

UFRRJ

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

TESE

**Aplicação de Técnicas Independentes de Cultivo
na Detecção de Bactérias de Importância
Agropecuária**

Bruno Oliveira de Carvalho

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E
INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS INDEPENDENTES DE CULTIVO NA
DETECÇÃO DE BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA AGROPECUÁRIA

BRUNO OLIVEIRA DE CARVALHO

Sob a Orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

e Co-orientação da Professora
Irene da Silva Coelho

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Área de Concentração em Patobiologia Animal.

Seropédica, RJ
Março de 2015

636.089601 Carvalho, Bruno Oliveira de, 1983-
C331a Aplicação de técnicas independentes de cultivo na
T detecção de bactérias de importância agropecuária /
 Bruno Oliveira de Carvalho. – 2015.

 76 f.: il.

Orientador: Miliane Moreira Soares de Souza.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária, 2015.

Bibliografia: f. 59-74.

1. Microbiologia veterinária - Teses. 2. Microbiologia agrícola - Teses. 3. Bacteriologia - Técnica – Teses. 4. Bactérias - Genética - Teses. 5. Mastite – Teses. I. Souza, Miliane Moreira Soares de, 1970- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
EM AGROPECUÁRIA**

BRUNO OLIVEIRA DE CARVALHO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, área de concentração em Patobiologia Animal.

TESE APROVADA EM: 17/ 03/ 2015

Miliane Moreira Soares de Souza. Dra. UFRRJ

(Orientadora)

Everaldo Zonta. Dr. UFRRJ

Valéria Moura de Oliveira. Dr. UFRRJ

Ederson da Conceição Jesus. Dr. Embrapa Agrobiologia

Marco Antonio Sloboda Cortez. Dr. UFF

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, por todo cuidado que tem dedicado a mim todo esse tempo.

Agradeço também a minha mãe, por ser uma guerreira e me apoiar todo esse tempo, assim como meu pai, que nos deixou no ano de 2014, não podendo presenciar mais essa vitória. Vitória essa que não seria possível sem o apoio desses pais maravilhosos, que fizeram um esforço muito além do possível para formar o filho.

À Miliane Moreira Soares de Souza eu agradeço todo o direcionamento da minha vida, não só o direcionamento acadêmico, mas o pessoal e o espiritual, além da paciência, atenção e cuidado nos melhores e piores momentos da minha vida.

À professora Shana de Mattos de Oliveira Coelho pelo apoio fundamental para meu ingresso no doutorado.

À professora Irene pela co-orientação intensa que permitiu que eu completasse esse desafio.

Agradeço aos amigos, Daniel Paiva, Marisol Gomez, Gabrielli Santiago, Viviane Marques, Bruno Pribul, Marcelo Oliva, Dayanne Araújo e Greiciane Bronzato pela amizade e pelos bons momentos vividos.

Agradeço à Naiara de Miranda pelo apoio incondicional dedicado a mim.

Aos amigos Ramon Pimenta e Cassia Motta pela torcida mútua na luta para a conquista de um sonho.

Pelo apoio técnico agradeço ao professor Everaldo Zonta e sua equipe do Laboratório de Estudo das Relações Solo-Planta no Departamento de Solos que foram fundamentais para a implementação da técnica de DGGE em nosso laboratório.

Aos estagiários agradeço a dedicação, em especial a Jessica de Oliveira que atuou diretamente no desenvolvimento do estudo e a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a trilhar esse caminho.

Aos professores Viviana Beoletto e Juan Miguel Marioli da Universidade Nacional de Rio Cuarto (UNRC), na Argentina, pela orientação, apoio e dedicação durante meu intercambio.

À Professora Lúcia Helena Cunha dos Anjos, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária (PPGCTIA) da UFRRJ pela sua dedicação e comprometimento dedicados ao curso além do suporte aos seus alunos.

À Técnica Administrativa Renata Gomes de Souza que, com toda sua paciência, organização seriedade e carinho desempenha papel muito importante na trajetória de todos que passaram pelo PPGCTIA.

Ao PPGCTIA, pela oportunidade de aprendizado e formação.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

RESUMO GERAL

CARVALHO, Bruno Oliveira de. **Aplicação de técnicas independentes de cultivo na detecção de bactérias de importância agropecuária**. 2015. 76f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2015.

O conhecimento das informações genéticas bacterianas tem permitido avanços em diversas áreas do conhecimento. Esse conhecimento permite detectar microrganismos, bem como avaliar a produção de fatores de virulência e resistência em determinadas populações. Mais recentemente, o diagnóstico molecular pela detecção de fragmentos de DNA específicos desses agentes vem sendo implementado em situações onde o cultivo bacteriano não é viável ou é dificultado por condições bióticas ou abióticas. Além da detecção de agentes específicos, o conhecimento da diversidade bacteriana presente em alguns ambientes pode ser um importante critério, como, por exemplo, para avaliar a qualidade do solo. A forma mais comum de avaliar a diversidade bacteriana se dá através do cultivo. Porém, a maior parte das populações bacterianas presentes no solo não são cultiváveis, com isso, a utilização de ferramentas moleculares são cada vez mais utilizadas nesse tipo de análise. O presente estudo teve como objetivo padronizar a utilização de técnicas independentes de cultivo para atender demandas de três setores da agricultura. O primeiro capítulo padronizou a utilização da técnica de DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante) para análise da diversidade bacteriana do leite de tetos mastíticos e sadios de um mesmo animal. Os resultados apontaram para diferenças no perfil bacteriano dos dois grupos analisados. O segundo capítulo avaliou o impacto sobre a microbiota bacteriana em solos tratados com associações de cascalho de perfuração e tortas de mamona e crambe como adubos agrícolas através da análise de DGGE. A aplicação da técnica de DGGE foi eficiente na avaliação e confirmou que os tratamentos contribuíram para o aumento da diversidade bacteriana nas amostras de solos estudadas. O terceiro experimento comparou a sensibilidade da técnica de cultivo, oficial para diagnóstico da Cria Pútrida Americana (CPA), uma doença apícola causada por *Paenibacillus larvae*, com técnica de independente de cultivo por PCR do material extraído direto do mel. Este estudo constatou que a sensibilidade da técnica proposta foi superior à obtida pela técnica de cultivo de *P. larvae*. Com isso, conclui-se que as técnicas independentes de cultivo foram úteis no atendimento das demandas das questões dos setores agrícolas contemplados no estudo.

Palavras-chave: Mastite. Solos. *Paenibacillus larvae*. DGGE. Independente de cultivo

GENERAL ABSTRACT

CARVALHO, Bruno Oliveira de. **Application of cultivation independent techniques in the detection of agricultural importance bacteria**. 2015. 76p. Thesis (Doctorate in Science, Technology and Agricultural Innovation). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2015.

The knowledge of bacterial genetic information has enable advances in many areas allowing detecting microorganisms and evaluating the production of virulence factors and resistance in certain populations. This knowledge allows the detection of microorganisms, as well as the evaluation of virulence and resistance factors production in certain populations. More recently, molecular diagnosis based on the detection of specific fragments from these agents has been implemented in no viable bacterial cultivation environments or hampered by biotic or abiotic conditions. Besides specific agent detection, bacterial diversity analysis might be an important criterion, such as assessing soil quality. Cultivation has been the most common way for evaluating bacterial diversity. However, most of soil bacteria are not cultivable; therefore, the employment of molecular tools has been increasingly used on this sort of analysis. This survey aimed standardizing the use of cultivation independent techniques for granting three agriculture sectors demands. The first chapter standardized the employment of DGGE technique for analyzing milk bacterial diversity from mastitis and healthy teats belonging to the same animal. Results pointed to differences on bacterial profile from both groups. The second chapter evaluated the impact of the employment of drill cuttings with castor beans and cramble pies association as agricultural fertilizers by DGGE analysis. The application of this technique was efficient for evaluating treatments, as well as, confirming the treatments contribution for increasing bacterial diversity in soil samples. The third chapter compared the cultivation technique sensitivity for American Foul Brood (AFB) diagnosis, a bee disease caused by *Paenibacillus larvae*, to cultivation independent technique by PCR. This survey demonstrated that sensitivity of the technique was greater than that one by *P. larvae* cultivation technique. Thus, the present survey concluded that cultivation independent techniques were useful for granting agriculture sectors demands.

Key-words: Mastitis. Soils. *Paenibacillus larvae*. DGGE. Independent cultive techniques.

RESUMEN AMPLIADO

CARVALHO, Bruno Oliveira de. **Aplicación de técnicas independiente de cultivo en la detección de bacterias de importancia agrícola**. 2015. 76p. Tesis (Doctorado en Ciencia Tecnología y Innovación Agropecuaria). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural Rio de Janeiro. Seropédica, RJ: UFRRJ, 2015.

1. Introducción

Según el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento (MAGA), en 2011, la agroindustria representó más del 22 % del producto bruto interno (PBI), que es la suma de toda la riqueza producida en el país. Estos datos revelan su impacto en la economía nacional. Por lo tanto, las enfermedades causan daño a este sector productivo, afectando directa o indirectamente a la economía de todo el país. Este estudio se dividió en tres capítulos que abarcan temas desde tres diferentes sectores de la industria agrícola.

El primer capítulo fue dirigida al ganado lechero, más específicamente a la mastitis, una enfermedad causada principalmente por la infección bacteriana y la principal causa de pérdida de la calidad de la leche y la disminución de la producción. El conocimiento de la etiología de la mastitis en el hato permite una toma de decisiones más eficiente y minimizar las pérdidas.

El segundo capítulo tiene como objetivo evaluar el impacto de la utilización de los residuos procedentes de la industria agroenergética como abono en la agricultura. Esta evaluación se realizará mediante la observación de la dinámica poblacional de bacterias en muestras de suelo después del tratamiento. Al igual que en el primer capítulo, se utilizará la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante - DGGE para este análisis. En este modelo de análisis, las ventajas de las técnicas independientes de cultivo son mucho mayor en comparación con el cultivo dependiente, dado el hecho de que el 99% de las bacterias presentes en el suelo no son cultivables. Como desventaja, podemos destacar una posible sobreestimación de la diversidad, ya que estos análisis cada banda representa un UTO (Unidad taxonómica operativa), que en la práctica significa que cada banda puede representar más de una especie o de una especie puede tener más de un banda.

El tercer capítulo de la tesis se presenta la implementación de la vigilancia de las esporas de *Paenibacillus larvae* en muestras de miel, la metodología para la detección de 16S fragmentos específicos de DNA ribosomal de *P. larvae* utilizando material genético extraído directamente de muestras de miel. El diagnóstico y el seguimiento de la presencia de esporas *P.larvae* en la miel, comúnmente se llevan a cabo mediante métodos de cultivo en medios selectivos para inhibir contaminantes. Sin embargo, este tipo de diagnóstico no presenta un grado suficiente de sensibilidad para detectar la presencia de esporas en pequeñas cantidades. La posibilidad de implementar una técnica de extracción directamente de miel representa una mayor sensibilidad para la detección de algunas esporas lo que significa un avance que puede contribuir a un mejor estudio epidemiológico de la distribución de esta bacteria en la cadena productiva de Brasil. Para ello, la técnica estándar debe proporcionar, además de la eficiencia de recuperación de ADN presente en baja cantidad y la eliminación de las sustancias presentes en la miel que inhiben la amplificación por PCR

2. Materiales y Métodos

Para llevar a cabo el primer capítulo, fueron seleccionados para el experimento 10 animales que mostraron simultáneamente cuartos sanos y mastitis subclínica diagnosticado por la CMT. Se recogieron dos muestras, una de cuartos sanos y otros cuartos con mastitis para cada animal. Las muestras se sometieron a ambos análisis dependientes e independientes de 10 animales. En función del análisis de cultivo, las bacterias aisladas fueron identificadas fenotípicamente y confirmados por la técnica MALDI-TOF MS. En el análisis independiente de cultivo fue sometido a protocolo de extracción de ADN y el material sometido a amplificación por PCR anidada y su producto utilizado para realizar DGGE.

El segundo capítulo se divide en dos experimentos. El primer experimento se evaluó la asociación entre la perforación grave y ricino, en dos tipos de suelo: Planossolo y Argissolo, con dos cultivos diferentes: girasol y ricino. El segundo experimento se evaluó la asociación de recortes de perforación con la “torta” crambe en diferentes concentraciones en Planossolos cultivadas con girasol. La electroforesis en gel de desnaturalización gradiente - DGGE se utilizó para evaluar los efectos del tratamiento sobre la diversidad bacteriana. Además, se estudiaron los factores que podrían influir en la dinámica de poblaciones bacterianas.

Por último, en el tercer capítulo de la elección del medio de cultivo líquido, se probaron seis medios diferentes con 12 cepas diferentes de *P. larvae*. La elección del protocolo de extracción de ADN fue dada por la comparación de los resultados de cuatro protocolos de extracción diferentes: perlas de vidrio; choque térmico; perlas de vidrio + PEG8000 y detergente + sal + calor. La elección de los cebadores usados en la amplificación se realiza mediante la comparación de dos pares de cebadores: 6F AF / AF 7R 1 y Pl / pl 2.

3. Resultados y Discusión

En el análisis preliminar del primer capítulo, fue posible detectar *Staphylococcus aureus* en seis de los diez animales. Resultados confirmados por MALDI-TOF MS. En los otros cuatro animales no fue posible detectar bacterias. Al observar el gel de DGGE se confirmó que no había diferencia en la población de bacterias entre las muestras de los cuartos mastíticos de muestras de cuartos sanos en comparación. En ocho animales fue posible detectar la presencia de la unidad taxonómica operacional - Exclusivo Otus de cuartos mastíticos. En los otros dos animales el perfil bandas no difirió entre los grupos, aún así, era posible detectar un aumento de la intensidad de algunas bandas en las muestras de cuartos mastíticos.

El gel producido por DGGE en el primer experimento del segundo capítulo mostró un aumento de la diversidad bacteriana en Planossolo suelos de tipo, independientemente de la planta cultivada. Además, no hubo correlación significativa entre el contenido de Mg en el suelo y el recuento de bacterias mesófilas en PCA ($r = 0,58$) y el número de UTOs in DGGE ($r = 0,64$). Estos resultados muestran que las variaciones en el contenido de Mg de las parcelas siguieron el cambio en la diversidad bacteriana en las diferentes porciones por ambos métodos dependientes y el método independiente de cultivo. El segundo experimento mostró un mayor número de bandas en el gel de DGGE cuando una cantidad más grande de “torta” de crambe y una concentración residuos de perforación respectivamente 32t.ha-1 y 30t.ha-1, no se encontraron factores correlacionados en la dinámica de la población de bacterias en este experimento.

Los resultados obtenidos en el tercer capítulo, los medios de lo cultivo CBL modificados tuvieron el mejor rendimiento en el cultivo de 12 cepas. La principal

característica que lo diferencia de los demás es la adición de tioglicolato de sodio, que ofrece un ambiente anaeróbico propicio para la germinación de las esporas de *P. larvae*. El protocolo seleccionado es lo que se utiliza para la lisis por detergente, sal y temperatura para evaluar la calidad del ADN extraído y la simplicidad de la metodología. La técnica de cultivo independiente propuesto por este trabajo, presenta un mayor grado de sensibilidad que la técnica oficial dependiente de cultivo. La técnica propuesta por el estudio fue capaz de detectar las esporas en presencia de miel con solamente 10^2 UFC / g *P. larvae*, mientras que la técnica oficial sólo fue capaz de detectar la presencia de *P. larvae* en la muestra con 10^6 UFC / g de *P. larvae*. El par de cebadores utilizados en este estudio fue la 6F AF / AF 7R.

4. Conclusiones

Este estudio confirmó que las técnicas de cultivo independientes pueden ser utilizadas para satisfacer las diversas demandas del sector agrícola. La técnica de DGGE era adecuada y eficiente en la evaluación de las diferencias entre las poblaciones bacterianas en cuartos mastíticos y sano de vacas positivas para CMT. La técnica también ha demostrado ser eficaz en la evaluación de la diversidad bacteriana en las muestras de suelo tratadas con residuos de las industrias agroenergética. Para detectar distintos patrones de UTOs en tratamientos evaluados.

El estudio también demostró que el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es muy eficiente para detectar secuencias de genes específicos de agentes de difícil cultivo, con importancia para el sectores de la agricultura, tales como *Paenibacillus larvae* en la apicultura, puede representar un gran avance en el diagnóstico y seguimiento ya que tenía una mayor sensibilidad con el método oficial.

Por lo tanto, consideramos que dentro de la propuesta PPGCTIA, la tesis que aquí se presenta contribuye a proponer la aplicación de metodologías innovadoras para satisfacer las demandas del sector agrícola nacional.

Palabras-clave: Mastite. Suelos. *Paenibacillus larvae*. DGGE. Independiente de cultivo

LISTA DE TABELAS

	pg.
Tabela 01- Distribuição das espécies bacteriana nas amostras de leite analisadas	13
Tabela 02 - Tratamentos utilizados no experimento 1 em casa de vegetação	24
Tabela 03 - Tratamentos utilizados no experimento 2 em casa de vegetação	25
Tabela 04- Unidade Formadora de Colônias por grama de solo (UFC/g) de bactérias em solos tratados com torta de mamona e cascalho de perfuração em diferentes meios de cultura	31
Tabela 05 - Coeficiente de correlação de Pearson entre o número de Unidade Formadora de Colônia por grama de solos (UFC/g) em diferentes meios de cultura de solos tratados pela associação entre torta de mamona e cascalho de perfuração e característica de pH e teor de Na disponível das amostras	31
Tabela 06- Distribuição do número de UTOs reveladas pela técnica de DGGE em amostras de solos tratadas com diferentes associações de torta de crambe e cascalho de perfuração.	33
Tabela 07 – Composição dos meios de cultura líquidos testados para o cultivo de <i>Paenibacillus larvae</i>	44
Tabela 08 - Avaliação eletroforética da presença de DNA extraído por diferentes protocolos e respectivas produções de <i>amplicons</i> por reação de PCR	53
Tabela 09 – Distribuição e descrição das amostras de méis adicionadas de diferentes diluições do cultivo de <i>Paenibacillus larvae</i>	54

LISTA DE FIGURAS

	pg.
Figura 01- Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) em leites provenientes de tetos mastíticos (C) e sadios (S) de vacas, enfocando a presença e diferença na intensidade das bandas representativas dos UTOs	15
Figura 02 - Composição das matérias-primas utilizadas na produção do biodiesel do Brasil. Fonte: MAPA, 2003.	20
Figura 03. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação da região 16S do rDNA do DNA total extraído direto do solo com os <i>primers</i> 27f e 1512r. Tratamentos dos solos: 1. A-0/0-G, 2. A-10/16-G, 3. A-10/64-G, 4. A-0/0-M, 5. A-10/16-M, 6. A-10/64-M, 7. P-0/0-G, 8. P-10/16-G, 9. P-10/64-G, 10. P-0/0-M, 11. P-10/16-M, 12. P-10/64-M (Descrição dos tratamentos – tabela 2).	27
Figura 04. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação da região 16S do rDNA do DNA total extraído direto do solo com os <i>primers</i> GC-338f e 518r. Tratamentos dos solos: 1. A-0/0-G, 2. A-10/16-G, 3. A-10/64-G, 4. A-0/0-M, 5. A-10/16-M, 6. A-10/64-M, 7. P-0/0-G, 8. P-10/16-G, 9. P-10/64-G, 10. P-0/0-M, 11. P-10/16-M, 12. P-10/64-M (Descrição dos tratamentos – tabela 2).	27
Figura 05. Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante dos produtos de amplificação da região 16S do rDNA do DNA total extraído direto do solo com os <i>primers</i> GC-338f e 518r. Tratamentos dos solos: 1. Marcador, 2. A-0/0-G, 3. A-0/0-G, 4. A-10/16-G, 5. A-10/16-G, 6. A-10/64-G, 7. A-10/64-G, 8. A-0/0-M, 9. A-10/16-M, 10. Marcador, 11. A-10/16-M, 12. A-10/64-M, 13. P-0/0-G, 14. P-10/16-G, 15. P-10/16-G, 16. P-10/64-G, 17. P-10/64-G, 18. Marcador, 19. Marcador, 20. P-0/0-M, 21. P-0/0-M, 22. P-10/16-M, 23. P-10/16-M, 24. P-10/64-M (Descrição dos tratamentos – Tabela 2)	28
Figura 6. Dendograma de dissimilaridade genética obtido pelo método de agrupamento UPGMA gerado a partir da análise de bandas obtidas por PCR-DGGE com <i>primers</i> universais que amplificam a região do gene ribossomal 16S de <i>Bacteria</i> .	29
Figura 7– Eletroforese em gel de agarose 1,5% de <i>amplicons</i> produzidos pela reação de PCR com pares de <i>primers</i> 27F/1512R d material extraído direto de amostras de solos adicionados de Torta de Crambe/Cascalho de Perfuração. M= marcador 1kb DNA Ladder AMRESCO (k181); CP=controle positivo; 1=0/0; 2=16/0; 3=32/0; 4=0/30; 5=16/30; 6=32/30; 7=0/60; 8=16/60; 9=32/60; CN= controle negativo da reação.	32
Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% de <i>amplicons</i> produzidos pela reação de Nested-PCR com os <i>primers</i> CG338F/518R. M= marcador 100bp DNA Ladder Thermo Scientific (SM0241);; CN= controle negativo da reação;CP=controle positivo; 1=0/0; 2=16/0; 3=32/0; 4=0/30; 5=16/30; 6=32/30; 7=0/60; 8=16/60; 9=32/60.	32

- Figura 9** – Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) de *amplicons* produzidos pela reação de *Nested-PCR* com os *primers* CG338F/518R M= marcador; CN= controle negativo da reação; CP=controle positivo; 1=0/0; 2=16/0; 3=32/0; 4=0/30; 5=16/30; 6=32/30; 7=0/60; 8=16/60; 9=32/60. 33
- Fígura 10**- Dendograma relacionando amostras de solos submetidas a diferentes associações entre torta de crambe e cascalho de perfuração através do perfil de UTO decorrentes de DGGE. 35
- Figura 11** - Demonstração do desempenho no cultivo de cepas de *Paenibacillus larvae* em diferentes meios de cultura, eixo x representa as cepas de *P. larvae* e eixo Y o expoente da contagem de UFC/g. 51
- Figura 12**- Contagem de *Paenibacillus larvae*(UFC/mL) em Ágar MYPGP após diluição seriada de diferentes meios de cultura com objetivo de testar a eficiência do cultivo. 51
- Figura 13** – Eletroforese em gel de agarose 0,8% de DNA genômico total extraído de amostras de mel submetidas a dois protocolos de extração 1, 2 e 3= repetições da amostra não inoculada por *Paenibacillus larvae* submetidas ao protocolo 3 (*glass beads*+PEG8000); 4, 5 e 6= repetições da amostra inoculada com *P. larvae* submetidas ao protocolo 3; 7, 8 e 9= repetições da amostra não inoculada por *P. larvae* submetidas ao protocolo 4 (detergente+sal+térmico); 10, 11 e 12= repetições da amostra inoculada com *P. larvae* submetidas ao protocolo 4. 52
- Figura 14**– Eletroforese em gel de agarose 1,5% de *amplicons* produzidos pela reação de PCR com pares de primers 27F/1512R d material extraído direto de amostras de mel. 1= Marcador; 2,3 e 4= repetições da amostra não inoculada por *P. larvae* submetidas ao protocolo 4 (detergente+sal+térmico); 5, 6 e 7= repetições da amostra inoculada com *P. larvae* submetidas ao protocolo 4. 53
- Figura 15**- Contagem de *Paenibacillus larvae* em placas de Agar MYPGP (Caldo Mueller- Hinton , extrato de levedura , fosfato de potássio, glicose, ágar e piruvato). Placa P- mel adicionado do cultivo puro; Placa D1- mel adicionado da primeira diluição do cultivo; Placa D2- mel adicionado da segunda diluição do cultivo. 55
- Fígura 16** – Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos *amplicons* produzidos por PCR utilizando os *primers* AF 6f/AF 7r, do DNA extraído de amostras de méis inoculadas com diferentes quantidades de *P. larvae*. M= marcador 100bp DNA Ladder Thermo Scientific (SM0241); CP= controlepositivo da reação; Amostra A=10⁶UFC/g; Amostra B= 10⁵UFC/g; Amostra C=10⁴UFC/g; Amostra D=10³UFC/g; Amostra E=10² UFC/g; Amostra F=10¹UFC/g; Amostra G=1UFC/g ; CN= amostra controle negativo e b= controle negativo da reação 56

LISTA DE ABREVIACÕES

AMVF	Agar Manitol Vermelho de Fenol
AGEL	Agar Glicerol-Extrato de Levedura
AC	Agar Caseína
MYT	Meio Extrato de Levedura-Tiamina
CPA	Cria Pútrida Americana
UTO	Unidade Taxonomica Operacional
DGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
UFC/g	Unidade Formadora de Colonia por grama
	Caldo Mueller- Hinton , extrato de levedura , fosfato de potássio, glicose, ágar e piruvato
MYPGP	
CBL	Caldo <i>Bacillus larvae</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
CMT	<i>California mastitis test</i>
CCS	Contagem de Celulas Somáticas
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
TGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura
MAPA	Ministerio da Agricultura Pecuaria e Abastecimento
PPGCTIA	Programa de Pós Graduação em Ciencia Tecnologia e Inovação Agropecuaria
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Mg. ha ⁻¹	Megagrama por hectare
NaCl	cloreto de sódio
mL	mililitros

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	1
2.	CAPITULO I - PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA INDEPENDENTE DE CULTIVO EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO PARA AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA BACTERIANA RELACIONADA A MASTITE	5
2.1	RESUMO	6
2.2	ABSTRACT	7
2.3	INTRODUÇÃO	8
2.4	MATERIAL E MÉTODOS	11
2.4.1	Amostragem	11
2.4.2	Análise da microbiota bacteriana por metodologia dependente de cultivo	11
2.4.3	Análise da microbiota bacteriana por metodologia independente de cultivo	11
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
2.5.1	Análise da microbiota bacteriana por metodologia dependente de cultivo	13
2.5.2	Análise da microbiota bacteriana por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)	14
2.6	CONCLUSÕES	16
3.	CAPITULO II - AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA POR METODOLOGIA DEPENDENTE E INDEPENDENTE DE CULTIVO NO ESTUDO DE VIABILIDADE DA DESTINAÇÃO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA AGROENERGÉTICA COMO FERTILIZANTE AGRÍCOLA	17
3.1	RESUMO	18
3.2	ABSTRACT	19
3.3	INTRODUÇÃO	20
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.4.1	Montagem e condução dos experimentos em casa de vegetação	24
3.4.2	Amostragem e armazenamento de amostras dos solos	25
3.4.3	Análise da diversidade microbiana	25
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.5.1	Análise da diversidade bacteriana por eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE)	27
3.6	CONCLUSÕES	36
4.	CAPITULO III - IMPLEMENTAÇÃO DE METODOLOGIA INDEPENDENTE DE CULTIVO NO MONITORAMENTO DE PAENIBACILLUS LARVAE EM MEL, COMO ALTERNATIVA À METODOLOGIA DEPENDENTE DE CULTIVO	37
4.1	RESUMO	38

4.2	ABSTRACT	39
4.3	INTRODUÇÃO	40
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.4.1	Seleção de meio de cultura líquido para cultivo de <i>Paenibacillus larvae</i>	44
4.4.2	Seleção de técnica de extração de DNA bacteriano a partir de amostras de mel	46
4.4.3	Determinação do grau de sensibilidade das técnicas de monitoramento de esporos de <i>Paenibacillus larvae</i> dependentes e independentes de cultivo em mel	48
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.5.1	Seleção de meio de cultura líquido para cultivo de <i>Paenibacillus larvae</i>	50
4.5.2	Seleção de técnica de extração de DNA bacteriano de amostras de mel	52
4.5.3	Grau de sensibilidade das técnicas de monitoramento de esporos de <i>Paenibacillus larvae</i> dependentes e independentes de cultivo em mel	54
4.6	CONCLUSÕES	57
5	CONCLUSÕES GERAIS	58
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
7	ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO GERAL

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), no ano de 2011, o agronegócio representou mais de 22% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, que representa a soma de todas as riquezas produzidas no País. Esses dados revelam seu impacto na economia nacional. Desse modo, agravos que causem danos a este setor produtivo, impactam direta ou indiretamente, a economia de todo País. Para impulsionar este setor, o Governo Federal conta com diversas ações de apoio ao pequeno agricultor. Entre eles, o Programa Mais Alimentos, que oferece linha de crédito do Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar (PRONAF), para modernizar as unidades familiares. Desde 2008, financiou em todo o Brasil a compra de mais de 40 mil tratores, 2,6 mil caminhões e 160 colheitadeiras.

No ano de 2012, a agropecuária brasileira foi afetada pelo agravamento da crise de econômica mundial, sobretudo a economia europeia. Como reflexo da desaceleração econômica global, houve diminuição do volume de exportação de diversos produtos da agricultura nacional. Além dos fatores macroeconômicos responsáveis pelas dificuldades enfrentadas pelo setor, alguns períodos de estiagem (especialmente no segundo e terceiro trimestres) em parte dos municípios dos Estados do Rio Grande do Sul, de Mato Grosso do Sul, do Paraná, de Minas Gerais e do Ceará, também tiveram impacto negativo sobre a produção.

Dentro deste contexto, além dos fatores econômicos e ambientais mencionados, agravos à sanidade animal e vegetal, bem como acúmulos de resíduos produtivos são aspectos da cadeia produtiva agrícola que requerem atenção, não apenas do setor produtivo, mas dos envolvidos em ciência e produção de conhecimento. O presente trabalho objetiva avaliar a viabilidade da aplicação de metodologias independentes de cultivo para análise da microbiota relacionada a agravos sanitários ou impacto ambiental em três distintos setores produtivos, a saber, produção leiteira, indústria agroenergética e apícola.

O primeiro capítulo está direcionado a bovinocultura de leite, mais especificamente à mastite, principal problema enfrentado pela atividade. Na pecuária leiteira, o emprego da tecnologia, em especial, a adoção de Boas Práticas na ordenha, é traduzido em melhoria na qualidade do leite. A utilização de Boas Práticas envolve a implementação, manutenção e difusão de medidas de controle no manejo durante a ordenha com objetivo de melhorar a qualidade do leite e impedir o aparecimento de doenças no rebanho. A principal causa de perda de qualidade do leite e diminuição da produção são os altos índices de mastite, doença causada principalmente por infecções bacterianas. O conhecimento da etiologia da mastite no plantel viabiliza uma tomada de decisão mais eficiente e minimiza os prejuízos decorrentes.

O diagnóstico das mastites bacterianas se dá, principalmente, através de cultivo em meios específicos e posterior identificação. Essa identificação pode ser através da análise de suas características metabólicas por testes fenotípicos ou da detecção de genes específicos por PCR. Os grupos bacterianos envolvidos na mastite são diversos, o que dificulta seu diagnóstico, pois cada bactéria apresenta uma característica e exigência para seu cultivo. A pesquisa de todas as bactérias, até hoje, relatadas como causadoras de mastite por técnica dependente de cultivo seria completamente inviável economicamente, pois os meios de cultura são caros pela sua complexidade, e muitas técnicas se mostram demoradas e pouco sensíveis.

A implementação de técnica independente de cultivo que mostre a diversidade de bactérias presentes no leite oriundos de tetos mastíticos comparada a diversidade no leite de

tetos sadios evidencia possíveis agentes causadores, independentemente de suas exigências de cultivo. Com base nessas informações é possível traçar um real panorama dessa enfermidade, sendo o objetivo do presente estudo criar ferramentas para futuras análises. Essa avaliação será realizada com a utilização de DGGE.

O segundo capítulo objetiva avaliar o impacto da utilização de resíduos da indústria agroenergética como fertilizante na agricultura. Essa avaliação se dará pela observação da dinâmica populacional bacteriana em amostras de solo após tratamento. Assim como no primeiro capítulo, será utilizado o DGGE para essa análise. Nesse modelo de análise, as vantagens da técnica independente de cultivo são muito superiores comparadas as da dependente de cultivo, dado ao fato de que 99% das bactérias presentes no solo não são cultiváveis. Como desvantagem, pode-se destacar uma possível superestimação da diversidade já que nessas análises cada banda representa uma UTO (Unidade Taxonômica Operacional), o que na prática significa que cada banda pode representar mais de uma espécie ou que uma espécie pode apresentar mais de uma banda.

O terceiro capítulo da tese apresenta a implementação do monitoramento dos esporos de *Paenibacillus larvae* em amostras de mel, por metodologia de detecção de fragmentos do DNA ribossomal 16S específico de *P. larvae*, utilizando como molde material genético extraído diretamente das amostras de méis. O diagnóstico e monitoramento da presença de esporos de *P.larvae* em méis, comumente, são realizados através de métodos de cultivo em meios seletivos para inibição de contaminantes. Todavia esse tipo de diagnóstico não apresenta um grau de sensibilidade suficiente para detectar a presença de esporos em pouca quantidade. A possibilidade de implementação de uma técnica de extração diretamente do mel, que apresente uma sensibilidade maior para detecção de poucos esporos também representará um avanço que poderá contribuir com um melhor estudo epidemiológico da distribuição dessa bactéria na cadeia produtiva apícola no Brasil. Para isso, a técnica padronizada deve apresentar, além da eficiência na recuperação de DNA presente em pouca quantidade, a eliminação de substâncias presentes no mel que impedem a amplificação por PCR para identificação genotípica.

Técnicas de diagnóstico independentes de cultivo vêm sendo empregadas na apicultura, como análise metagenômica para o conhecimento da microbiota em colméias que sofriam da síndrome do colapso das colméias (COX-FOSTER et al., 2007). Essa doença foi relatada pela primeira vez em 2006 e na época do estudo já era responsável por um alto percentual de perdas de colméias nos Estados Unidos (VANENGELSDORP et al., 2007). A vantagem desse estudo se deve ao fato de revelar toda microbiota das amostras analisadas e não só de bactérias. Além disso, também abrange micro-organismos desconhecidos, pois não depende de prévia amplificação de genes conhecidos, com isso esse estudo contribui para futuros estudos baseados na detecção de genes, pois constrói biblioteca genômica do sistema analisado por ela. A principal desvantagem dessa técnica se deve ao alto custo, pois necessita do seqüenciamento de muitos fragmentos do DNA.

Várias técnicas têm sido usadas no estudo da diversidade microbiana em diversas matrizes como DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (*Random Amplified Polymorphic DNA* - RAPD) (FRANKLIN et al. 1999), *Microarrays* (Chip) (DESANTIS et al., 2007 e 2009; ZHANG et al., 2007) , polimorfismo de restrição de comprimento de fragmentos – RFLP (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* -ARDRA) LAGUERRE, et al., 1994; MASSOL-DEYA et al., 1995; MOYER et al., 1994; KIRK et al., 2004), polimorfismo de restrição de comprimento de fragmentos com marcação terminal (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* - T-RFLP) (THIES, 2007; FIERER &

JACKSON, 2006), polimorfismo de comprimento de PCR (*Length Heterogeneity Polymerase Chain Reaction* -LH-PCR) (Mills et al., 2007; Ritchie et al. 2000), análise do espaço intergênico ribossomal automatizada (*Automated Ribosomal intergenic spacer analysis* -ARISA) (KIRK et al, 2004; MAGGI & BREITSCHWERDT, 2005; FISHER & TRIPLETT, 1999; NAGPAL et al, 1998; JENSEN et al., 1993), polimorfismo de conformação de DNA fita única (*Single strand conformation polymorphism* - SSCP), *Denaturing-Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) e *Temperature-Gradient Gel Electrophoresis* (TGGE). A escolha da técnica deve levar em consideração o objetivo que se busca e a viabilidade de execução. O presente estudo utilizou a técnica de DGGE por sua relativa simplicidade de execução e análise de dados.

Na técnica de DGGE, pequenos produtos de PCR (cerca de 200-700 pb) são separados num gel de acrilamida com crescente gradiente desnaturante (MUYZER et al., 1993; MUYZER & SMALLA, 1998). Um dos iniciadores carrega um grampo artificial de cerca de 40 pb(50-GC)(MYERS et al., 1985). Fragmentos analisados por DGGE são geralmente do mesmo comprimento (não podendo assim haver diferenciação em géis sem desnaturante sejam de agarose ou de acrilamida),utilizando um gradiente químico de desnaturação. A direção da eletroforese é perpendicular ao gradiente de desnaturação. Inicialmente, os produtos são separados de acordo com peso molecular determinado principalmente pelo teor de GC. À medida que os produtos da PCR progridem através do gel são submetidos a condições de desnaturação cada vez maiores até que a separação parcial da dupla fita de DNA ocorra. O comportamento de separação depende principalmente do comprimento do produto, do seu conteúdo de GC e da sequência de nucleotídeos. Para atingir separação total da fita, quanto maior for a estabilidade intrínseca, mais forte deve ser a condição desnaturante. A forma física das moléculas afeta diretamente a sua mobilidade durante a eletroforese. O DNA parcialmente desnaturado migra mais lentamente no gel em comparação com a conformação nativa. Eventualmente separação ocorre em toda fita, com exceção de um grampo-GC (MYERS et al., 1985). Este grampo apresenta um nível muito elevado no ponto de separação, com isso mantém os fios juntos levando a uma molécula em forma de “borboleta”, cuja migração no gel é fortemente retardada em comparação com as moléculas não separadas. Como descrito acima, a separação das cadeias pode ser conseguida utilizando a desnaturação química por formamida (variando de 0-40%) e ureia (variando 0-7 M) em caso de DGGE, ou utilizando um gradiente térmico apropriado no caso de TGGE. Os gradientes podem sofrer alterações de acordo com a amostra (OGIER et al., 2002). Estes métodos apresentam potencial de detectar diferenças no comportamento de separação em pequenos fragmentos de DNA que apresentem no mínimo uma substituição em uma base. A presença do grampo de GC ligado à extremidade 5' de um dos iniciadores do PCR, normalmente tende a diminuir a eficiência de amplificação, a qual é observada como uma diminuição no rendimento dos produtos. Também tende a aumentar o risco de formação de *heteroduplex* nas etapas de anelamento (FERRIS & WARD, 1997; LEE et al., 1996; RUANO & KIDD, 1992). Baixa eficiência de amplificação torna-se um problema com alguns modelos ambientais que já são difíceis para amplificar por causa da presença de substâncias inibidoras. Se os pontos de fusão dos produtos são suficientemente elevados, sem o grampo GC, o grampo não seria essencial. Isso explica por que bons perfis têm sido observados sem o uso do grampo GC. Todavia, deve haver a certeza que esses produtos possuam um mínimo de conteúdo GC e que os géis não sejam executados ao ponto em que a separação completa do produto seja alcançada. Determinados produtos que apresentam um ponto de separação, apresentam uma desnaturação parcial ao fim da eletroforese. Essa separação parcial, ocorrida em partes separadas do produto e não continuamente como um zíper, já permite a separação bem sucedida de uma

amostra complexa. As vantagens destes métodos são a alta acessibilidade para laboratórios comuns e a relativa facilidade na interpretação dos resultados. Também, bandas individuais de interesse podem ser recuperadas a partir do gele posteriormente sequenciadas. Clonagem de bandas excisadas resulta em seqüências mais limpas comparado ao sequenciamento direto, mas é significativamente mais trabalhoso. O tamanho dos produtos gerados nas técnicas de DGGE pode ser prejudicial à análise das seqüências, já que o sequenciamento de fragmentos entre 300-400 bp pode não conter informações suficientes para uma classificação taxonômica precisa(OVREAS, 2000).

A análise semi-quantitativa só é possível através da determinação complexa das intensidades de sinal de todas as bandas. Algumas limitações podem ser superadas por trabalhar com produtos de PCR marcados por fluorescência. A utilização da fluorescência pode melhorar significativamente a sensibilidade da detecção.

Desse modo, os objetivos do estudo foram implementar as metodologias independentes de cultivo, em especial, a utilização de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) para caracterizar a diversidade microbiana em ambientes de produção leiteira e em solos tratados com resíduos da indústria agroenergética; bem como, detectar *Paenibacillus larvae* por amplificação em cadeia de polimerase (PCR).

2. CAPÍTULO I

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA INDEPENDENTE DE CULTIVO EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO PARA AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA BACTERIANA RELACIONADA A MASTITE

2.1 RESUMO

A mastite é uma inflamação das glândulas mamárias podendo ser causada por diversos fatores, sendo o principal bacteriano. A identificação do agente etiológico é a forma mais adequada para o diagnóstico da mastite, pois esse conhecimento auxilia na escolha da terapêutica a ser utilizada. O principal método utilizado para a descoberta da etiologia da mastite se dá pelo cultivo microbiano em placas e posterior identificação. Algumas bactérias relacionadas como agentes causadoras de mastite não são cultiváveis com facilidade em meios convencionais, dificultando assim seu diagnóstico por essa metodologia. Outra questão que deve ser levada em consideração na utilização dessa técnica se deve ao fato de que muitas bactérias relacionadas com a mastite também são consideradas comensais, dificultando o diagnóstico preciso. Técnicas moleculares têm sido utilizadas para caracterizar de forma mais específica os isolados oriundos da mastite bovina visando um melhor entendimento da enfermidade. O objetivo do presente estudo foi avaliar a diferença entre a população de bactérias de tetos mastíticos e sadios de um mesmo animal através da técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante - DGGE. Foram selecionados para o experimento 10 animais que apresentaram simultaneamente tetos saudáveis e com mastite subclínica diagnosticada pelo CMT. Foram coletadas duas amostras, uma de tetos sadios e outra de tetos com mastite para cada animal. Na análise preliminar, foi possível a detecção de *Staphylococcus aureus* em seis dos dez animais. Resultados confirmados pelo MALDI-TOF MS. Nos outros quatro animais não foi possível a detecção de bactérias. Pela observação do gel do DGGE foi possível confirmar que havia diferença na população de bactérias entre as amostras provenientes de tetos mastíticos comparadas as amostras de tetos sadios. Em oito animais foi possível detectar presença de Unidade Taxonômicas Operacionais - UTOs exclusivos dos tetos mastíticos. Nos outros dois animais o perfil de bandas não diferenciou entre os grupos, ainda assim, foi possível detectar um aumento da intensidade de algumas bandas nas amostras oriundas de tetos mastíticos. O presente estudo concluiu que a técnica de DGGE se mostrou eficiente para apontar a diferença entre a população oriunda do leite de tetos mastíticos e tetos sadios do mesmo animal.

Palavras-chave: Mastite. DGGE. Técnica independente de cultivo.

2.2 ABSTRACT

Mastitis is an inflammation of the mammary glands caused by several factors, bacterial being the main one, and *Staphylococcus spp.* the most important genus. Although California Mastitis Test (CMT) and Somatic Cell Count (SCC) are the main mastitis diagnosis tests, they do not point out the causative agent, nor treatment assistance. The identification of the etiologic agent has been the most appropriate way for mastitis diagnosis, supporting for selecting therapeutic. The primary method employed for mastitis etiologic detection is based on microbial cultivation on plates with subsequent identification by biochemical tests and morphological traits. Some bacteria associated to mastitis are not easily cultivated thus hampering its diagnosis by this methodology. It must be also taken into account the fact that many bacteria related to mastitis are also considered as commensal frustrating an appropriate diagnosis. Molecular Biology techniques have been employed for more specifically characterizing the strains from bovine mastitis aiming a better disease understanding. The present study aimed to evaluate the difference between bacterial populations considering mastitis and healthy teats from the same cow using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Ten animals simultaneously presenting healthy teats and subclinical mastitis teats diagnosed by CMT were selected for the experiment. For each animal, two samples, one from healthy teats and one from mastitis teats were collected. From ten animals used, six presented *Staphylococcus aureus* confirmed by MADITOF MS, the others four ones presented no bacteria. DGGE demonstrated difference on bacteria population between mastitis teats samples compared to healthy teats ones. Eight animals presented unique OTU from mastitis teats. In regarding to the other two animals, bands profile did not differ between groups, even so, from mastitis teats samples an increased intensity on some bands was detected. The present study could conclude DGGE as an appropriate technique for pointing out the difference between population from mastitis teats milk and healthy teats, as well.

Keywords: Mastitis. DGGE. Independent cultivate technique.

2.3 INTRODUÇÃO

Em 2011, o Brasil ocupou a sexta posição mundial na produção de leite, atrás da União Europeia, Índia, Estados Unidos, China e Rússia. (IBGE, 2011). A quantidade de vacas em lactação no Brasil, porém, foi proporcionalmente maior e alcançou a terceira posição, atrás da Índia e da União Europeia, devido à menor produtividade de leite do nosso rebanho. Na eficiência do rebanho leiteiro, a produtividade brasileira (1.471 litros/vaca/ano) (IBGE, 2013) é, em muito, superada pelas obtidas na União Europeia (5.978 litros/vaca/ano), nos Estados Unidos (5.710 litros/vaca/ano), na China (4.166 litros/vaca/ano) e, inclusive, na Índia (1.973 litros/vaca/ano). Ressalta-se, no entanto, que esta produtividade é bastante variável em nível nacional, desde 309 litros/vaca/ano, em Roraima, a 2.536 litros/vaca/ano no Rio Grande do Sul (IBGE, 2011).

As principais razões para essa baixa produtividade incluem a utilização de animais sem aptidão para produção de leite ou com potencial genético inapropriado; manejo alimentar, reprodutivo e sanitário inadequados; baixo nível de instrução dos produtores (57% dos produtores tem pouca instrução), o que dificulta a utilização adequada das tecnologias disponíveis; e falta de assistência técnica, considerando como exemplo, a zona da mata mineira, uma das maiores bacias leiteiras do país, onde 73% dos produtores informam que não recebem assistência técnica (IBGE, 2006).

Entre os fatores que ocasionam prejuízo direto pela redução na produtividade, figura a mastite, doença inflamatória de etiologia multifatorial que interfere na produção de células somáticas e nas características físico-químicas do leite, o que acarreta redução de qualidade. Dados do Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa, responsável pela análise mensal de amostras de aproximadamente 20 mil rebanhos, revelam que se a Instrução Normativa (IN) 51 não fosse revogada, poucos rebanhos estariam em conformidade com a legislação a partir de primeiro de janeiro de 2012. A substituição da IN 51 pela IN 62, que entrou em vigor em 1º de janeiro de 2012, veio com o objetivo de aumentar os prazos e limites de Contagem Total Bacteriana (CTB) e Contagem de Células Somáticas (CCS), para permitir a adequação dos produtores de leite. Aproximadamente 95% das análises laboratoriais para CTB estão acima de 100 mil/mL e 45% delas ficam acima de 400 mil/mL para CCS (VILELA, 2012), bem acima dos valores estabelecidos pela IN51.

Segundo Vilela (2012), para que o leite nacional obtenha os padrões exigidos pela IN62 no prazo estipulado, algumas medidas devem ser adotadas, como: Criar no âmbito da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA/MAPA), um Programa Nacional de Controle e Prevenção da Mastite, elaborado por um grupo de trabalho envolvendo instituições de pesquisa e ensino, empresas de laticínios, serviços de extensão e demais participantes da cadeia do leite.

Desse modo, a Embrapa, em parceria com outros órgãos desenvolveu um projeto para atendimento das demandas identificadas abordando as seguintes metas:

- Garantir investimentos em infraestrutura de energia elétrica e estradas;
- Oferecer condições básicas e prioritárias para que o leite, produzido com a qualidade higiênico-sanitária desejada, seja mantido durante o transporte para a indústria, e dentro da mesma;
- Propor programas de qualificação e capacitação dos técnicos da extensão rural e autônomos que atendem os produtores de leite;

- Propor programas de capacitação para os produtores e transportadores de leite com foco em educação sanitária e qualidade do leite;
- Incentivar as empresas de lácteos a adotar programas de pagamento de leite baseado em indicadores de qualidade pode ser uma das principais estratégias para melhoria da qualidade do leite;
- Melhorar o acesso ao crédito para financiamento da produção de leite;
- Realizar ações para sensibilizar o consumidor da importância da qualidade do leite.

Dentro da questão da qualidade do leite, em todo mundo, estudos são desenvolvidos na busca pela adoção de medidas eficazes para o controle da mastite. Como por exemplo, adoção de medidas profiláticas de vacinação, eliminação das infecções em curso com uso de antibióticos ou estimulação do sistema imunitário com imunomoduladores não específicos. No entanto, tais medidas apresentam pouca, ou nenhuma eficácia, e ainda podem comprometer o produto final (OSMAN, 2010). O uso de antimicrobianos além de possível liberação de resíduos no leite, inviabilizando-o, além de induzir a resistência em bactérias (PEXARA, 2013).

A implementação de Boas Práticas de ordenha visa prevenir a introdução de agentes causadores de mastite ou reduzir a disseminação dos mesmos. No entanto, antes de se implementar um programa de boas práticas de ordenha, deve-se considerar os recursos que cada propriedade dispõe, atentando principalmente para capacitação da mão de obra para que plano de controle ocorra sem falhas (FONSECA & SANTOS, 2000).

Outro cuidado importante na tentativa de controle dos casos de mastite no rebanho, que resulta no bom funcionamento do processo de ordenha, está relacionado ao manejo dos animais (GONZALEZ-SEDANO, 2010; SEPÚLVEDA-VARAS, 2013), como a condução dos animais para linha de ordenha de forma calma e ordenada, buscando evitar o estresse dos animais e aumenta do peristaltismo gerando defecação na linha de ordenha, além de retenção do leite, o que favorece a multiplicação de microrganismos no interior da glândula mamária e redução da produção (FONSECA e SANTOS, 2000; HACHEM, 2005). Além disso, é importante que após a ordenha os animais permaneçam de pé para se evitar a penetração de bactérias pelo canal da teta, que permanece aberto por um período variável entre 30 e 120 minutos. Desse modo, deve-se evitar fornecer alimentação aos animais durante a ordenha, e sim o fornecimento de ração no cocho na saída do local de ordenha (FONSECA & SANTOS, 2000; HACHEM, 2005). Adicionalmente, deve-se detectar as vacas infectadas e promover medidas de isolamento ou restrição (OSMAN, 2010).

O CMT (*California Mastitis Test*) é considerado um eficiente método de diagnóstico da mastite no rebanho (FOSGATE, 2012). Este é um teste indireto que mede a quantidade de ácido desoxirribonucleico (DNA), proveniente de células nucleadas no leite. É o método mais comum utilizado na detecção de mastites subclínicas no rebanho leiteiro. O reagente do CMT é um detergente com indicador de pH que, quando misturado ao leite em partes iguais, dissolve as paredes celulares e nucleares dos leucócitos presentes, liberando o material nuclear. O DNA livre forma uma massa gelatinosa que aumenta de consistência proporcionalmente com o número de leucócitos presentes no leite (MELLENBERGER, 2001). Outro método mais simples de diagnóstico é o do uso da caneca de fundo preto, que permite a observação de anormalidades no leite (CLEMENTS, 2003).

Todavia, por se tratar de diagnóstico indireto, a positividade, não necessariamente, indica mastite infecciosa. Pois, em muitos casos positivos para a mastite, pelo método de

CMT, não há presença de agente infeccioso em testes dependentes de cultivo (RIBEIRO, 2003).

Embora, como anteriormente citado, a etiologia da mastite seja bastante diversificada, podendo ser bacteriana, viral, fúngica, e até mesmo química, a maioria dos casos é de origem bacteriana. Várias bactérias são incriminadas nos casos de mastite em gado de leite. No Brasil as principais bactérias envolvidas são do gênero *Staphylococcus* spp. sendo a principal espécie *S. aureus* (OLIVEIRA et al., 2014). Além de *S. aureus*, algumas espécies coagulase negativa, são, também, isoladas de amostras de mastite como agentes causadores (RADOSTITS et al., 2010). Coliformes também são agentes de mastite, sendo *Escherichia coli* e *Klebsiela pneumoniae* as principais espécies desse grupo (HOGAN, 2003). *Streptococcus agalactiae* já tem sido associada em vacas leiteira com mastite clínica em diversos continentes como na África (PETZER et al., 2009), na Oceania (LEELAHAPONGSATHON et al., 2014) e países da América Latina (RAMIREZ et al., 2014; PANTOJA, 2014).

Embora raro no Brasil, *Mycoplasma bovis* pode estar envolvido em casos de mastite bovina (PUNYAPORNWITHAYA et al., 2010; PUNYAPORNWITHAYA et al., 2011; GONZALEZ & WILSON, 2003). O cultivo de *Mycoplasma bovis* é muito complexo e demorado, variando de 7-10 dias (HOGAN, 1999), com isso, sua avaliação raramente é realizada em casos de mastite.

Na rotina do diagnóstico bacteriológico da mastite, é comum a aplicação de métodos dependentes de cultivo associados a identificação fenotípica. Todavia, essa abordagem não se mostra tão eficiente na detecção de espécies mais exigentes quanto aos parâmetros nutricionais e que necessitam de maior tempo de cultivo. Para esses agentes, a aplicação de técnicas de extração do DNA total diretamente da amostra e posterior amplificação com *primers* específicos pode representar um avanço na detecção microbiana e consequente controle (DIBBERN et al., 2015).

O advento das técnicas moleculares permitiu conhecer os perfis genéticos destes agentes e cruzar tais informações para análise da diversidade dos clones circulantes na região estudada, fator essencial para o desenvolvimento apropriado de programas de prevenção e de terapias bem sucedidas (GIANNECHINI et al., 2002; MARQUES et al., 2013).

A técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante - DGGE, inicialmente foi proposta com objetivo de detectar mutações pontuais em determinados genes (FODDE & LOSEKOOT, 1994). Atualmente essa técnica tem sido empregada em avaliações do impacto de algum tratamento na diversidade microbiana. Na pecuária leiteira, essa técnica já foi usada para caracterizar a população de bactérias que colonizam a superfície do teto de vacas leiteiras (BRAEM et al., 2012) assim como detectar bactérias que apresentam dificuldades no cultivo para diagnóstico de mastite subclínica (KUANG et al., 2009).

Assim, esse estudo tem como padronizar a técnica de DGGE para a análise da diversidade microbiana do leite.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Amostragem

A comparação entre a metodologia tradicional de isolamento e identificação e a metodologia proposta de análise da diversidade microbiana por DGGE foi realizada em 20 amostras de leite bovino obtidas de 10 vacas, provenientes de fazendas da região Sul-Fluminense. Para fins do presente estudo, foram selecionadas amostras provenientes de vacas que apresentaram heterogeneidade de resultado entre os quatro tetos no teste de mastite. Em cada propriedade, antes da ordenha, realizou-se o *California Mastitis Test* (CMT) para diagnóstico de mastite subclínica (MENDONÇA, 2012). As coletas do leite foram realizadas no período matutino, e realizadas por meio de ordenha manual e individual segundo Fonseca & Santos (2000). As amostras foram obtidas dentro de condições de assepsia e antissepsia e encaminhadas para análise no Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LABAC-VET) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

2.4.2 Análise da microbiota bacteriana por metodologia dependente de cultivo

a) Isolamento bacteriano e identificação fenotípica

As amostras foram submetidas à rotina preconizada no LABAC-VET que consistiu na incubação das amostras por 6h a 37°C e isolamento primário em ágar Sangue (ágar base HiMedia® com 5% sangue de carneiro), as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a identificação presuntiva das colônias, as mesmas foram submetidas à coloração de Gram, para confirmação de suas características morfotintórias. De acordo com as características encontradas os isolados foram processados para melhor identificação fenotípica segundo protocolos estabelecidos na literatura (KONEMAN et al., 2008).

b) Identificação por MALDI-TOF MS

Para a confirmação da identificação fenotípica, os isolados foram submetidos a técnica de MALDI-TOF MS. Os espectros de cada amostra foram gerados em um espectrômetro de massa (MALDI-TOF LT MicroflexBruker, Bruker) equipado com laser de 337 nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa FlexControl 3.3 (Bruker).

Os espectros foram coletados na faixa de massas entre 2.000-20.000 m/s, e posteriormente analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker), com as configurações padronizadas para identificação bacteriana. Neste trabalho, considera-se como uma identificação aceitável aquelas que apresentaram valores iguais ou superiores a dois de uma escala de confiança que vai de zero a três.

2.4.3 Análise da microbiota bacteriana por metodologia independente de cultivo

a) Extração do DNA bacteriano diretamente de amostras de leite

Para extração do DNA total, foi utilizado protocolo adaptado por Tito e colaboradores (2015) para extração de DNA total de bactérias gram positivas e gram negativas. Um mililitro de cada amostra de leite foi centrifugado por 5 minutos a 1239g. As células foram ressuspendidas em 600 µL de solução de extração (TrisHCl 200 mM pH 8,0; EDTA 25 mM

pH 8,0; SDS 1%, NaCl 25 mM) e agitadas em vortex, sendo incubadas a 65°C por 30 min. Em seguida os tubos foram resfriados a temperatura ambiente, foi adicionado 600 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), seguido de uma homogeneização por 2 min e centrifugação a 14549g por 10 min. A fase superior foi transferida para um novo microtubo (aproximadamente 400 µL) e adicionado 2 volumes de etanol 100 % gelado, seguido de incubação a 20 °C por 2 ou 12 horas para a precipitação do DNA. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 14549g por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol 70% (aproximadamente 500 µL). Depois de seco a temperatura ambiente, os sedimentos foram ressuspensos em 30 µL de água ultrapura e armazenados a -20 °C.

b) Reação de polimerase em cadeia – PCR da região 16S do rDNA de bactérias

Para aumentar a sensibilidade, e para facilitar a análise dos fragmentos do mesmo tamanho, a técnica de nested-PCR foi utilizada. Na primeira reação de PCR, foram utilizados 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas), tampão de reação 1X, 200 µM de cada dNTP, 3,0 mM MgCl₂ e 0,5 µM dos *primers* 27f (SUZUKI E GIOVANNONI, 1996) e 1512r (KANE et al., 1993). As amplificações foram conduzidas segundo os seguintes parâmetros: 5 min de desnaturação inicial a 94 °C, 30 ciclos de 94 °C por 60 s, 68 °C por 60 s, 72 °C por 60 s, seguida de uma elongação final a 72 °C por 10 min. Cinco microlitros dos produtos de PCR foram separados em eletroforese em gel de 1,5 % de agarose acrescido de SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), e o gel foi visualizado sob luz UV 254 nm. Os produtos da primeira reação foram utilizados como molde para a segunda reação de PCR utilizando os *primers* que amplificam a região V3 do rDNA 16S, GC-338f e 518r *primers* (OVREAS et al., 1997). As amplificações foram conduzidas segundo os seguintes parâmetros: 5 min de desnaturação inicial a 94 °C, 30 ciclos de 94 °C por 60 s, 55 °C por 60 s, 72 °C por 60 s, seguida de uma elongação final a 72 °C por 5 min.

c) Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante - DGGE

Os produtos da segunda reação de PCR foram avaliados em um gel de 8% de poliacrilamida e gradiente de concentração entre 40% e 70% definido a partir da mistura de soluções de uréia e formamida deionizada. A eletroforese foi realizada a 70 V e 60°C, por 18 horas, em um equipamento DcodeTM “Universal Mutation Detection System” (BIO-Rad, Richmond, EUA). Os géis foram fotografados e as imagens foram analisadas com o software Bionumerics (AppliedMaths, Saint-Martens-Latem).

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Análise da microbiota bacteriana por metodologia dependente de cultivo

Foi possível o isolamento bacteriano em seis das 10 amostras analisadas neste estudo (Tabela 1). A espécie *Staphylococcus aureus* foi a única detectada através do protocolo de isolamento e identificação utilizado. Cabe ressaltar que este protocolo é padronizado para análises deste tipo de amostra (BLAGITZ et al., 2011). Estes resultados apontam para as dificuldades encontradas na adoção de protocolos dependentes de cultivo, uma vez que não é possível afirmar que o não crescimento bacteriano observado é decorrente de algum agente inibitório, de natureza biótica ou abiótica, interferindo no crescimento de espécies presentes na amostra, ou ainda se o processo inflamatório detectado pelo CMT não era causado por agente bacteriano.

Tabela 1-Distribuição das espécies bacteriana nas amostras de leite analisadas.

Amostra	Vaca	CMT/Teto	Isolados	Confirmação MALDI-TOF MS
1C		POSITIVO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1S	Laica	NEGATIVO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
2C		POSITIVO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
2S	Chica	NEGATIVO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
3C		POSITIVO	NHCB	NHCB
3S	Carioca	NEGATIVO	NHCB	NHCB
4C		POSITIVO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
4S	Chalana	NEGATIVO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
5C		POSITIVO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
5S	Imperatriz	NEGATIVO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
6C		POSITIVO	NHCB	NHCB
6S	Adelaide	NEGATIVO	NHCB	NHCB
7C		POSITIVO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
7S	Raina	NEGATIVO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
8C		POSITIVO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
8S	Passa vinte	NEGATIVO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
9C		POSITIVO	NHCB	NHCB
9S	Baixinha	NEGATIVO	NHCB	NHCB
10C		POSITIVO	NHCB	NHCB
10S	Jandira	NEGATIVO	NHCB	NHCB

*NHCB= Não houve crescimento bacteriano

A única espécie isolada nas amostras estudadas foi *S. aureus*, o que não é incomum uma vez que esta é considerada o principal agente relacionado a mastite bovina (LAZZARI et al., 2014; VIANA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014; PARDO et al., 2014). Kaiser et al. (2014) não observaram crescimento bacteriano em 68 das 295 amostras analisadas, corroborando a idéia de que fatores bióticos e abióticos podem interferir no crescimento e comprometer a acurácia da técnica. Deve ser considerado que não se pode atribuir a etiologia a um agente simplesmente pela sua detecção, pois bactérias como *S. aureus* também são consideradas parte integrante da microbiota das vacas (ROBERSON et al., 1994). Outros critérios devem ser levados em consideração tais como, concentração do agente, patogenicidade da cepa, estado imunitário do animal. Devido a limitações das técnicas fenotípicas de isolamento e identificação bacteriana, atualmente, estas tem sido associada a técnicas moleculares que permitem maior especificidade na diferenciação entre os isolados bacterianos, bem como maior acurácia na diferenciação de cepas patogênicas das não patogênicas (MACHRY et al., 2010).

A associação entre técnicas fenotípicas e moleculares na detecção e identificação bacteriana representa um avanço na eficácia desse modelo de análise, mas por outro lado, continua sendo um processo laborioso, caro e que não necessariamente produzirá os resultados desejados. Desse modo, a padronização de metodologia independente de cultivo na análise direta das amostras de leite mastítico poderia representar um processo de triagem na identificação de possíveis agentes etiológicos. Embora tal metodologia ainda seja de uso restrito ao ambiente acadêmico, dentro da proposta do Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, cabe envidar esforços no sentido de adaptar tais técnicas ao atendimento das demandas do campo.

2.5.2 Análise da microbiota bacteriana por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

Pela observação do gel de DGGE foi possível detectar a diferença existente entre as amostras de leite dos tetos com mastite subclínica e amostras provenientes de tetos sadios do mesmo animal. Desta forma comprovou-se que existe diferença entre a população de bactérias nos dois grupos analisados. Essa diferença foi observada não só pela presença ou ausência de Unidade Taxonômica Operacional (UTO), mas também pelo aumento da sua intensidade nas amostras positivas para mastite subclínica (Figura 1).

Na observação do perfil eletroforético dos dois grupos dentro do mesmo animal, foi possível detectar a presença de UTOS exclusivos dos tetos mastíticos em oito animais. Em dois animais, não houve diferença no perfil de bandas entre os grupos, porém, foi possível detectar um aumento da intensidade de algumas bandas nas amostras oriundas de tetos mastíticos. A avaliação da intensidade das bandas faz da técnica uma análise semiquantitativa (ASHER et al., 2010), revelando um aumento na concentração de DNA representativo de tais UTOS. Essa técnica já havia sido usada no estudo da diversidade em mastite se mostrando eficiente na caracterização da microbiota da superfície de tetos de vacas mastíticas (BRAEM et al., 2012) e no diagnóstico de bactérias que apresentam dificuldades no cultivo (KUANG et al., 2009).

A aplicação da técnica de DGGE demonstrou a diferença de populações bacterianas existente no leite proveniente de tetos mastíticos e sadios. Para caracterização e identificação dos membros predominantes de grupos específicos de microrganismos nas amostras, faz-se necessário, em etapa futura, realizar a excisão, eluição, sequenciamento dos fragmentos e afiliação filogenéticas das sequências.

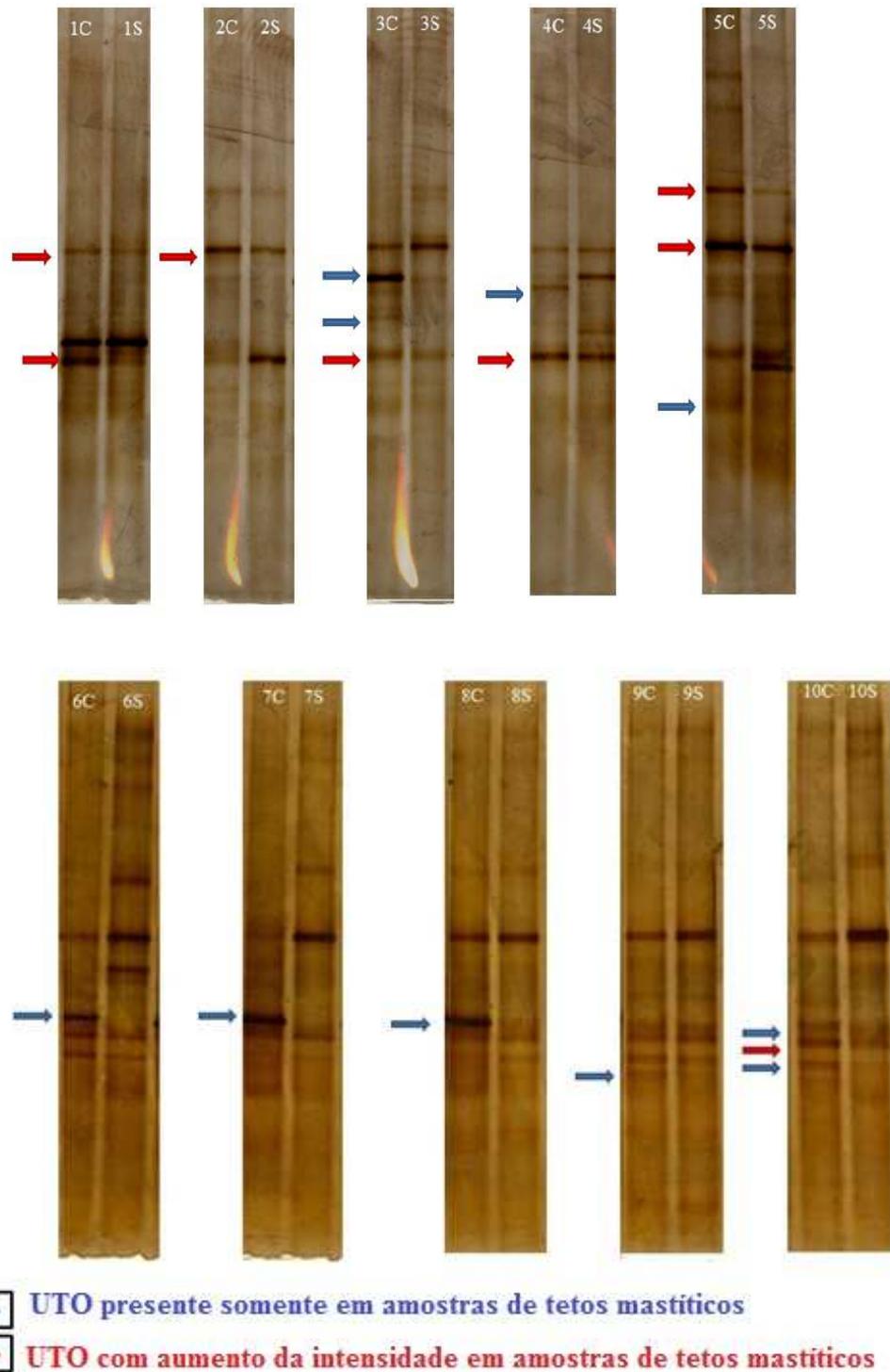


Figura 1- Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) em leites provenientes de tetos mastíticos(C) e sadios (S) de vacas, enfocando a presença e diferença na intensidade das bandas representativas dos UTOs.

2.6 CONCLUSÕES

A espécie *Staphylococcus aureus* foi prevalente nas amostras avaliadas.

Não foi possível o isolamento bacteriano em algumas amostras.

A observação do gel de DGGE assinalou diferenças entre a população oriunda do leite de tetos mastíticos e sadios do mesmo animal.

O sequenciamento das UTOs do gel de DGGE é uma ferramenta que pode ser utilizada em estudos futuros para diferenciar a microbiota comensal da microbiota com potencial patogênico.

3. CAPITULO II

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA POR METODOLOGIA INDEPENDENTE DE CULTIVO NO ESTUDO DE VIABILIDADE DA DESTINAÇÃO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA AGROENERGÉTICA COMO FERTILIZANTE AGRÍCOLA

3.1 RESUMO

Substituição dos combustíveis fósseis é uma preocupação mundial. Essa tendência se deve as oscilações no preço do petróleo no mercado internacional e por questões ecológicas. O biodiesel produzido pelas indústrias agroenergéticas tem se mostrado uma alternativa viável a essa questão. Sendo o Brasil um dos países que se destacam nesse setor, muitos estudos são desenvolvidos para otimizar sua produção. Assim como a indústria petrolífera, a indústria agroenergética gera resíduos que devem ser corretamente destinados. Uma das possíveis destinações para esses resíduos é sua utilização como adubos agrícolas. O objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto do uso da associação entre cascalho de perfuração (resíduo da indústria petrolífera) e dois resíduos da indústria agroenergética, torta de mamona e torta de crambe. O primeiro experimento avaliou a associação entre o cascalho de perfuração e a torta de mamona, em dois tipos de solos: Planossolo e Argissolo, com dois cultivos diferentes: girassol e mamona. O segundo experimento avaliou a associação do cascalho de perfuração com torta de crambe em diferentes concentrações em Planossolos cultivados com girassol. A técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante - DGGE foi utilizada para avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a diversidade bacteriana. O gel produzido pelo DGGE no primeiro experimento mostrou aumento da diversidade bacteriana em solos do tipo Planossolo, independente da planta cultivada. O segundo experimento revelou maior número de bandas no de gel DGGE quando uma maior quantidade da torta de crambe e uma concentração intermediária de cascalho de perfuração, respectivamente $32t.ha^{-1}$ e $30t.ha^{-1}$, foram utilizadas. O presente estudo concluiu que a técnica de DGGE se mostrou eficiente na avaliação da diversidade bacteriana em solos submetidos a diferentes tratamentos.

Palavras-chave: Cascalho de perfuração. DGGE. Solos. Diversidade bacteriana.

3.2 ABSTRACT

Substitution of fossil fuels has been a global concern, due to oil prices fluctuation at the international market and ecological issues. Biodiesel produced by agro-energy industry has been a viable alternative. Many studies have been developed for optimizing its production because Brazil has stood up this sector. Agro-energy industry, as well as, oil industry has generated waste which must be properly designated. One of the possible destination for this waste is its employment as agriculture fertilizer. This study aimed the evaluation of the impact of the association between drill cuttings (castor beans oil industry residue) and two agro-energy industry residues: castors beans and cramble pies. The first experiment evaluated the association between drill cuttings and castor beans, in two soil types: *Planossolo* and *Argissolo* with two different crops: Sunflower and Castor Beans. The second experiment evaluated the association of drill cuttings with cramble pie at different concentrations. Denaturing gradient gel electrophoresis- DGGE was used to assess the effects of treatments on bacterial diversity. The first one showed the best result on *Planossolo* due to the increasing in bacterial diversity independently of the type of crop cultivated. The second experiment showed the best employment of cramble pie and drill cuttings was the one employing the largest amount of cramble pie and intermediate concentration of drill cuttings, 32 t.ha⁻¹ and 30 t.ha⁻¹, respectively. This study concluded the DGGE technique as an efficient one for detecting differences between bacterial diversity in soils submitted to different treatments.

Key words: Drill cuttings. DGGE. Soil. Bacterial diversity.

3.3 INTRODUÇÃO

O Brasil é referência na produção de agroenergia. Programas como os do etanol e do biodiesel atraem a atenção do mundo por ofertar alternativas econômica e ecologicamente viáveis à substituição dos combustíveis fósseis. Menos poluente e mais barata, a geração de energia com o uso de produtos agrícolas representa a segunda principal fonte de energia primária do País. O consumo do álcool supera o da gasolina e o biodiesel já conta com participação relevante na matriz de combustíveis no País em mistura obrigatória com o óleo diesel.

Dados do SAPCANA, Sistema de Acompanhamento da Produção Canavieira, revelam que até o mês de maio de 2013 a safra nacional de cana já passou de nove milhões de toneladas. Quase a totalidade dessa produção está situada na região centro-sul, sendo o estado de São Paulo o maior produtor do Brasil. Ainda segundo o SAPCANA o volume nacional de etanol produzido nacionalmente passa dos 360 mil m³.

Além da produção do etanol, o biodiesel também pode ser usado como alternativa à substituição dos combustíveis fósseis. Nessa área, o Brasil apresenta um grande potencial produtivo. Ao analisar a produção nacional de biodiesel dos últimos oito anos, observa-se uma grande elevação (MAPA, 2013). Em 2005 a produção nacional foi de 736 m³, seis anos depois, em 2011 essa produção ultrapassou 2,6 milhões de m³.

O biodiesel é produzido a partir de diversos óleos vegetais e animais. No Brasil, é composto principalmente pelo óleo de soja, seguido imediatamente pela gordura bovina e óleo de algodão, como observado na Figura 02.

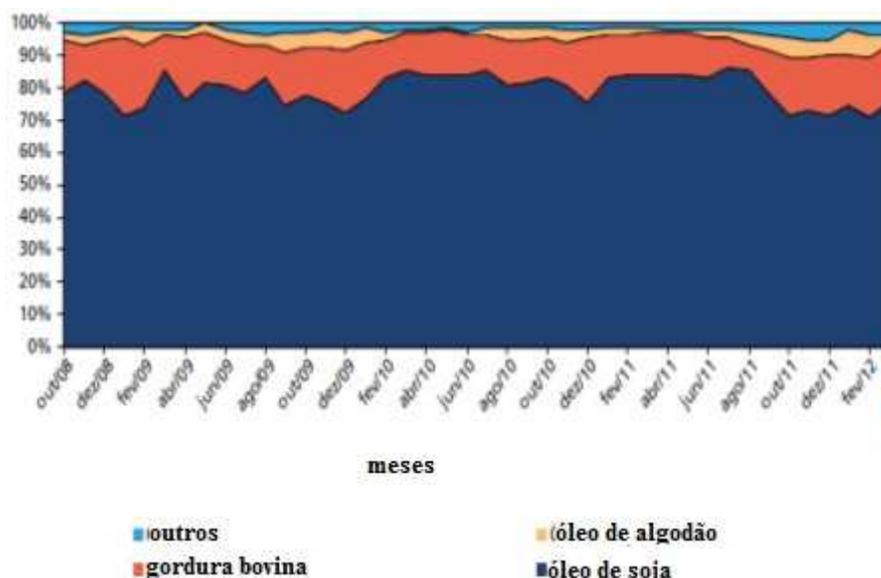


Figura 2 - Composição das matérias-primas utilizadas na produção do biodiesel do Brasil.
Fonte: MAPA, 2003.

Outros substratos mais rentáveis podem ser utilizados na produção do biodiesel como o girassol, algodão, amendoim, mamona e a canola (GAZZONI, 2009). Levando em consideração o rendimento de óleo, o girassol apresenta um melhor desempenho que a soja, porém seu balanço energético é desfavorável (GAZZONI, 2005). Levando em consideração o

rendimento de óleo, a mamona apresenta grande vantagem em relação aos outros substratos, seu rendimento é de 4.700 kg/ha de óleo, enquanto que a soja apresenta um rendimento de 560 kg/ha e o girassol 774 kg/ha. A desvantagem da mamona está em seu balanço energético que está em 1:1,85, menor inclusive que o do girassol, que está em 1:2,37 (MAPA, 2013). Isto significa que, na cultura da mamona, para cada unidade de energia que entra no sistema são produzidas 1,85 unidades de energia, sendo essa relação de 1:3,95 para a soja.

Para melhorar o balanço energético de culturas como girassol, algodão, amendoim, mamona e a canola é necessário reduzir a demanda energética com adubação nitrogenada, uso de máquinas, implementos e transporte e com herbicida. Para tanto, são necessários investimentos em pesquisa para descobrir microrganismos simbiotes com a propriedade de fixar N atmosférico, à semelhança do que ocorre com leguminosas e, em menor escala, com outras famílias de vegetais (GAZZONI, 2005).

Diversos são os desafios para monitoramento dos aspectos relacionados ao desenvolvimento da produção de biocombustíveis no Brasil. A maioria dos estudos sobre impactos ambientais da geração e do uso da agroenergia não leva em consideração a mudança no uso da terra para esse fim (JANDREY, 2010). A Política de Biodiesel brasileiro não possui objetivos de promover a inclusão social e o desenvolvimento regional. Sua base está limitada a soja e sua produção predominante pelos grandes produtores, com pouca participação da agricultura familiar (GARCEZ, 2009).

Além dos prejuízos sociais, a produção de óleo vegetal, matéria prima para a produção do biodiesel, gera resíduos. O acúmulo a longo prazo desses resíduos orgânicos sem um tratamento adequado gera riscos sanitários e ambientais. No entanto, a Petrobrás desenvolveu uma nova rota tecnológica para fabricação de biodiesel que prevê a produção diretamente de sementes (de qualquer planta oleaginosa), sem a necessidade de extrair o óleo anteriormente (FREITAS, 2009). Ambos os processos geram um resíduo denominado torta.

Ainda na área energética, mas se tratando da extração do petróleo, a indústria petrolífera produz efluentes líquidos, gasosos e resíduos sólidos que podem ser nocivos ao meio ambiente e à saúde pública. Os fragmentos de rocha triturados pela broca de perfuração, conhecidos como cascalho de perfuração, são removidos continuamente através de um fluido de perfuração, que é injetado por dentro da coluna de perfuração e retorna pelo espaço anular entre a coluna e as paredes do poço (LINS & LUZ, 2003).

Durante a perfuração dos poços de petróleo o principal resíduo produzido é o cascalho de perfuração, que é constituído de partículas de rocha impregnadas com fluido de perfuração. Historicamente, a maior parte do cascalho de perfuração tem sido gerenciada através da disposição em aterros (poços em continente: *on-shore*) ou no mar (*off-shore*), no entanto sua reutilização em outras atividades pode ser vantajosa, desde que os teores de hidrocarbonetos, umidade, salinidade e argila estejam adequados à destinação pretendida. O uso como material de preenchimento em pavimentações de estradas, betume, asfalto ou em fábricas de cimentos estão entre as destinações mais frequentes do cascalho de perfuração (BALL et al., 2012).

A reutilização de resíduos é, sem dúvida, a opção mais interessante sob o ponto de vista econômico, ambiental, e, muitas vezes, social. A reciclagem de resíduos representa um benefício inquestionável: a minimização do problema ambiental que representa seu descarte inadequado. Neste contexto, destaca-se a reciclagem de resíduos em solos agrícolas, que é uma alternativa muito utilizada em vários países. Entre os resíduos orgânicos também merecem destaque os oriundos da agroindústria, pois, em função da sua origem, a probabilidade destes apresentarem contaminantes em sua composição é pequena. Sob o ponto de vista agrícola, a principal vantagem do uso de resíduos relaciona-se ao fornecimento de nutrientes neles contidos e/ou com benefícios ligados ao seu conteúdo orgânico, que pode

manter, ou mesmo elevar, o teor de matéria orgânica do solo, além de corrigir a acidez do solo (MARCIANO et al., 2001; PIRES et al., 2008).

A utilização na agricultura dos resíduos das indústrias agroenergética e petrolífera contribui para redução dos prejuízos decorrentes de seu mau acondicionamento. Porém, esse direcionamento deve ser tratado com muita seriedade e estudos visando o monitoramento de seu impacto, para que esse uso não gere um problema ainda maior são essenciais (OLIVEIRA, 2008).

A diversidade microbiológica do solo é uma característica que indica a sua qualidade. O estudo dessa diversidade pode auxiliar no monitoramento da qualidade de solos submetidos a diferentes condições ambientais, sendo utilizado como indicador de qualidade ambiental (KENNEDY & SMITH, 1995; MENDES & REIS, 2010).

A detecção e identificação de microrganismos em amostras ambientais podem ser baseadas em técnicas de plaqueamento e cultivos em meios seletivos e/ou não seletivos e, métodos de observação direta em microscópio (TORSVIK & OVREAS, 2002). Os microrganismos que conseguem crescer em meios artificiais não são necessariamente metabólica ou numericamente dominantes no meio natural de onde foram retirados, havendo uma forte seleção em função da habilidade dos microrganismos em se desenvolverem em meios com altas concentrações de nutrientes e geralmente em condições aeróbias (HUGENHOLTZ, 2002; MYUZER & RAMSING, 1995). Nesse contexto, numerosos meios de cultura, seletivos e não-seletivos, têm sido utilizados para enumerar e isolar microrganismos do solo e da rizosfera com influência dos mesmos nos graus de diversidade genética obtidos (BUYER, 1995; TABACCHIONI et al., 2000). Entretanto, a abordagem baseada em cultivo tem limitado a estimativa da diversidade microbiana, devido à falha de cultivo da maioria dos microrganismos pelos métodos convencionais. Ferramentas moleculares vêm reduzindo essas limitações e revelando nova perspectiva sobre a diversidade microbiana. Esses novos métodos de detecção de microrganismos, sem necessariamente cultivá-los, certamente contribuirão para inferir sobre a significância dos mesmos nos solos.

Vários métodos têm surgido para caracterizar a comunidade microbiana, incluindo os microrganismos não cultiváveis, produzindo sequências de novas linhagens filogenéticas, através da utilização do DNA genômico extraído diretamente de amostras ambientais.

A diversidade microbiana estrutural vem atualmente sendo estudada através de métodos que se baseiam na investigação de parte da sequência do DNA ambiental, notadamente o gene 16S rDNA em bactérias, e 18S rDNA para fungos, que é amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e posteriormente caracterizado através da clonagem e sequenciamento ou então analisado por eletroforese, por meio das técnicas de ARDRA, T-RFLP, RAPD, RISA, DGGE/TGGE e SSCP, obtendo-se um perfil da comunidade microbiana. Este tipo de análise tem-se tornado muito popular para auxiliar a identificação de bactérias não conhecidas (ELSAS & SMALLA, 1995; DERAKSHANI et al., 2001; TORSVIK & OVREAS, 2002).

No DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), primeiramente utilizado por Muzer et al. (1993) para avaliação da diversidade microbiana, os produtos de PCR são separados em géis de poliacrilamida contendo um gradiente desnaturante com concentrações crescentes de formamida e uréia. A separação de fragmentos de tamanhos semelhantes, mas de composição nucleotídica diferente, baseia-se na mobilidade eletroforética das moléculas de DNA parcialmente desnaturadas em géis de poliacrilamida. As variações na composição de nucleotídeos dos diferentes fragmentos de DNA determinam seu comportamento de migração no gel, fazendo com que fragmentos com composição nucleotídica diferentes terminem sua migração em posições diferentes ao longo

do gel. A migração dos fragmentos de DNA no DGGE é governada não apenas pela composição de nucleotídeos, mas também pelas interações entre estes dentro da molécula (BRESLAUER et al., 1986).

A técnica do DGGE permite investigar as comunidades de microrganismos do solo e é capaz de apontar mudanças dentro da composição dessa comunidade em função de atividades antrópicas (FERREIRA, 2009).

O objetivo deste capítulo é avaliar o impacto da utilização de resíduos da indústria de agroenergia – cascalho de perfuração e tortas de mamona e crambe na diversidade microbiana do solo. O entendimento da dinâmica e a mensuração dos efeitos deste rejeito no solo podem contribuir para a criação de um plano de manejo e gerenciamento dos cascalhos de perfuração e tortas, vislumbrando sua reutilização de forma segura e responsável no meio ambiente.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Montagem e condução dos experimentos em casa de vegetação

As amostras de solos utilizadas para análise da diversidade bacteriana por metodologia independente de cultivo pela técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante - DGGE foram oriundas de dois experimentos realizados em casa de vegetação, na área experimental do Departamento de Solos do Instituto de Agronomia da UFRRJ, sob a coordenação do professor Everaldo Zonta. Os experimentos 1 e 2 foram conduzidos por 76 e 90 dias, respectivamente.

a) Experimento 1 – Avaliação da associação entre torta de mamona e cascalho de perfuração em solos cultivados com girassol e mamona

O delineamento experimental foi do tipo fatorial (2 x 3 x 2 x 3), composto por dois solos de texturas contrastantes (arenoso e argiloso), duas combinações de torta de mamona e cascalho de perfuração, previamente caracterizados, duas oleaginosas (mamona –*Ricinnus comunis L.* e girassol –*Helianthus annusL.*) e três repetições, totalizando 36 unidades experimentais (Tabela 02).

Foram utilizados vasos fechados, com um volume de 0,0042 m³. Foram pesados 5 kg do substrato de textura arenosa e 4 kg do substrato argiloso, sendo assim possível manter 70% da capacidade de campo de forma constante durante a condução do experimento.

Tabela 2 - Tratamentos utilizados no experimento 1 em casa de vegetação

Tratamentos	Solos	Plantas	Torta de mamona	Cascalho de perfuração
			(PDS)	
			----- Mg ha ⁻¹ -----	
A-0/0-G-8*	Argissolo	Girassol	0	0
A-10/16-G			10	16
A-10/64-G			10	64
A-0/0-M*		Mamona	0	0
A-10/16-M			10	16
A-10/64-M			10	64
P-0/0-G*	Planossolo	Girassol	0	0
P-10/16-G			10	16
P-10/64-G			10	64
P-0/0-M*		Mamona	0	0
P-10/16-M			10	16
P-10/64-M			10	64

*Controles

b) Experimento 2 – Avaliação da associação entre torta de crambe e cascalho de perfuração em solos cultivados com girassol

O delineamento experimental foi do tipo fatorial (3x3), composto por três combinações de torta de crambe e três combinações de cascalho de perfuração, onde foram

cultivadas as mudas de girassol (*Helianthus annuus L.*), totalizando nove unidades experimentais (Tabela 03).

Cada parcela foi constituída de um pote com 8L de amostra de solo (Planossolo) acrescido do respectivo tratamento. A mistura foi umedecida e após 10 dias foi realizado o plantio das sementes de girassol.

Tabela 3 - Tratamentos utilizados no experimento 2 em casa de vegetação

Tratamentos	Solos	Plantas	Torta de crambe ----- Mg ha ⁻¹ -----	Cascalho de perfuração
0/0*	Planossolo	Girassol	0	0
16/0			16	0
32/0			32	0
0/30			0	30
16/60			16	30
32/30			32	30
0/60			0	60
16/60			16	60
32/60			32	60

*Controle

3.4.2 Amostragem e armazenamento de amostras dos solos

Foram coletadas 35 g de amostras de solo ao final de cada experimento, no momento de coleta das plantas. Amostras de 25 g de cada tratamento foram analisadas fenotipicamente em estudos anteriores e seus resultados subsidiarão aspectos da discussão do presente estudo. Amostras de 10 g foram estocadas a -20 ° C para análises independentes de cultivo.

3.4.3 Análise da diversidade microbiana

Para a análise da diversidade bacteriana foi utilizada a técnica independente de cultivo através do DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*).

a) Extração de DNA direto do solo

A extração do DNA total do solo foi realizada utilizando o kit PowerMax™ Soil DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Inc), segundo protocolo fornecido pelo fabricante.

b) Avaliação da quantidade e qualidade do DNA

Todas as amostras foram armazenadas a -20° C, e a quantidade e a qualidade do DNA obtido foi avaliada eletroforese em gel de agarose 0,8 % acrescido de SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), e o gel foi visualizado sob luz UV 254 nm.

c) PCR (*Polymerase Chain Reaction*) da região 16S rDNA de bactérias

Para aumentar a sensibilidade, e para facilitar a análise dos fragmentos do mesmo tamanho, a técnica de *nested*-PCR foi utilizada. Na primeira reação de PCR, foram utilizados 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas), tampão de reação 1X, 200 µM de cada dNTP, 3,0 mM MgCl₂ e 0,5 µM dos *primers* 27f (SUZUKI & GIOVANNONI, 1996) e 1512r (KANE et al., 1993). As amplificações foram conduzidas segundo os seguintes parâmetros: 5 min de desnaturação inicial a 94 °C, 30 ciclos de 94 °C por 60 s, 68 °C por 60 s, 72 °C por 60 s, seguida de uma elongação final a 72 °C por 10 min. Cinco microlitros dos produtos de PCR

foram separados em eletroforese em gel de 1,5% de agarose acrescido de SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), e o gel foi visualizado sob luz UV 254 nm. Os produtos da primeira reação foram utilizados como molde para a segunda reação de PCR utilizando *primers* que amplificam a região V3 do rDNA 16S, GC-338f e 518r (OVREAS et al., 1997). As amplificações foram conduzidas segundo os seguintes parâmetros: 5 min de desnaturação inicial a 94 °C, 30 ciclos de 94 °C por 60 s, 55 °C por 60 s, 72 °C por 60 s, seguida de uma alongação final a 72 °C por 5 min.

d) Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE*)

Os produtos da segunda reação de PCR foram avaliados em um gel de 8% de poliacrilamida e gradiente de concentração entre 44% e 60% definido a partir da mistura de soluções de uréia e formamida deionizada. A eletroforese foi realizada a 70 V e 60°C, por 16 horas, em um equipamento Dcode™ “*Universal Mutation Detection System*” (BIO-Rad, Richmond, EUA). Os géis foram fotografados e as imagens foram analisadas com o software Bionumerics (AppliedMaths, Saint-Martens-Latem). determinando-se as diferenças através do coeficiente de Dicce para a análise de agrupamento foi usado o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*).

e) Preparo e sequenciamento de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) de interesse

Algumas bandas de interesse foram selecionadas para identificação por sequenciamento. Após a seleção, essas bandas foram excisadas do gel com lâmina de bisturi esterilizada e eluída em 10 uL de água ultrapura por 16 h a 4°C. Após a incubação esse material foi centrifugado por 1 minuto a 124g e uma alíquota de 2 uL usada para amplificação por PCR utilizando os *primers* 518R/338F. As amplificações foram conduzidas segundo os seguintes parâmetros: 5 min de desnaturação inicial a 94 °C, 30 ciclos de 94 °C por 60 s, 55 °C por 60 s, 72 °C por 60 s, seguida de uma alongação final a 72 °C por 5 min. Cinco microlitros dos produtos de PCR foram separados em eletroforese em gel de 1,5% de agarose acrescido de SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), e o gel foi visualizado sob luz UV 254 nm. O produto de PCR foi purificado com uso do Kit QIAquick *gel extraction* (Qiagen, Hilden, Alemanha) e, em seguida, sequenciado no sequenciador ABI 3130xl da *Applied Biosystems* do Laboratório de Biotecnologia da Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Análise da diversidade bacteriana por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE*)

a) Experimento 1 - Avaliação da associação entre torta de mamona e cascalho de perfuração no cultivo de girassol e mamona

Após a extração do material genético das amostras do solo, esse DNA foi amplificado com uso dos pares de *primers* 27F/1512R (Figura 3) cujos *amplicons* de aproximadamente 1500 pb gerados foram usados na segunda reação de PCR (*Nested-PCR*) com os *primers* CG-338F/518R (Figura 4). Os *amplicons* de aproximadamente 198 pb produzidos no *Nested-PCR* foram submetidos a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) (Figura 5).

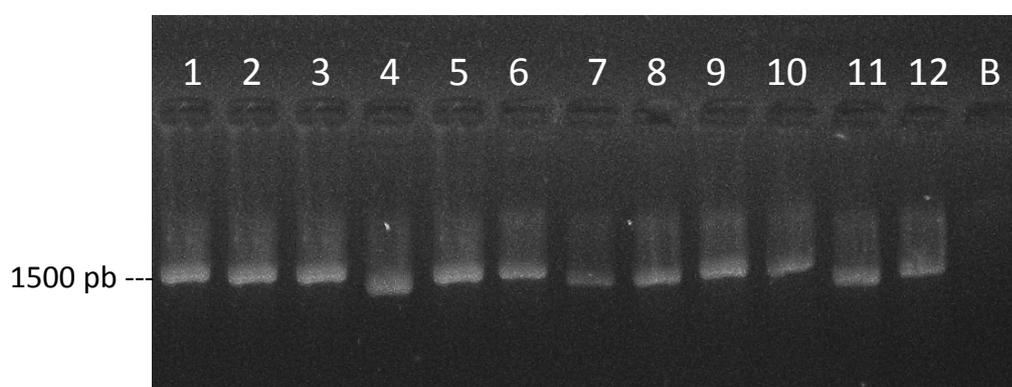


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação da região 16S do rDNA do DNA total extraído direto do solo com os *primers* 27f e 1512r. Tratamentos dos solos: 1. A-0/0-G, 2. A-10/16-G, 3. A-10/64-G, 4. A-0/0-M, 5. A-10/16-M, 6. A-10/64-M, 7. P-0/0-G, 8. P-10/16-G, 9. P-10/64-G, 10. P-0/0-M, 11. P-10/16-M, 12. P-10/64-M (Descrição dos tratamentos – Tabela 2).

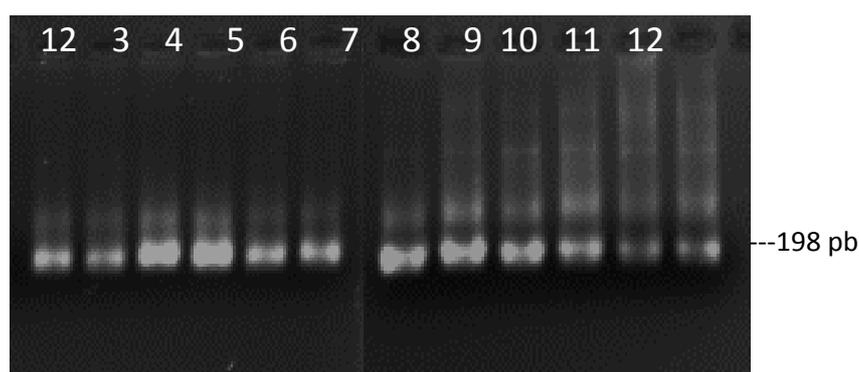


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação da região 16S do rDNA do DNA total extraído direto do solo com os *primers* GC-338f e 518r. Tratamentos dos solos: 1. A-0/0-G, 2. A-10/16-G, 3. A-10/64-G, 4. A-0/0-M, 5. A-10/16-M, 6. A-10/64-M, 7. P-0/0-G, 8. P-10/16-G, 9. P-10/64-G, 10. P-0/0-M, 11. P-10/16-M, 12. P-10/64-M (Descrição dos tratamentos – Tabela 2).

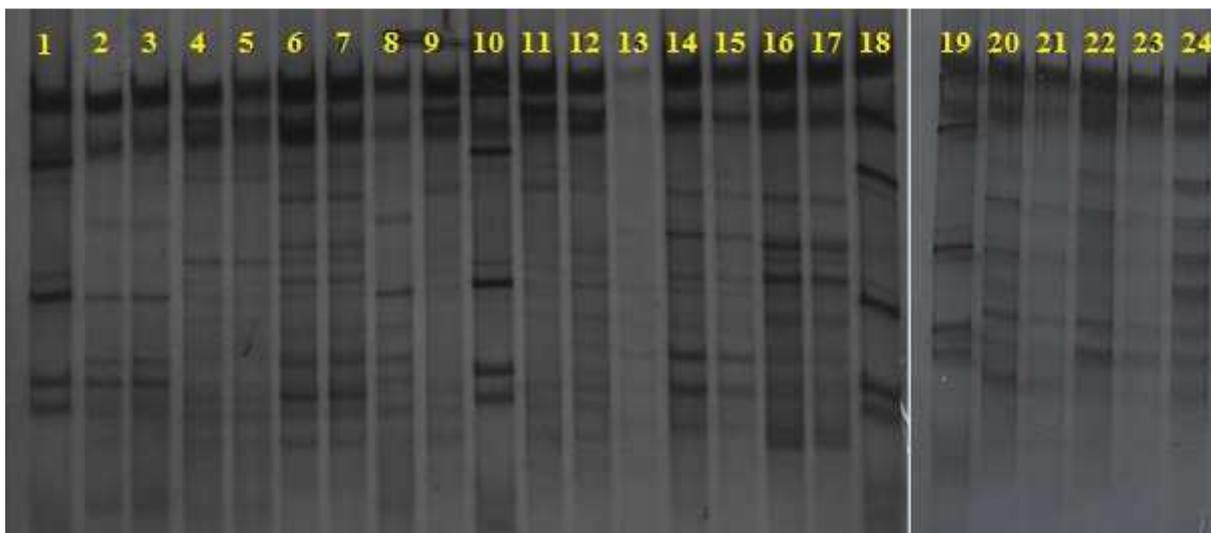


Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante dos produtos de amplificação da região 16S do rDNA do DNA total extraído direto do solo com os *primers* GC-338f e 518r. Tratamentos dos solos: 1. Marcador, 2. A-0/0-G, 3. A-0/0-G, 4. A-10/16-G, 5. A-10/16-G, 6. A-10/64-G, 7. A-10/64-G, 8. A-0/0-M, 9. A-10/16-M, 10. Marcador, 11. A-10/16-M, 12. A-10/64-M, 13. P-0/0-G, 14. P-10/16-G, 15. P-10/16-G, 16. P-10/64-G, 17. P-10/64-G, 18. Marcador, 19. Marcador, 20. P-0/0-M, 21. P-0/0-M, 22. P-10/16-M, 23. P-10/16-M, 24. P-10/64-M (Descrição dos tratamentos – Tabela 2)

O padrão de bandejamento dos *amplicons* no gel de DGGE revelou a existência de diferentes unidades taxonômicas operacionais (UTOs) de bactérias, com perfis de distribuição diversos entre as amostras. Os perfis eletroforéticos demonstraram que, comparado ao grupo controle, as amostras que receberam a associação entre torta de mamona e cascalho de perfuração apresentaram um aumento na diversidade bacteriana. O aumento do número de bandas no gel foi progressivo nas amostras em que foram cultivadas mamona, tanto para o substrato Planossolo quanto Argissolo. Quando cultivadas com girassol, em substrato Planossolo, não houve aumento do número de bandas conforme o aumento da concentração de cascalho de perfuração. Já no substrato Argissolo, houve uma relação inversa, quanto maior a concentração de cascalho de perfuração, menor o número de bandas observadas no gel (Tabela 4). Estes resultados corroboram com a literatura que relata que diferentes plantas selecionam populações bacterianas distintas (DA COSTA et al., 2014).

Singh et al. (2006) aplicaram as técnicas de DGGE e T-RFLP, juntamente com métodos fisiológicos (Biolog) e bioquímicos (análise de ácidos graxos de fosfolípídeos ou *Phospholipids Fatty Acid* ou PLFA) para detectar efeito da planta *Lolium perenne* em três tipos de solos com propriedades químicas diferentes sobre a estrutura das comunidades microbianas no qual concluiu que DGGE tem grande capacidade de detectar alterações pela diferença do substrato dos solo e do cultivo de plantas.

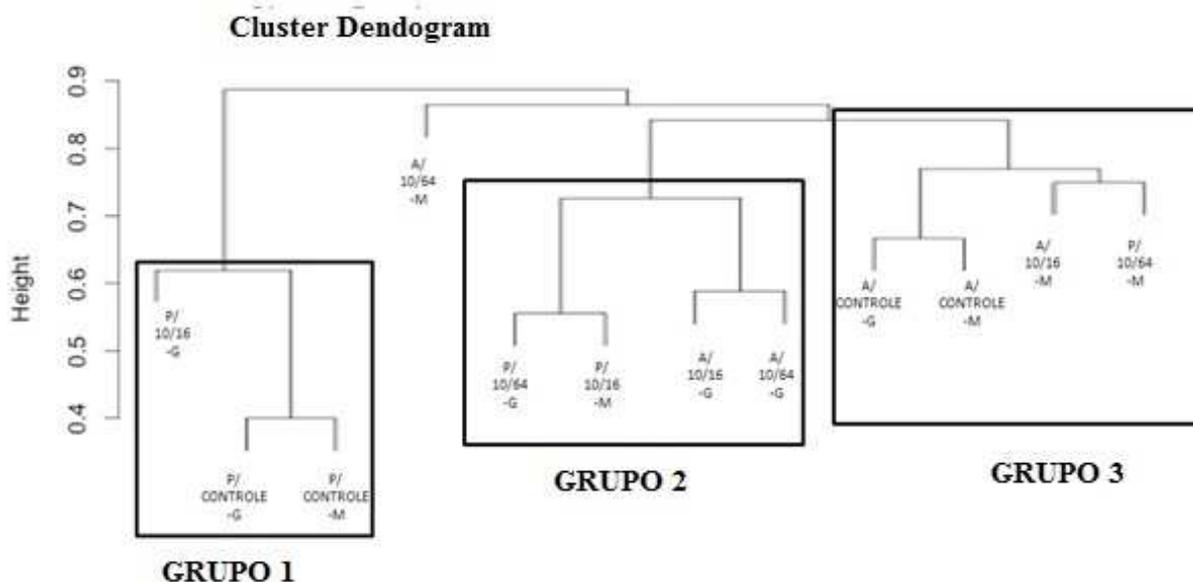


Figura 6 - Dendrograma de dissimilaridade genética obtido pelo método de agrupamento UPGMA gerado a partir da análise de bandas obtidas por PCR-DGGE com *primers* universais que amplificam a região do gene ribossomal 16S de *Bacteria*.

A: Argissolo, P: Planossolo, G: Girassol, M: Mamona, 10/16: 10 Mg ha⁻¹ de torta de mamona e 16 Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração, 10/64: 10 Mg ha⁻¹ de torta de mamona e 64 Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração.

Embora o tratamento tenha gerado um aumento da diversidade bacteriana, a adição dos resíduos da indústria agroenergética não causou a seleção de populações específicas de acordo com o dendrograma (Figura 6) elaborado para ilustrar o agrupamento das populações bacterianas das diferentes parcelas do experimento. Não foi possível um agrupamento esperado pela composição dos tratamentos e sim a formação de 3 grupos distintos G1, G2 e G3 a partir da distância euclidiana média de 0,8.

O grupo 1 é formado pela amostra de Planossolo tratado com a associação de 10 Mg ha⁻¹ de torta de mamona e 16 Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração e cultivado com girassol, além dos controles das amostras de Planossolo. O grupo 2 foi formado pelas amostras de Planossolo tratados com a associação de 10 Mg ha⁻¹ de torta de mamona e 16 Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração e cultivado com mamona e 64 Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração e cultivado com girassol, além das amostras de Argissolo tratados com a associação de 10 Mg ha⁻¹ de torta de mamona e 16 Mg ha⁻¹ e 64 Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração ambas cultivadas com girassol. O grupo 3 foi formado pelos controles das amostras de Argissolos, além da amostra de Argissolo tratado com a associação de 10 Mg ha⁻¹ de torta de mamona e 16 Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração e de Planossolo tratado com associação de 10 Mg ha⁻¹ de torta de mamona e 64 Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração, ambas cultivadas com mamona.

Estes perfis de agrupamentos mostram que o aumento na diversidade bacteriana gerado pelo tratamento não se deve ao favorecimento de populações específicas. Essa análise mostrou que há apenas similaridade entre as populações representativas dos controles nas diferentes matrizes de solos, o que confirma a autenticidade da técnica elaborada.

Diminuindo a distância euclidiana média para um intervalo entre 0,6 e 0,7 ocorre-se o agrupamento das amostras representativas do controle do cultivo de girassol e mamona na matriz Argissolo. Já o agrupamento entre as amostras representativas dos controles na matriz Planossolo ocorre em torno de 0,4 da distância euclidiana média.

O presente estudo representa um desdobramento do projeto desenvolvido por Freitas (2013), onde outros parâmetros como a contagem de UFC/g das amostras de solo e a análise de características físico-químicas, como pH, teor de sódio, cálcio e magnésio (Tabela 4), foram avaliados e subsidiarão aspectos da discussão desta análise pelo DGGE.

Freitas (2013) observou que no Argissolo, houve aumento da contagem bacteriana no Ágar para Contagem em Placa (PCA) em todos os tratamentos quando comparada aos controles, independente das concentrações de resíduos incorporados e do tipo de oleaginosa cultivada (Tabela 4). Quando os tratamentos foram realizados em Planossolo cultivado com girassol, houve uma redução na quantidade de UFC/g no grupo tratamento comparado ao grupo controle. Em Planossolo cultivado com mamona não foi possível a observação de diferenças na contagem bacteriana decorrente dos tratamentos.

O meio Ágar Glicerol-Extrato de Levedura (AGEL) foi utilizado para contagem de actinomicetos. Em Argissolo cultivado com girassol, foi observada redução na contagem do tratamento com a maior concentração de cascalho de perfuração em relação ao controle. Quando cultivado com mamona, essa redução foi observada em ambas as concentrações. Em Planossolo, houve um aumento na população de actinomicetos comparado ao grupo controle, independente da oleaginosa cultivada.

O meio Ágar Manitol Vermelho de Fenol (AMVF) foi utilizado para contagem de bactérias halotolerantes ou halofílicas. Em Argissolo, não foi observada qualquer alteração na contagem bacteriana, independente das concentrações de resíduos incorporados e do tipo de oleaginosa cultivada. Em Planossolo, houve aumento na contagem bacteriana quando cultivado com girassol e redução no cultivo da mamona.

O Ágar Caseína (AC) foi utilizado para contagem de bactérias proteolíticas. De modo geral, em Argissolo, o tratamento gerou uma redução na população bacteriana independente das oleaginosas cultivadas. Em Planossolo cultivado com girassol não foi possível avaliar alteração decorrente dos tratamentos. Quando cultivado com mamona, a maior concentração de cascalho de perfuração gerou uma redução na contagem bacteriana quando comparada ao controle e a menor concentração do tratamento.

Esse estudo também mostrou que à medida que aumentou a quantidade de cascalho de perfuração, tanto o teor de sódio, cálcio e magnésio quanto o pH das amostras também aumentaram (Tabela 4).

Foi realizada análise de correlação entre as variáveis apresentadas no experimento, a saber, quantidade de UFC/g em PCA, AGEL, AC, AMVF, quantidade de UTOs no DGGE, teor de sódio, cálcio e magnésio disponível e pH.

Houve correlação significativa entre o teor de Mg no solo e a contagem de bactérias mesófilas em PCA ($r=0,58$) e no número de UTOs no DGGE ($r=0,64$). Estes resultados mostram que as variações ocorridas no teor de Mg nas parcelas acompanharam a mudança na diversidade bacteriana nas diferentes parcelas tanto pela metodologia dependente quanto pela metodologia independente de cultivo.

Embora a maioria dos estudos em amostras de solos não aponta para a influência do teor de magnésio disponível sobre a diversidade bacteriana (BAPTISTA et al., 2007; CASTILHOS et al., 2000; MARTINEZ, 2000) o maior coeficiente de correlação observado ($r=0,64$) relacionava a quantidade de UTOs com o teor de magnésio disponível na amostra (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4- Unidade formadora de colônias por grama de solo (UFC/g) de bactérias em solos tratados com torta de mamona e cascalho de perfuração em diferentes meios de cultura

Amostra	pH*	Mg*	Ca*	Na*	Bactérias – PCA*	Actinomicetos-AGEL*	<i>Staphylococcus</i> spp. AMVF*	Bactérias proteolíticas-AC*	UTO
A-0/0-G	4,8	0,1	0,5	0,2	1,78X10 ⁶	1,66X10 ⁴	4,80X10 ⁴	4,70X10 ⁴	6
A-10/16-G	5,1	0,4	1,5	2,6	1,21X10 ¹⁰	7,10X10 ⁴	9,00X10 ⁴	3,20X10 ³	13
A-10/64-G	6,6	0,7	3,5	7,3	4,30X10 ¹³	5,70X10 ³	9,00X10 ⁴	3,80X10 ³	11
A-0/0-M	4,9	0,0	0,9	0,2	3,15X10 ⁵	1,92X10 ⁴	1,04X10 ⁴	4,50X10 ⁴	6
A-10/16-M	5,2	0,3	1,5	2,1	9,00X10 ⁸	2,56X10 ³	6,20X10 ⁴	7,00X10 ⁴	8
A-10/64-M	6,6	0,4	2,6	9,4	7,00X10 ¹¹	2,03X10 ³	9,00X10 ⁴	1,60X10 ³	9
P-0/0-G	5,4	0,2	0,6	0	5,00X10 ¹²	9,70X10 ²	2,00X10 ⁵	1,36X10 ⁶	3
P-10/16-G	5,8	0,3	1,4	1,5	4,30X10 ⁸	4,30X10 ³	4,80X10 ⁶	6,70X10 ⁶	7
P-10/64-G	7,3	0,5	3,6	7	4,30X10 ⁹	7,80X10 ⁴	2,28X10 ⁶	7,50X10 ⁶	7
P-0/0-M	5,6	0,0	0,7	0	4,53X10 ¹¹	1,16X10 ³	1,16X10 ⁶	6,20X10 ⁵	5
P-10/16-M	6,1	0,2	1,3	1,3	4,00X10 ¹¹	1,12X10 ³	5,90X10 ³	1,00X10 ⁶	6
P-10/64-M	7,3	0,5	2,7	7,2	5,50X10 ¹¹	5,60X10 ⁴	8,50X10 ³	9,40X10 ³	7

*(FREITAS, 2013). PCA – Agar para Contagem em Placas, AGEL – Agar Glicerol Extrato de Levedura, AMVF- Agar Manitol Vermelho de Fenol, AC- Agar Caseína, UTO- Unidade Taxonômica Operacional.

Tabela 5- Coeficiente de correlação de Pearson entre o número de Unidade Formadora de Colônia por grama de solos (UFC/g) em diferentes meios de cultura de solos tratados pela associação entre torta de mamona e cascalho de perfuração e característica de pH e teor de Na disponível das amostras

	r		r
AMVF*Na	-0,06	AMVF*pH	0,16
PCA*Na	0,35	PCA*pH	0,24
AGEL*Na	0,34	AGEL*pH	0,34
AC*Na	0,08	AC*pH	0,35
AMVF*Mg	0,04	UTO*Na	0,5
PCA*Mg	0,58	UTO*Ca	0,5
AGEL*Mg	0,39	UTO*Mg	0,64
AC*Mg	0,17	UTO*pH	0,12
AMVF*Ca	0,08	UTO*PCA	0,37
PCA*Ca	0,48	UTO*AMVF	-0,12
AGEL*Ca	0,44	UTO*AC	-0,17
AC*Ca	0,28	UTO*AGEL	0,38

Com base nas análises comparativas efetuadas entre o experimento desenvolvido por Freitas (2013) e o presente estudo, foi possível avaliar que a técnica de DGGE mostrou-se adequada ao tipo de análise proposta, possibilitando inferir os grupos populacionais impactados pelos tratamentos. Desse modo, em uma segunda etapa, a técnica foi diretamente aplicada para análise da diversidade bacteriana conforme descrito para o experimento 2.

b) Experimento 2 - Avaliação da associação entre torta de crambe e cascalho de perfuração no cultivo de girassol

Nesse experimento, a diversidade bacteriana foi analisada somente por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) dos *amplicons* produzidos pelo *Nested-PCR*. Após a extração do material genético das amostras do solo, esse DNA foi amplificado com os *primers* 27F/1512R (Figura 7) cujos *amplicons* de aproximadamente 1500 pb gerados foram usados na segunda reação de PCR (*Nested-PCR*) com os *primers* CG-338F/518R (Figura 8). Os *amplicons* de aproximadamente 198 pb produzidos no *Nested-PCR* foram submetidos a eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE), conforme figura 9A.

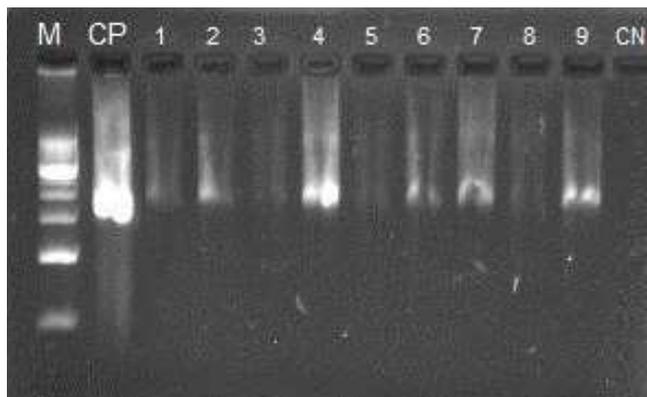


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação da região 16S do rDNA do DNA total extraído direto do solo, tratados com torta de crambe/cascalho de perfuração, com os *primers* 27f e 1512r. M= marcador 1 Kb DNA Ladder AMRESCO (k181); CP=controle positivo; 1=0/0; 2=16/0; 3=32/0; 4=0/30; 5=16/30; 6=32/30; 7=0/60; 8=16/60; 9=32/60; CN= controle negativo da reação.

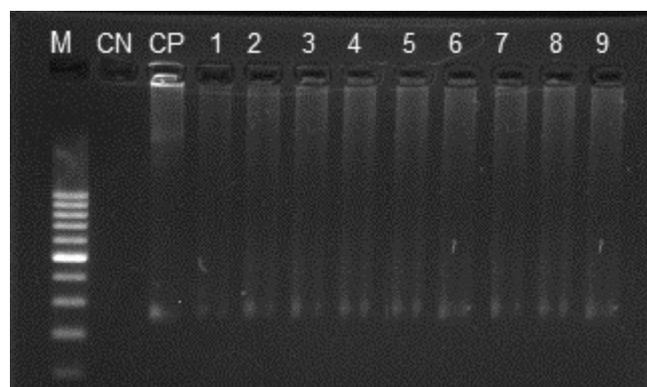


Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação da região 16S do rDNA do DNA total extraído direto do solo, tratados com torta de crambe/cascalho de perfuração, com os *primers* CG338F/518R. M= marcador 100bp DNA Ladder Thermo Scientific (SM0241); CN= controle negativo da reação; CP=controle positivo; 1=0/0; 2=16/0; 3=32/0; 4=0/30; 5=16/30; 6=32/30; 7=0/60; 8=16/60; 9=32/60.

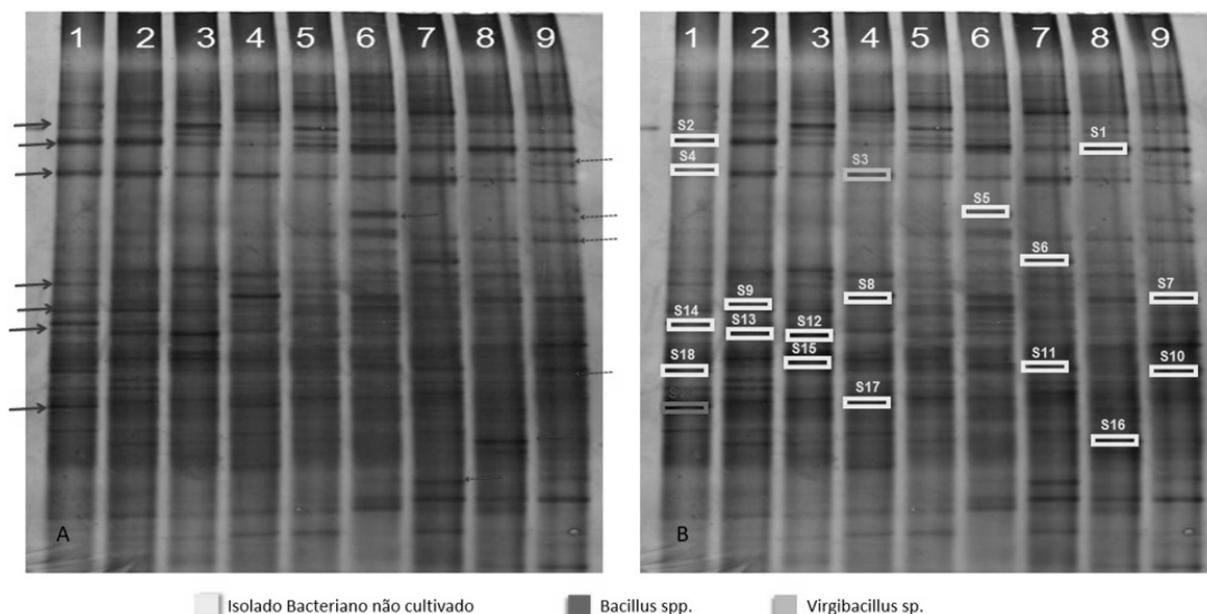


Figura 9 – A- Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante dos produtos de amplificação da região 16S do rDNA do DNA total extraído direto do solo com os primers GC-338f e 518r. 1=0/0; 2=16/0; 3=32/0; 4=0/30; 5=16/30; 6=32/30; 7=0/60; 8=16/60; 9=32/60. B- identificação das bandas sequenciadas.

Ao observar o gel do DGGE constatou-se que a amostra 32/30 (torta de crambe/cascalho de perfuração) apresentou a maior quantidade de UTOs (27,5), indicando que esta associação propiciou a maior diversidade bacteriana neste experimento. A tabela 6 apresenta o perfil de UTOs gerado em cada associação, permitindo a análise da dinâmica da diversidade bacteriana. Quando houve apenas adição de cascalho de perfuração, sem a torta de crambe, foi possível observar um aumento do número de UTOs. A adição de 16Mg ha⁻¹ ou 32Mg ha⁻¹ de torta de crambe, associada a 30Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração produziu os maiores números de UTOs observados no experimento. Entretanto, as associações de torta de crambe com 60Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração comprometeu a diversidade, o que foi observado pela redução do número de UTOs.

Tabela 6 - Distribuição do número de UTOs reveladas pela técnica de DGGE em amostras de solos tratadas com diferentes associações de torta de crambe e cascalho de perfuração

Cascalho de perfuração	Torta de crambe	Na*	K*	Ca*	Mg*	NÚMERO DE UTOs	pH*
0	0	0,088197496	0,41113	3,966667	3,700	21,5	4,85
0	16	0,18807764	3,250648	5,900	5,333333	24	5,90667
0	32	0,387837928	6,383909	8,633333	7,866667	22,5	5,06
30	0	28,93019377	0,606958	16,733333	7,433333	20,5	5,73
30	16	29,23976229	3,022181	19,566667	6,933333	25	5,95667
30	32	40,22657811	7,101948	23,900	12,433333	27,5	5,99
60	0	51,88918964	1,390274	27,566667	9,466667	24	6,113333
60	16	68,21287455	3,74022	29,933333	10,266667	20	6,18667
60	32	56,55026302	6,057528	34,800	13,766667	21,5	6,24

*(PRESOTTO, 2014) UTOs- Unidades Taxonômicas Operacionais.

Os parâmetros como teor de sódio, potássio, cálcio e magnésio (Tabela 6) aumentam à medida que aumentamos as doses de associação de cascalho de perfuração e torta de crambe. Essa variação não acompanhou a dinâmica da diversidade bacteriana. Ao avaliar a qualidade do solo pela diversidade bacteriana, a amostra que recebeu 32Mg ha⁻¹ de torta de crambe associada com 30Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração se mostrou superior as demais. No entanto, PRESOTTO (2014), utilizando as mesmas amostras do presente estudo, observou que o acúmulo de biomassa do girassol é favorecido pela aplicação de doses intermediárias de torta de crambe. Para aplicações acima de 20 Mg ha⁻¹ ocorre inversão no efeito. Isto aponta para a necessidade de utilização de várias características do solo para determinar sua qualidade e dimensionar o impacto oriundo das intervenções.

A análise de variância (ANOVA) para determinar as influências, isoladas e em associação, da torta de crambe e cascalho de perfuração na diversidade bacteriana mostrou que essas variações ocorreram ao acaso ($p > 0,5$). Isso indica que a influência da adição de cascalho de perfuração e torta de crambe sobre a diversidade bacteriana foi nula ou muito baixa. Esse dado é importante, pois vai contra a hipótese de que o uso de grandes quantidades de cascalho de perfuração no solo pode comprometer a diversidade da população bacteriana.

Além da observação das diferenças na quantidade de UTOs nos diferentes tratamentos do experimento, também foi avaliada a similaridade entre os perfis gerados pelo DGGE, através da elaboração de um dendograma. Pela avaliação do dendograma observa-se que as amostras que receberam aplicação de 60 Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração pertenciam ao mesmo grupo (Figura 10), pois possuíam o mesmo perfil bacteriano. Este resultado indica que embora a adição do cascalho de perfuração não influenciou diretamente no aumento da diversidade bacteriana, houve o favorecimento de uma população bacteriana específica estando essa população também presente na amostra que obteve maior diversidade.

O resultado do sequenciamento foi comparado com as sequências registradas no GenBank com objetivo de conhecer a populações bacterianas envolvida no estudo. Todavia, das 19 bandas selecionadas em apenas duas foi possível a identificação de gênero (Anexo 2), sendo eles *Virgibacillus* sp. e *Bacillus* spp., conforme figura 9B. Este dado indica que os *primers* utilizados no DGGE podem ter gerado fragmentos com tamanho insuficiente para a identificação mais específica desses isolados ou a população dessas bactérias oriundas de solos tratados com esses resíduos selecionou bactérias pouco conhecida pela comunidade científica, Não sendo assim possível discutir sua real importância para a qualidade do solo.

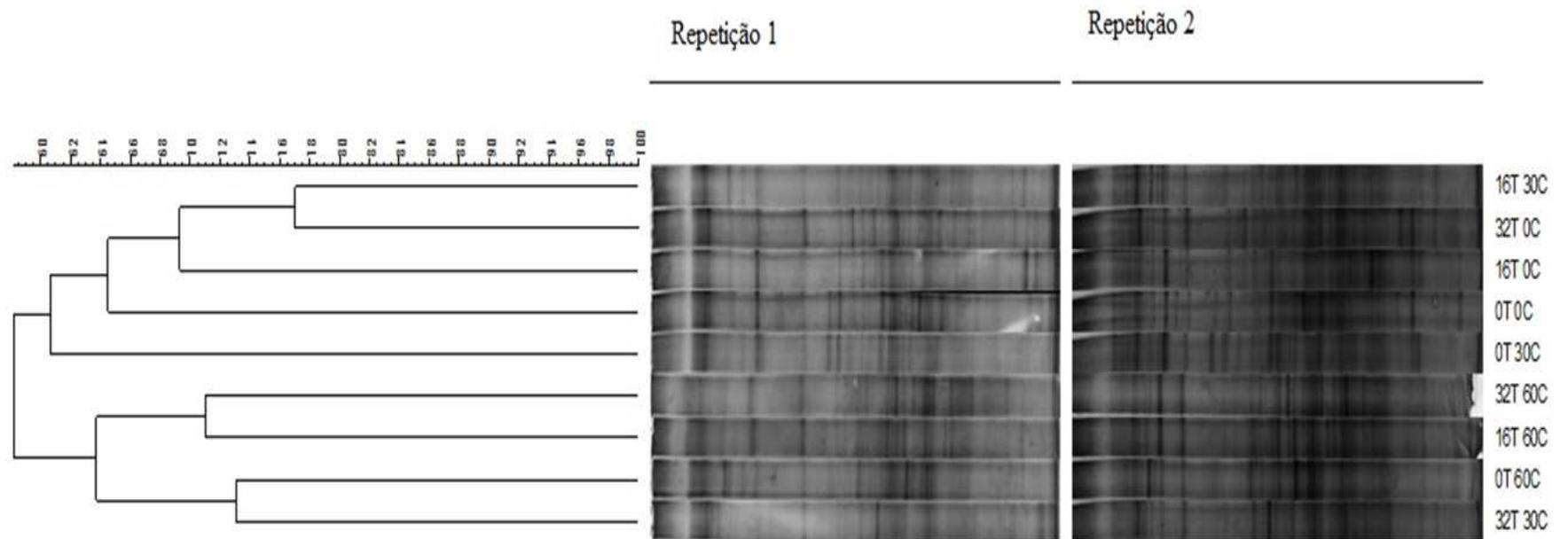


Figura 10- Dendrograma de similaridade genética do DNA total do solo após a amplificação com *primers* que amplificam a região do gene ribossomal 16S obtido pelo método de agrupamento UPGMA.

3.6 CONCLUSÕES

A técnica de DGGE foi adequada ao tipo de análise proposta.

A técnica de DGGE se mostrou eficiente na avaliação da diversidade bacteriana por ter possibilitado detectar diferentes padrões de UTOs nos tratamentos avaliados.

As análises de correlação realizadas permitiram inferir sobre a influência do magnésio na diversidade bacteriana em solos tratados com cascalho de perfuração e torta de mamona.

A técnica de DGGE permitiu observar que a maior diversidade bacteriana foi obtida na aplicação de quantidades medianas de torta de crambe e cascalho de perfuração.

O dendograma gerado pelo DGGE revelou um único perfil bacteriano para os tratamentos que receberam aplicação da maior concentração de cascalho de perfuração.

Não houve prejuízo na diversidade bacteriana pela adição altas doses de cascalho de perfuração associado com torta de crambe.

4.CAPITULO III

IMPLEMENTAÇÃO DE METODOLOGIA INDEPENDENTE DE CULTIVO NO MONITORAMENTO DE *Paenibacillus larvae* EM MEL COMO ALTERNATIVA À METODOLOGIA DEPENDENTE DE CULTIVO

4.1 RESUMO

Cria Pútrida Americana (CPA) é a doença apícola de maior importância econômica, sendo obrigatória a notificação de qualquer caso suspeito. O presente estudo tem por objetivo elaborar um meio de cultura líquido para cultivo de *P. larvae*, além de protocolo de extração de DNA em amostras de mel para detecção deste agente e comparação do grau de sensibilidade da técnica dependente de cultivo com técnica independente de cultivo proposta neste estudo. Para a escolha do meio de cultura líquido, foram testados seis diferentes meios com 12 diferentes cepas de *P. larvae*. A escolha do protocolo de extração do DNA foi dada pela comparação dos resultados de quatro diferentes protocolos de extração: *glass beads*; choque térmico; *glass beads*+PEG8000 e detergente+sal+térmico. A escolha dos *primers* usados na amplificação foi feita pela comparação de dois pares de *primers*: AF 6F/AF 7R e Pl 1/Pl 2. O meio de cultura que obteve o melhor desempenho no cultivo das 12 cepas foi o CBL Modificado, a principal característica que o diferencia dos demais é a adição de Tioglicolato de sódio, que propicia um ambiente de anaerobiose, favorável a germinação dos esporos de *P. larvae*. O protocolo selecionado foi o que utilizou a lise por detergente, sal e temperatura pela avaliação da qualidade do DNA extraído e simplicidade da metodologia. A técnica independente de cultivo, proposta pelo trabalho, apresentou um grau de sensibilidade maior que a técnica oficial, dependente de cultivo. A técnica proposta pelo estudo foi capaz de detectar a presença de esporos em méis com apenas 10^2 UFC/g de *P. larvae*, enquanto a técnica oficial só foi capaz de detectar a presença de *P. larvae* na amostra com 10^6 UFC/g de *P. larvae*. O par de *primers* utilizados nesse estudo foi o AF 6F/AF 7R. Com isso, o presente estudo conclui que o uso de técnica de diagnóstico independente de cultivo, pela extração do material genético e posterior amplificação do fragmento do DNA ribossomal 16S utilizando *primers* específico para *P. larvae*, no monitoramento de esporos de *P. larvae* circulantes em méis se mostra uma excelente alternativa, e CBL Modificado se mostrou um excelente meio de cultura no cultivo de *P. larvae*.

Palavras-chave: *Paenibacillus larvae*. Monitoramento. Mel. Técnica independente de cultivo.

4.2 ABSTRACT

American Foul Brood (AFB) is the bee disease of the greatest economic importance with mandatory notification from any suspected case. This survey aimed the development of a *P. Larvae* liquid cultivation medium and DNA extraction protocol in honey samples for detecting the agent. Also it compared the sensitivity degree of the cultivation dependent to the independent techniques proposed by this study. Six different media were tested by 12 *P. larvae* different strains for choosing liquid cultivation medium. DNA extraction protocol option was obtained comparing results from four different extraction (*glass beads*; thermal shock; *glass beads* + PEG8000 and detergent + salt + heat). The amplification was achieved comparing two pairs: AF6F/ AF7R and P1/P2. Modified CBL presented the best performance in regarding to the 12 cultivation strains, being its main feature, the sodium thioglycolate addition providing an anaerobic environment favoring spores germination. The protocol selected was that one employing detergent + salt + heat for assessing extracted DNA quality and methodology simplicity. Cultivation independent technique proposed by this survey presented greater sensitivity degree than the official technique. While the official one detected *P. larvae* spores presence at 10^6 UFC/g, the one proposed by the survey detected 10^2 UFC/g. AF 6F / AF 7R primers pair was employed. Thus, this survey might conclude that the employment of cultivation independent technique, by DNA extraction and subsequent 16 SrDNA fragment amplification using *P. larvae* specific primers for monitoring spores has been an excellent alternative. Also Modified CBL showed to be an excellent cultivation medium *P. larvae*.

Key word: *Paenibacillus larvae*. Monitoring. Honey. Independent cultivation techniques.

4.3 INTRODUÇÃO

Em 1956, visando a melhoria da produção de mel no Brasil, um estudo da Universidade de São Paulo introduziu as subespécies africanas *Apis mellífera scutellata*, consideradas mais produtivas e resistentes às doenças (PEREIRA & VILELA, 2003). Com isso, deu-se a africanização das abelhas no Brasil (KERR, 1967; RANGEL, 2006). Antes da chegada das abelhas africanas, a produção nacional de mel era de, aproximadamente, cinco mil toneladas por ano e alcançou 50 mil toneladas por ano em 2004, como reflexo da africanização (GONÇALVES, 2006).

No ano de 2000, o Brasil exportou 269 toneladas de mel; em 2001, 2.489 toneladas e em 2002, as vendas externas atingiram 12.641 toneladas. Ou seja, grande parte da produção nacional de mel era destinada ao mercado externo. Fatores externos como problemas em sanidade apícola na China e na Argentina permitiram essa abertura do mercado externo para os produtos brasileiros que levou a elevação abrupta das exportações a partir de 2002. O embargo internacional à China e à Argentina criou um déficit de 50.000 toneladas de mel no mercado internacional (NETO, 2006).

O último *ranking* da produção nacional revelou que o país produziu mais de 35.000 t de mel (IBGE, 2013). Este *ranking* aponta a permanência do Estado do Rio Grande do Sul como o principal estado produtor, com uma produção em torno de 7.286 t, seguido do Estado do Paraná na faixa de 5.565 t. Nos anos anteriores (IBGE, 2010), o Estado do Rio Grande do Sul (7.155 t) já figurava em 1º lugar, seguido do Estado do Paraná (4.831 t), a principal mudança ocorreu no Estado do Piauí que detinha a 3º maior produção (4.144 t), mas que vem sofrendo uma redução drástica decorrentes de fatores climáticos, sendo ultrapassado pelo Ceará e Santa Catarina caindo para 5ª colocação no ano de 2010 (IBGE, 2011) e atualmente se encontra na 8ª colocação (IBGE, 2013).

Ainda assim, o Brasil explora apenas 15% do potencial da flora apícola. E possui um potencial inexplorado superior a 200.000 t/ano. Seu consumo é de 200 g de mel/pessoa/ano. Já na Alemanha, o consumo médio é de 2,4kg de mel/habitante/ano, ou seja, 12 vezes mais, e a maior parte dos apicultores brasileiros possui, em média, menos de 100 colméias, e estão ligados a associações ou cooperativas apícolas (SEBRAE/AL, 2004).

Os principais estados brasileiros exportadores de mel no período de janeiro a março de 2010 foram: 1º - Rio Grande do Sul com receita total de US\$ 1.268.000 pela exportação de 1.268 t, vendidas a US\$ 2,85/kg; 2º - São Paulo com receita total de US\$ 2.672.000 relativo a exportação de 959 t; 3º - Ceará (US\$ 2,277 milhões, volume: 762 t, US\$ 2,99/kg); 4º - Piauí (US\$ 1,615 milhões, 587 t e US\$ 2,75/kg); 5º - Santa Catarina (US\$ 1,679 milhões, 570 t e US\$ 2,95/kg); 6º - Paraná (US\$ 820,273 mil, 274 t e US\$ 3,00/kg) e 7º - Rio Grande do Norte (US\$ 507,412 mil, 208 t e US\$ 2,44/kg) (SEABPR, 2010).

Na região sudeste, o Estado de São Paulo destaca-se por sua colocação no *ranking* de exportação, porém apresenta produção inferior a do Estado de Minas Gerais (2.605t). O estado produz 2.103.341kg de mel, superando o Estado do Espírito Santo (366.625kg) e o Estado do Rio de Janeiro (317.775kg) (IBGE, 2010).

A apicultura fluminense foi uma das pioneiras no Brasil por auxiliar a difusão deste cultivo em todo o país entre as décadas de 40 e 60. Esta atividade soma mais de 60 anos no Estado, com uma produção intensa de mel, anual, de cerca de 400 toneladas que não atende à demanda interna estimada em cerca de 1.200 toneladas. Para atender à carência deste

mercado, é necessário que a classe apícola disponha de incentivos para incrementar a sua produção (LORENZON, 2010)

O Estado do Rio de Janeiro apresenta um alto potencial de produção devido as suas características geográficas, conservacionistas e de florada (LUZ, 2007), porém apresenta a produção mais baixa da região sudeste, não ocupando local de destaque no *ranking* de produção e de exportação. A causa dessa baixa produção do Estado pode estar relacionada a doenças apícolas que ocorrem com frequência no Estado do Rio de Janeiro (PACHECO, 2007). Outra razão apontada é o baixo grau de escolaridade dos apicultores, pois mais da metade possui apenas o nível fundamental ou menos, o que contribui para o baixo índice tecnológico da atividade no Rio de Janeiro (GOLYNSKI, 2009).

A partir do censo apícola de 2006, o MAPA, em 2009, passou a apoiar através de edital público um projeto para diagnosticar as condições da sanidade apícola, através de questões que envolvem as condições de higiene dos apiários, dos apicultores, de seus produtos e a ocorrência de enfermidades de abelhas. Este projeto é realizado em parceria pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária, Pesca e Abastecimento (SEAPPA/RJ), FIOCRUZ, Empresa de Pesquisa Agropecuária (PESAGRO-Rio) e Federação de Agricultura Pecuária e Pesca do Rio de Janeiro (FAERJ), de modo a destacar as deficiências mais marcantes da apicultura fluminense e favorecer suas correções (LORENZON, 2010).

A questão da sanidade é bastante significativa na produtividade, uma vez que doenças apícolas tem sido o principal motivo de perdas de colméias (PACHECO, 2007). Essa questão leva os apicultores a investir em tecnologias com objetivo de reduzir os prejuízos causados pelas doenças. Muitas podem ser as causas de doenças em abelhas, inclusive intoxicação por plantas tóxicas, já que longevidade das abelhas é significativamente afetada pelo teor de tanino na alimentação (SANTORO, 2004). A seleção de colméias geneticamente resistentes a doenças é um mecanismo muito eficiente de prevenção usado por grandes criadores, sendo avaliada pelo comportamento higiênico da colméia. Encontram-se na literatura vários métodos para estudos do comportamento higiênico em abelhas melíferas, dentre eles, os mais utilizados ultimamente são o método de congelamento de crias, descrito por Gonçalves & Kerr (1970) e o método de perfuração de crias (NEWTON & OSTASIEWSKI, 1986), onde, para fins de seleção, as colônias que removem 80% ou mais das crias mortas são consideradas higiênicas (GRAMACHO & GONÇALVES, 1994).

A disseminação de doenças apícolas das abelhas melíferas, como as loques, de origem bacteriana, causam prejuízos significativos à apicultura. A falta de monitoramento microbiológico contribui para esta situação (FRIES et al., 2006). Além da perda econômica direta decorrente da perda da produção e morte de colméias, essas enfermidades prejudicam o comércio internacional de produtos apícolas, devido a fácil disseminação de seus agentes.

Em 2006, o Ministério da Agricultura aprovou o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Sanidade Apícola (PNSApi). O regulamento define as competências dos órgãos públicos, apicultores, veterinários, técnicos e laboratórios no combate às doenças de abelhas e padroniza ações profiláticas, de diagnóstico e de saneamento dos apiários e estabelecimentos que manipulam, processam ou comercializam os produtos apícolas (BRASIL, 2006). Loque Americana, ou Cria Pútrida Americana, é a enfermidade apícola de maior impacto mundial, sendo sua notificação obrigatória.

Paenibacillus larvae, agente etiológico da Cria Pútrida Americana(CPA), também conhecida como Loque Americana (LA), é caracterizado como bastonetes longos e finos (2,5 a 5,0x 0,5x 0,5 µm), Gram-positivos, dispostos em cadeias de tamanho variável. Os esporos

são termoestáveis e resistentes a produtos químicos e sobrevivem as condições intrínsecas do mel (JELIŃSKI, 2003). São ovais de dimensões aproximadas de 0,6 x 1,3 µm, que se caracterizam por apresentarem movimento Browniano, quando em montagens úmidas coradas com carbol-fucsina observadas em gota pendente. São conhecidos quatro genótipos diferentes de *P. larvae*, diferindo o grau de virulência entre eles (GENERSCH, 2005;2006)

As larvas de abelhas são sensíveis à infecção até 53 horas após a eclosão dos ovos. Segundo Brødsgaard (2000) a dose infectante média (LD50) para larvas de um dia é de 1350 esporos. Os restos larvais são a principal fonte de disseminação da doença, porém a alimentação com méis que contenham esporos, a introdução de rainhas provenientes de colméias contaminadas, o apicultor ou pessoas que tratam da colméia podem também contribuir para a disseminação da CPA.

Até os dias atuais não há casos de CPA em território nacional, embora a presença de esporos dessa bactéria tenha sido detectada em méis circulantes no interior do Rio Grande do Sul, ainda que os sintomas da doença não tenham ocorrido (SCHUCH et al., 2003).

Na Argentina, o primeiro relato da CPA ocorreu em 1989 em Buenos Aires (ALIPPI,1990), contudo, esporos de *P. larvae*, já haviam sido detectados em amostras de mel da Argentina importadas pela Dinamarca (HANSEN,1984). Desde então a doença tem se espalhado para as Províncias de Entre Rios, Córdoba, Rio Negro e La Rioja (ALIPPI, 1992), além das províncias de Santa Fé, La Pampa e Chaco (RABINOVICH, 1994). Essa propagação ocorre devido a trabalhos de polinização e ao comércio de núcleos sem controle sanitário.

No Uruguai, *P. larvae* se distribui de uma forma bem definida, se concentrando em regiões de fronteira com a Argentina, não sendo detectada nas regiões de fronteira com o Brasil (ANTÚNEZ et al., 2004).

O mel pode ser contaminado pelas abelhas durante a sua produção. *P. larvae* podem habitar o trato intestinal de abelhas adultas de forma assintomática (YOSHIYAMA & KIMURA, 2009). O monitoramento microbiológico do mel é considerado um método bastante eficaz para prevenir a disseminação de doenças de abelhas no âmbito regional e nacional (GILLARD et al., 2008).

Em 100 anos de esforços para cultivar *P. larvae*, consideráveis progressos foram alcançados para germinação de esporos e crescimento. Na primeira tentativa, WHITE (1907) *apud* DE GRAF (2006) utilizou um extrato de larvas de abelhas. Ao longo do tempo, novos meios de cultura foram desenvolvidos ou adaptados para utilização em diagnóstico da CPA: J - ágar (meio J) (GORDON et al., 1973), ágar de infusão de cérebro – coração (ABHI) suplementado com tiamina (GOCHNAUER, 1973), Caldo MYPGP – Caldo Mueller- Hinton , extrato de levedura , fosfato de potássio, glicose, ágar e piruvato (DINGMAN&STAHLY, 1983), ágar sangue Columbia (PLAGEMANN, 1985), ágar sangue de carneiro (LLOYD, 1986) e mais recentemente , ágar Bacillus Larvae (ABL) (SCHUCH et al.,2001).

O monitoramento da presença de esporos de *P. larvae* realizado atualmente se dá por meio de isolamento em meio de cultura e identificação por testes fenotípicos. Todavia, o diagnóstico por metodologias independentes de cultivo vem sendo testado com objetivo de aumentar sua eficiência tanto em amostras de mel, como diretamente da colméia infectada (BAKONYI, 2003; MARTÍNEZ, 2010;LINDSTROM, 2008).

Várias etapas devem ser seguidas para se chegar a implementação de uma técnica independente de cultivo por amplificação de fragmentos de DNA. A primeira etapa é a escolha de um protocolo de extração. Os métodos para extração de DNA podem ser divididos em dois tipos: método indireto, no qual as células microbianas são extraídas da matriz, no caso o mel, por centrifugação e, a partir disso, sofrem a lise e extração dos ácidos nucléicos; e

o método direto, que consiste na extração do DNA diretamente das células, ainda na matriz (ROSA, 2006).

Existem vantagens e desvantagens nesses dois tipos de extração, deve-se levar em consideração o tipo da matriz a ser analisada e sua composição para concluir a escolha. No caso dos solos, o método indireto é pouco aplicado, pois permite baixo rendimento na extração de DNA, sendo também pouco representativo, uma vez que muitas células ficam retidas nas partículas do solo e não têm seu DNA extraído e analisado. As células bacterianas extraídas do solo por esse método representam apenas 25 a 50% do total da comunidade endógena do solo (TREVORS & VAN ELSAS, 1995), além de ser muito trabalhoso, nesse caso o mais aconselhado seria a escolha de uma metodologia direta.

No caso do mel, por se tratar de uma matriz que apresenta uma composição muito diferente dos solos, não possuindo tantas partículas que ficariam em suspensão após a centrifugação, retendo parte da microbiota, a metodologia indireta se mostra mais eficiente, pois ao concentrar as células e descartar o sobrenadante, grande parte dos componentes do mel, que poderiam interferir na qualidade do DNA extraído, serão eliminados antes do início da extração.

Outra etapa importante é a escolha dos pares de *primers* utilizados, no caso do presente estudo testados dois pares de *primers* descritos na literatura como representante da espécie de *P. larvae*.

O objetivo do estudo foi padronizar técnicas de monitoramento independente de cultivo de *Paenibacillus larvae* em mel e compará-la a técnica dependente de cultivo.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Seleção de meio de cultura líquido para cultivo de *Paenibacillus larvae*

Seis diferentes meios de cultura (Tabela 7) foram testados para cultivar *P. larvae*. Todos foram adicionados de ácido pipemídico e ácido nalidíxico nas concentrações de 18mg/L e 9mg/L, respectivamente. Cada meio de cultura foi inoculado em triplicata por doze diferentes cepas de *P. larvae* provenientes a Coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Nacional de Rio Cuarto, Córdoba, Argentina.

No preparo do inoculo cada cepa foi previamente isolada em placas de petri com Ágar MYPGP e incubada a 37°C por 48h em ambiente de anaerobiose. Após a incubação as colônias foram ressuspensas em 10 mL de solução PBS com pH 7,0 (cloreto de sódio e fosfato de sódio). A turvação de cada tubo foi comparada e padronizada na escala 0,5 de *McFarland*. Foram preparados 37 tubos com 10mL de cada meio de cultura testado, sendo 36 inoculados e um não inoculado, usado como controle negativo. Durante a inoculação dos tubos, foram adicionados 0,1 mL da suspensão das cepas de *P.larvae*. Cada cepa foi inoculada em triplicata, nos diferentes meios de cultura, e incubada em ambiente de anaerobiose a 37 °C por 48 h. Após a incubação, foram quantificadas as bactérias em cada tubo, através do método de contagem de células viáveis por plaqueamento utilizando a técnica de *spread plate* em Ágar MYPGP, após prévia diluição seriada em solução PBS pH 7,0.

Tabela 7 – Composição dos meios de cultura líquidos testados para o cultivo de *Paenibacillus larvae*

MEIO 1- MYT (GENDE et al., 2008)	
Infuso de Carne	15g
Hidrolisado de Caseína	1g
Amido	0,07g
Extrato de levedura	0,15g
Tiamina	0,1mg
Água destilada	1L
MEIO 2 – MYPGP (DINGMAN & STAHLY, 1983)	
Infuso de carne	75g
Hidrolisado de caseína	4,5g
Amido	0,4g
Extrato de levedura	15g
D (+) glicose (C ₆ H ₁₂) ₆ H ₂ O	2g
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	3g
Água destilada	1L
MEIO 3 - MYPGP Modificado (0,15% ÁGAR)	
Infuso de carne	75g
Hidrolisado de caseína	4,5g
Amido	0,4g
Extrato de levedura	15g
D (+) glicose (C ₆ H ₁₂) ₆ H ₂ O	2g

Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	3g
Ágar bacteriológico	1,5g
Água destilada	1L

Tabela 7 - continuação

MEIO 4 - CBHI + TIAMINA (GOCHNAUER, 1973)

Infusão de cérebro de carneiro	12,5g
Infusão de coração de boi	5g
Proteose-peptona	10g
D (+) glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆ H ₂ O)	2g
Cloreto de sódio (NaCl)	5g
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	2,5g
Tiamina	0,1mg
Água destilada	1L

MEIO 5- CALDO Bacillus larvae (CBL) (SCHUCH et al., 2001)

Manitol	3,3g
Cloreto de sódio(NaCl)	1g
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ .H ₂ O)	0,03g
Fosfato de monopotássio (KH ₂ PO ₄)	0,075g
Piruvato de sódio	3,3g
Peptona de caserna	5g
Peptona de farinha de soja	2g
Caldo nutritivo	8g
Extrato de levedura	2g
Extrato de carne	1g
Água destilada	1L

MEIO 6 - CBL MODIFICADO (0,05% AGAR + 0,05% TIOGLICOLATO DE SODIO)

COMPOSIÇÃO:

Manitol	3,3g
Cloreto de sódio(NaCl)	1g
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ .H ₂ O)	0,03g
Fosfato de dissódio (Na ₂ HPO ₄)	1g
Fosfato de monopotássio (KH ₂ PO ₄)	0,075g
Azul de bromotimol	0,04g
Piruvato de sódio	3,3g
Peptona de caserna	5g
Peptona de farinha de soja	2g
Caldo nutritivo	8g
Extrato de levedura	2g
Extrato de carne	1g
Ágar bacteriológico	0,5g
Tioglicolato de sódio	0,5g
Água destilada	1L

4.4.2 Seleção de técnica de extração de DNA bacteriano a partir de amostras de mel

a) Preparo do inóculo de *Paenibacillus larvae*

Uma cepa de *P.larvae* foi inoculada em placa de petri contendo Ágar MYPGP e incubada a 37°C por 48h em ambiente de anaerobiose. Após a incubação as colônias foram ressuspensas em tubos de ensaio com 10 mL de solução PBS com pH 7,0. A turvação de cada tubo foi comparada e padronizada na escala 0,5 de *McFarland*.

b) Preparo das amostras

Foram fracionadas duas amostras de mel com 24 g cada. Na primeira amostra, foram inoculados 1000 µL de solução PBS sem cultivo bacteriano para servir de controle negativo e na segunda amostra foram inoculadas 1000 µL da suspensão de *P.larvae*. As amostras de mel foram incubadas por 24 h em temperatura ambiente. O experimento ocorreu em triplicata

Para cada repetição da avaliação dos protocolos de extração, duas alíquotas de 1 mL cada foram reservadas de cada amostra. A primeira alíquota foi submetida à extração sem previa incubação, a segunda adicionada de caldo *Bacillus Larvae Modificado*(CBLM) na proporção 1:1 e incubada a 37°C por 24 h, com objetivo de favorecer a extração do DNA de *P. larvae*.

c) Protocolos de extração de DNA bacteriano diretamente do mel

c1) Protocolo 1 (*glass beads*)(COSTA et al., 2004)

Em um tubo de 2 mL foi adicionado 1 mL de tampão de extração I (50 mM de NaCl, 50 mM de TrisHCl pH 7,6, 50 mM de EDTA, 5% SDS) e 0,8 g da amostra de mel. Foram adicionados 0,4 g de *glass beads* (150-212 µm) e 1 µL de ditioneitol (DTT) 1 M, seguido de homogeneização no Vortex por 3 min e incubação a 65° C por 30 min. Após incubação essas soluções foram centrifugadas a 14549g por 5 min. Aproximadamente 800 µL do sobrenadante foram transferidos para novo tubo e adicionados mesmo volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), seguido de uma homogeneização por 2 min e centrifugação a 14549g por 10 minutos. Aproximadamente 700 µL do sobrenadante foram novamente transferidos para novo tubo onde foram adicionados o mesmo volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguido de uma homogeneização por 2 min e centrifugação a 14549g por 10 min. A fase superior foi transferida para um novo microtubo e adicionado acetato de amônio 2,5 M e 1 volume de isopropanol gelado, seguido de incubação a 20 °C por 2 ou 12 h para a precipitação do DNA. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 14549g por 30 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol 70 % (aproximadamente 500 µL). Depois de seco a temperatura ambiente, os sedimentos foram ressuspensos em 30 µL de água ultrapura e armazenados a -20 °C.

c 2) Protocolo 2 (choque térmico) (HANG et al., 2006)

Em um tubo de 2 mL, adicionar 1 g de amostra do mel e 1 mL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, EDTA 100 mM, fosfato de sódio 100 mM, NaCl 1,5 M, brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) 1%, pH 8,0) e proteinase K para concentração final de 0,1 mg/mL. Essa solução foi homogeneizada em vortex por 5min e adicionado SDS para concentração final de 3%. As amostras foram transferidas para um banho-maria a 65° C/20min seguidos de incubação a -20°C/30min por três vezes e centrifugadas a 86g por 10 min. Aproximadamente 900 µL do sobrenadante foram transferidos para novo tubo e adicionados mesmo volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), seguido de uma homogeneização por 2 min e centrifugação a 14549g por 10 min. Aproximadamente 800 µL

do sobrenadante foram novamente transferidas para novo tubo onde foram adicionados o mesmo volume de clorofórmio:álcoolisoamílico (24:1), seguido de uma homogeneização por 2 min e centrifugação a 14549g por 10 min. A fase superior foi transferida para um novo microtubo e adicionado mesmo volume de isopropanol gelado, seguido de incubação a 20 °C por 2 ou 12 h para a precipitação do DNA. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 14549g por 30 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol 70 % (aproximadamente 500 µL). Depois de seco a temperatura ambiente, os sedimentos foram ressuspensos em 30 µL de água ultrapura e armazenados a -20 °C.

c3) Protocolo 3 (Glass beads + PEG8000) (YEATS et al, 2008)

Em um tubo de 2 mL contendo 0,4 g de *glass beads* (150-212 µm), foram adicionados 1 g da amostra da amostra do mel e 500 µL de tampão de extração (1% de CTAB, 1,5 M de NaCl, 0,1 M de EDTA, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,1 M Tris-HCl pH 8,0). Essa solução foi homogeneizada no vortex por 4 a 5 min com intervalos de 10 segundos a cada 90 segundos. Após a etapa de homogeneização, foram adicionados 500 µL de SDS (Dodecil sulfato de sódio) para concentração final de 5%. Logo após foi realizada incubação em banho-maria a 65° C por 1 h com leve agitação a cada 15 min. Após essa etapa, foram centrifugadas a 2152g por 15 min. Em seguida, 900 µL dessa solução foi transferidas para novo tubo de 2mL onde foram adicionados 900 µL de isopropanol. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 15 min e centrifugadas a 124g por 15 min. O precipitado foi ressuspensado em 800 uL de TE, onde foi adicionado 1 mL de solução PEG8000 e NaCl para concentração final de 1,6 M e incubados por mais 2 h a temperatura ambiente. Após centrifugação a 124g por 20 min, o precipitado foi ressuspensado em 400 uL de TE e adicionado acetato de amônio para concentração final de 2,5 M. Essa solução foi incubada no gelo 5 min e centrifugada a 124g por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo onde foi adicionado mesmo volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), seguido de uma homogeneização por 2 min e centrifugação a 14549g por 10 min. Novamente os sobrenadantes foram transferidos para novo tubo onde foram adicionados o mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguido de uma homogeneização por 2 minutos e centrifugação a 14549g por 10 minutos. A fase superior foi transferida para um novo microtubo e adicionado mesmo volume de isopropanol gelado, seguido de incubação a 20°C por 2 ou 12 h para a precipitação do DNA. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 14549g por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol 70 % (aproximadamente 500 µL). Depois de seco a temperatura ambiente, os sedimentos foram ressuspensos em 30 µL de água ultra pura e armazenados a -20 °C.

c 4) Protocolo 4 (Detergente, sal e térmico) (adaptado por TITO et al., 2015)

Para extração do DNA total, 1g de cada amostra foi diluída em 1mL de CBLM (conforme tabela 1). Após a diluição as amostras foram centrifugadas por 5 min a 1239g. As células foram ressuspensas em 600 µL de solução de extração (TrisHCl 200 mM pH 8,0; EDTA 25 mM pH 8,0; SDS 1%, NaCl 25 mM) e agitadas em vortex, sendo incubadas a 65°C por 30 min. Em seguida os tubos foram resfriados a temperatura ambiente, foi adicionado 600 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), seguido de uma homogeneização por 2 min e centrifugação a 14549g por 10 min. A fase superior foi transferida para um novo microtubo (aproximadamente 400 µL) e adicionado 2 volumes de etanol 100 % gelado, seguido de incubação a 20 °C por 2 ou 12 horas para a precipitação do DNA. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 14549g por 30 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol 70% (aproximadamente 500 µL). Depois de seco a

temperatura ambiente em uma capela de exaustão, os sedimentos foram ressuspensos em 30 µL de água ultrapura e armazenados a -20 °C.

d) Avaliação da qualidade do DNA—O DNA extraído foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8 % acrescido de SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Os géis foram visualizados sob luz UV 254 nm. A qualidade do DNA foi avaliada pela ausência de rastro no gel em todas as amostras.

e) Reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) da região 16S do rDNA - As reações de PCR foram realizadas em um volume de 20 µL contendo 1 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas), tampão de reação 1X, 200 µM de cada dNTP, 3,0 mM de MgCl₂, 0,3 µM dos *primers* 27f (Suzuki e Giovannoni, 1996) e 1512r (Kane et al., 1993). As amplificações foram conduzidas segundo os seguintes parâmetros: 5 min de desnaturação inicial a 94 °C, 30 ciclos de 94 °C por 60 s, 68 °C por 60 s, 72 °C por 60 s, seguida de uma elongação final a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram separados em eletroforese em gel de agarose 1,5 % acrescido de SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Os géis foram visualizados sob luz UV 254 nm.

4.4.3 Determinação do grau de sensibilidade das técnicas de monitoramento de esporos de *Paenibacillus larvae* dependentes e independentes de cultivo em mel

a) Preparo do inóculo

Uma cepa de *Paenibacillus larvae* foi inoculada em caldo Bacillus Larvae modificado (CBLM) e incubada a 37°C por 48h. Após a incubação foram feitas diluições seriadas e posterior inoculação em Agar MYPGP e incubação por 48 h a 37 °C sob anaerobiose para estimar UFC/mL do cultivo. No experimento foram usados sete inóculos, em triplicata: O primeiro inóculo foi composto de 2,5 ml do cultivo de *P. larvae* sem diluição; o segundo inóculo formado da diluição 1:10 do cultivo, sendo uma parte de cultivo diluída em 9 partes de CBLM estéril; o terceiro inóculo formado da diluição 1:10 do segundo inóculo; o quarto inóculo formado da diluição 1:10 do terceiro inóculo; o quinto inóculo formado da diluição 1:10 do quarto inóculo; o sexto inóculo formado da diluição 1:10 do quinto inóculo; e por fim, o sétimo inóculo formado pela diluição 1:10 do sexto inóculo.

b) Preparo das amostras

Foram preparadas sete amostras em triplicatas. As amostras foram constituídas por 22,5 g de mel + 2,5mL dos respectivos inóculos de *P. larvae*, sendo o primeiro composto pelo cultivo em caldo CBLM não diluído e os seguintes por suas diluições seriadas da 10⁻¹ a 10⁻⁶. Como controle negativo foi utilizado mel com adição do meio de cultivo não inoculado. Após o preparo das amostras, as mesmas foram mantidas sob temperatura ambiente por 24h antes do início dos experimentos.

c) Metodologia dependente de cultivo

Protocolo dependente de cultivo, preconizado pelo MAPA (Anexo da Portaria nº 137, de 5 de junho de 2006):

c 1) Preparo da amostra

A amostra de mel foi aquecida em banho-maria a 45°C para facilitar a manipulação e a homogeneização dos esporos presentes. Duzentos mililitros foram transferidos asépticamente para frasco estéril, e adicionados 40mL de solução salina fosfatada tamponada, pH 7,2 (PBS), seguida de homogeneização. A amostra foi centrifugada a 775g por 30 min e o sobrenadante

foi descartado cuidadosamente. A verificação da presença de esporos que apresentam movimento Browniano (movimento vibratório) no sedimento foi realizada por meio da técnica de gota pendente modificada por SHIMANUKI & KNOX (1988), após inativação das formas vegetativas.

c 2) Inativação das formas vegetativas

O precipitado foi ressuspendido em 1mL de PBS, transferido para tubos com tampa de rosca e aquecido a 80°C, em banho-maria, por 10 minutos.

c 3) Pesquisa de *Paenibacillus larvae*

O precipitado foi inoculado em Agar Bacillus Larvae (ABL) (conforme tabela 7) e incubado a 35°C por até cinco dias. Após 48h as placas foram observadas diariamente quanto à presença de colônias típicas de *P. larvae*. As colônias típicas de *P. larvae* apresentam-se planas, com superfície suavemente granulada, com bordas irregulares, sem brilho, lecitinase negativa, de cor verde clara, e diâmetro de 2 a 4 mm no ABL. Três a cinco colônias típicas devem ser selecionadas e testadas quanto à presença de catalase. As colônias que apresentarem resultado negativo para a prova da catalase devem ser reisoladas em placas com ABL e incubadas 35-37°C por 48 a 72 h.

c 4) Provas confirmatórias

Para confirmação foram realizadas as provas de identificação presuntiva: coloração de Gram, teste da catalase, redução de nitratos, crescimento em superfície de ágar nutritivo. Foram consideradas como *Paenibacillus larvae* as culturas que se apresentarem como bastonetes Gram positivos finos e longos, dispostos em cadeias de tamanho variável, catalase negativa, redutora de NO₃ e incapaz de crescer em ágar nutritivo em até três dias.

d) Metodologia independente de cultivo

d 1) Detecção de *Paenibacillus larvae* por metodologia independente de cultivo

Após a etapa de extração utilizando o protocolo com melhor desempenho no experimento anterior, a foi realizada a amplificação por PCR da região 16S do rDNA. Foram utilizados os seguintes pares de nucleotídeos: AF 6f (5'- GCA AGT CGA GCG GAC CTT GT -3') eAF 7r (5'- GCA TCG TCG CCT TGG TAA GC -3') (Bakonyi, 2003) e PL 1f (5'- AAG TCG AGC GGA CCT TGT GTT TC-3') ePL 2r (5'-TCT ATC TCA AAA CCG GTC AGA GG-3') (GOVAN, 1999).As amplificações foram conduzidas segundo os seguintes parâmetros: 5 min de desnaturação inicial a 95 °C, 40 ciclos de 95 °C por 20 s, 50 °C por 20 s, 72 °C por 60 s, seguida de uma elongação final a 72 °C por 7 min.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Seleção de meio de cultivo líquido para cultivo de *Paenibacillus larvae*

Houve diferença qualitativa e quantitativa entre os diferentes meios. Qualitativa, pois nem todos os isolados se desenvolveram nos diferentes meios de cultura. Quantitativa, pois a quantidade de bactérias ao final do cultivo também variou nas comparações entre os diferentes meios de cultura. Nos meios de cultura MYPGP e MYPGP modificado, 16,66 % dos tubos não apresentaram cultivo detectável. Já para os meios MYT e BHI com tiamina esses percentuais foram, respectivamente, 30,55% e 47,22%. O CBL teve o segundo maior percentual de tubos com quantidade não detectada de bactérias, 41,66%. Apenas o CBL modificado apresentou crescimento detectável em todos os tubos avaliados (Anexo 1).

Além de obter 100% dos tubos com quantidade detectável, os tubos contendo CBL com Agar e tioglicolato de sódio também obtiveram as maiores contagens de UFC/ml chegando a quantidade de 10^9 UFC/ml nas cepas 2 e 9, conforme ilustrado na Figura 11.

O estudo avaliou o desempenho dos diferentes meios de cultura no cultivo de *P. larvae* pelo método de contagens de células viáveis por plaqueamento (Figura 12) e não pela leitura de espectrofotômetro como realizado por GENDE, et al. (2008), pois dessa forma considera-se apenas as células viáveis, não quantificando as células mortas. expoente da contagem de UFC/g.

Pouco se sabe sobre as exigências metabólicas de *P. larvae*. Em estudo metabólico do cultivo de *P. larvae*, Digman & Stahly (1983) concluíram que a glicose é fundamental para o evento de esporulação, principalmente porque falhas na gliconeogênese não são raras, uma alternativa de auxiliar no processo de esporulação é a adição de piruvato de sódio. O extrato de levedura tem sido apontado como fundamental para o crescimento de *P. larvae* (DIGMAN & STAHLY, 1983). Uma hipótese para o desempenho superior do CBLM no cultivo de *P. larvae* pode estar relacionada à adição de tioglicolato de sódio que favoreceu o ambiente de anaerobiose, protegendo as bactérias do oxigênio, que provoca um efeito comprovadamente tóxico para *P. larvae* (DIGMAN & STAHLY, 1983).

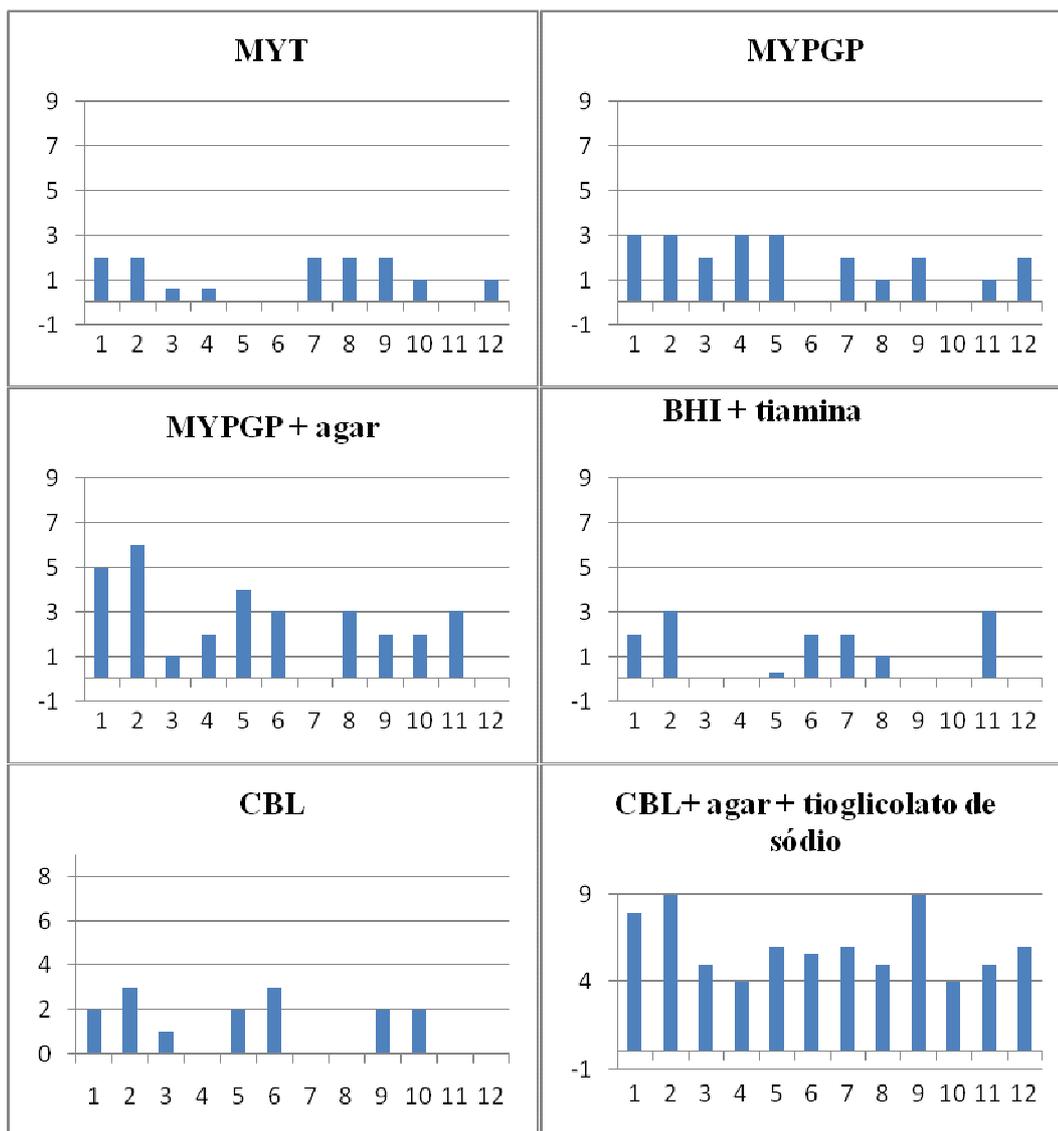


Figura 11- Demonstração do desempenho no cultivo de cepas de *Paenibacillus larvae* em diferentes meios de cultura, eixo x representa as cepas de *P. larvae* e eixo Y o



Figura 12-Contagem de *Paenibacillus larvae*(UFC/mL) em Ágar MYPGP após diluição seriada de diferentes meios de cultura com objetivo de testar a eficiência do cultivo.

4.5.2 Seleção de técnica de extração de DNA bacteriano de amostras de mel

Foram testados quatro protocolos de extração, em triplicata, e não houve diferença nos resultados nas repetições. Não foi possível a detecção de DNA em nenhum dos protocolos quando a amostra não foi previamente incubada, mostrando que nenhum protocolo se mostrou eficiente para a extração de DNA diretamente dos esporos bacterianos. Quando as amostras sofreram prévia diluição e incubação foi possível a detecção e posterior amplificação do material extraído em dois dos quatro protocolos testados conforme Tabela 8. Através do protocolo 1 (*glass beads*) e do protocolo 4 (Figura 12) (detergente+sal+térmico) foi extraído material genético detectado na eletroforese, com pouco rasto e relativa integridade. Através da eletroforese do material oriundo do protocolo 3 (*glass beads*+PEG8000) foi possível a observação de rasto, indicando que o material extraído se apresentava degradado (Figura 13).

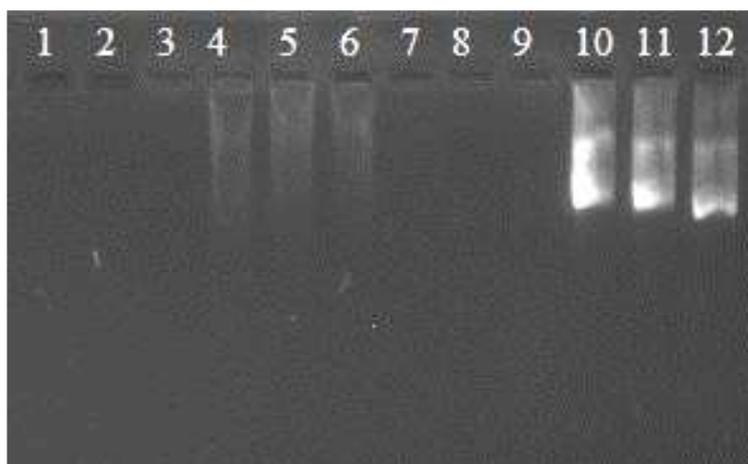


Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% de DNA genômico total extraído de amostras de mel submetidas a dois protocolos de extração 1, 2 e 3= repetições da amostra não inoculada por *Paenibacillus larvae* submetidas ao protocolo 3 (*glass beads*+PEG8000); 4, 5 e 6= repetições da amostra inoculada com *P. larvae* submetidas ao protocolo 3; 7, 8 e 9= repetições da amostra não inoculada por *P. larvae* submetidas ao protocolo 4 (detergente+sal+térmico); 10, 11 e 12= repetições da amostra inoculada com *P. larvae* submetidas ao protocolo 4.

Não foi possível extrair material genético detectável na eletroforese pelo protocolo 2 (choque térmico). O material extraído foi submetido a PCR usando os *primers* 27F e 1512R para avaliar a sua qualidade; porém só foram produzidos *amplicons* nas reações que usaram materiais oriundos dos protocolos 1 e 4 (Figura 14).

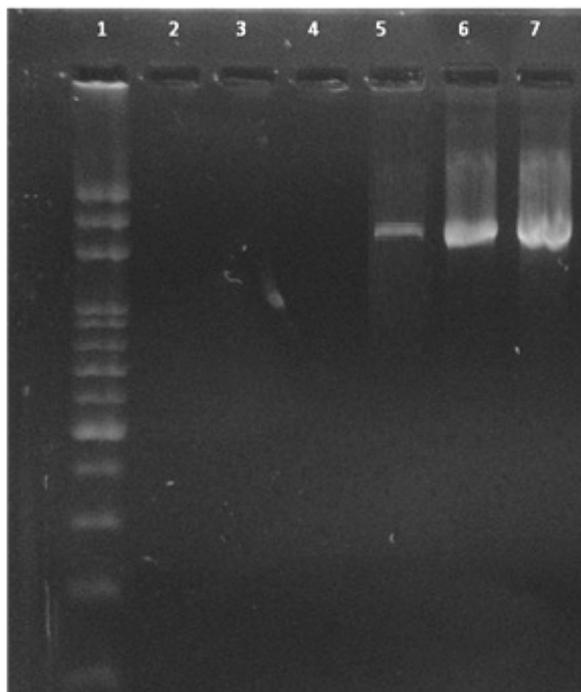


Figura 14– Eletroforese em gel de agarose 1,5% de *amplicons* produzidos pela reação de PCR com pares de primers 27F/1512R d material extraído direto de amostras de mel. 1= Marcador; 2,3 e 4=repetições da amostra não inoculada por *P. larvae* submetidas ao protocolo 4 (detergente+sal+térmico); 5, 6 e 7=repetições da amostra inoculada com *P. larvae* submetidas ao protocolo 4.

Tabela 8-Avaliação eletroforética da presença de DNA extraído por diferentes protocolos e respectivas produções de *amplicons* por reação de PCR.

		Mel com <i>P. larvae</i>		controle negativo		
		DNA total	Amplicon	DNA total	Amplicon	
PROTOCOLO 1	COM INCUBAÇÃO	R1	positivo	positivo	negativo	negativo
		R2	positivo	positivo	negativo	negativo
		R3	positivo	positivo	negativo	negativo
	SEM INCUBAÇÃO	R1	negativo	negativo	negativo	negativo
		R2	negativo	negativo	negativo	negativo
		R3	negativo	negativo	negativo	negativo
PROTOCOLO 2	COM INCUBAÇÃO	R1	negativo	negativo	negativo	negativo
		R2	negativo	negativo	negativo	negativo
		R3	negativo	negativo	negativo	negativo
	SEM INCUBAÇÃO	R1	negativo	negativo	negativo	negativo
		R2	negativo	negativo	negativo	negativo
		R3	negativo	negativo	negativo	negativo
PROTOCOLO 3	COM INCUBAÇÃO	R1	positivo	negativo	negativo	negativo
		R2	positivo	negativo	negativo	negativo
		R3	positivo	negativo	negativo	negativo
	SEM INCUBAÇÃO	R1	negativo	negativo	negativo	negativo
		R2	negativo	negativo	negativo	negativo
		R3	negativo	negativo	negativo	negativo

Tabela 8 - Continua

PROTOCOLO 4	COM INCUBAÇÃO	R1	positivo	positivo	negativo	negativo
		R2	positivo	positivo	negativo	negativo
		R3	positivo	positivo	negativo	negativo
	SEM INCUBAÇÃO	R1	negativo	negativo	negativo	negativo
		R2	negativo	negativo	negativo	negativo
		R3	negativo	negativo	negativo	negativo

*(negativo)= ausência de banda visualizada na eletroforese; (positivo)= presença de banda na eletroforese

4.5.3 Grau de sensibilidade das técnicas de monitoramento de esporos de *Paenibacillus larvae* dependentes e independentes de cultivo em mel

A quantificação do inóculo revelou que em um mililitro do cultivo de *P. larvae* continha 10^7 UFC, desta forma, o grau de contaminação e a descrição de cada amostra estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9 – Distribuição e descrição das amostras de méis adicionadas de diferentes diluições do cultivo de *Paenibacillus larvae*

	<i>Paenibacillus larvae</i> NA	
AMOSTRA		COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA
AMOSTRA A	10^6 UFC/g	22,5g MEL+2,5mL CULTIVO PURO
AMOSTRA B	10^5 UFC/g	22,5g MEL+2,5mL DILUIÇÃO 10^{-1}
AMOSTRA C	10^4 UFC/g	22,5g MEL+2,5mL DILUIÇÃO 10^{-2}
AMOSTRA D	10^3 UFC/g	22,5g MEL+2,5mL DILUIÇÃO 10^{-3}
AMOSTRA E	10^2 UFC/g	22,5g MEL+2,5mL DILUIÇÃO 10^{-4}
AMOSTRA F	10^1 UFC/g	22,5g MEL+2,5mL DILUIÇÃO 10^{-5}
AMOSTRA G	1 UFC/g	22,5g MEL+2,5mL DILUIÇÃO 10^{-6}
CONTROLE NEGATIVO	0	22,5g MEL+2,5mL CBLM não inoculado

a) Metodologia dependente de cultivo

O experimento foi conduzido em triplicata, não havendo diferença entre as repetições, foram consideradas apenas as placas que apresentaram um número superior a 25 e inferior a 250 colônias. Pela metodologia dependente de cultivo, a detecção bacteriana foi possível apenas repetições da amostra A, a qual foi adicionado o cultivo sem diluição, conforme figura 15. Esse resultado mostra que o grau de sensibilidade da técnica é baixo e que a detecção só é possível em amostras com alta contaminação.

A dificuldade de recuperação do agente da Cria Pútrida Americana é a principal razão da baixa sensibilidade do diagnóstico dependente de cultivo (ALVARADO et al., 2013). Estudos com objetivo de aumentar a sensibilidade da detecção do agente em amostras clínicas vêm sendo desenvolvidos ao longo do tempo, todavia sem muito sucesso (TITERA & HAKLOVA, 2003; BZDIL, 2007).

O número mínimo necessário de células bacterianas capazes de induzir sintomas clínicos da doença não está bem esclarecido. Segundo Bucher (1958) a dose infectante média (LD50) para larvas de um dia é de 35 esporos, já para Brødsgaard (2000) 1350 esporos são

necessários para instalar a infecção. Outros autores sugerem um mínimo de 10^6 (PANKIW & CORNER, 1966) e 10^9 UFC (HANSEN & BRØDSGAARD, 1995). Todavia, para um diagnóstico preventivo, se faz necessária técnica mais sensível, acessível e rápida (RYBA et al., 2009).

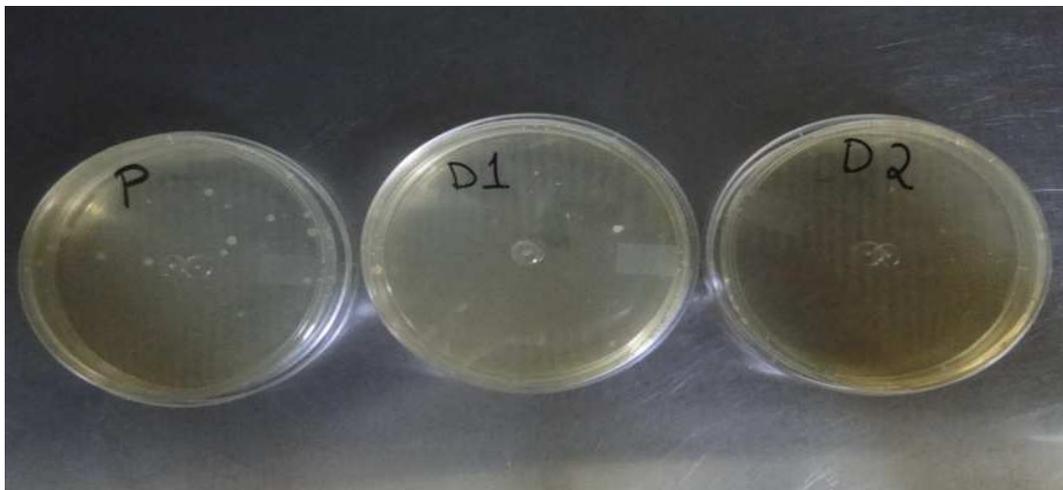


Figura 15- Contagem de *Paenibacillus larvae* em placas de Agar MYPGP (Caldo Mueller-Hinton, extrato de levedura, fosfato de potássio, glicose, ágar e piruvato). Placa P- mel adicionado do cultivo puro; Placa D1- mel adicionado da primeira diluição do cultivo; Placa D2- mel adicionado da segunda diluição do cultivo.

O cultivo de *P. larvae* já vem se mostrando ineficiente como forma de diagnóstico (BAKONYI, 2003). Já se sabe que apenas 6% dos esporos de *P. larvae* presentes no mel germinam (DINGMAN & STAHLY, 1983; ALVARADO, et. al., 2013). Outro fator limitante da técnica é que mesmo com uso de substâncias inibitórias, e eliminando as formas vegetativas, a presença de outros *Bacillus* spp. pode impedir a germinação de *P. larvae*. As principais causas da inibição da germinação de *P. larvae* são alterações no pH e formação de indol e fenol pelo metabolismo da microbiota contaminante (ALVARADO et al., 2013). Todavia, Jeliński (2003) ao analisar uma amostra de mel de uma colméia positiva para Loque Americana, armazenada a 19 anos, conseguiu a recuperação do agente, mostrando que os esporos podem sobreviver durante anos no mel. Com isso, ferramentas moleculares têm sido propostas como alternativa mais sensível e rápida de monitoramento (BAKONYI, 2003).

e) Metodologia independente de cultivo

O experimento foi conduzido em triplicata, não havendo diferença entre as repetições, o protocolo 4 (detergente+sal+térmico) foi escolhido para o experimento, levando em consideração não só o bom desempenho nos testes anteriores, mas também sua praticidade. Após a extração do DNA diretamente das amostras o material foi submetido a PCR com os primers PL 1f/ PL 2r e AF 6f/AF 7r. Não foi possível a observação de amplicons pela eletroforese dos produtos da reação cujos primers PL 1f/ PL 2r foram utilizados em nenhuma das amostras. Com a utilização dos primers AF 6f/AF 7r, foi possível a detecção de amplicons nas amostras A, B, C, D e E, conforme Figura 16.

O experimento mostrou que o grau de sensibilidade da técnica com a utilização dos primers AF 6f/AF 7r foi de 10^2 UFC/g, muito superior a técnica dependente de cultivo que só detectou a presença de *P. larvae* em amostras com 10^6 UFC/g. O presente estudo ressalta a

importância na escolha dos *primers* utilizados para a detecção de *P. larvae*. A baixa prevalência encontrada em estudo realizado na Espanha pode ter sido em decorrência da escolha dos *primers* utilizados, pois no estudo foram utilizados os *primers* PL 1f/ PL 2r (GARRIDO-BAILÓN, 2013). Bakonyi (2003) ao testar o desempenho de diferentes *primers* também sugeriu os pares AF 6f/AF 7r, como mais representativos da espécie.

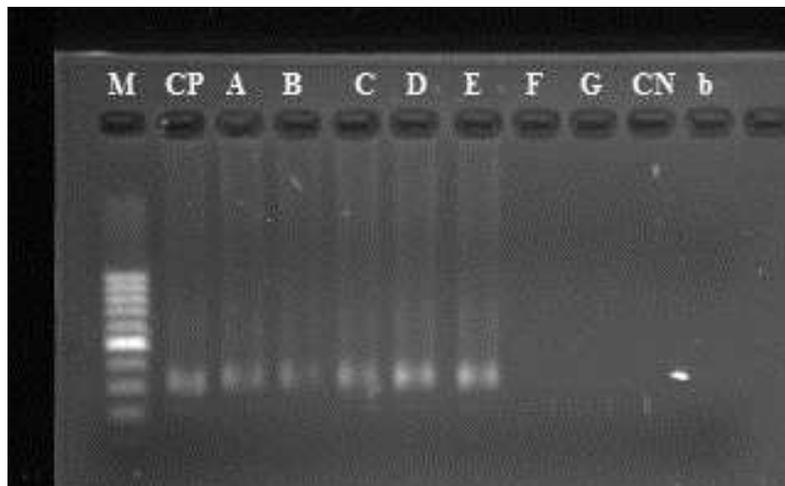


Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos *amplicons* produzidos por PCR utilizando os *primers* AF 6f/AF 7r, do DNA extraído de amostras de méis inoculadas com diferentes quantidades de *P. larvae*. M= marcador 100bp DNA Ladder Thermo Scientific (SM0241); CP= controle positivo da reação; Amostra A= 10^6 UFC/g; Amostra B= 10^5 UFC/g; Amostra C= 10^4 UFC/g; Amostra D= 10^3 UFC/g; Amostra E= 10^2 UFC/g; Amostra F= 10^1 UFC/g; Amostra G=1UFC/g ; CN= amostra controle negativo e b= controle negativo da reação

4.6 CONCLUSÕES

O caldo Bacillus Larvae modificado foi considerado como alternativa para o cultivo de *P. larvae*.

A implementação de testes de diagnósticos mais sensíveis é essencial para a pesquisa deste microrganismo dada a dificuldade em seu cultivo.

O uso da técnica de diagnóstico independente de cultivo, pela extração do material genético e posterior amplificação do fragmento do DNA ribossomal 16S utilizando *primers* específico para *P. larvae*, no monitoramento de esporos de *P. larvae* circulantes em méis se mostrou uma excelente alternativa.

5 CONCLUSÕES GERAIS

O estudo confirmou que técnicas independentes de cultivo podem ser usadas para atender a diversas demandas do setor agrícola. A técnica de DGGE mostrou-se adequada e eficiente na avaliação das diferenças entre as populações bacterianas em tetos mastíticos e sadios de vacas positivas ao CMT. A técnica também se mostrou eficiente na avaliação da diversidade bacteriana em amostras de solos tratados com resíduos da indústria agroenergética por ter possibilitado detectar diferentes padrões de UTOs nos tratamentos avaliados. No entanto, para caracterização e identificação dos membros predominantes de grupos específicos de microrganismos nas diferentes amostras, faz-se necessário realizar a excisão, eluição, seqüenciamento dos fragmentos e afiliação filogenéticas das sequências.

O estudo também mostrou que a utilização da reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção de sequências gênicas específicas de agentes de difícil cultivo que impactam setores da agropecuária, como o *Paenibacillus larvae* na apicultura, pode representar um avanço em termos de diagnóstico e monitoramento, uma vez que apresentou sensibilidade superior ao método oficial.

Desse modo, consideramos que dentro da proposta do PPGCTIA, a tese ora apresentada contribui na proposta de implementação de metodologias inovadoras para atendimento as demandas do setor agrícola nacional.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALIPPI, A. M. Técnicas de laboratorio para el aislamiento y identificación de *Bacillus larvae* W., el agente causal de la Loque Americana. La Plata. **Comisión de Investigaciones Científicas**. 19 p. 1990.

ALIPPI, A.M. Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of American foulbrood of honey bees. First record of its occurrence in Argentina. **Rev. Arg. Microbiol.** v.24, p.67–72, 1992. . F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v.215, n.3, p.403-410, 1990.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Acids Research**. v.25:p.3389-3402, 1997.

ALVARADO, I.; PHUI, A.; ELEKONICH, M.M.; ABEL-SANTO, E. Requirements for In Vitro Germination of *Paenibacillus larvae* Spores. **Journal of Bacteriology**. v.195, n.5, p. 1005–1011, 2013.

AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Review**, v.59, p.143-169, 1995.

ANTÚNEZ, K.; D’ALESSANDRO, B.; PICCINI, C.; CORBELLA, E.; & ZUNINO, P. *Paenibacillus larvae* larvae spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 86, n. 1, p. 56-58, 2004.

ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; CHROŇÁKOVÁ, A.; JIROUT, J.; BORGOGNI, F.; ELHOTTOVÁ, D. & PIETRAMELLARA, G. Evaluation of the denaturing gradient gel electrophoresis-apparatus as a parameter influencing soil microbial community fingerprinting. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 9, p. 1721-1726, 2010.

ATLAS, R.M. Use of microbial diversity measurements to assess environmental stresses. Appud: KLUG, M.J.; REDDY, C.A. Current perspectives in microbial ecology. **American Society for Microbiology**, p. 540-545, 1984.

BABA, S.; KUKITA, Y.; HIGASA, K.; TAHIRA, T.; HAYASHI, K. Single-stranded conformational polymorphism analysis using automated capillary array electrophoresis apparatuses. **Biotechniques**. v.34, p.746–750, 2003.

BAKONYI, T.; DERAKHSHIFAR, I.; GRABENSTEINER, E.; NOWOTNY, N. Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. **Appl. Environ. Microbiol.** v.69, p.1504–1510, 2003.

BALL, A. S.; STEWART, R. J.; SCHLIEPHAKE, K. A review of the current options for the treatment and safe disposal of drill cutting. **Waste Management e Research**, v.30, p.457-473, 2012.

BARROS, E.M.; IORIO, N.L.; BASTOS, M.F.B.; DOS SANTOS, K.R.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. Species-level identification of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis of a partial groEL gene sequence. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v.59, p.157– 251, 2007.

BATISTA, W. B.; NOBRE, S. A. M.; NOBRE, P. B.; FERNANDES, B. H. A.; GOMES, H. A. R.; AGUIAR, R. M.; PEREIRA, G. V. N.. Avaliação de actinomicetos com potencial para promoção de crescimento em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) de diferentes cultivares. **Unimontes Científica**, v. 12, n. 2, p.60-68, 2011.

BEARE, M.H.; COLEMAN, D.C.; CROSSLEY JR, D.A.; HENDRIX, P.F.; ODUM, E.P. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. **Plant and Soil**, v.170, p.5-22, 1995.

BRAEM, G.; DE VliegHER, S.; VERBIST, B.; HEYNDRICKX, M.; LEROY, F., & DE VUYST, L. Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 3, p. 383-390, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 51, de 18 de set. 2002. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo a, do leite tipo b, do leite tipo c, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel, em conformidade com anexos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Seção 1, n. 183, p. 55. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, Seção 1, p. 6, 2011

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 137, de 5 de junho de 2006. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Sanidade Apícola – PNSAp. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n.109, p.1-6, 8 jun. 2006.

BRESLAUER, K.J.; FRANK, R.; BLOCKER, H.; MARKY, L.A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 83, p. 3746-3750, 1986.

BRØDSGAARD C.J.; HANSEN H. & RITTER W. Progress of *Paenibacillus larvae* larvae infection in individually inoculated honey bee larvae reared single in vitro, in micro colonies, or in full-size colonies. **J. Apicult. Res.**, v.39 n 1–2, p. 19–27, 2000.

BURNS, R. G.; DEFOREST, J.L.; MARXSEN, J.; SINSABAUGH, R. L.; STROMBERGER, M. E.; WALLENSTEIN, M.D.; WEINTRAUB, M.N.; ZOPPINI, A. Soil

enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.58 , p. 216-234, 2013

BUYER, S. A Soil and rhizosphere microorganism isolation and enumeration medium that inhibits *Bacillus mycoides*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p.1839-42, 1995.

BZDIL J.: Detection of *Paenibacillus larvae* Spores in the debris and wax of honey bee by the tween 80 method. **Acta Vet. Brno** v.76, p. 643-648. 2007.

CARACCIOLO, A.B.; BOTTONI, P.; GRENNI, P. Fluorescence *in situ* hybridization in soil and water ecosystems: a useful method for studying the effect of xenobiotics on bacterial community structure. **Toxicol. Environ. Chem.**, v. 92 p.567–579, 2010.

CHAILLAN, F.; LEFLECHE, A.; BURY, E.; GRIMONT, P.; SALIOT, A.; OUDOT, J. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 587-595, 2004

CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C.; CHIKERE B. O. Bacterial diversity in a tropical crude oil-polluted soil undergoing bioremediation. **African Journal of Biotechnology** .v.8 n.11, p 2535-2540, 2009

CLARK, F. E. Agar-plate method for total microbial count. In: C. A. Black (ed.) Methods of soil analysis, Part 2. Agronomy 9:1460-1466. **Am. Soc. of Agron., Inc.**, Madison, Wis, 1965.

CLEMENTS, A.C.A.; TAYLOR, D.J.; FITZPATRICK, J.L. Evaluation of diagnostic procedures form sub clinical mastitis in meat-producing sheep. **Dairy Research**, v.70, p.139-148, 2003.

COSTA R.; GOMES N.C.M.; MILLING A.; SMALLA K. An optimized protocol for simultaneous extraction of DNA and RNA from soils. **Braz. J. Microbiol.**v. 35, p. 230-234, 2004.

COX-FOSTER, D. L.; CONLAN, S.; HOLMES, E. C.; PALACIOS, G.; EVANS, J. D.; MORAN, N. A. & MARTINSON, V. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, v. 318, n. 5848, p. 283-287, 2007.

DE GRAAF, D. C.; ALIPPI, A. M.; BROWN, M.; EVANS, J. D.; FELDLAUFER, M.; GREGORC, A. & TOMKIES, V. Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. **Letters in Applied Microbiology**, v.43, p. 583–590, 2006.

DEANGELIS, K.M.; BRODIE, E.L.; DESANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G.L.; LINDOW, S.E.; FIRESTONE, M.K. Selective progressive response of soil microbial community to wildo at roots. **ISME Journal**v.3, p.168-178, 2009.

DERAKSHANI, M.; LUKOW, T.; LIESACK, W. Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rDNA genes from bulk soil and rise roots of flooded rise microcosms. **Applied Environmental Microbiology**. v.67, p.623-631, 2001.

DESANTIS, T.Z.; BRODIE, E.L.; MOBERG, J.P.; ZUBIETA, I.X.; PICENO, Y.M.; ANDERSEN, G.L. High-density universal 16S rRNA microarray analysis reveals broader diversity than typical clone library when sampling the environment. **Microbial Ecology** v.53, p.371-383, 2007.

DINGMAN D.W.; STAHLY D.P. Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. **Appl Environ Microbiol.** v. 46, p.860-869. 1983.

DRINKWATER, L.E.; CAMBARDELLA, C.A.; REEDER, J.D.; RICE, C.W. Potentially mineralizable nitrogen as an indicator of biologically active soil nitrogen. In: DORAN, J.W.; JONES, A.J. (eds.) Methods for assessing soil quality. **Soil Science Society of America**, v.49, p.217-229, 1996

ELSAS, J.D.V.; SMALLA, K. Extraction of microbial community DNA from soils. **Kluwer Academic Publishers.** p. 1-11, 1995.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution.** v.39, p.783-791, 1985.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, p.783-791, 1985.

FERREIRA, E.P.B; NUNES, M.U.C.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Perfis de PCR-DGGE de comunidades bacterianas associadas ao rizoplane de milho sob diferentes doses de adubação com compostos orgânicos. **Biosci. J.** v. 25, n. 3, p. 41-50, 2009.

FERRIS, M.J.; WARD, D.M. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. **Appl Environ Microbiol.** v.63, p.1375–1381, 1997.

FIERER, N.; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.103, p.626–631, 2006.

FISHER, M.M.; TRIPLETT, E.W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. **Appl Environ Microbiol.** v.65, p. 4630–4636, 1999.

FODDE, R., & LOSEKOOT, M.. Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Human mutation**, v. 3, n. 2, p. 83-94, 1994.

FONSECA L.F.L. & SANTOS M.V. Qualidade do leite e controle de mastite. **Editores Lemos**, São Paulo. 50p., 2000

FOSGATE, G. T.; PETZER, I. M.; KARZIS, J. Sensitivity and specificity of a hand-held milk electrical conductivity meter compared to the California mastitis test for mastitis in dairy cattle. **The Veterinary Journal**, 2012.

FRANKLIN, R.B.; TAYLOR, D.R.; MILLS, A.L. Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **J. Microbiol. Methods.** v.35, p.225–235, 1999.

FREITAS, F.. Caracterização química de cascalhos de perfuração de poços de petróleo e seus efeitos em plantas e nas bases trocáveis dos solos. 2013. 135f Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013

FREITAS, F.C. Uso de resíduo orgânico da produção de biodiesel direta da semente na atenuação dos efeitos de hidrocarbonetos de petróleo no solo. 2009. 97f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009

FRIES, I.; LINDSTROM, A.; KORPELA, S. Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*), **Veterinary Microbiology**, v 114, p 269-274, 2006.

GARCEZ, C.A.G.; VIANNA, J.N.S. Brazilian Biodiesel Policy: Social and environmental considerations of sustainability. **Energy**, n.34, p.645–654, 2009.

GARRIDO-BAILÓN, E.; HIGES, M.; MARTÍNEZ-SALVADOR, A.; ANTÚNEZ, K.; BOTÍAS, C.; MEANA, A. & MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay. **Microbial Biotechnology**, v6, p.731–739, 2013

GAZZONI, D.L.; BORGES, J.L.B.; ÁVILA, M.T.; FELICI, P.H. Balanço energético da cultura da canola para a produção de biodiesel. **Espaço Energia**, n.11, 2009.

GAZZONI, D.L.; FELICI, P.H.; CORONATO, R.M.S.; RALISCH, R. Balanço energético das culturas de girassol e soja para produção de biodiesel. **Biomassa & Energia**, v. 2, n. 4, p. 259-265, 2005.

GENDE, L.B.; EGUARAS, M.J.; FRITZ, R. Evaluation of culture media for *Paenibacillus larvae* applied to studies of antimicrobial activity. **Revista Argentina de Microbiología** v.40, p. 147-150, 2008.

GENERSCH, E.; ASHIRALIEVA, A.; FRIES, I. Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. **Appl. Environ. Microbiol.**v.71p.7551–7555, 2005.

GENERSCH E. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**v.56 p.501–511, 2006

GIANNECHINI, R.E.; CONCHA, C.; FRANKLIN, A. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy herds in the west littoral region of Uruguay, **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 43, p. 31–41, 2002.

GILLARD, M; CHARRIERE, J.D.; BELLOY, L. Distribution of *Paenibacillus larvae* spores inside honey bee colonies and its relevance for diagnosis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 99, p 92-95, 2008.

GOCHNAUER, T.A. Growth, protease formation, and sporulation of *Bacillus larvae* in aerated broth culture. **J Invertebr Pathol.** v.22, p.251–257. 1973.

GOLYNSKI, A. Avaliação da viabilidade econômica e nível tecnológico da apicultura no Estado do Rio de Janeiro. Tese (Doutorado), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2009.

GONÇALVES, L. S.; KERR, W. E. Genética, Seleção e Melhoramento. 1. Noções sobre genética e melhoramento em abelhas. In: **Congresso Brasileiro de Apicultura**, 1., Florianópolis, 1970. p. 8-36, 1970.

GONZALEZ, R.N.; WILSON, D.J. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**v.19, p.199–221, 2003.

GONZALEZ-SEDANO, M.; MARIN-MEJIA, B.; MARANTO, M.I.; LEME DE MAGALHAESLABARTHE A.C.; ALONSO-DIAS, M.A. Effect of residual calf suckling on clinical and sub-clinical infections of mastitis in dual-purpose cows: epidemiological measurements. **Res Vet Sci.** v.89, n.3, p.362–366, 2010.

GORDON, R.E.; HAYNES, W.C. AND PANG, H.N.The Genus *Bacillus*. **Agriculture Handbook** No. 427. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, 1973.

GOVAN, V. A.; ALLSOPP .M. H.; DAVISON, S..A PCR detection method
GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S. Estudo comparativo dos métodos de congelamento e perfuração de crias para avaliação do comportamento higiênico em abelhas africanizadas. In: **Congresso Latino ibero americano De Apicultura**,v.4. , p.45, 1994.

GUANGHUA, W.;JUNJIE,L.; XIAONING, Q. ; JIAN, J.; YANG, W.;XIAOBING, L. Effects of fertilization on bacterial community structure and function in a black soil of Dehui region estimated by Biolog and PCR-DGGE methods. **Acta Ecologica Sinica.** p. 220–226, 2008

HACHEM, N. I.; MASTITE BOVINA: Descrição dos tipos mais frequentes e métodos de prevenção e tratamento visando a melhoria da qualidade do leite e saúde dos rebanhos, 2005. Dissertação (Pós-Graduação Lato Sensu em Processamento e Controle de Qualidade em Carne, Leite, Ovos e Pescado) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp.** v. 41, p.95-98, 1999.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.68, p.669–685, 2004.

HANG M.; XIAO-YU X.; ZHEN-MEI L.; HE L. Comparison of DNA extraction methods for PCR-DGGE analysis of the soil bacterial community. **Chin. J. Agric. Biotechnol,** v. 3, p. 1-6, 2006.

HANSEN, H. Forholdsregler mod Varroa-miden.Tidskr.**Biavl.**,p.118: 229, 1984.

HANSEN, H.; BRØDSGAARD, C.J. Field trials with induced infection of *Bacillus larvae*. In: **XXXIV International Apicultural Congress of Apimondia Lausanne**, Apimondia Publishing House; Bucharest, Romania.1995.

HIGGINS, E.T.; RONEY, C.; CROWE, E.; HYMES, C. Ideal versus ought predilections for approach and avoidance: Distinct self-regulatory systems. **Journal of Personality and Social Psychology**, v.66, p.276–286, 1994.

HILL, G.T.; MITKOWSKI, N.A.; ALDRICH-WOLFE, L.; EMELE, L.R.; JURKONIE, D.D.; FICKE, A.; MALDONADO-RAMIREZ, S.; LYNCH, S.T.; NELSON, E.B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v.15, p.25-36, 2000.

HOFMAN, J.; BEZCHLEBOVÁ, J.; DUSEK, L.; DOLEZAL, L.; HOLOUBEK, I.; AND-L, P.; ANSORGOVÁ, A.; ALY, S. Novel approach to monitoring of the soil biological quality. **Environment International**, v.28, n.8, p.771-778, 2003.

HOGAN, J.; SMITH, K. L. Coliform mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 507-519, 2003.

HOGAN, J.S.; GONZALEZ, R.N.; HARMON, R.J.; NICKERSON, S.C.; OLIVER, S.P.; PANKEY, J.W.; SMITH, K.L. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. **Rev. ed. National Mastitis Council Madison, WI**, 1999

HUGENHOLTZ, P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. **Genome Biology**, v. 3, 2002.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), Pesquisa Pecuária Municipal-2009, 2010. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=rj>>. Acesso em: 20/05/2011.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Comentários. **Produção da Pecuária Municipal**, v.37, 2010

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Comentários. **Produção da Pecuária Municipal**, v.38, 2011

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Comentários. **Produção da Pecuária Municipal**, v.40, 2013

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Comentários. **Censo Agropecuário 2006**.

JANDREY, D.B.; SILVA, P.R.F.; FEDERIZZI, L.C.; VLADIRENEMACEDO VIEIRA, V.M.; LUÍS SANGO, L. Agroenergia e Agricultura. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. v.9, n.1, p. 82-89, 2010.

JELIŃSKI, M. Survival of *Paenibacillus larvae* subsp. Larvae Endospores in honey substitute obtained From bee colonies Affected with american foul brood. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**v.47,p. 271-273, 2003.

JENSEN, M.A.; WEBSTER, J.A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Appl Environ Microbio**, v.159 p. 945–952, 1993.

- KAISER, T. S.; MARTINS, L. R. V.; FRAGA, D. D. R.; GANACINI, J. C. & VIERO, L. M. Perfil microbiológico do leite bovino analisado no laboratório de microbiologia veterinária da Unijui. **Salão do Conhecimento**, v. 2, n. 01, 2014.
- KANE, D. J.; SARAFIAN, T. A.; ANTON, R.; HAHN, H.; GRALLA, E. B.; VALENTINE, J. S.; BREDESEN, D. E. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. **Science**, v.262, n.5137, p.1274-1277, 1993.
- KENNEDY, A.C. & SMITH, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**.v.170, p.75-86, 1995.
- KENZAKA, T.; YAMAGUCHI, N.; TANI, K.; NASU, M. rRNA targeted fluorescent in situ hybridization analysis of bacterial community structure in river water. **Microbiology**, v.144, p.2085-2093, 1998.
- KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; ASSMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.853-862, 1997.
- KIRK, J.L.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KHIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. **J Microbiol Meth**v.58, p. 169–188, 2004.
- KUANG, Y.; TANI, K.; SYNNOTT, A. J.; OHSHIMA, K.; HIGUCHI, H.; NAGAHATA, H. & TANJI, Y.. Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR–DGGE method. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 1, p. 76-81, 2009.
- LAGUERRE, G.; ALLARD, M.R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction-fragment-length-polymorphism analysis of PCR-amplified 16S ribosomal-RNA genes. **Appl Environ Microbiol**, v.60, p. 56–63, 1994.
- LAZZARI, A. M.; OLIVEIRA, M. V. S.; MORETI, B.; GUIMARÃES, G.; KRUG, F.; NOLETO, G., ... & NEVES, J. P. Aspectos clínicos e laboratoriais da mastite induzida por inoculação intramamária de *Staphylococcus aureus* em vacas e búfalas. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 66, n. 5, p. 1299-1307, 2014.
- LEE, DH, ZO, YG, KIM, SJ. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR single-strand-conformation polymorphism. **Appl Environ Microbiol**v. 62, p. 3112–3120, 1996.
- LEELAHAPONGSATHON, K.; SCHUKKEN, Y. H., & SURIYASATHAPORN, W. Quarter, cow, and farm risk factors for intra mammary infections with major pathogens relative to minor pathogens in Thai dairy cows. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 6, p. 1067-1078, 2014.
- LINDSTROM, A.; KORPELA, S.; FRIES, I. The distribution of *Paenibacillus larvae* spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. **J. Invertebr. Pathol.**n.99, p.82–86, 2008.

- LINDSTROM, A.; KORPELA, S.; FRIES, I. The distribution of *Paenibacillus larvae* spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. **J. Invertebr. Pathol.** n.99, p.82–86, 2008.
- LIU, W.T.; MARSH, T.L.; CHENG, H.; FORNEY, L.J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Appl Environ Microbiol** v.63, p.4516–4522, 1997.
- LLOYD, J.M..Simplified laboratory diagnosis of American foul brood disease. **J Apic Resv.**25, p.55–57. 1986.
- LORENZON, M. C. A. A trajetória da Câmara Técnica de Apicultura do Estado do Rio de Janeiro, suas realizações e desafios. **Revista cooperativismo Fluminense.** n.2, ano 1, p. 16-17, 2010.
- LUZ, C.F.P.; THOMÉ, M.L.; BARTH, O.M. Recursos tróficos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) na região de Morro Azul do Tinguá, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasil. Bot.**, v.30, n.1, p.29-36, . 2007
- MACHRY, L.; RIBEIRO, R. L.; BRAZIL, J. M. V.; BALASSIANO, I. T.; OLIVEIRA, I. C. M. D., & AVELAR, K. E. S. Caracterização de cepas de referência de *Leptospira* sp utilizando a técnica de pulsed field gel electrophoresis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 2, p. 166-9, 2010.
- MAGGI, R.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species. **J Clin Microbiol** v.43, p. 1171–1176, 2005.
- MAKIKO, K.; KAZUAKI, S.; SHUNJI, O.; SHIN, T.; AKIKO, M. Identification of alkane degrading bacteria in petroleum hydrocarbon-contaminated soil. **Journal of Japan Society on Water Environment.** v. 29, n. 1, p. 37-43, 2006
- MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Anuário estatístico de agroenergia 2012. **Secretaria de Produção e Agroenergia. Bilíngue.**284p, 2013.
- MARCIANO, C. R.; MORAES, S. O.; OLIVEIRA, F. C.; MATTIAZZO, M. E. Efeito do lodo de esgoto e composto de lixo urbano sobre a condutividade hidráulica de um Latossolo Amarelo saturado e não saturado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, n. 1, p. 1-9, 2001
- MARRIEL, I.E.; OLIVEIRA, C.A. de; RAPOSEIRAS, R.; GOMES, E.A.; LANNA, U.G. de P.; CARNEIRO, A.A.; CARNEIRO, N.P. Aplicação da técnica eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) na caracterização de microrganismos dominantes na rizosfera de plantas cultivadas em solo ácido. **Ciencia Técnica Embrapa Milho e Sorgo**, v. 72, 8p. 2005.
- MARTÍNEZ, J.; SIMON, V.; GONZALEZ, B.; CONGET, P. A real-time PCR-based strategy for the detection of *Paenibacillus larvae* vegetative cells and spores to improve the diagnosis and the screening of American foul brood. **Lett Appl Microbiol**, v.50, p. 603-610, 2010.

MASSOL-DEYA, A.A.; ODELSON, D.A.; HICKEY, R.F.; TIDEJE, J.M. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis [ARDRA]. In: Akkermans, AD (Ed.) **Molecular Microbial Ecology Manual**. Kluwer Academic Publisher, p 1–18, 1995.

MELLENBERGER, R. California Mastitis Test (CMT): An invaluable tool for managing Mastitis, 2001. Disponível em: <<http://www.immucell.com/pdf/An%20Invaluable%20Tool.pdf>> acessado em 01/07/2011.

MENDES, I.C.; REIS JUNIOR, F.B. O uso dos microrganismos como bioindicadores para avaliar qualidade dos solos agrícolas (2010). Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/publicacoes/search_pbl/1?q=Soil%20microorganisms> acessado em 10/07/2013

MILLS, D.K.; ENTRY, J.A.; GILLEVET, P.M. Assessing microbial community diversity using amplicon length heterogeneity polymerase chain reaction. **Soil Sci. Soc. Am. J.** v.71, p.572–578, 2007.

MOYER, C.L.; DOBBS, F.C.; KARL, D.M. Estimation of diversity and community structure through restriction-fragment-length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S ribosomal-RNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. **Appl Environ Microbiol** v.60, p.871–879, 1994.

MOYER, C.L.; TIEDJE, J.M.; DOBBS, F.C.; KARL, D.M.. A computer simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. **Appl Environ Microbiol** v.62, p. 2501–2507, 1996.

MUYZER, G.; DEWAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. **Appl Environ Microbiol**, v. 59, p. 695–700, 1993.

MUYZER, G. & SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol** 73: 127–141, 1998.

MUYZER, G.; DE WALL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** v.59, p.695- 700,1993.

MYERS, R.M.; FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC clamp can be detected by denaturing gradient gel-electrophoresis. **Nucleic Acids Res** v.13, p. 3131–3145, 1985.

MYUZER, G.; RAMSING, N.B. Molecular methods to study the organization of microbial communities. **Water Science Technology**.1995; v.32p.1-9, 1995.

NAGPAL, M.L.; FOX, K.F.; FOX, A. Utility of 16S-23S rRNA spacer region methodology: how similar are interspace regions within a genome and between strains for closely related organisms. **J Microbiol Meth.** V.33, p. 211–219, 1998.

NEWTON, D. C.; OSTASIEWSKI, Jr., N. J. A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Am. Bee J.**, v. 126, n. 4, p. 278-281, 1986.

OGIER, J.C.; SON, O.; GRUSS, A.; TAILLIEZ, P.; DELACROIX-BUCHET, A. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. **Appl Environ Microbiol.** v.68, p. 3691–3701, 2002.

OLIVEIRA, J. L. P. D.; KOZERSKI, N. D.; SILVA, D. R. D.; SILVA, A. V. D. & MARTINS, L. D. A.. FATORES DE RISCO PARA MASTITE E QUALIDADE DO LEITE NO MUNICÍPIO DE ALTÔNIA-PR. **Arq. ciênc. vet. zool. UNIPAR**, v. 16, n. 1, 2014.

OLIVEIRA, S. D. Avaliação das técnicas de bioaumento fúngico e bioestímulo em processos de biorremediação utilizando solo contaminado por petróleo..Dissertação (Mestrado em Ciências) UFRJ/EQ, 2008.

ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel-electrophoresis single-strand conformation polymorphisms. **Proc Natl Acad Sci U S A**.v.86, p. 2766–2770, 1989.

OSMAN, K. M.; HASSAN, H. M.; IBRAHIM, I. M.; MIKHAIL, M. The impact of staphylococcal mastitis on the level of milk IL-6, lysozyme and nitric oxide. Comparative immunology. **Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 1, p. 85-93, 2010.

OVREAS, L. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. **EcolLett**v.3, p. 236–251, 2000.

OVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L. & TORSVIK, V. Distribution of bacterio plankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**.v.63, n.9, p.3367-3373, 1997.

OYARZUM, P.J.; GERLAUGH, M.; ZADOKS, J.C. Factors associated with soil receptivity to some fungal root rot pathogens of peas. **Applied Soil Ecology**, v.10, p.151-169, 1998.

PACHECO, M.R. Cria Ensacada Brasileira em *Apis mellifera Linnaeus* no Estado do Rio de Janeiro: perdas, zoneamento, palinologia e microbiologia. Dissertação (Mestrado), Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Estado do Rio de Janeiro, 2007.

PANKHURST, C.E.; DOUBE, B.M.; GUPTA, V.V.S.R. **Biological indicators of soil health**. Wallingford: CAB International, 1997.

PANKIW, P.; CORNER, J. Transmission of American foulbrood by package bees. **J.Apicult. Res.** V.5, p.99–101.1966.

PANTOJA, J. C. Profile of clinical and subclinical mastitis pathogens isolated from cows housed on compost bedding. **ADSA-ASAS-CSAS Joint Annual Meeting**. 2014.

PARDO, R. B.; STURION, D. J.; BASILE, J. R.; FRANCISCO, A. C. N.; DA SILVA DUARTE, D. D.; FERNANDES, A. A. Levantamento dos agentes etiológicos da mastite bovina na região de Arapongas (PR). **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 1, n. 1, 2014.

PASSOS, C. T.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. Isolada de um solo contaminado do Sul do Brasil. **Química Nova**, vol.XY, n. 00 1-5, 2009.

PETZER, I.M.; KARZIS, J.; WATERMEYER, J.C.; VAN DER SCHANS, T.J.; VAN REENEN, R. Trends in udder health and emerging mastitogenic pathogens in South African dairy herds. **Journal of the South African Veterinary Association**.v.80, p.17–22. , 2009.

PEXARA, A.; SOLOMAKOS, N.; GOVARIS, A. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk and dairy products. **Journal Of The Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 64, n. 1, p. 17-34, 2013.

PIRES, A. M. M.; MATTLAZZO, M. E.; Avaliação da Viabilidade do Uso de Resíduos na Agricultura. **Circular Técnica, EMBRAPA**, Jaguariúna, SP, 2008.

PLAGEMANN, O. A simple culture method for the bacteriological identification of *Bacillus larvae* on Columbia blood-slant agar. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr.** v. 98, p.61–62.1985.

PUNYAPORNWITHAYA, V.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; ALLDREDGE, J. R. Association between an outbreak strain causing *Mycoplasma bovis* mastitis and its symptomatic carriage in the herd: a case study from Idaho, USA. **Prev. Vet. Med.** V. 93, p.66–70. 2010.

PUNYAPORNWITHAYA, V.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; WENZ, J. R.; ALLDREDGE, J. R. Incidence and transmission of *Mycoplasma bovis* mastitis in Holstein dairy cows in a hospital pen: A case study. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 98, n. 1, p. 74-78, 2011.

RABINOVICH, M.. Situación actual sanitaria de la abeja melífera en la República Argentina. Anais do **X Congresso Brasileiro De Apicultura**, CBA Pousada do Rio Quente, GO. p.356 , 1994.

RAGHUKMAR, C., S.; RAGHUKUMAR, G.; SHEELU, S.M.; GUPTA, B.N..Buried in time: culturable fungi in a deep sea sediment core from the Chagos Trench, Indian Ocean.Deep-Sea Res. Part I-Oceanogr. **Res. Pap.** v.51, p.1759-1768, 2004.

RAMÍREZ, N. F.; KEEFE, G.; DOHOO, I.; SÁNCHEZ, J.; ARROYAVE, O.; CERÓN, J. & PALACIO, L. G. Herd-and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 7, p. 4141-4150, 2014.

RIBEIRO, M.; PETRINI, L.; AITA, M.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JUNIOR, W.; GOMES, J.; BARBOSA, R. Relação Entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 9, n. 3, 2003.

RIESENFELD, C.S.; SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* v.38, p.525–552, 2004.

RITCHIE, N.J.; SCHUTTER, M.E.; DICK, R.P.; MYROLD, D.D. Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Appl. Environ.Microbiol.* v. 66, p.1668–1675, 2000.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M., & BESSER, T. E. . Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *Journal of dairy science*, v. 77, n. 11, p. 3354-3364, 1994.

RONDON, M.R.; AUGUST, P.R.; BETTERMANN, A.D.;BRADY, S.F.; GROSSMAN, T.H.; LILES, M.R.; LOIACONO, K.A.; LYNCH, B.A.; MACNEIL, I.A.; MINOR, C., TIONG, C.L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M.S.;CLARDY, J.; HANDELSMAN, J., GOODMAN, R.M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ.Microbiol.* v.66, p.2541–2547, 2000.

ROSA, M.M., Avaliação de diferentes metodologias para extração De DNA de solo sob cultivo de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado) Instituto De Biociências – Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2006.

ROSZAK, D.B. & COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiology Reviews*, v.51, p.365-379, 1987.

ROXO, E.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V. C. A.; HARAKAVA, R.; RUGGIERO, A. P. M. & VIALTA, A.. Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA de *Mycobacterium bovis* a partir de leite. *Arq. Inst. Biol.*, v.69, p.46, 2002

RUANO, G.; KIDD, K.K. Modeling of heteroduplex formation during PCR from mixtures of DNA templates. *PCR Methods Appl*v.2, p. 112–116, 1992.

RYBAS.;TITERA, D.; HAKLOVA,M.; STOPKA, P.A PCR method of detecting American Foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris.*Veterinary Microbiology*, v. 139, p. 193–196. 2009.

SANTORO, K.R.; VIEIRA, M.E.Q.; QUEIROZ M.L.; QUEIROZ, M.C.& BARBOSA, S.B.P. Efeito do tanino de *Stryphnodendron* spp. sobre a longevidade de abelhas *Apis mellifera* L. (Abelhas Africanizadas) *Arch. Zootec.*,v. 53, p. 281-29, 2004.

SANTOS, F. G. B.; MOTA, R. A.; SILVEIRA-FILHO, V. M.; SOUZA, H. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; JOHNER, J. M. Q. & LEALBALBINO, T. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. *Revista Napgama*, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 19-23, 2003.

SANTOS, O.C.S.; BARROS, E. M.; BRITO, M. A. V. P.; BASTOS, M.C.F.; SANTOS K. R.N.; MARVAL, M. G. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the groEL gene; *Veterinary Microbiology*. v.130 p.134–140, 2008.

SAPCANA, Sistema de Acompanhamento da Produção Canavieira, disponível em:<http://mapas.agricultura.gov.br:81/Spc/daa/Resumos/ACOMPANHAMENTO_PRODU_CAO_16_04_2013_13-14.pdf>, acessado em 10/07/2013.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S. & HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **Journal of clinical microbiology**, n.48, v.3, p.765-769, 2010.

SCHORTEMMEYER, M.; HARTWIG, U.A.; HENDREY, G.R.; SADOWSKY, M.J. Microbial community changes in the rhizosphere of white clover and perennial ryegrass exposed to free air carbon dioxide enrichment (FACE). **Soil Biol. Biochem.** v.28, p.1717–1724, 1996.

SCHUCH, D.M.T.; MADDEN, R.H. AND SATTTLER, A. An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp *larvae* spores in honey. **J Apic Res** v.40, p.59–64.2001.

SCHUCH, D.M.T; TOCHETTO, L.G.; SATTTLER, A. Isolamento de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* no Brasil. **Pesq. agropec. bras.**, v.38, n.3, p. 441-444, 2003.

SCHWIEGER, F.; TEBBE, C.C. A new approach to utilize PCR single- strand-conformation polymorphism for 16s rRNA gene based microbial community analysis. **Appl Environ Microbiol**v.64, p.4870–4876, 1998.

SEABPR (Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do estado do Paraná), 2010. Disponível em: http://www.seab.pr.gov.br/modules/qas/uploads/2231/mel_003_24mai2010.pdf acesso em 20/05/2011.

SEBRAE/AL - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas / Alagoas. APL Apicultura do Sertão: Programa de mobilização para o desenvolvimento dos arranjos e territórios produtivos locais do Estado de Alagoas. Maceió: SEBRAE/AL, 2004.

SELVAKUMAR, N, DING, BC, WILSON, SM Separation of DNA strands facilitates detection of point mutations by PCR-SSCP.**Biotechniques**v.22, p. 604–606, 1997.

SEPÚLVEDA-VARAS, P ; HUZZEY, J. M.; WEARY, D. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. Behaviour, illness and management during the periparturient period in dairy cows. **Animal Production Science**, 2013.

SHIMANUKI, H.; KNOX, D.A. Improved method for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey. **American Bee Journal**, v.128, 1988.

SINGH, B. K.; MUNRO, S.; REID, E.; ORD, B.; POTTS, J. M.; PATERSON, E.; MILLARD, P. Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. **European Journal of Soil Science**, Amsterdam, v. 57, n. 1, p. 72-82, Mar. 2006.

- SILVA, W.P.; SILVA, A.J.; MACEDO, M.R.P.; ARAÚJO, M.R.; MATA, M.M.; GANDRA, E.A. Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* by Pcr amplification of *coa* and *nuc* genes. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.34, n.1, p.125-127, 2003.
- SORHEIM, R.; TORSVIK, V.L.; GOKSOYR, J. Phenotypical divergence between populations of soil bacteria isolated on different media. **Microbial Ecology**, v.17, p.181-192, 1989.
- SUZUKI, M. T., & GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and environmental microbiology**, n.62, v.2, p.625-630, 1996.
- SUZUKI, M. T., & GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and environmental microbiology**, n.62, v.2, p.625-630, 1996.
- TABACCHIONI S.; CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; CANTALE, C.; AND DALMASTRI, C. Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. **Microbiology Ecology**.v.40, p.169-176, 2000.
- THIES, J.E. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. **Soil Sci. Soc. Am. J.** v.71, p.579–591, 2007.
- TIEDJE, J.M.; ASUMING-BREMPOG, S.; NUSSLEIN, K.; MARSH, T.L.; FLYNN, S.J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Appl Soil Ecol**.v.13, p. 109–122, 1999.
- TITERA, D.; HAKLOV, M. detection method of Paenibacillus Larvae from beehive winter debris. **Apiacta** v.2, 2003
- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, p.782-787, 1990.
- TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Curr Opin Microbiol**.v.5, n.3, p.240-245, 2002.
- TREVORS, J.T.; VAN ELSAS, J.D. Recovery of bacterial cells from soil, **Nucleic Acids in the Environment**. Springer, Berlin, p. 9–27, 1995.
- VANENGELSDORP, D., R.; UNDERWOOD, D.; CARON, J.; HAYES, J.R. An Estimate of Managed Colony Losses in the Winter of 2006 A Report Commissioned by the Apiary Inspectors of America. **American Bee Journal**, v.147, n.7, p. 599-603, 2007.
- VIANA, K. F.; PIETRALONGA, P. G.; CANGUSSU, A. S. R.; COSTA, J. D. L. & ZANINI, M. S. Sensibilidade a antimicrobianos apresentada por microrganismos isolados de casos de mastite na região sul do Estado do Espírito Santo. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 5, n. 3, 2014.
- VILELA, D. Instrução Normativa 62 e a qualidade do leite no Brasil, 2012. Disponível em:<<http://repileite.ning.com/profiles/blogs/instrucao-normativa-62-e-a-qualidade-do-leite-no-brasil>> acessado em:11/07/2013.

VISSER, S.; PARKINSON, D. Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganisms. **American Journal of Alternative Agriculture**, v. 7, n.1/2, p.33-37, 1992.

WHITE, G.F. The Cause of American Foulbrood. Circular 94. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, **Bureau of Entomology**. 1907.

WIDJOJOATMODJO, M.N.; FLUIT, A.C.; VERHOEF, J. Molecular identification of bacteria by fluorescence-based PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S ribosomal-RNA gene. **J Clin Microbiol** v.33, p. 2601–2606, 1995.

YEATES C., GILINGS M.R., DAVISON A.D., ALTAVILLA N. VEAL DA. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. **Biological Procedures Online** .v.1. p. 40-47. 1998.

YOSHIYAMA, M.; KIMURA, A.K. Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against, the causal agent of American foul brood. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 102, p 91-96, 2009.

ZHANG, Y.; ZHANG, X.; LIU, X.; XIAO, Y.; QU, L.; WU, L.; ZHOU, J. Microarray-based analysis of changes in diversity of microbial genes involved in organic carbon decomposition following land use/cover changes. **FEMS Microbiology Letters**. v.266, p.144-151, 2007.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, J.G.; XAVIR, G.R.; COUTINHO, H.L.C.; NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n. 3, p. 391-411. 2003

7. ANEXOS

ANEXO 1

Cepas	MYT			MYPGP			MYPGP MODIFICADO			BHI + tiamina			CBL			CBL MODIFICADO.		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	10 ²	10 ²	10 ²	10 ³	10 ³	10 ³	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ²	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸					
2	10 ²	10 ²	10 ²	10 ³	10 ³	10 ³	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ³	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹					
3	10 ¹	0	10 ¹	10 ²	10 ²	10 ²	10 ¹	10 ¹	10 ¹	0	0	0	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
4	0	10 ¹	10 ¹	10 ³	10 ³	10 ³	10 ²	10 ²	10 ²	0	0	0	0	0	0	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
5	0	0	0	10 ³	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	0	10 ¹	0	10 ²	10 ²	10 ²	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
6	0	0	0	0	0	0	10 ³	10 ³	10 ³	10 ²	10 ²	10 ²	10 ³	10 ³	10 ³	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶
7	10 ²	0	0	0	10 ²	10 ²	10 ²	0	0	0	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶					
8	10 ²	10 ²	10 ²	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ³	10 ³	10 ³	10 ¹	10 ¹	10 ¹	0	0	0	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
9	10 ²	10 ²	10 ²	0	0	0	10 ²	10 ²	10 ²	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹						

Tabela 1. Quantidade de unidades formadoras de colônias por mililitro de cultivo de cepas de *Paenibacillus larvae* em diferentes meios de cultura

10	10^1	10^1	10^1	0	0	0	10^2	10^2	10^2	0	0	0	10^2	10^2	10^2	10^4	10^4	10^4
11	0	0	0	10^1	10^1	10^1	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3	0	0	0	10^5	10^5	10^5
12	10^1	10^1	10^1	10^2	10^2	10^2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10^6	10^6	10^6

ANEXO 2

Tabela 2 Análise de sequências das bandas excisadas do gel de DGGE das amostras de Planossolo Háplico tratadas com associações de resíduos da indústria energética.

Identificação da Banda excisada	<i>Closest relative</i>	<i>Identity</i>	<i>Accession no.</i>
S1	<i>Uncultured bacterium isolate</i>	94%	EF366387.1
S2	<i>Uncultured bacterium clone</i>	92%	JF194885.1
S3	<i>Virgibacillus sp.</i>	87%	KJ584890.1
S4	<i>Uncultured bacterium clone</i>	92%	KF096722.1
S5	<i>Uncultured microorganism clone</i>	90%	JN915056.1
S6	<i>Uncultured bacterium clone</i>	88%	KF110654.1
S7	<i>Uncultured bacterium clone</i>	85%	JF163311.1
S8	<i>Uncultured bacterium clone</i>	91%	JF162119.1
S9	<i>Uncultured bacterium clone</i>	97%	JF162243.1
S10	<i>Uncultured bacterium clone</i>	91%	JF114851.1
S11	<i>Uncultured microorganism clone</i>	91%	JN915084.1
S12	<i>Uncultured bacterium clone</i>	97%	JF143760.1
S13	<i>Uncultured bacterium clone</i>	94%	JF427841.1
S14	<i>Uncultured bacterium clone</i>	98%	JF122902.1
S15	<i>Uncultured bacterium clone</i>	94%	JF109824.1
S16	<i>Uncultured bacterium clone</i>	94%	JF192610.1
S17	<i>Uncultured bacterium clone</i>	99%	KF092445.1
S18	<i>Uncultured bacterium clone</i>	86%	JF165298.1
S19	<i>Bacillus sp.</i>	89%	JX274439.3