

Variabilidade Genética de Linhagens de *Zymomonas mobilis* UFPEDA pelo Sequenciamento do Gene 16S rDNA

A. L. S. Câmara¹; L. C. N. Silva¹; L. M. S. Oliveira¹; J. M. Araújo²; M. V. Silva¹

¹ Departamento de Bioquímica/Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-PE, Brasil

² Departamento de Antibióticos/Laboratório de Genética de Micro-organismos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-PE, Brasil

luisclaudionsilva@yahoo.com.br;

(Recebido em 02 de março de 2013; aceito em 30 de agosto de 2013)

Tradicionalmente diversas técnicas fenotípicas são aplicadas para caracterizar bactérias, entretanto, os avanços nas técnicas moleculares têm possibilitado maiores índices de especificidade e confiabilidade. Nesse caso, a maioria dos métodos utilizados compreende a aplicação de PCR (Polymerase Chain Reaction) para estudos de marcadores genético-moleculares, dentre eles se destaca o gene 16S rDNA, devido sua elevada conservação intraespecífica. *Zymomonas mobilis* tem atraído considerável interesse devido à sua elevada aptidão biotecnológica. A variabilidade genética em sete linhagens de *Zymomonas mobilis* UFPEDA foi analisada por meio do sequenciamento e perfil de restrição do gene 16S rDNA. Cada linhagem foi cultivada em meio SSDL por 24 horas à 30° para extração de DNA. As reações de PCR foram realizadas com iniciadores e condições específicas para a amplificação do gene 16S rDNA. Os fragmentos obtidos foram sequenciados e analisados com os programas BLASTn e MultAlin. Os perfis de restrição teórico das endonucleases de restrição *HaeIII*, *NdeII* e *StuI* foram gerados a partir do DistinctiEnz. Por fim, foi construído um cladograma com o programa ClustalW pelo método de neighbor-joining. Verificou-se o grau de conservação do gene 16S rDNA de linhagens de *Z. mobilis* UFPEDA, sendo possível observar diversos eventos de mutações pontuais, responsáveis pelo diferente padrão de clivagem entre as linhagens UFPEDA e as linhagens das coleções européias, não sendo possível subtipar as primeiras por esta técnica. Este trabalho evidencia diferenças genéticas nas linhagens UFPEDA que devem ser relacionadas com o padrão fisiológico visando aprimorar a aptidão biotecnológica dessa coleção.

Palavras-chave: *Zymomonas mobilis*, 16S rDNA, filogenia.

Genetic Variability of *Zymomonas mobilis* UFPEDA strains by 16S rDNA Gene Sequencing

Traditionally, several phenotypic techniques have been applied to investigate bacterial characterization, however, advances in molecular techniques have enabled higher levels of specificity and reliability. In this case, most methods used include the application of PCR (Polymerase Chain Reaction) studying genetic-molecular markers, among them stands the 16S rDNA, because of its high intraspecific conservation. The bacterium *Z. mobilis* has attracted considerable interest due to its biotechnology potential. The genetic variability among seven strains of *Zymomonas mobilis* UFPEDA was analyzed by the sequencing and the restriction patterns of 16S rDNA. Each strain was grown in SSDL for 24 hours at 30 degrees, followed by centrifugation and DNA extraction. PCR reactions were performed with primers and conditions for amplification of the 16S rDNA. The fragments were sequenced and analyzed with the programs BLASTn, MultAlin. The theoretical restriction patterns of restriction endonucleases *HaeIII*, *NdeII* and *StuI* were generated from DistinctiEnz. Finally, a cladogram was built using the program ClustalW by neighbor-joining method. It was verified the degree of conservation of the 16S rDNA of strains of *Z. mobilis*, and can be observed several events of mutations that certainly was responsible for the different pattern of cleavage between the UFPEDA lines o and the lines of European collections, it is not possible subtyping the first by this technique. This work evidences genetic differences in UFPEDA strains which to be related to the physiological pattern aiming to improve the biotechnology ability of this collection.

Keywords: *Zymomonas mobilis*, 16S rDNA, phylogeny.

1. INTRODUÇÃO

Zymomonas mobilis são bactérias gram-negativas, anaeróbias facultativas, pertencentes ao subgrupo α proteobactérias. Microscopicamente, as células se apresentam em forma de bastonetes curtos e grossos, com 2,0 a 6,0 μm de comprimento e 1,0 a 4,0 μm de largura, geralmente agrupadas aos pares e apresentam de 1 a 4 flagelos. Essas bactérias não formam esporos ou cápsula e também não apresentam lipídios intracelulares ou glicogênio. Apresentam colônias de coloração branca, lenticulares, de bordas irregulares. Em meio líquido, seu crescimento é caracterizado pela alta densidade celular dispersa, como também pelo sedimento [1, 2, 3, 4].

Essas bactérias ocorrem em regiões de clima tropical, normalmente associada a plantas com seivas contendo alto teor de açúcar, não sendo patogênica ao homem, animais ou plantas. O crescimento pode ocorrer em pH de 3,5 a 7,5 e em temperatura variando entre 25° a 42°C. Muitas linhagens são tolerantes ao álcool, crescendo em meio com glicose acima de 25%. A cepa de *Z. mobilis* CP4, por exemplo, cresce a temperatura de 38°C e não tolera concentração de cloreto de sódio (NaCl) maior que 1% [5, 6, 7].

Z. mobilis tem atraído considerável interesse como resultado de seu rápido metabolismo e eficiente habilidade em produzir etanol a partir de açúcares simples. No entanto, apesar das aparentes vantagens como maiores rendimentos, taxas de crescimento específicas mais rápidas, menor produção de biomassas, não necessidade de adição controlada de oxigênio e boa receptividade à manipulação genética, principalmente quando comparada à *Saccharomyces cerevisiae*, principalmente micro-organismos utilizados na produção de etanol; ainda não existem, plantas em escala industrial que utilizem *Z. mobilis* para produção de etanol combustível [8].

Atualmente, muitos avanços vêm sendo obtidos na genética de *Z. mobilis* com o emprego de técnicas da biologia molecular, as quais podem ser utilizadas para as mais diversas aplicações, visando estudos de biodiversidade bem como das principais enzimas envolvidas na utilização de açúcares [9, 10, 11, 12], e produção de levana [10].

A Coleção de Culturas de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos (UFPEDA) teve seu início em 1951, com culturas trazidas do México pelo Professor Oswaldo Gonçalves de Lima. O acervo inicial era de cerca de 200 linhagens, formado por actinobactérias, leveduras e eubactérias, e dentre essas estava a linhagem de *Z. mobilis* AG-11. Com a fundação do Instituto de Antibióticos em oito de março de 1952, a coleção foi consolidada, tendo como função principal a preservação de micro-organismos produtores de antibióticos, isolados e identificados por pesquisadores do próprio Instituto e de outras instituições. Em decorrência da ampliação das áreas de pesquisa do Instituto, ao longo dos anos foram adicionadas linhagens microbianas de interesse para a indústria, para a saúde humana e animal, para a agricultura e para o meio ambiente.

Desse modo as linhagens de *Z. mobilis* depositadas na Coleção de Culturas da UFPEDA representam um patrimônio de grande importância biotecnológica em decorrência dos vários metabólitos produzidos por esta bactéria. Desde 1976 métodos para identificação e caracterização de *Z. mobilis* são baseados em testes fisiológicos [2]. Estes testes consomem tempo e frequentemente são duvidosos. A diferenciação de linhagens de *Z. mobilis* ao nível de subespécies, baseado em testes fisiológicos inclui o cultivo a 36°C e na avaliação do crescimento na presença de 0,5% NaCl, 0,0075% KCN ou 0,2% de sais biliares. Estes testes consomem tempo e frequentemente são duvidosos [13]. Por isso, técnicas moleculares são propostas como uma alternativa interessante para caracterização da variabilidade genética destas bactérias.

Fazem parte do acervo da Coleção UFPEDA 34 linhagens de *Z. mobilis* isoladas de várias destilarias do Nordeste e Sudeste, bem como variantes obtidas pela fusão de esferoplastos por vários pesquisadores do Departamento de Antibióticos [14]. Portanto, técnicas moleculares são importantes para avaliar a diversidade intraespecífica destas linhagens. Algumas dessas linhagens já foram caracterizadas quanto ao perfil plasmidial [15, 16]; pela análise de proteínas totais (SDS-PAGE) e por técnicas moleculares como RAPD e rep-PCR [17, 18]. Entretanto, uma caracterização molecular mais detalhada ainda não foi efetuada.

Os ácidos ribonucleicos ribossômicos (rRNA) são considerados os biopolímeros mais adequados para estudos de diversidade. Seus genes, os rDNA, são universalmente distribuídos

entre os diversos grupos de seres vivos e apresentam elevado grau de conservação [19]. Todas as células vivas contêm rRNA classificados pela constante de sedimentação (Svedberg ou S). As células procarióticas possuem rRNA 23S, 16S e 5S que junto a proteínas constituem os ribossomos bacterianos. Os genes ribossomais são os genes mais estudados em bactérias [20]. Neste trabalho foi analisada a variabilidade genética de sete linhagens de *Z. mobilis* por meio do sequenciamento e análise filogenética do gene ribossomal 16S (*16S rDNA*).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Biológico

As linhagens de *Zymomonas mobilis* foram isoladas de diversos habitats e fazem parte do acervo da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPEDA (Tabela 1).

2.2 Extração De Dna

Z. mobilis foi cultivada a 30° C, em tubos de ensaio contendo o meio padrão SSDL. Após 24 horas de cultivo cada cultura foi centrifugada em tubo Falcon por 10 minutos a 1.000 Xg. O sobrenadante foi descartado e acrescentado ao pellet 500 µL de tampão TE (constituído de Tris-HCl 1M pH 8,0 a 1%; e EDTA 0,5M pH 8 a 0,2%). O material foi ressuspensionado e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores, por duas vezes.

Em seguida foi acrescentado 0,10g de sílica especial para extração de DNA e 40µL de Dodecil sulfato de sódio (10%), seguida de agitação no “Bead-beater” por 60s/3.500 a 4.200 bpm e centrifugado por 10 minutos a 14000 Xg. O sobrenadante foi transferido para um microtubo limpo e acrescentado 450 µL de clorofil (solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1). misturado por inversão e repetido a centrifugação nas mesmas condições. Do sobrenadante, foi transferido 200 µL para um microtubo limpo, adicionado 20 µL de NaCl 5M e 120 µL de isopropanol e misturado por inversão. Após 10 minutos de repouso o material foi centrifugado nas mesmas condições anteriores, e ao precipitado foi acrescentado etanol a 70% (gelado) seguido de centrifugação por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o microtubo foi invertido na estufa a 37°C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram ressuspensionadas em 50 µL de tampão TE e colocado a -20°C.

Tabela 1: Relação das linhagens de *Zymomonas mobilis* UFPEDA.

Número UFPEDA	Sigla	Autor	Local
202	CP4	Gonçalves de Lima <i>et al.</i> , 1970	Recife/PE
204	Z-2-80	Falcão de Morais <i>et al.</i> , 1983	São Paulo
206	P3	Falcão de Morais <i>et al.</i> , 1983	Engenho Pitu, Vitória de Santo Antão/PE
208	Z-1-81a	Falcão de Morais <i>et al.</i> , 1983	Usina Bulhões, Jaboatão/PE
241	ZAG-12	Calazans <i>et al.</i> , 1989	-
355	Z-1-87	Falcão de Morais <i>et al.</i> , 1993	Engenho de Alagoas/AL
356	Z-1-88	Falcão de Morais <i>et al.</i> , 1993	Usina Laranjeiras, Vicência/PE

Para avaliar a qualidade do DNA, 5 µL dessa suspensão foi adicionado a um microtubo e misturados a 3 µL de tampão de amostra (glicose a 15%, azul de bromofenol a 0,25%) e aplicado em gel de agarose a 1% utilizando como marcador Lambda HindIII (Q-Bio Gene).

2.3 Amplificação Do Gene 16s Rdna

Para caracterização molecular das linhagens de *Z. mobilis* foram utilizados iniciadores específicos para amplificação do gene RNA ribossômico 16S (16S rDNA). Na amplificação das

amostras, foram utilizados tampão 1X, MgCl₂ (1,5 mM) e *Taq* polimerase (0,05 U μL⁻¹) do kit GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), dNTPs (0,2 mM) (Promega) e iniciadores (1,0 μM/cada) (Integrated DNA Technologies), diluídos em água MiliQ esterilizada (Tabela 2). O volume total da reação foi de 25μL, sendo 1,0μL de DNA adicionado para cada reação. As reações de PCR foram realizadas no termociclador PROGENE (Techne, Cambridge, UK).

O gene do RNA ribossomal 16S (*16S rDNA*) foi amplificado utilizando oligonucleotídeos iniciadores universais (21). As reações de PCR foram realizadas no termociclador PROGENE (Techne, Cambridge, UK), programado com um ciclo inicial de 2 minutos a 40°C, conforme recomendado pelo fabricante, mais 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos, cada ciclo consistindo de uma etapa de desnaturação (1 minuto a 94°C), uma etapa de pareamento (30 segundos a 60°C) e uma etapa de alongamento (2 minutos a 72°C) e, por fim, uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos (Tabela 2).

Tabela 2: Primers e condições utilizados na amplificação do gene 16S rDNA das linhagens de *Zymomonas mobilis* – UFPEDA.

GENE	PRIMER	SEQUÊNCIA (5'-3')	Condições de PCR
<i>16S rDNA</i>	fd1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	5 min a 94°C, 30x (1min a 94°C, 30s a 60°C, 2min a 72°C) e 10min a 72°C
	rD1	AAGGAGGTGATCCAGCC	

Após o processo de amplificação, 5μL de cada reação de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), em tampão de corrida, utilizando o marcador lambda *HindIII*. O gel foi corado com Sybr® Green, observado em um transiluminador U.V. e, em seguida, fotodocumentado.

2.4 Sequenciamento Do Dna E Análise Das Sequências

Os produtos obtidos via PCR foram clonados em vetor T/A pCR2.1 TOPO (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante e transformadas em células de *Escherichia coli* DH5a. As colônias transformadas foram inoculadas em meio de cultura LB acrescido de 100 mgL⁻¹ de ampicilina. As colônias obtidas foram sequenciadas em sequenciador automático de DNA ABI 3100.

2.5 Análise Das Sequências E Construção Filogenética

Todas as sequências de 16S rDNA de *Z. mobilis* obtidas foram comparadas com outras sequências depositadas no banco de dados Genbank do NCBI usando a ferramenta BLASTn [22] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

As sequências obtidas foram alinhadas multiplamente com o software Multialin [23], e, junto com outras sequências depositadas no GenBank foram analisadas com o programa ClustalW [24] com construção de um cladograma pelo método neighbor-joining [25]. Perfis de restrição teóricos foram determinadas utilizando o programa DistinctiEnz disponível online (www.bioinformatics.org), utilizando as enzimas *HaeIII*, *NdeII* e *StuI* [26].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise Das Sequências

As sequências do gene 16S rDNA foram obtidas após a amplificação do DNA genômico purificado das linhagens de *Z. mobilis* UFPEDA (CP4, Z-2-80, P3, Z-1-81A, ZAG-12, Z-1-87 e Z-1-88). O tamanho do fragmento amplificado obteve variou conforme a linhagem de 666 pb (Z-

1-81A) a 1306 pb (Z-2-80) (Tabela 3). O sequenciamento do gene 16S rDNA têm sido extensamente utilizado em estudos de identificação e da diversidade bacteriana [27, 28, 29].

O alinhamento múltiplo das linhagens de *Z. mobilis* UFPEDA realizado com o programa MultAlin permite verificar regiões gênicas com elevada conservação como a região entre o nucleotídeo 92 e 390 (Figura 1), onde são encontrados poucos *gaps* e algumas mutações de bases. Exemplos de mutação pontual do tipo transição de bases nesta região, caracterizado pela substituição de bases do mesmo tipo, ocorrem nas posições 113 (onde uma Guanina substitui uma Adenina na linhagem CP4) e 262 (Guanina substitui uma Adenina na linhagem Z-1-88), entre outros. Nesta região também podemos observar mutações pontuais do tipo transversão (substituição de uma base por outra de classe diferente), como a encontrada na posição 284 na qual Z-1-88 e Z-1-81A possuem uma citosina substituindo a guanina encontrada nas demais linhagens.

Nas outras regiões dos fragmentos amplificados podemos observar diversos outros exemplos de mutações pontuais, principalmente na linhagem Z-1-81A. Essas mutações pontuais são também chamadas de polimorfismos de base única (SNPs – *Single Nucleotide Polymorphism*) são a forma mais frequentes de variação na sequência de DNA encontrada nos organismos [30].

Nas sequências analisadas observou-se diferentes graus de semelhanças com linhagens padrão de coleções internacionais: *Z. mobilis* subsp. *mobilis* ZM4, *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* ATCC 29192 e com *Z. mobilis* subsp. *mobilis* LMG 445 (tabela 3).

As linhagens CP4, Z-2-80, P3, Z-1-81a, ZAG-12, Z-1-87, Z-1-88 apresentam 1152, 1306, 1138, 666, 1206, 1146 e 1158 pares de bases respectivamente. A linhagem CP4 teve 90% de semelhança com *Z. mobilis* ZM4 e 89% com as linhagens *Z. mobilis* ATCC 29192 e *Z. mobilis* LMG 445. As linhagens Z-2-80, P3, Z-1-81a e Z-1-87 obtiveram 90% de semelhança com as linhagens padrão 1, 2 e 3. Enquanto que a linhagem ZAG-12 teve 92% de semelhança com as três linhagens padrão. Já a linhagem Z-1-88 obteve 90% de semelhança com ZM4 e 89% com as linhagens *Z. mobilis* ATCC 29192 e *Z. mobilis* LMG 445.

Para considerar que uma linhagem pertence a uma determinada espécie é necessário que ela possua uma homologia na sequência do gene 16S rDNA igual ou superior a 98% (31). Nas estudadas não se verificou esse grau de homologia com as linhagens depositadas no GenBank, isso certamente ocorreu porque essas sequências representam apenas um fragmento parcial do gene 16S rDNA. Os alinhamentos obtiveram o *score* máximo e *e-value* igual a zero.

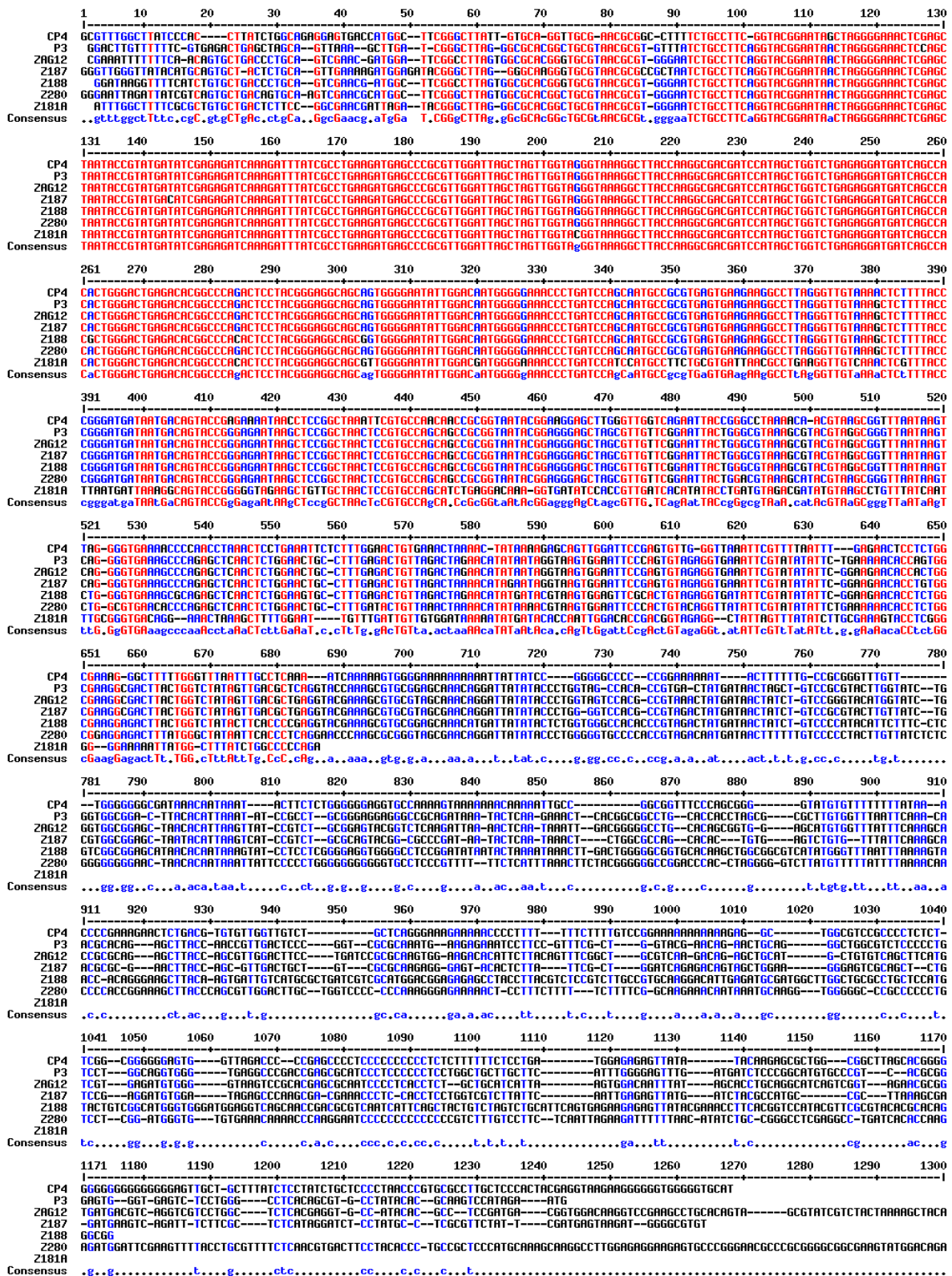


Figura 1: Alinhamento múltiplo das seqüências de 16S rDNA das linhagens *Zymomonas mobilis* UFPEDA gerado pelo programa MultAlin.

Tabela 3: Número de pares de bases e semelhança das linhagens testadas com linhagens padrão de outras coleções.

Linhagem	Tamanho do fragmento amplificado	Semelhança com <i>Z. mobilis</i> ZM4 ¹	Semelhança com <i>Z. mobilis</i> ATCC 29192 ²	Semelhança com <i>Z. mobilis</i> LMG 445 ³
CP4	1152 pb	90%	89%	89%
Z-2-80	1306 pb	90%	90%	90%
P3	1138 pb	90%	90%	90%
Z-1-81a	666 pb	90%	90%	90%
ZAG-12	1206 pb	92%	92%	92%
Z-1-87	1146 pb	90%	90%	90%
Z-1-88	1158 pb	90%	89%	89%

1- *Z. mobilis* subsp. *mobilis* ZM4 pertencente a *American Type Culture Collection* (ATCC)

2 - *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* pertencente a *American Type Culture Collection* (ATCC)

3 - *Z. mobilis* subsp. *mobilis* LMG 445 pertencente a *Belgian Coordinated Cultures of Microorganisms* (BCCM).

3.2 Perfis De Restrição Teóricos

Os perfis de restrição das sequências foram obtidos a partir da clivagem *in silico* com o programa *DistinctiEnz*. As três endonucleases (*HaeIII*, *NdeII* e *StuI*) testadas geram diferentes perfis de restrição expostos na Tabela 4.

Tabela 4: Perfis de restrição teóricos utilizando as enzimas *HaeIII*, *NdeII* e *StuI*.

Linhagem	<i>HaeIII</i>	<i>NdeII</i>	<i>StuI</i>
CP4	76 - 85 - 126 - 192 - 224 - 449	24 - 76 - 83 - 140 - 829	353 - 799
Z-2-80	8 - 85 - 89 - 96 - 108 - 148 - 275 - 497	24 - 76 - 83 - 147 - 182 - 794	89 - 96 - 360 - 761
P3	32 - 37 - 85 - 106 - 160 - 268 - 450	24 - 41 - 76 - 83 - 85 - 99 - 730	353 - 785
Z-1-81a	8 - 271 - 387	24 - 76 - 83 - 139 - 143 - 201	666
ZAG-12	49 - 85 - 222 - 364 - 486	24 - 76 - 83 - 143 - 295 - 585	356 - 850
Z-1-87	85 - 274 - 787	24 - 47 - 55 - 76 - 83 - 109 - 146 - 606	359 - 787
Z-1-88	49 - 85 - 96 - 222 - 344 - 362	24 - 76 - 83 - 143 - 228 - 604	356 - 802
ZM4	48 - 71 - 85 - 131 - 157 - 222 - 281 - 487	9 - 24 - 39 - 76 - 83 - 169 - 176 - 318 - 588	157 - 378 - 947
ATCC 29192	48 - 72 - 85 - 126 - 131 - 222 - 281 - 487	8 - 24 - 39 - 76 - 83 - 158 - 318 - 588	126 - 379 - 947
LMG 445	18 - 48 - 71 - 85 - 131 - 222 - 281 - 487	24 - 39 - 76 - 83 - 103 - 112 - 318 - 588	71 - 325 - 947

Coton e colaboradores [25] utilizaram essas enzimas para classificar linhagens de *Z. mobilis* subsp. *mobilis*, *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* e alguns novos isolados franceses pertencentes a *Adria Normandie Collection* e concluíram que a enzima *Hae III* originou três perfis de restrição específicos para cada subespécie. Os resultados neste trabalho apresentam perfis de restrição

diferentes aos propostos por esses autores, não possibilitando usar esse método para subtipar as linhagens UFPEDA.

Pode-se atribuir essas diferenças entre as linhagens UFPEDA e as linhagens das coleções européias ao processo de mutação pontual. Por exemplo, para a enzima *Stu I* foi encontrado apenas um sítio de clivagem para as linhagens CP4, P3, Z-ZAG-12, Z-1-87 e Z-1-88; três para a linhagem Z-2-80 e nenhum para Z1-81A. Enquanto as linhagens padrão possuem o mesmo perfil de clivagem. O mesmo efeito ocorre com as outras enzimas onde observou-se tanto diferenças no número quanto no tamanho dos fragmentos clivados.

3.3 Análise Filogenética

A relação filogenética das linhagens UFPEDA com outras linhagens de *Z. mobilis* depositadas no Genbank está representada no cladograma gerado pelo programa ClustalW (Figura 2). No cladograma tem-se a formação de quatro grupos polifiléticos. As linhagens UFPEDA apresentaram-se mais agrupadas com a linhagem *Z. mobilis* ZM4.

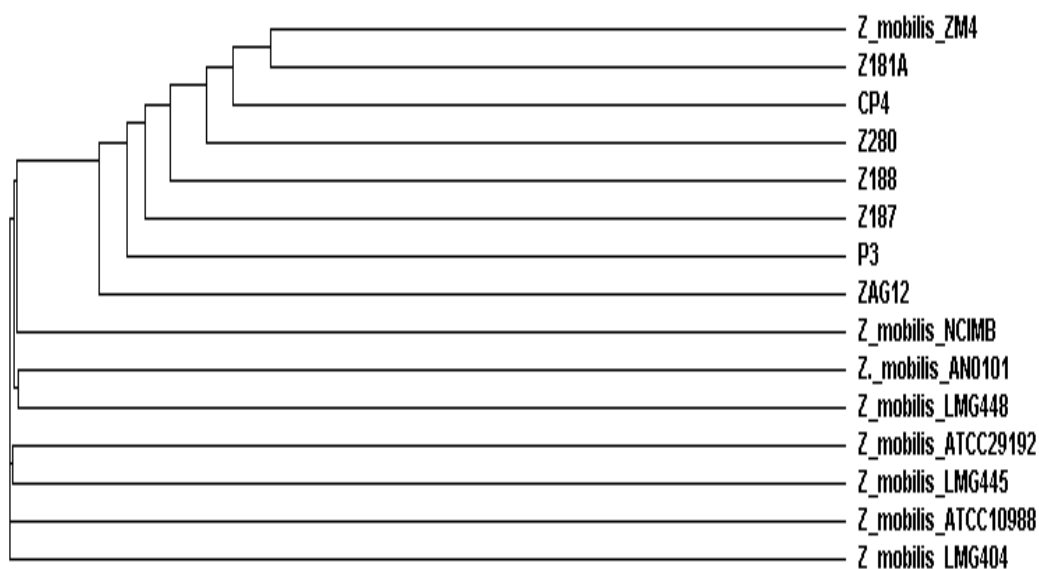


Figura 2: Cladograma gerado pelo programa ClustalW a partir das sequências de 16SrDNA de linhagens de *Zymomonas mobilis* UFPEDA e outras *Zymomonas mobilis* depositadas no GenBank..

4. CONCLUSÃO

A técnica de amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA de linhagens de *Zymomonas mobilis* UFPEDA é eficaz para relevar o grau de conservação deste gene. O alinhamento das sequências possibilita a observação de diversos eventos de mutações pontuais que certamente foram responsáveis pelo diferente padrão de clivagem entre as linhagens UFPEDA e as linhagens das coleções européias, não sendo possível subtipar as primeiras por esta técnica.

Baseados nestes resultados, outras metodologias devem ser empregadas para maior caracterização de variabilidade gênica destas linhagens, possibilitando um melhor conhecimento de sua diversidade e relacionando essa variabilidade com os padrões fisiológicos.

1. SWINGS, J; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*. 41:1–46, 1977.
2. CONWAY, T. 1992. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiology Reviews* 9: 1–27.
3. FALCÃO DE MORAIS, J. O. *Zymomonas mobilis* e seu possível emprego como agente de fermentação alcoólica. *Revista do Instituto de Antibióticos* 21:169-182. (1982).

4. JEON, Y. J.; XUN, Z.; SU, P.; ROGERS, P. L. Genome-wide transcriptomic analysis of a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 1-6. (2012).
5. SHAKIROVA, L.; GRUBE, M.; GOODACRE, R.; GAVARE, M.; AUZINA, L.; ZIKMANIS, P. FT-IR spectroscopic investigation of bacterial cell envelopes from *Zymomonas mobilis* which have different surface hydrophobicities. *Vibrational Spectroscopy*. (2012).
6. KANG, H. L.; KANG, H. S. A physical map of the genome of ethanol fermentative acterium *Zymomonas mobilis* ZM4 and localization of genes on the map. *Gene* 206: 223-228. (1998).
7. GONÇALVES DE LIMA, O.; ARAÚJO, J. M.; SCHUMACHER, I. E.; CAVALCANTI DA SILVA, E. Estudos de microrganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas usadas pelo povo do Recife. I – Sobre uma variedade de *Zymomonas mobilis* (Lindner) Kluyver e Van Niel (1936): *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* (Gonçalves de Lima; Araújo, Schumarcher; Cavalcanti) (1970), isolada da bebida popular “caldo de cana picado”. *Revista Instituto de Antibióticos* 10: 57-69. (1970).
8. WANG, C.; LIU, C.; HONG, J.; ZHANG, K.; MA, Y.; ZOU, S.; ZHANG, M. Unmarked insertional inactivation in the *gfo* gene improves growth and ethanol production by *Zymomonas mobilis* ZM4 in sucrose without formation of sorbitol as a by-product, but yields opposite effects in high glucose. *Biochemical Engineering Journal*. 72, 61-69. (2013).
9. NAJAFPOUR, G. D. Biochemical engineering and biotechnology. 1a ed, Elsevier B. V., Amsterdam, 2007.
10. WEISER, P.; KRAMER, R.; SPRENGER, G. A. Expression of the *Escherichia coli pmi* gene, encoding phosphomannose-isomerase in *Zymomonas mobilis*, leads to utilization of mannose as a novel growth substrate, which can be used as selective marker. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 4155-4161. (1996).
11. DEANDA, K. et al. Development of an arabinose-fermenting *Z. mobilis* strains by metabolic pathway engineering. *Applied Environmental Microbiology*. 62, 4465- 4470. (1996).
12. KYONO, K. et al., Cloning and characterization of *Zymomonas mobilis* genes encoding extracellular levansucrase and invertase. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 289-293. (1995).
13. YANASE, H et al. Cloning, sequencing and characterization of the intracellular invertase gene from *Zymomonas mobilis*. *Agric. Biol. Chem.* 55: 1383-1390. (1991).
14. COTON, M.; LAPLACE, J.; AUFRAY, Y.; COTON, E. Polyphasic study of *Zymomonas mobilis* strains revealing the existence of a novel subspecies *Z. mobilis* subsp. *francensis* subsp. nov., isolated from French cider. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 121–125. (2006)
15. CALAZANS, G. M. T.; RIOS, E. M.; FALCÃO DE MORAIS, J. O.; SOUZA, M. F. V. Q.; MARÇAL, S. F.; LOPES, C. E. Produção de etanol e levana por *Zymomonas mobilis* amostra ZAP, em meio de sacarose. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 32: 631-636. (1989).
16. DALLY, E. L.; STOKES, H. W.; EVELEIGH, D. E. A genetic comparison of strain of *Zymomonas mobilis* by analysis of plasmid DNA. *Biotechnology Letters* 4: 91-96. (1982.)
17. YABLONSKY, M. D.; GOODMAN, A. E.; STEVNSBORG, N.; GONCALVES DE LIMA, O.; FALCÃO DE MORAIS, J. O.; LAWFOR, H. G.; ROGERS, P. L.; EVELEIGH, D. E. *Zymomonas mobilis* CP4: a clarification of strains via plasmid profile. *Journal of Biotechnology* 9: 71-80. (1988).
18. DE SOUZA, L. G. M.; OLIVEIRA, S. L. I.; BOMURA, R. Y.; ARAÚJO, J. M. Detection of bacteriocins in *Zymomonas mobilis* and RAPD fingerprinting of the producer strains. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 5: 2132-2139. (2011).
19. SHAJANI, Z.; SYKES, M. T.; WILLIAMSON, J. R. Assembly of bacterial ribosomes. *Annual review of biochemistry*. 80, 501-526. (2011).
20. LANE, D. L.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 82: 6955-6959. (1985).
21. BROSIUS, J.; PALMER, M. L.; KENNEDY, P. J.; NOLLER, H. F. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science* 75: 4801–4805. (1978).
22. WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173:697-703. (1991).
23. ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. (1990).
24. CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 16: 10881-10890. (1988).

25. THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Ac. Res.* 22, 4673-4680. (1994).
26. SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution.* 4:406-425. (1987).
27. COTON, M.; LAPLACE, J.; COTON, E. *Zymomonas mobilis* subspecies identification by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Letters in Applied Microbiology.* 40: 152–157. (2005).
28. RUDI, K.; SEKELJA, M. High or low correlation between co-occurring gene clusters and 16S rRNA gene phylogeny. *FEMS microbiology letters.* 339, 23-29. (2013).
29. GULITZ, A.; STADIE, J.; EHRMANN, M. A.; LUDWIG, W.; VOGEL, R. F. Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. *Journal of applied microbiology.* (2013).
30. MURAYAMA, M.; KAKINUMA, Y.; MAEDA, Y.; RAO, J. R.; MATSUDA, M.; XU, J.; MOORE, P. J. A.; MILLAR, C. B.; ROONEY, P. J.; GOLDSMITH, C. E.; LOUGHREY, A.; MCMAHON, M. S.; MCDOWELL, D. A.; MOORE, J. E. Molecular identification of airborne bacteria associated with aerial spraying of bovine slurry waste employing 16S rRNA gene PCR and gene sequencing techniques. *Ecotoxicology and environmental safety.*73: 443-447. (2010).
31. HOLT, K. E.; TEO, Y. Y.; LI, H.; NAIR, S.; DOUGAN, G.; WAIN, J.; PARKHILL, J. Detecting SNPs and estimating allele frequencies in clonal bacterial populations by sequencing pooled DNA. *Bioinformatics.* 25: 2074-2075. (2009).
32. STACKBRANDT, E.; GOEBEL, B. E. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 44, 846-849. (1994).