	(ND) *
LMG 10890	Solo	(9) *
LMG 10989	Bilis	(ND) *
LMG 10991	Perna infeccionada	(2) *
LMG 10992	Secreção pulmonary	(6) *
LMG 10996	Perna ulcerada	(2) *
LMG 11000	Bilis	(2) *
LMG 11002	Infecção mamária	(3) *
LMG 11004	Urina	(2) *
LMG 11087	Rizosfera	(9) *
LMG 11108	Rizosfera	(9) *
LMG 11111	Catéter	(2) *
LMG 11114	Cultura de sangue humano	(1) *
LMG 22072^T *S.africana*	Paciente HIV positivo	(ND)
LMG 22073 ^{T} *S.acidaminiphila*	Reator UASB	(ND)
LMG 22074 ^{T} *S. nitritireducens*	Biofiltro	(ND)
LMG 22075 ^{T} *S. rhizophila*	Canola e batata	(ND)
DSMZ 17805 ^{T} *S. koreensis*	Composto (palha +esterco)	(ND)
CIP 108839 ^{T} *S. dokdonensis*	Solo	(ND)
ICB 89	Cana-de-açúcar	(ND)
ICB 91	Cana-de-açúcar	(ND)
ICB 128	Colmo de trigo	(ND)
ICB129	Colmo de Trigo	(ND)
ICB 130	Raiz de triticale	(ND)
ICB 133	Raiz de trigo	(ND)
ICB 134	Raiz de trigo	(ND)
ICB 141	Raiz de trigo	(ND)
ICB 194	Cana-de-açúcar	(ND)
ICB 207	Cana-de-açúcar	(ND)

ICB 209	Cana-de-açúcar	(ND)
ICB 220	Cana-de-açúcar	(ND)

Grupo genômico* ND (Não determinado). Os grupos genômicos foram determinados por Hauben *et al* (1999). Os isolados ambientais e as novas linhagens tipo não possuem grupos genômicos determinados.

Cultivo das linhagens

As linhagens tipo e de referência, provenientes da coleção de cultura LMG encontravam-se liofilizadas e foram reativadas em meio líquido Trypticase Soy Broth (TSB; Difco). Posteriormente essas linhagens foram cultivadas em meio sólido Trypticase soy agar (TSA; Difco) para verificação de pureza e testes de Gram.

Já as linhagens ambientais provenientes do estudo de Ramos (2003) estavam preservadas em glicerol (10% - v/v) em freezer -80ºC. Cerca de 100 µL das culturas criporeservadas foram reativada em 3 mL de meio de cultura TSB. Posteriormente, realizou-se repique em meio de cultura TSA (tabela 2b) para verificação de pureza e teste de Gram.

Todos os isolados foram cultivados a temperatura de 30ºC por 24 horas apresentando crescimento ótimo.

Composição dos meios de cultura utilizados

Os meios de cultura considerados ideais para o crescimento das bactérias do gênero *Stenotrophomonas* são TSA (Triptona Soy Agar) e NA (Nutriente Agar). Porém esses meios podem ter algumas soluções acrescidas o que é sugerido por alguns pesquisadores. A composição dos meios utilizados neste trabalho está listada abaixo e para ambas as formulações foi utilizada água destilada.

Formulação do meio NA

Composição	g/L
Lab-Lemco beef extract	1
Extrato de levedura	2
Peptona	5
NaCl	5
Agar	15
pH	7,4

Formulação do meio TSA

Composição	g/L
Triptona	15 g
Soja peptona	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
pH	7,0

Teste de Gram

Todos os isolados e linhagens foram submetidos ao teste de Gram. Inicialmente foi feito um esfregaço a partir de uma colônia pura em lâmina de vidro, esse esfregaço foi coberto pela solução cristal violeta durante 1 minuto, posteriormente o corante foi descartado e a lâmina foi lavada em água destilada. Na segunda etapa o esfregaço foi coberto novamente com solução lugol durante 1 minuto, novamente lavado em água destilada e depois submerso em álcool acetonado em posição de 90º durante 30 segundos. Foi realizada a lavagem em água destilada e mais uma vez corado em solução safranina por 5 minutos. Foi realizada mais uma lavagem em água destilada. Finalmente quando a lâmina estava completamente seca foi realizada a leitura em microscópio para confirmação do tipo de Gram.

Anexo 2

Dados de teste de recombinação

Freqüência alélica

Alelo	*atp*A	*rec*A	*uvr*B
1	7	6	4
2	6	1	1
3	3	1	1
4	1	1	1
5	1	1	1
6	1	1	2
7	1	1	1
8	1	1	1
9	2	2	1
10	3	1	1
11	3	1	2
12	3	1	1
13	1	1	1
14	1	1	1
15	1	1	1
16	1	1	1
17	1	1	1
18	1	3	1
19	1	1	2
20	1	1	1
21	2	1	1
22	2	1	1
23	1	2	2
24	1	1	1
25	1	3	1
26	1	2	1
27	1	1	1
28	-	3	1

29	-	1	1
30	-	1	1
31	-	2	1
32	-	1	1
33	-	1	2
34	-	1	1
35	-	-	1
36	-	-	1
37	-	-	1
38	-	-	1
39	-	-	1
40	-	-	1
41	-	-	1
Total	**27**	**34**	**41**

Teste de Sawyer (10000 repetições).

Sítios Polimórficos Silenciosos

Locus	Sítios polimórficos silenciosos	Twofold degenerate sites	Threefold degenerate sites	Fourfold degenerate sites	Mixed degenerate sites
atpA	21	6	2	11	2
recA	21	6	2	10	3
uvrB	5	2	0	2	1

atpA fragmentos mais condensados

Tamanho	**Fragmento condensado**	**Seqüências**
21	1 - 21	atpA20 / atpA21
21	1 - 21	atpA19 / atpA21
21	1 - 21	atpA19 / atpA20
21	1 - 21	atpA18 / atpA21

atpA fragmentos menos condensado

Tamanho	Fragmento menos condensado	Seqüências
167	1 - 167	atpA26 / atpA27
167	1 - 167	atpA25 / atpA27
167	1 - 167	atpA25 / atpA26
167	1 - 167	atpA23 / atpA27

***rec*A** fragmentos mais condensados

Tamanho	Fragmento condensado	Seqüências
21	1 - 21	recA10 / recA12
21	1 - 21	recA5 / recA14
21	1 - 21	recA1 / recA14
21	1 - 21	recA1 / recA5

***rec*A** fragmento menos condensado

Tamanho	Fragmento menos condensado	Seqüências
117	1 - 117	recA33 / recA34
117	1 - 117	recA31 / recA32
117	1 - 117	recA28 / recA29
117	1 - 117	recA23 / recA25

***uvr*B** fragmento mais condensado

Tamanho	Fragmento condensado	Seqüências
5	1 - 5	uvrB3 / uvrB4
5	1 - 5	uvrB2 / uvrB5
5	1 - 5	uvrB1 / uvrB5
5	1 - 5	uvrB1 / uvrB2

***uvr*B** fragmento menos condensado

tamanho	Fragment menos condensado	Sequencias
101	1 - 101	uvrB40 / uvrB41
101	1 - 101	uvrB39 / uvrB41
101	1 - 101	uvrB39 / uvrB40
101	1 - 101	uvrB36 / uvrB41

Conteúdo de GC %

Isolados	***atp*A**	***rec*A**	***uvr*B**	**%GC**
LMG958T	63,10	57,26	62,75	**61,04**
LMG22075T	62,50	57,26	62,75	**60,84**
LMG10991	63,10	57,26	61,76	**60,71**
LMG10996	63,10	57,26	60,78	**60,38**
LMG11000	63,10	57,26	59,80	**60,05**
LMG10992	62,50	57,26	62,75	**60,84**
LMG22072T	63,10	57,26	62,75	**61,04**
LMG22073T	65,48	60,68	62,75	**62,97**
LMG22074T	62,50	60,68	65,69	**62,96**
DSMZ17805T	62,50	57,26	64,71	**61,49**
CIP108839T	62,50	55,56	62,75	**60,27**
LMG10877	62,50	58,12	63,73	**61,45**
LMG10878	63,10	57,26	60,78	**60,38**
LMG10882	63,10	57,26	56,86	**59,07**
LMG10883	62,50	57,26	60,78	**60,18**
LMG10881	63,10	57,26	67,65	**62,67**
LMG10989	62,50	57,26	60,78	**60,18**
LMG11004	63,10	57,26	59,80	**60,05**
LMG11087	62,50	57,26	59,80	**59,86**
LMG11108	63,10	57,26	61,76	**60,71**
LMG11111	63,10	57,26	61,76	**60,71**
LMG978	64,88	59,83	59,80	**61,50**

LMG980	64,88	58,97	57,84	**60,57**
LMG981	64,29	56,41	63,73	**61,47**
LMG1108	62,50	56,41	62,75	**60,55**
LMG10851	64,88	56,41	63,73	**61,67**
LMG957	64,88	60,68	62,75	**62,77**
LMG6608	63,10	58,12	58,82	**60,01**
LMG10874	63,10	58,12	61,76	**60,99**
LMG10879	63,10	58,12	66,67	**62,63**
LMG10887	63,10	58,12	59,80	**60,34**
LMG10888	63,10	58,12	54,90	**58,71**
LMG10890	63,10	54,70	66,67	**61,49**
LMG11114	63,69	58,12	61,76	**61,19**
ICB89	63,69	58,12	55,88	**59,23**
ICB128	63,69	58,12	58,82	**60,21**
ICB91	64,29	59,83	59,80	**61,31**
ICB194	63,69	59,83	52,94	**58,82**
ICB129	64,29	58,97	62,75	**62,00**
ICB130	63,10	59,83	62,75	**61,89**
ICB133	64,88	59,83	57,84	**60,85**
ICB134	63,10	59,83	61,76	**61,56**
ICB141	64,88	59,83	62,75	**62,49**
ICB209	63,10	56,41	62,75	**60,75**
ICB220	64,29	57,26	62,75	**61,43**
ICB207	63,69	57,26	58,82	**59,93**
LMG10857	64,88	57,26	63,73	**61,96**
LMG11002	64,29	60,68	56,86	**60,61**
LMG10853	63,10	60,68	62,75	**62,17**
Média	**63,46**	**58,05**	**61,36**	**60,96**

Teste de Homoplasia

Determinação do número de sítios informativos para cada gene

Gene	Alelos analisados	Sítios variáveis	Sítios informativos
atpA	27	21	14

recA	34	21	16
uvrB	41	5	3

Sítios Polimórficos de *atp*A

27 alelos, 44 sítios polimórficos

Freqüência de polimorfismos(Número de alélos e linhagens com polimorfismos)

Posição	G alleles	A alleles	T alleles	C alleles	G strains	A strains	T strains	C strains
2	4	-	23	-	6	-	43	-
10	-	-	4	23	-	-	4	45
16	-	-	2	25	-	-	2	47
19	-	-	1 (atpA26)	26	-	-	1 (ICB91)	48
22	-	-	24	3	-	-	46	3
31	-	-	3	24	-	-	3	46
38	7	20	-	-	9	40	-	-
46	-	-	26	1 (atpA7)	-	-	48	1 (ICB220)
52	-	-	1 (atpA27)	26	-	-	1 (ICB129)	48
61	-	-	1 (atpA25)	26	-	-	1 (ICB194)	48
64	26	1 (atpA7)	-	-	48	1 (ICB220)	-	-
67	3	-	-	24	3	-	-	46
69	1 (atpA 25)	-	-	26	1 (ICB194)	-	-	48
70	20	1 (atpA20)	-	6	40	1 (LMG11002)	-	8
71	-	21	-	6	-	41	-	8
76	14	-	-	13	32	-	-	17
82	-	-	22	5	-	-	44	5
85	17	-	-	10	28	-	-	21
86	25	2	-	-	47	2	-	-
88	25	-	-	2	47	-	-	2
100	26	1 (atpA26)	-	-	48	1 (ICB91)	-	-
101	26	1 (atpA5)	-	-	48	1 (DSMZ17805T)	-	-

102	25	2	-	-	47	2	-	-
103	-	1 (atpA26)	-	26	-	1 (ICB91)	-	48
112	-	-	1 (atpA7)	26	-	-	1 (ICB220)	48
121	22	3	-	2	40	7	-	2
127	4	5	14	4	4	7	34	4
130	25	-	-	2	47	-	-	2
134	26	-	1 (atpA24)	-	48	-	1 (ICB207)	-
136	1 (atpA 24)	-	-	26	1 (ICB207)	-	-	48
145	2	-	15	10	2	-	35	12
148	25	-	2	-	47	-	2	-
149	-	24	3	-	-	46	3	-
150	-	1 (atpA24)	-	26	-	1 (ICB207)	-	48
151	2	-	-	25	2	-	-	47
152	13	13	-	1 (atpA24)	15	33	-	1 (ICB207)
153	1 (atpA 24)	-	26	-	1 (ICB207)	-	48	-
154	5	-	9	13	5	-	11	33
156	1 (atpA 24)	-	-	26	1 (ICB207)	-	-	48
158	-	25	-	2	-	47	-	2
160	-	-	1 (atpA24)	26	-	-	1 (ICB207)	48
161	2	25	-	-	2	47	-	-
163	2	-	-	25	2	-	-	47
166	25	-	-	2	47	-	-	2

Sítios Polimórficos de *rec*A

34 alelos, 30 sítios polimórficos

Freqüência de polimorfismos(Número de alélos e linhagens com polimorfismos)

Posição	G alleles	A alleles	T alleles	C alleles	G strains	A strains	T strains	C strains
9	-	-	11	23	-	-	16	33
12	-	1	3	30	-	2	3	44

		(recA9)						
13	-	-	33	1 (recA9)	-	-	47	2
14	-	-	1 (recA9)	33	-	-	2	47
15	32	-	1 (recA24)	1 (recA11)	47	-	1 (LMG10890)	1 (LMG10989)
18	16	2	-	16	21	2	-	26
21	-	-	4	30	-	-	7	42
22	-	1 (recA9)	-	33	-	2	-	47
27	-	-	7	27	-	-	10	39
30	-	-	2	32	-	-	2	47
33	-	-	6	28	-	-	8	41
36	-	-	22	12	-	-	33	16
42	-	-	10	24	-	-	10	39
45	33	-	-	1 (recA13)	48	-	-	1 (LMG11087)
51	33	1 (recA18)	-	-	46	3	-	-
57	-	-	14	20	-	-	22	27
60	-	-	3	31	-	-	3	46
63	33	1 (recA6)	-	-	48	1 (CIP108839T)	-	-
69	-	-	3	31	-	-	3	46
72	-	1 (recA15)	9	24	-	1 (LMG11111)	17	31
82	-	33	-	1 (recA6)	-	48	-	1 (CIP108839T)
83	1 (recA6)	33	-	-	1 (CIP108839T)	48	-	-
93	6	-	-	28	6	-	-	43
94	32	1 (recA6)	1 (recA20)	-	47	1 (CIP108839T)	1 (LMG6608)	-
95	1 (recA20)	-	33	-	1 (LMG6608)	-	48	-
96	1 (recA11)	-	-	33	1 (LMG10989)	-	-	48
105	33	1 (recA9)	-	-	47	2	-	-
111	20	11	1 (recA30)	2	27	19	1 (ICB209)	2
114	8	1 (recA6)	20	5	11	1 (CIP108839T)	32	5
117	33	-	-	1 (recA17)	48	-	-	1 (LMG980)

Sítios Polimórficos de *uvr*B

41 alelos, 65 sítios polimórficos

Freqüência de polimorfismos(Número de alélos e linhagens com polimorfismos)

Posição	G alleles	A alleles	T alleles	C alleles	G strains	A strains	T strains	C strains
1	2	6	4	29	2	6	4	37
4	26	11	3	1 **(uvrB34)**	33	12	3	1 **(ICB130)**
5	1 **(uvrB38)**	-	35	5	1 **(ICB128)**	-	43	5
6	3	-	2	36	3	-	2	44
7	38	-	-	3	45	-	-	4
8	39	1 **(uvrB38)**	1 **(uvrB34)**	-	47	1 **(ICB128)**	1 **(ICB130)**	-
9	1 **(uvrB38)**	39	-	1 **(uvrB34)**	1 **(ICB128)**	47	-	1 **(ICB130)**
10	1 **(uvrB38)**	-	1 **(uvrB9)**	39	1 **(ICB128)**	-	1 **(LMG10888)**	47
11	-	39	1 **(uvrB38)**	1 **(uvrB34)**	-	47	1 **(ICB128)**	1 **(ICB130)**
12	40	-	-	1 **(uvrB38)**	48	-	-	1 **(ICB128)**
13	3	-	5	33	3	-	5	41
14	39	1 **(uvrB38)**	-	1 **(uvrB34)**	47	1 **(ICB128)**	-	1 **(ICB130)**
15	2	39	-	-	2	47	-	-
16	21	20	-	-	24	25	-	-
17	39	-	-	2	47	-	-	2
18	-	-	1 **(uvrB38)**	40	-	-	1 **(ICB128)**	48
19	32	3	1 **(uvrB35)**	5	39	4	1 **(ICB194)**	5
20	8	1 **(uvrB38)**	3	29	9	1 **(ICB128)**	4	35
21	-	1 **(uvrB34)**	40	-	-	1 **(ICB130)**	48	-
22	40	-	1 **(uvrB40)**	-	48	-	1 **(ICB207)**	-
23	1 **(uvrB34)**	-	1 **(uvrB31)**	39	1 **(ICB130)**	-	1 **(ICB91)**	47
24	39	-	1 **(uvrB17)**	1 **(uvrB34)**	47	-	1 **(LMG978)**	1 **(ICB130)**

25	4	-	1 **(uvrB40)**	36	5	-	1 **(ICB207)**	43
26	-	28	-	13	-	32	-	17
27	-	1 **(uvrB17)**	38	2	-	1 **(LMG978)**	46	2
28	9	-	2	30	11	-	3	35
30	-	40	1 **(uvrB34)**	-	-	48	1 **(ICB130)**	-
31	23	18	-	-	29	20	-	-
32	-	1 **(uvrB34)**	3	37	-	1 **(ICB130)**	3	45
33	1 **(uvrB38)**	-	40	-	1 **(ICB128)**	-	48	-
34	38	1 **(uvrB38)**	2	-	46	1 **(ICB128)**	2	-
37	1 **(uvrB32)**	-	6	34	1 **(ICB89)**	-	8	40
40	-	2	31	8	-	2	35	12
43	1 **(uvrB25)**	-	2	38	1 **(LMG10991)**	-	2	46
45	-	40	1 **(uvrB25)**	-	-	48	1 **(LMG10991)**	-
46	37	2	-	2	45	2	-	2
47	36	5	-	-	44	5	-	-
49	7	-	-	34	7	-	-	42
50	40	-	-	1 **(uvrB38)**	48	-	-	1 **(ICB128)**
52	37	4	-	-	45	4	-	-
53	-	32	-	9	-	39	-	10
54	1 **(uvrB21)**	40	-	-	1 **(LMG10883)**	48	-	-
55	38	1 **(uvrB10)**	-	2	46	1 **(LMG10996)**	-	2
56	-	35	-	6	-	42	-	7
58	8	-	-	33	9	-	-	40
59	2	39	-	-	2	47	-	-
60	10	-	-	31	11	-	-	38
61	10	3	-	28	11	3	-	35
62	-	18	3	20	-	19	4	26
70	-	1 **(uvrB32)**	23	17	-	1 **(ICB89)**	25	23
73	37	4	-	-	44	5	-	-
74	-	-	3	38	-	-	3	46
76	10	-	2	29	10	-	2	37
79	1	-	-	40	2	-	-	47

	(uvrB11)							
82	1 **(uvrB40)**	-	10	30	1 **(ICB207)**	-	14	34
85	29	12	-	-	35	14	-	-
87	8	1 **(uvrB35)**	-	32	8	1 **(ICB194)**	-	40
88	23	1 **(uvrB36)**	1 **(uvrB21)**	16	29	1 **(ICB209)**	1 **(LMG10883)**	18
89	-	12	-	29	-	15	-	34
91	39	-	-	2	47	-	-	2
96	3	38	-	-	3	46	-	-
97	10	2	-	29	11	2	-	36
98	-	28	-	13	-	35	-	14
101	-	12	-	29	-	12	-	37
102	-	28	11	2	-	35	11	3

Anexo 3

Trabalho submetido à publicação no IJSM - Taxonomy of the genus *Stenotrophomonas* by means of multilocus sequence analysis (MLSA)