

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Caracterização Fenotípica e Genotípica de Bactérias do Ácido Acético Isoladas de Alimentos

2º Ciclo em Biotecnologia e Qualidade Alimentar

Cândida Filipa Gonçalves Martins

Orientadores: Professor Doutor António Inês

Professora Doutora Alexandra Ferreira



Vila Real, 2012

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Caracterização Fenotípica e Genotípica de Bactérias do Ácido Acético Isoladas de Alimentos

2º Ciclo em Biotecnologia e Qualidade Alimentar

Cândida Filipa Gonçalves Martins

Orientadores: Professor Doutor António Inês

Professora Doutora Alexandra Ferreira



Vila Real, 2012

Instituição	Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
Curso	Mestrado em Biotecnologia e Qualidade Alimentar
Título	Caracterização Fenotípica e Genotípica de Bactérias do Ácido Acético Isoladas de Alimentos
Autor	Cândida Filipa Gonçalves Martins
Orientadores	Prof. Doutor António Inês Prof. Doutora Alexandra Ferreira

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Professor Doutor António Inês e Professora Doutora Alexandra Ferreira, pela compreensão e apoio durante este trabalho, pela preciosa transmissão de conhecimentos e ideias, pela incansável colaboração, pelo tempo disponibilizado para a coordenação deste trabalho, pelo estímulo na vontade de aprender e progredir, pela compreensão e paciência que demonstraram comigo.

À Professora Doutora Arlete Faia coordenadora da Unidade de Microbiologia e Biotecnologia dos vinhos/IBB-CGB pelo apoio e disponibilidade.

À Professora Doutora Maria José Saavedra pela disponibilidade e apoio especial neste trabalho.

À coordenadora do Mestrado, Professora Doutora Ana Barros, pela amizade, total disponibilidade, compreensão e apoio que sempre demonstrou durante a realização deste trabalho.

A todos os que trabalham no Sector de Enologia, principalmente à Catarina e à Patrícia, pela colaboração neste projecto, pela amizade e simpatia, pela inextinguível amabilidade, pelos conselhos preciosos, apoio e disponibilidade dispensados.

A todos os Professores que me acompanharam ao longo deste mestrado, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus amigos e colegas de curso e mestrado e principalmente a Filipa, a Ema e a Beatriz, pelo apoio incondicional, pelo sentido de ajuda e companheirismo que contribuíram para a manutenção moral elevada na realização desta dissertação.

À minha amiga Filipa um agradecimento especial, pela companhia desde o início, pela ajuda, pelo apoio, pela compreensão e principalmente por me aturar.

A todos os meus amigos, principalmente à Sofia, Filipa, Diana, André, Joana, Pedro e o Tiago pelo apoio incondicional prestado.

Aos meus pais, Preciosa e Mário que acreditaram sempre em mim, sendo o meu suporte e inspiração em cada passo desta caminhada, tendo tornado possível a concretização deste sonho. O seu apoio e amor incondicional foram sem dúvida essenciais.

Aos meus irmãos, Nelson, Toni, Paula e Susana, pelo apoio e amor incondicional, por tudo o que fizeram por mim, por terem contribuído para a pessoa que sou hoje, por simplesmente fazerem parte da minha vida.

Aos meus cunhados, Soraia, Inês e João pela sua presença na minha vida e também pelo apoio incondicional.

Aos meus sobrinhos e afilhada, Davide, Mário, Cristiana, Gabriela, Maria, Melissa e Paulinho por iluminarem e fazerem parte da minha vida, por simplesmente me arrancarem um sorriso nos momentos mais difíceis.

A todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos o meu **MUITO OBRIGADA**

Este trabalho foi expressamente elaborado como dissertação
original para o efeito de obtenção do grau de mestre em
Biotecnologia e Qualidade Alimentar

Índice Geral

	Página
Índice de Figuras	viii
Índice de Quadros	ix
Resumo	x
Abstract	xi
1. Introdução	1
1.1 Caracterização geral das bactérias do ácido acético	1
1.2 Classificação das bactérias do ácido acético	3
1.3 Isolamento	5
1.4 Identificação	7
1.4.1 Métodos fenotípicos	7
1.4.2 Métodos quimiotaxonômicos	10
1.4.3 Métodos moleculares	10
1.5 Bactérias do ácido acético como agentes de transformação	13
1.6 Bactérias do ácido acético como agentes de contaminação	18
1.7 Fatores que afetam o crescimento e a sobrevivência das bactérias acéticas nos vinhos	22
1.7.1 Temperatura	23
1.7.2 Etanol	23
1.7.3 pH	24
1.7.4 SO ₂	24
1.7.5 Ácido acético	25
1.7.6 Oxigênio	25
1.7.7 Outros microrganismos	26
1.8 Resistência aos antibióticos	27
1.8.1 Mecanismos de resistência	28
1.8.2 Antibióticos	29
1.8.2.1 Antibióticos antiparietais	29
1.8.2.1.1 Fosfomicina	30
1.8.2.1.2 β-lactâmicos	30
1.8.2.2 Antibióticos inibidores de síntese proteica	31
1.8.2.2.1 Aminoglicosídeos	31

1.8.2.2.2 Tetraciclina	32
1.8.2.2.3 Cloranfenicol	32
1.8.2.2.4 Macrólidos	33
1.8.2.3 Antibióticos inibidores da síntese dos ácidos nucleicos	33
1.8.2.3.1 Quinolonas	33
1.8.2.4 Antibióticos antimetabolitos	34
1.8.2.4.1 Sulfonamidas/Trimetopim	34
2. Objetivos	35
3. Material e Métodos	36
3.1 Estirpes bacterianas	36
3.2 Armazenamento das estirpes	37
3.3 Caracterização fenotípica dos isolados	37
3.3.1 Resistência ao SO ₂	38
3.3.2 Resistência ao ácido acético	38
3.3.3 Tolerância ao etanol	38
3.3.4 Resistência ao pH	38
3.4 Produção de aminas biogénicas	38
3.5 Perfil de suscetibilidade aos antibióticos	39
3.6 Extração de DNA	39
3.7 Caracterização genotípica e identificação das estirpes	40
3.7.1 Sequenciação parcial de rDNA 16S	41
4. Resultados e Discussão	42
4.1 Caracterização fenotípica	42
4.1.1 Temperatura	42
4.1.2 Etanol	42
4.1.3 Ácido acético	43
4.1.4 SO ₂	45
4.1.5 pH	46
4.2 Análise global da caracterização fenotípica	47
4.3 Caracterização genotípica	49
4.3.1 Identificação	49
4.3.2 Tipificação	53
4.4 Aminas biogénicas	56

4.5 Perfil de suscetibilidade dos antibióticos	57
5. Considerações Finais	60
6. Referências Bibliográficas	62
ANEXO I	74
ANEXO II	83
ANEXO III	84

Índice de Figuras

	Página
Figura 1 - (a) <i>Acetobacter aceti</i> observada num microscópio de contraste com uma ampliação de 1000x. (b) <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> num microscópio de contraste	1
Figura 2 - Oxidação do etanol pelas bactérias acéticas	2
Figura 3 - Diferentes tipos de fermentadores utilizados na produção de vinagre (método de Orleans, método de submersão e método alemão)	14
Figura 4 - Película de celulose uniforme e irregular formada por <i>Gluconobacter persimmonis</i>	17
Figura 5 - Representação dos locais de atuação dos diferentes grupos de antibióticos	27
Figura 6 - Efeito do etanol no crescimento a diferentes temperaturas	43
Figura 7 - Efeito do ácido acético no crescimento a diferentes temperaturas	44
Figura 8 - Efeito do SO ₂ no crescimento a diferentes temperaturas	45
Figura 9 - Efeito do pH no crescimento a diferentes temperaturas	46
Figura 10 – Dendrograma referente aos testes fenotípicos de resistência/tolerância efetuados aos 70 isolados de bactérias acéticas e às 7 estirpes da coleção CECT	48
Figura 11 - Dendrograma construído a partir da matriz de semelhança média resultante da análise <i>in silico</i> dos perfis de M13, ERIC, GTG ₅ -PCR <i>fingerprinting</i> dos 70 isolados em estudo e das 7 estirpes de referência da CECT	50
Figura 12 - Dendrograma construído a partir da matriz de semelhança média resultante da análise <i>in silico</i> dos perfis de M13, ERIC, GTG ₅ -PCR <i>fingerprinting</i> das estirpes identificadas como <i>Acetobacter pasteurianus</i> e da estirpe de referência	54
Figura 13 - Perfil genotípico e fenotípico das estirpes identificadas como <i>Acetobacter pasteurianus</i>	55
Figura 14 - Produção de aminas biogénicas (histamina, tiramina e putrescina) a diferentes temperaturas	56
Figura 15 - Exemplo de resultado positivo da produção de putrescina	56
Figura 16 - Perfil de suscetibilidade de 21 isolados de bactérias acéticas	57

Índice de Quadros

	Página
Quadro 1 - Géneros da família <i>Acetobacteraceae</i> de acordo com o índice taxonómico dos procariotas	4
Quadro 2 - Espécies dos géneros <i>Acetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> e <i>Gluconacetobacter</i>	4
Quadro 3 - Meios mais utilizados no isolamento de bactérias do ácido acético a partir de uvas, mostos e vinhos	6
Quadro 4 - Testes bioquímicos para a distinção das bactérias acéticas das bactérias lácticas associadas ao vinho	7
Quadro 5 - Testes bioquímicos para distinção dos géneros de bactérias acéticas associadas ao vinho	8
Quadro 6 - Lista das estirpes em estudo	36
Quadro 7 - Resultados da aplicação do algoritmo BLASTN para comparação das sequências parciais de rDNA 16S das estirpes seleccionadas com as disponíveis nas bases de dados públicas	52
Quadro I.1 - Resultados dos testes de resistência/tolerância das estirpes a 30°C	74
Quadro I.2 - Resultados dos testes de resistência/tolerância das estirpes a 37°C	77
Quadro I.3 - Resultados dos testes de resistência/tolerância das estirpes a 20°C	80
Quadro II.1 - Halos de inibição (mm) e categorias de avaliação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos de algumas estirpes de bactérias acéticas	83
Quadro III.1 - Dados estatísticos dos resultados das tolerâncias/resistências e das aminas biogénicas	84
Quadro III.2 - Dados estatísticos da análise global da caracterização fenotípica	85

Resumo

As bactérias do ácido acético (BAA) são responsáveis pela produção de vários subprodutos muito utilizados na indústria alimentar. Podem atuar como agentes de transformação no caso do vinagre e como agentes de contaminação no caso do vinho.

Neste trabalho, a resistência das bactérias acéticas a vários fatores de *stress* que ocorrem durante a produção industrial de vinagre, foi avaliada. Para tal, foram utilizadas 70 isolados provenientes de uvas sãs e podres, mostos, vinhos, sãos e alterados, e vinagres caseiros. A capacidade de resistência a diferentes condições de etanol, ácido acético, SO₂ e pH e o efeito cruzado da temperatura foi avaliada por crescimento em meio de cultura sólidos. Foi observada uma grande variabilidade na resistência às diferentes condições testadas, sendo que a temperatura de incubação foi diretamente correlacionada com o aumento da sua sensibilidade.

Foi observado que apenas um número reduzido destas bactérias demonstram capacidade para produzir aminas biogénicas nomeadamente a histamina (3%), e a putrescina (5%). Por outro lado, as bactérias acéticas estudadas revelaram um perfil de multiresistência a vários antibióticos o que sugere que estudos posteriores deverão ser conduzidos de forma a avaliar o seu impacto em termos de segurança alimentar.

Com o objetivo de proceder à identificação dos isolados foram incluídas neste trabalho sete estirpes de referência, pertencentes à Coleção Espanhola de Culturas Tipo (CECT). A utilização da técnica de PCR *fingerprinting* com os *primers* M13, ERIC e (GTG)₅ não permitiu obter a identificação credível dos isolados em estudo. Pela análise das sequências parciais do rDNA 16S foi possível a identificação de 17 estirpes selecionadas aleatoriamente o que permitiu inferir a identificação de outros isolados. Assim, um grupo de estirpes identificados como *Acetobacter pasteurianus* foi caracterizado genotipicamente, tendo-se verificado uma grande variabilidade, também traduzida nos parâmetros fenotípicos avaliados.

Palavras-Chave: Bactérias do ácido acético, tolerâncias/resistências, antibióticos, DNA *Fingerprinting*, 16 rDNA.

Abstract

Acetic acid bacteria (AAB) are responsible for the production of some interesting products, very useful for a variety of industries including food industry. They can have a positive role as transformation agents in vinegar production, but their growth is undesirable in the the wine industry being responsible for wine spoilage.

In this work, the resistance of the acetic bacteria to some stress factors that they may encounter during production of vinegar, was evaluated. For such purpose, 70 acetic bacteria strains isolated from healthy and rotten grapes, grape-juices, wines, either spoiled or not, and vinegars, were used. The resistance of the isolates to different conditions of ethanol, acetic acid, SO₂ and pH and the cross-effect of temperature was evaluated by its growth in solid culture media. A great variability in the resistance to the different tested conditions was observed, being temperature of incubation directly correlated with the increase of its sensitivity.

Only a reduced number of these bacteria demonstrated capacity to produce biogenic amines, like histamine (3%) and putrescine (5%). On the other hand, acetic bacteria displayed an antibiotic multiresistance profile suggesting that further studies should be performed to assess its impact on food safety and public health.

In order to identify the natural isolates used, seven reference strains belonging to the Spanish Type Culture Colection (CECT) were included in this work. PCR fingerprinting technique using M13, ERIC e (GTG)₅ primers did not allow a reliable identification of the strains. Yet, 17 randomly selected strains were identified by analysis of the partial sequences of 16S rDNA which allowed us to infer the identification of some other isolates through the analysis of similarity of genotypic profiles obtained. The genotypic dissimilarity observed within the group of strains identified as *Acetobacter pasteurianus* was correlated with its divergence phenotypic profiles.

Keywords: Acid acetic bacteria, tolerances / resistances, Antibiotics, DNA fingerprinting, 16 rDNA.

1. Introdução

1.1 Caracterização geral das bactérias do ácido acético

As bactérias do ácido acético pertencem à família *Acetobacteraceae* e são bactérias Gram negativas ou Gram variável, de forma elipsoidal a alongada (bastonetes), apresentando assim pleomorfismo celular. Podem ocorrer individualmente, em pares ou em cadeias. A sua largura varia entre 0,4 e 1 µm e o seu comprimento entre 0,8 e 4,5 µm (figura 1). São catalase positiva e oxidase negativa (De Ley *et al.*, 1984a).

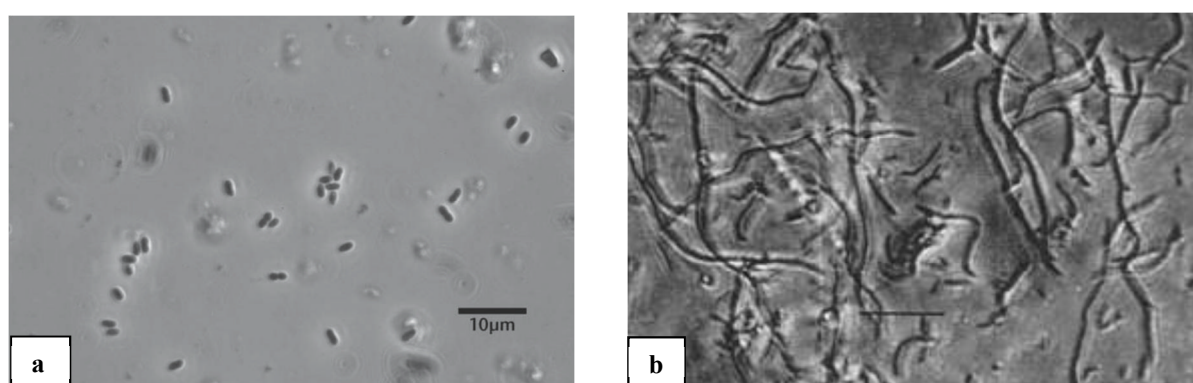


Figura 1 - (a) *Acetobacter aceti* observada num microscópio de contraste com uma ampliação de 1000x (adaptado de Fugelsang, 1997). **(b)** *Gluconacetobacter diazotrophicus* num microscópio de contraste (adaptado de Muthukumarasamy *et al.*, 2002)

As bactérias acéticas apresentam mobilidade devido à presença de flagelos polares ou peritríquios e não formam endósporos como forma de resistência. Este grupo de bactérias apresenta um metabolismo aeróbio obrigatório com o oxigénio como o aceitador final de electrões, ou seja, as bactérias acéticas realizam uma respiração aeróbia, apesar de muitas vezes a sua atividade ser designada incorretamente de fermentação acética.

O pH ótimo de crescimento das bactérias acéticas situa-se entre 5,0 e 6,0 (De Ley *et al.*, 1984a) contudo podem crescer a valores de pH mais reduzidos, nomeadamente entre 3,0 e 4,0 (Du Toit e Pretorius, 2002). Estas bactérias são mesófilas, a sua temperatura ótima de crescimento situa-se entre 25° e 30°C (De Ley *et al.*, 1984a).

As bactérias acéticas podem surgir em ambientes açucarados, alcoolizados e um pouco ácidos, tais como flores, frutos, cerveja, vinho, cidra, vinagre, sumos de fruta

ácidos e mel. Nestes meios, oxidam açúcares e álcoois resultando na acumulação de ácidos orgânicos como produtos finais. Quando o substrato é o etanol, é produzido o ácido acético e é daqui que o nome do grupo bacteriano provém (Benito, 2005). As estirpes de *Gluconobacter* preferem ambientes ricos em açúcar ao contrário da maioria das estirpes de *Acetobacter* e *Gluconacetobacter*, que preferem crescer em meios ricos em álcool. Contudo, estas bactérias também oxidam glucose a ácido glucónico, galactose a ácido galactónico e arabinose a ácido arabinóico. As bactérias acéticas desempenham um papel importante na produção de alimentos e bebidas alcoólicas, bem como na bioprodução de produtos químicos industriais (Raspor e Goranovič, 2008). Uma das principais características das bactérias acéticas é a sua capacidade em oxidar uma vasta variedade de substratos e de acumular no meio produtos resultantes do seu metabolismo sem toxicidade para as próprias bactérias. Esta capacidade é devida à atividade de desidrogenases localizadas na membrana da célula, associadas com a cadeia de citocromos (Matsushita *et al.*, 1985).

O metabolismo do etanol pelas bactérias acéticas envolve a oxidação do etanol a ácido acético em duas etapas, na primeira etapa o etanol é oxidado a acetaldeído e na segunda etapa o acetaldeído é oxidado a acetato (figura 2). Em ambas as reações, ocorre a transferência de electrões, e que são mais tarde aceites pelo oxigénio. Neste processo de oxidação existem duas enzimas que desempenham um papel fundamental e crítico, que são a álcool desidrogenase e a aldeído desidrogenase (Saeki *et al.*, 1997).

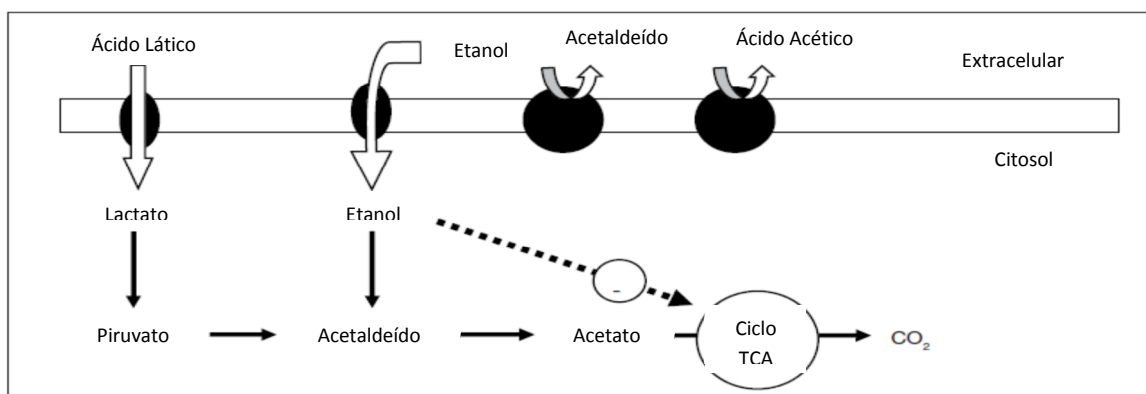


Figura 2 - Oxidação do etanol pelas bactérias acéticas (adaptado de Mas *et al.*, 2007)

Estas bactérias podem produzir pigmentos em meios sólidos e uma grande variedade de polissacarídeos (De Ley *et al.*, 1984b), celulose e vitaminas, em particular a vitamina C, produzida essencialmente pelo género *Gluconobacter* (Macauley *et al.*, 2001). De salientar ainda que de acordo com Ryssel *et al.*, (2009) que as bactérias

acéticas também apresentam boas propriedades bactericidas sobre bactérias infecciosas Gram negativas.

1.2 Classificação das bactérias do ácido acético

Apesar da atividade destas bactérias já ser mencionada desde os tempos antigos por todo o mundo, a sua descoberta como seres vivos e a sua classificação só foi feita muito mais tarde. Quando Lavoisier escreveu o seu livro "Tratado de Química Elemental" no âmbito do estudo do método de produção de vinagre de "Orleans", disse que o vinagre não era nada mais que o vinho acetificado devido à absorção do oxigénio, sendo apenas o resultado de uma reação química, a partir do etanol presente no vinho. Naquela altura, pensava-se que a camada fina que se formava na superfície do vinho em processo de acetificação era apenas um produto da transformação, mas não a causa. Só mais tarde, Pasteur demonstrou que sem a presença e participação das bactérias acéticas não havia produção de vinagre, concluindo assim que quando o vinho se transformava em vinagre era devido à participação das bactérias acéticas que se desenvolviam na superfície formando uma película.

Inicialmente, as bactérias acéticas foram designadas por *Micoderma vini*. Mais tarde com base no seu aspecto morfológico, foram classificadas em três espécies: *Bacterium aceti*, *Bacterium pasteurianum* e *Bacterium kurtzingianus* (Rizzon, 2006a). Uma das classificações sugeridas por Hansen em 1894, era baseada na ocorrência da película em meio líquido e a sua reação com iodeto. Em 1925, Vissert Hooft propôs uma classificação baseada nas características bioquímicas e fisiológicas deste grupo de bactérias. Mais tarde Asai (1934-35) fez uma proposta de classificar as bactérias acéticas em dois géneros, *Acetobacter* e *Gluconobacter*, baseada nas características citológicas e fisiológicas. Frateur em 1950 formulou uma classificação baseada principalmente em cinco características fisiológicas, presença de catalase, produção de ácido glucónico a partir da glucose, oxidação do ácido acético em dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O), oxidação do glicerol em hidroxiacetona e a oxidação do lactato em dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O). Leifson (1954) agrupou as bactérias acéticas que tinham flagelos e que eram capazes de oxidar o etanol a ácido acético e o ácido acético a CO_2 e H_2O no género *Acetobacter* e aquelas que tinham flagelos polares e eram incapazes de fazer a oxidação completa do etanol no género *Gluconobacter* (Benito, 2005). Mais tarde em 1997, Yamada e seus colaboradores introduziram um

novo género *Gluconacetobacter*, baseado nas sequências parciais de 16S rRNA e nas comparações quimiotaxonômicas dos sistemas de ubiquinonas. Filogeneticamente as bactérias acéticas estão agrupadas na família *Acetobacteraceae*, que pertence à classe *Alphaproteobacteria*. Atualmente esta família é constituída por 30 géneros (quadro 1).

Quadro 1 – Géneros da família *Acetobacteraceae* de acordo com o índice taxonômico dos procariotas (adaptado de Garrity, *et al.*, 2007)

Géneros			
<i>Acetobacter</i>	<i>Asaia</i>	<i>Neoasia</i>	<i>Saccharibacter</i>
<i>Acidiphilium</i>	<i>Belnapia</i>	<i>Paracraurococcus</i>	<i>Stella</i>
<i>Acidisphaera</i>	<i>Craurococcus</i>	<i>Neokomagataea</i> ^{*4}	<i>Swaminathania</i>
<i>Acidicaldus</i>	<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Rhodopila</i>	<i>Tanticharoenia</i> ^{*5}
<i>Acidocella</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>Rhodovarius</i>	<i>Teichococcus</i>
<i>Acidisoma</i> ^{*1}	<i>Granulibacter</i> ^{*3}	<i>Roseococcus</i>	<i>Zavarzinia</i>
<i>Acidomonas</i>	<i>Kozakia</i>	<i>Roseomonas</i>	
<i>Ameyamaea</i> ^{*2}	<i>Muricoccus</i>	<i>Rubritepida</i>	

*1 Belova *et al.*, 2009 *2 Yukphan *et al.*, 2010a *3 Greenberg *et al.*, 2006 *4 Yukphan *et al.*, 2011 *5 Yukphan *et al.*, 2008

As espécies dos géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter* (quadro 2) estão frequentemente associados à degradação das uvas, mostos, vinhos e produção de vinagres. Mais recentemente, Mas *et al.*, (2007) referem também a presença das espécies dos géneros *Acidomonas*, *Asaia*, *Kozakia*, *Saccharibacter*, *Swaminathania*, *Neoasia* e *Granulibacter*, nos referidos alimentos.

Quadro 2 – Espécies dos géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter*

Género	Espécie	Ref. Bibliográfica
<i>Acetobacter</i>	<i>aceti</i>	Lisdiyanti <i>et al.</i> , 2000
	<i>cerevisiae</i>	Cleenwerck <i>et al.</i> , 2002
	<i>cibinongensis</i>	Lisdiyanti <i>et al.</i> , 2001
	<i>estuniensis</i>	Lisdiyanti <i>et al.</i> , 2000
	<i>indonesiensis</i>	Lisdiyanti <i>et al.</i> , 2000
	<i>lovaniensis</i>	Lisdiyanti <i>et al.</i> , 2000
	<i>malorum</i>	Cleenwerck <i>et al.</i> , 2002
	<i>nitrogenifingens</i>	Dutta e Gachhui, 2006
	<i>oeni</i>	Silva <i>et al.</i> , 2006
	<i>orientalis</i>	Lisdiyanti <i>et al.</i> , 2001
	<i>orleanensis</i>	Lisdiyanti <i>et al.</i> , 2000
	<i>pasteurianus</i>	Lisdiyanti <i>et al.</i> , 2000
	<i>peroxydans</i>	Lisdiyanti <i>et al.</i> , 2000
	<i>pomorum</i>	Sokollek <i>et al.</i> , 1998
	<i>syzigii</i>	Lisdiyanti <i>et al.</i> , 2001
	<i>tropicalis</i>	Lisdiyanti <i>et al.</i> , 2000

Quadro 2 – Espécies dos géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter* (continuação)

Género	Espécie	Ref. Bibliográfica
<i>Gluconobacter</i>	<i>asai</i>	Mason e Claus, 1989
	<i>albidus</i>	Yukphan <i>et al.</i> , 2004
	<i>cerinus</i>	Katsura <i>et al.</i> , 2002
	<i>frateurii</i>	Mason e Claus, 1989
	<i>thailandicus</i>	Tanasupawat <i>et al.</i> , 2004
	<i>oxydans</i>	Mason e Claus, 1989
	<i>japonicus</i>	Malimas <i>et al.</i> , 2009a
	<i>kanchanaburiensis</i>	Malimas <i>et al.</i> , 2009b
	<i>kondonii</i>	Malimas <i>et al.</i> , 2008
	<i>nephelii</i>	Kommanee <i>et al.</i> , 2011
	<i>roseus</i>	Malimas <i>et al.</i> , 2008b
	<i>sphaericus</i>	Malimas <i>et al.</i> , 2008a
	<i>wancherniae</i>	Yukphan <i>et al.</i> , 2010b
	<i>uchimurae</i>	Tanasupawat <i>et al.</i> , 2011
	<i>persimmonis</i>	Soo-Hwan <i>et al.</i> , 2004
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>liquefaciens</i>	Yamada <i>et al.</i> , 1997
	<i>azotocaptans</i>	Fuentes-Ramírez <i>et al.</i> , 2001
	<i>diazotrophicus</i>	Yamada <i>et al.</i> , 1998
	<i>entanii</i>	Schüller <i>et al.</i> , 2000
	<i>europaeus</i>	Yamada <i>et al.</i> , 1997
	<i>hansenii</i>	Yamada <i>et al.</i> , 1998
	<i>intermedius</i>	Yamada, 2000
	<i>johannae</i>	Fuentes-Ramírez <i>et al.</i> , 2001
	<i>oboediens</i>	Yamada, 2000
	<i>nataicola</i>	Lisdiyanti <i>et al.</i> , 2006
	<i>rhaeticus</i>	Dellagio <i>et al.</i> , 2005
	<i>sacchari</i>	Franke <i>et al.</i> , 1999
	<i>saccharivorans</i>	Lisdiyanti <i>et al.</i> , 2006
	<i>swingsii</i>	Dellagio <i>et al.</i> , 2005
	<i>xilynus</i>	Yamada <i>et al.</i> , 1997
	<i>kombuchae</i>	Dutta e Gachhui, 2007

1.3 Isolamento

Normalmente, o isolamento de bactérias acéticas é feito a partir da inoculação de alíquotas de substratos em meios sólidos ou líquidos enriquecidos e seletivos para este grupo particular de bactérias. A composição destes meios é feita tendo em consideração as necessidades fisiológicas e metabolismo das bactérias acéticas, ou seja, tem que se fazer uma reprodução laboratorial do meio natural onde se desenvolvem. Também muitas vezes são adicionados antibióticos para inibir o crescimento de leveduras e de bactérias do ácido láctico. Podem ser utilizados a piramicina (Joyeux *et al.*, 1984b e González, *et al.*, 2004) e a ciclohexamida (Passmore e Carr, 1974; Drysdale e Fleet, 1988; Yamada *et al.*, 1999; Bartowsky *et al.*, 2003 e Amoa-Awua *et al.*, 2006) para

evitar o crescimento dos bolores e das leveduras, respetivamente e a penicilina (Amoa-Awua *et al.*, 2006) e a nisina (Du Toit e Lambrechts, 2002) para evitar o crescimento das bactérias do ácido láctico. Os meios mais utilizados no isolamento de bactérias acéticas a partir de uvas, mostos e vinhos são apresentados no quadro 3.

Quadro 3 – Meios mais utilizados no isolamento de bactérias do ácido acético a partir de uvas, mostos e vinhos

Meios de cultura	Composição (g/L)	Ref. Bibliográficas*
GYC (“glucose, yeast extract, calcium carbonate”)	Glucose (50) Extrato de levedura (10) Carbonato de cálcio (5) Agar (20)	[1, 4, 5, 7, 8,10]
YPM (“yeast extract, peptone, manitol”)	Extrato de levedura (5) Peptona (3) Manitol (25) Agar (20)	[1; 6; 7; 8; 10 e 12]
YGM (“yeast extract, glucose, manitol”)	Extrato de levedura (10) Glucose (20) Manitol (20) Etanol (25) Ácido acético (5 ml) depois da esterilização	[11]
BME (“Basal medium with etanol”)	Extrato de levedura (0,5) Hidrolizado de caseína sem vitaminas (3) Etanol (3 ml)	[2, 3]
AAM (“acid acetic médium”)	Glucose (10) Etanol (5) Ácido acético (3) Peptona (15) Extrato de levedura (8)	[3, 9]
MYA (“malt extract, yeast extract, agar”)	Extrato de malte (15) Extrato de levedura (5) Agar (15) Etanol (60 ml)	[8]
AE (“glacial acid acetic, ethanol”)	Glucose (5) Extrato de levedura (3) Peptona (4) Etanol absoluto (3ml) Ácido acético glacial (3ml) Agar (0.9)	[7, 8]
Carr	Glucose (5) Extrato de Levedura (20) Verde de Bromocresol (0,02) Agar (20)	[13]

* 1- Amoia-Awua *et al.*, 2006; 2- Cleenwerck *et al.*, 2007; 3- Cleenwerck *et al.*, 2008; 4- Drysdale e Fleet 1985/1989a; 5- Dutta e Gachhui, 2006; 6- González *et al.*, 2006; 7- Gullo *et al.*, 2006; 8- Gullo e Giudici, 2008; 9- Lisdiyanti *et al.*, 2001; 10- Mas *et al.*, 2007; 11- Ndoye *et al.*, 2007; 12- Sokollek *et al.*, 1998 13- Fugelsang, 1997.

1.4 Identificação

A identificação das bactérias acéticas inicia-se com a distinção entre este grupo de bactérias e outras bactérias (quadro 4), particularmente as Bactérias do Ácido Lático (BAL) também capazes de crescer em matrizes semelhantes às das bactérias acéticas, passando pela diferenciação de géneros até à diferenciação de espécies. A identificação é assim feita recorrendo a uma série de testes mais simples ou mais complexos, podendo estes ser divididos genericamente em métodos fenotípicos, métodos quimiotaxonómicos e métodos moleculares.

Quadro 4 – Testes bioquímicos para a distinção das bactérias acéticas das bactérias lácticas associadas ao vinho (adaptado de Bartowsky e Henschke, 2008)

	BAA	BAL
Coloração de Gram	Negativo	Positivo
Reação da catalase	Positivo	Negativo
Mobilidade	Móveis ou não móveis	Não móveis
Necessidade de oxigénio	Aeróbias estritas	Aeróbias ou anaeróbias
Produção de ácido acético a partir de etanol	Sim	Não
Metabolismo do açúcar	Via hexose monofosfato	Homo ou heterofermentativas
Conteúdo de G + C (% mol)	>50	<50

1.4.1 Métodos fenotípicos

Hoje em dia a caracterização e a identificação das bactérias acéticas a nível de género usando testes fenotípicos são relativamente fáceis. A taxonomia microbiana clássica usa tradicionalmente as diferenças morfológicas e fisiológicas entre os géneros para os discriminar. Assim, muitas características podem contribuir para a diferenciação (quadro 5). Uma das principais diferenças entre géneros é que as espécies do género *Gluconobacter* não conseguem oxidar completamente o ácido acético a CO₂ e H₂O e as espécies dos géneros *Gluconacetobacter* e *Acetobacter* podem ser diferenciados com base no tipo de ubiquinonas. Além dos testes descritos no quadro 5, também podem ser realizados outros, como verificar a produção de celulose pelas bactérias acéticas, fervendo as películas numa solução de NaOH (5%) durante 2 horas, sendo confirmada a produção de celulose quando não ocorre a dissolução da película após a fervura. Também se pode verificar o crescimento das bactérias acéticas na presença de HNO₃ (1%) (Cleenwerck e De Vos, 2008).

Quadro 5 – Testes bioquímicos para distinguir os géneros de bactérias acéticas associadas ao vinho (adaptado de Bartowsky e Henschke, 2008; Cleenwerck e De Vos, 2008)

	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>
Mobilidade e flagelos	Peritríquios ou não móveis	Peritríquios ou não móveis	Polares ou não móveis
Oxidação de etanol a ácido acético	Positivo	Positivo	Positivo
Oxidação de ácido acético a CO ₂ e H ₂ O	Positivo	Positivo	Negativo
Oxidação de lactato a CO ₂ e H ₂ O	Positivo	Positivo ou Negativo	Negativo
Crescimento em meio com 0,35% de ácido acético	Positivo	Positivo	Positivo
Crescimento na presença de 30% de glucose	Negativo	Positivo ou Negativo	Negativo ou Positivo fraco
Cetogénese a partir do glicerol	Positivo ou Negativo	Positivo ou Negativo	Positivo
Produção de álcool a partir de:			
glicerol	Positivo ou Negativo	Positivo	Positivo
D-manitol	Positivo ou Negativo	Positivo ou Negativo	Positivo
rafinose	Negativo	Negativo	Negativo
Produção de pigmentos castanhos solúveis	Negativo	Variável	Variável
Tipo de ubiquinonas	Q-9	Q-10	Q-10

Os testes de oxidação de etanol a ácido acético e da oxidação de ácido acético a CO₂ e H₂O apresentados no quadro 5 podem ser realizados através da utilização de alguns meios de cultura, nomeadamente o Carr, o GYC e o Frateur agar. Estes meios são utilizados para fazer a diferenciação de géneros uma vez que o metabolismo das bactérias, se reflete em mudanças de cor, em formação de halos em volta das colónias, formação de pigmentos e outras alterações, inerentes aos diferentes géneros. É de salientar que estes meios além de serem específicos para a distinção de géneros também podem ser utilizados para o crescimento e isolamento das bactérias acéticas embora os mais indicados já tenham sido referidos. O objetivo da utilização do meio Carr é fazer a distinção dos géneros com base numa mudança de cor do meio, revelada por um indicador, o verde de bromocresol. Este indicador tem uma cor azul/verde que em presença de ácido passa a amarelo. Assim, neste meio, os três géneros ao oxidarem o etanol a ácido acético, fazem com que a cor azul/verde passe a amarelo, mas como o género *Gluconobacter* não consegue levar a oxidação mais longe o meio permanece amarelo. No caso das espécies dos géneros *Acetobacter* e *Gluconacetobacter* por oxidarem o ácido acético a CO₂ e H₂O, aumentam o pH, o que faz com que o meio volte lentamente à cor inicial azul/verde. As observações dos referidos resultados podem demorar 3 ou mais semanas a concretizar-se. No meio de Frateur o componente mais

importante é o CaCO_3 , que funciona como um indicador. As colónias ao crescerem produzem ácido que neutraliza o CaCO_3 insolúvel, fazendo com que haja uma clarificação (halo) à volta das colónias. Este meio funciona de uma maneira análoga ao Carr, por isso se o halo se mantiver à volta das colónias é indicativo do género *Gluconobacter*, mas se o CaCO_3 voltar a precipitar é indicativo da presença de isolados dos géneros *Acetobacter* ou *Gluconacetobacter*. Tal como no meio Carr, a observação dos resultados pode demorar 3 ou mais semanas. O meio GYC é o meio mais utilizado para o cultivo de bactérias acéticas, possuindo também CaCO_3 funcionando por isso de modo semelhante ao meio Frateur. Este meio é recomendado para a observação de pigmentos castanhos hidrossolúveis produzidos ao fim de 3 a 5 semanas, característicos das espécies do género *Gluconobacter* (Fugelsang, 1997).

O teste da oxidação do lactato em CO_2 e H_2O também descrito pode ser feito com o meio de lactato de cálcio cujo funcionamento é baseado na capacidade das espécies do género *Acetobacter* oxidarem D- e L- lactato a CO_2 e H_2O , neste caso o lactato de cálcio funciona como fonte de carbono e como indicador. Assim o crescimento de espécies de *Acetobacter* seguida da oxidação completa resulta na formação de um precipitado de carbonato de cálcio.

O teste da cetogénese a partir do glicerol é feito a partir de um meio líquido com glicerol (meio de glicerol) que permite detetar a oxidação do glicerol a di-hidroxiacetona (cetogénese). A presença de di-hidroxiacetona pode ser detetada usando um dos vários testes utilizados para os açúcares redutores, nomeadamente os kits comerciais (clinitest^R) para diabéticos.

Também existem os testes fenotípicos miniaturizados que não têm sido muito utilizados para as bactérias acéticas, mas têm a vantagem de serem rápidos, simples e altamente padronizados. No entanto em 2005, Dellaglio e os seus colaboradores usaram a galeria ID32C, para testar o crescimento de bactérias acéticas isoladas a partir da maçã em diferentes fontes de carbono. Greenberg *et al.* (2006) usaram as galerias API 20 NE (BioMérieux) e RapID NH (Remel) numa tentativa inicial de obter uma identificação preliminar, mas sem sucesso. Como estes testes foram inicialmente concebidos para grupos de bactérias muito restritos é normal que não tenham muito valor na caracterização das bactérias acéticas (Cleenwerck e De Vos, 2008).

1.4.2 Métodos quimiotaxonômicos

Os métodos quimiotaxonômicos têm como objetivo avaliar a composição química de alguns constituintes celulares. Os principais métodos quimiotaxonômicos utilizados na identificação das bactérias acéticas são, os perfis dos ésteres metílicos de ácidos gordos (“FAME- Fatty Acid Methyl Esthers”) e os tipos de quinonas (Cleeenwerck e De Vos, 2008).

Os extratos para obtenção dos perfis de ésteres metílicos de ácidos gordos são obtidos em condições padronizadas (meio de cultura, temperatura, etc.) e analisados por cromatografia gasosa. As bactérias acéticas são caracterizadas pela presença de cadeias C18:1 ω 7 de ácidos insaturados em maior quantidade mas também contêm ácidos 2-hidroxi.

As quinonas isoprenóides são extraídas e purificadas pelo método de Yamada *et al.*, (1969) e determinadas quantitativamente por cromatografia gasosa de fase reversa (RP-HPLC “reverse-phase high performance liquid chromatography”) (Tamaoka *et al.*, 1983; Komagata e Suzuki, 1987). As espécies de *Acetobacter* apresentam ubiquinonas Q9 e as espécies de *Gluconacetobacter* e de *Gluconobacter* apresentam ubiquinonas Q10 (Trcek e Teuber, 2002).

1.4.3 Métodos moleculares

Os métodos moleculares desenvolvidos no final do século XX, são hoje em dia ferramentas indispensáveis para uma boa classificação dos microrganismos. O principal objetivo da aplicação dos métodos moleculares é permitir a identificação a nível de espécie dos microrganismos, embora a discriminação ou tipificação de estirpes ou de genótipos de uma espécie esteja a ganhar cada vez mais importância sob o ponto de vista industrial. Nem todas as estirpes têm a mesma capacidade de oxidar o etanol a ácido acético, por isso é importante determinar o poder discriminante de cada técnica e saber quantas espécies ou estirpes estão envolvidas em vários processos. A discriminação interespecífica ou intraespecífica depende do grau de polimorfismos obtidos com diferentes marcadores moleculares. Assim neste contexto as diferentes técnicas moleculares dividem-se em dois grupos: as que conseguem discriminar a nível de espécie e as que conseguem discriminar a nível da estirpe (Benito, 2005).

A nível da espécie:

(i) Hibridação DNA-DNA consiste em quantificar os valores de hibridação, a percentagem de ligação DNA-DNA e a razão relativa de ligação que são parâmetros indiretos da similaridade das sequências entre dois genomas. A hibridação é uma ferramenta essencial para descrever e confirmar novas espécies (Wayne *et al.*, 1987). Um nível de associação superior a 70% entre dois isolados, revela que estes dois isolados pertencem à mesma espécie. Porém há diferentes metodologias utilizadas para medir a reassociação e os critérios de avaliação podem variar, tornando difícil a reprodutibilidade da experiência. Sendo assim, o valor de 70% deve ser apenas indicativo e não absoluto. Além disso, a metodologia de reassociação DNA-DNA pode tornar-se demasiadamente demorada pois envolve comparações par-a-par (*parwise*) fazendo com que o número de comparações seja menor que o desejável. Mesmo assim, o resultado da reassociação é estável e suporta bem as definições de espécies (Vandamme *et al.*, 1996).

(ii) Sequenciação dos genes 16S rDNA, das regiões ITS e do gene *rec A*, em que a região genética de interesse é amplificada por PCR e os produtos purificados do PCR são sujeitos a reações sequenciadoras usando *primers* ou ddNTP's fluorescentes. Os produtos da reação são posteriormente separados por um sequenciador de DNA, usando a tecnologia capilar e durante a separação dos produtos marcados com fluorescência são excitados por um laser e detetados automaticamente (Cleenwerck e De Vos, 2008).

(iii) RFLP, (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) a análise de polimorfismos de dimensão de fragmentos de restrição consiste na digestão de DNA genómico com enzimas de restrição de corte frequente (4 – 6 pb) e na separação do elevado número de fragmentos obtidos por eletroforese. Os perfis obtidos são característicos de cada espécie, o que torna possível caracterizar quase todas as espécies de bactérias acéticas. Quando os perfis electroforéticos são analisados diretamente é designada por RFLPs diretos. Esta técnica foi utilizada por Ruiz *et al.*, (2000) na identificação de bactérias acéticas isoladas a partir de fermentações de vinhos, também foi utilizado por Cleenwerck e De Vos (2008) na taxonomia polifásica das bactérias acéticas.

(iv) 16S e ITS-ARDRA (*Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis*), consiste na amplificação por PCR dos genes ribossomais, rDNA 16S ou a região ITS (*Intergenic Transcribed Spacer*), ou seja, a região entre os genes rDNA 16S e 23S, seguida da digestão dos produtos amplificados por uma endonuclease de restrição. Os

perfis de restrição obtidos são característicos de cada espécie. Esta metodologia foi aplicada na identificação de bactérias acéticas por Ruiz *et al.*, (2000), Trcek e Teuber (2002), González *et al.*, (2006b) e Trček e Raspor (1999).

(v) DGGE, (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) a electroforese em gel de gradiente desnaturante faz a separação dos amplicões dos genes ribossomais rDNA 16S e 23S permitindo caracterizar comunidades microbianas de nichos ambientais muito específicos, não necessitando que os microrganismos estejam isolados. Esta técnica consiste assim na amplificação de uma região do genoma, seguida da separação dos fragmentos de DNA de igual tamanho, mas que têm diferentes sequências (Myers *et al.*, 1985). O padrão de bandas obtido é indicativo do número de diferentes espécies presentes na amostra. Esta técnica foi usada por Lopez *et al.*, (2003) para caracterizar todos os microrganismos no vinho (leveduras, BAL e bactérias acéticas).

(vi) FISH, (*Fluorescence in situ hybridization*) permite a quantificação e identificação direta de espécies bacterianas a nível microscópico sem cultura prévia. A técnica utiliza sondas de DNA marcadas com fluorocromos que hibridam especificamente com cada espécie ou género. Esta técnica foi utilizada por Franke *et al.*, (1999) para detetar estirpes de *Gluconacetobacter sacchari* isoladas de cana-de-açúcar.

(vii) PCR em tempo real permite a identificação e enumeração de espécies de bactérias sem ser necessário o seu cultivo. É um método rápido e fidedigno onde se usa uma transcriptase reversa para converter o RNA em DNA que depois serve como molde para a PCR (Montville e Matthews, 2008). É possível determinar assim a concentração do *template* por medição contínua do produto durante a reação e o número inicial de células pode ser estimado corretamente por comparação com uma curva padrão. Assim esta técnica tem sido usada por vários autores como por exemplo González *et al.*, (2006a) na enumeração e deteção de bactérias acéticas em amostras de vinho.

A nível da estirpe:

(i) AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) a análise de polimorfismos de tamanho de fragmentos amplificados não tem sido utilizada na identificação das bactérias acéticas mas sim na sua tipificação. É uma impressão do genoma baseado numa amplificação seletiva de fragmentos de DNA que são gerados por enzimas de restrição (Vos *et al.*, 1995).

(ii) PCR *fingerprinting* é genericamente chamada a todos os métodos baseados em PCR e que originam um *fingerprint* (impressão digital) de cada microrganismo e

baseiam-se na amplificação de diferentes regiões do genoma por PCR, utilizando apenas um *primer* e condições pouco restritas de PCR. Estas podem ser separadas em grupos de acordo com a região alvo do *primer* no genoma. Assim nas técnicas de RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) e de AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*) em que o *primer* utilizado se liga aleatoriamente a diferentes regiões do genoma enquanto que nas outras técnicas, BOX-PCR, REP-PCR (*Repetitive Extragenic palindromic-PCR*), ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR*), M13-PCR (*microsatellite-primed-PCR*), o *primer* é direcionado para sequências repetidas espalhadas pelo genoma (Inês, 2007). As técnicas REP-PCR e ERIC-PCR foram usadas por González *et al.*, (2004) na diferenciação de bactérias acéticas isoladas de mostos e vinhos e Nanda *et al.*, (2001) usaram ERIC-PCR e RAPD na caracterização de bactérias acéticas isoladas de vinagre de arroz.

1.5 Bactérias do ácido acético como agentes de transformação

As bactérias acéticas como agentes de transformação dão origem a produtos alimentares de variada qualidade e origens, bebidas como o kombucha e cacau, sendo o vinagre o mais conhecido. Mas para além destes produtos, as bactérias acéticas também são utilizadas para a produção de variados compostos com importante interesse na biotecnologia como a produção de celulose, a produção de L-Ácido ascórbico (vitamina C), (Raspor e Goranovič, 2008, Guillamón e Mas 2009) produção de D-Tagatose e produção de chiquimato (Raspor e Goranovič, 2008), sorbose e sorbitol (Mas *et al.*, 2007).

O vinagre pode ser elaborado a partir de várias matérias-primas como o vinho, a cerveja, a cidra e outras bebidas que derivam da fermentação alcoólica de cereais, frutas e batatas, e podem ainda ser usadas soluções açucaradas como o melaço, o mel e soro. A utilização dos vinagres que se obtêm a partir destes alimentos varia de região para região, uma vez que depende da bebida alcoólica tradicional local (Raspor e Goranovič, 2008). Mas o vinagre não é uma descoberta recente, é um produto conhecido há muito tempo e de elevada importância na dieta humana (8000 anos a.C.). Na época, as pessoas usavam-no como um condimento, como conservante de alimentos (prevenção de possíveis contaminações microbiológicas), como bebida refrescante (diluído em água), como medicamento, para tratar de disfunções respiratórias, feridas, úlceras, devido às suas propriedades desinfetantes e anti-inflamatórias (Rizzon, 2006b). Apesar do

reduzido conhecimento acerca do papel das bactérias acéticas na produção de vinagre, o ácido acético foi considerado por muitos séculos o ácido mais forte até ao aparecimento do ácido sulfúrico.

Existem três processos biotecnológicos (figura3) diferentes para a produção de vinagre: (i) o método tradicional de Orleans (processo lento) (ii) o método alemão (processo rápido) e (iii) o método de submersão (Raspor e Goranovič, 2008; Vegas *et al.*, 2010)

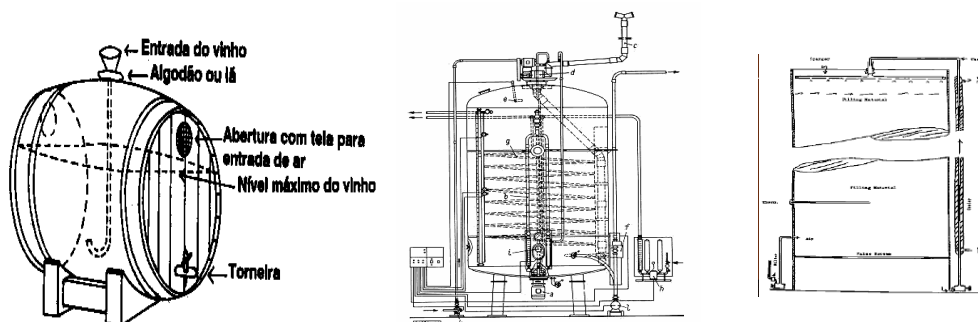


Figura 3 - Diferentes tipos de fermentadores utilizados na produção de vinagre (método de Orleans, método de submersão e método alemão) (Adaptado de: < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinagre/SistemaProducaoVinagre/acetificacao.htm>> e <http://www.msstate.edu/org/silvalab/vinegar_lactic.pdf>).

De uma forma geral todos estes métodos seguem o mesmo princípio, a obtenção biológica de ácido acético pela conversão oxidativa por bactérias acéticas de soluções que contêm etanol. Antigamente apenas se colocava o vinho em contacto com o ar e deixavam-se as bactérias transformarem o álcool em ácido acético. Apesar de este método produzir um produto organolepticamente muito bom, era muito lento e de baixo rendimento pois a oxidação só ocorria na superfície onde estava o oxigénio. Nos dias de hoje o vinagre é produzido industrialmente por métodos que utilizam bactérias imobilizadas. Geralmente consiste em verter gota a gota uma solução alcoólica sobre aparas de madeira colonizadas por bactérias do género *Acetobacter*. É também acompanhado por uma circulação de ar que garante as condições de aerobiose favorecendo assim a oxidação do álcool pelas bactérias do ácido acético. A solução acética é recolhida depois no fundo de uma cuba. Pode haver um melhoramento do processo, já que para além do que foi anteriormente explicado também há um controlo da temperatura, uma circulação de ar mais intensa e recirculação da solução acética até ao esgotamento do etanol presente. Outro método consiste numa suspensão de bactérias do ácido acético em atividade graças a uma corrente de ar forçado do líquido alcoólico.

O rendimento é elevado se a temperatura, a pressão osmótica, o oxigénio dissolvido, a concentração em etanol e outros, forem devidamente controlados. No final, o vinagre antes de ser engarrafado é pasteurizado para a destruição de microrganismos presentes (Lacasse 1995).

Até hoje foram feitos muito poucos estudos ecológicos do vinagre, pois o facto de existirem bactérias acéticas viáveis mas não cultiváveis dificultaram os poucos estudos existentes (Benito, 2005). Em estudos recentes foi verificada a importância do melhoramento da qualidade do vinagre, e que para isso serão necessárias diferentes estratégias como por exemplo um melhor sistema de acetificação, melhorar as condições ótimas do processo e seleção de estirpes mais produtoras (Raspor e Goranovič, 2008). Para a produção do vinagre, as bactérias acéticas devem apresentar características específicas para crescerem no vinho, particularmente resistência à elevada concentração de álcool, de ácido acético, reduzidas exigências nutritivas, elevadas velocidades de transformação do álcool em ácido acético, bom rendimento de transformação, sem oxidar o ácido acético formado e conferir boas características organolépticas ao vinagre. As bactérias acéticas necessitam do oxigénio do ar para realizarem a acetificação, por isso multiplicam-se mais na parte superior do vinho, formando uma película, mais ou menos espessa de acordo com o tipo de bactéria. As bactérias acéticas são particularmente instáveis, mostrando acentuado polimorfismo e variação das propriedades bioquímicas. Em alguns casos, podem até mesmo perder a capacidade fundamental de oxidar o etanol a ácido acético (Rizzon, 2006a).

O kombucha é uma bebida tradicional fermentada que começou a ficar conhecida devido aos seus efeitos benéficos para a saúde humana. Esta é obtida pela mistura de chá açucarado com uma cultura simbiótica de bactérias acéticas e leveduras que juntas formam o que é normalmente chamado de chá de fungos. Estas bactérias e leveduras formam uma ligação tão forte que inibem o crescimento de possíveis contaminantes. As principais bactérias acéticas encontradas neste chá pertencem às espécies *Gluconacetobacter xylinus*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* e algumas espécies de *Gluconobacter* como por exemplo a *Gluconobacter xylinus* que estimulada pela cafeína e xantinas provenientes do chá, tem a capacidade de sintetizar a rede flutuante de celulose que promove a simbiose formada pelas bactérias e as leveduras (Raspor e Goranovič, 2008). Ao analisar o líquido fermentado foram detetados maioritariamente os ácidos, acético, láctico e glucónico, mas também foram

identificados uma grande variedade de compostos responsáveis pelo *flavor*, alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres, e aminoácidos (Teoh *et al.*, 2004).

O cacau ou bebida de cacau é obtida a partir das sementes dos frutos do Cacaueiro (*Theobroma cacao*), planta originária da América Central e do Brasil. Os vários microrganismos identificados no cacau em fermentação são essencialmente leveduras, bactérias lácticas, bactérias acéticas e fungos esporulados, contudo quem domina é a levedura *Sacharomyces cerevisiae*. Durante a primeira fase de fermentação e, devido aos seguintes fatores: acidez da polpa, presença de açúcares fermentescíveis e condições de anaerobiose, predominam as leveduras. As condições de anaerobiose devem-se ao facto de o cacau em goma preencher todos os espaços dos recipientes de fermentação. Mais tarde no processo de fermentação criam-se condições favoráveis ao desenvolvimento das bactérias lácticas, o que acontece quando a atividade das leveduras se atenua, fazendo com que o pH da polpa aumente devido ao consumo de ácido cítrico pelas leveduras. Quando se atingem as temperaturas atingidas na fermentação alcoólica, as bactérias acéticas multiplicam-se rapidamente e atuam logo que haja álcool no meio para oxidar. A atividade destas bactérias provoca assim o abaixamento do pH da polpa. Durante a fermentação o pH vai aumentando e quando a atividade das bactérias acéticas diminui, devido à falta de substrato e abaixamento de temperatura, podem aparecer bactérias do tipo *Aerobacter*, que actuem sobre os aminoácidos produzindo amoníaco e aminas. Estes compostos provocam o enegrecimento das sementes, o que indica que o cacau sofreu fermentação exageradamente longa. Também podem aparecer ataques de fungos filamentosos, provocando gostos estranhos no cacau e, este deteriora-se se o processo não for interrompido (Ferrão, 2002).

A celulose é um polímero formado com várias unidades de glucose através da ligações β -1,4, é sintetizado por várias estirpes das espécies de *Acetobacter*, de *Gluconobacter* e de *Gluconacetobacter* (figura 4). A celulose tem propriedades excelentes, tais como a transparência, alta pureza, força de tensão, capacidade de retenção da água, afinidade biológica e biodegradabilidade, o que torna este composto importante em muitas áreas da biotecnologia industrial (Raspor e Goranovič, 2008, Takai e Erata, 1998). Em medicina pode ser usado como substituto de tecidos, substitui a pele ou outros tecidos interiores por ser permeável ao oxigénio, e apresenta uma grande capacidade de reter água que aparenta estimular o novo crescimento da pele ou outro tecido enquanto previne contra infeções (Raspor e Goranovič, 2008). O pH ótimo

para a produção de celulose é de 5,5 e a temperatura ótima é de 30°C (Hungund e Gupta, 2010).

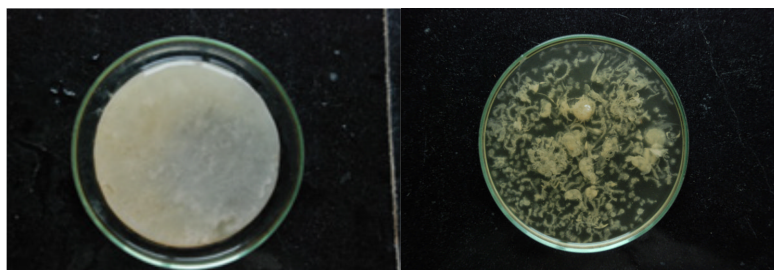


Figura 4 - Película de celulose uniforme e irregular formada por *Gluconobacter persimmonis* (Hungund e Gupta, 2010).

O ácido L-ascórbico (vitamina C) é uma vitamina hidrossolúvel indispensável ao bom funcionamento do organismo humano e animal, sendo usado também na indústria alimentar como antioxidante. As estirpes de *Gluconobacter* (particularmente *Gluconobacter oxydans*) são usadas para fazer a oxidação de D-sorbitol a L-sorbose que é um importante intermediário para a produção da vitamina (Raspor e Goranovič, 2008). Mais recentemente existem dois métodos mais avançados para a produção de ácido L-ascórbico que são pela via 2,5-dicetoglucónico e pela via do sorbitol (De Wulf *et al.*, 2000).

A D - tagatose é uma cetohehexose rara e um epímero C-4 da frutose, normalmente reconhecida como uma substância segura usada como um agente de coesão na comida e como um adoçante não calórico. Tem um sabor muito semelhante à sacarose, sem deixar gosto na boca depois do seu consumo e sem efeitos de arrefecimento, também não apresenta efeitos laxativos, ao contrário de outros polióis. A síntese deste composto ocorre naturalmente e sendo um alimento não digerível, apresenta um efeito probiótico e prébiótico podendo beneficiar a saúde dos humanos pela seletividade estimulante do crescimento ou atividade de um número limitado de bactérias, melhorando a vida do hospedeiro. No entanto é produzida em pouca quantidade em ambiente natural, assim foram estudados muitas formas de síntese produtiva de D - tagatose como por exemplo usando o galactiol, mas este era muito dispendioso. Assim este composto é obtido pela biotransformação do D-galactiol e pela bioconversão da D-galactose (Suresh *et al.*, 2006), ou seja, as bactérias acéticas fazem a biotransformação oxidativa do D-galactiol em D-tagatose, catalizada pela enzima galactiol desidrogenase.

O chiquimato é um composto chave intermediário para aminoácidos aromáticos e para um grande número de antibióticos, alcalóides e herbicidas, mais recentemente este foi considerado um precursor para a síntese de um antiviral (“Oseltamivir”), protegendo as pessoas da gripe pandémica. Este é difícil de preparar uma vez que possui duas vias metabólicas, a via da glicólise e a via pentose fosfato têm de ser combinadas para formar 3-deoxi-7-fosfo-D-arabinoheptulosonato antes de chegar a chiquimato. Para além disso a localização metabólica do chiquimato é longe da D-glucose e é difícil direccionar a via metabólica para a produção de chiquimato pela tecnologia de fermentação clássica ou por biotecnologia molecular moderna (Raspor e Goranovič, 2008). Por isso a síntese total do chiquimato através de química orgânica nunca foi praticada. Para isso, é necessário desenvolver um novo método para a produção de chiquimato mais eficiente e conveniente, contribuindo para a síntese do antiviral. A quinoproteína quinato dehidrogenase (QDH) e a 3-dehidroquinato desidratase estão localizados predominantemente na superfície das membranas citoplasmáticas de algumas espécies de *Gluconobacter* e o quinato é oxidado a 3-dehidrochiquimato de forma sequencial. No citoplasma, o NADP-dependente chiquimato dehidrochiquimato (SKDH) cataliza uma reacção reversível do 3-dehidrochiquimato a chiquimato (Adachi et al., 2003).

1.6 Bactérias do ácido acético como agentes de contaminação

As bactérias acéticas podem funcionar como agentes de contaminação no vinho, na cerveja (pode ficar azeda na presença de O₂), em frutos e em bebidas. No entanto o vinho é o alimento em que a presença destas bactérias é mais conhecida. Existem vários microrganismos presentes no vinho, as leveduras que realizam a fermentação alcoólica, (principalmente a espécie *Saccharomyces cerevisiae*), as bactérias do ácido láctico, responsáveis pela fermentação maloláctica, em que o ácido málico é transformado em ácido láctico, fazendo assim com que o vinho fique menos ácido e mais suave e as bactérias acéticas cujo desenvolvimento durante as várias fases do processo de vinificação é indesejado uma vez que a produção de ácido acético resultante do seu metabolismo, vai depreciar a qualidade do produto final. De facto, o aparecimento de vinhos com níveis elevados de acidez volátil, expressa em g/L de ácido acético, é um dos maiores problemas encontrados na indústria, não só pelo seu contributo negativo do

ponto de vista sensorial, mas também porque existem limites máximos estabelecidos para vinhos (Bartowsky e Henscheke, 2008).

A produção de vinho começa na vinha, as uvas adquirem e mantêm a quantidade de açúcar certa e a composição do sumo faz com que seja ideal para o crescimento de vários microrganismos (Mas *et al.*, 2007). O crescimento de bactérias acéticas foi observado em várias fases da produção de vinho (Drysedale e Fleet, 1988), incluindo algumas condições em que não era esperado o seu crescimento (Benito, 2005). Inicialmente nas uvas são predominam bactérias acéticas pertencentes à espécie *Gluconobacter oxydans*, porque a espécie utiliza preferencialmente açúcares como fonte de carbono, enquanto que mais tarde predominam as espécies de *Acetobacter* e de *Gluconacetobacter* que preferem o etanol como fonte de carbono (Fugelsang e Edwards, 2007). De acordo com Joyeux *et al.*, (1984a) na etapa inicial há um crescimento até cerca de 10^2 ufc/ml de bactérias acéticas. Mais tarde por causa da baixa tolerância ao etanol a espécie *Gluconobacter oxydans* vai desaparecendo ao longo da fermentação alcoólica, uma vez que o teor de álcool vai aumentando. Apesar de na etapa inicial predominar o género *Gluconobacter*, já foram isoladas espécies de *Acetobacter* e de *Gluconacetobacter* mas em pequenas quantidades (Du Toit e Lamberchts, 2002). As uvas em condições especiais como por exemplo, infetadas por fungos, danificadas ou podres podem ser infetadas por leveduras e por bactérias acéticas, pertencendo a maioria às espécies *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus* (Joyeux *et al.*, 1984a). Nestes casos as leveduras iniciam o metabolismo dos açúcares transformando-os em etanol, que mais tarde é oxidado a ácido acético pelas bactérias acéticas presentes. Tanto o etanol como o glicerol são produtos do metabolismo das leveduras, assim o glicerol produzido pode ser metabolizado pelas bactérias acéticas em di-hidroxiacetona, que afeta a qualidade sensorial do vinho, podendo combinar-se com o SO_2 , diminuindo assim as suas propriedades antimicrobianas. Deste modo a composição do sumo de uva pode ser alterada significativamente se os bagos forem infetados pelas bactérias acéticas. As mudanças não só têm efeitos na qualidade sensorial do vinho mas também no crescimento de leveduras durante a fermentação alcoólica (Drysedale e Fleet, 1989b) e no crescimento das bactérias do ácido láctico, embora Joyeux *et al.*, (1984a) tenham verificado contagens constantes de bactérias acéticas durante a fermentação maloláctica aproximadamente de 10^2 a 10^3 ufc/ml que eram maioritariamente de *Acetobacter pasteurianus*. Neste tipo de processo o mosto também pode ser contaminado por

bactérias acéticas que se encontram nas adegas durante a trasfega do mosto. Como já foi referido ao longo da fermentação, há aumento do teor em etanol, o que torna o meio mais apropriado para as espécies de *Acetobacter* e de *Gluconacetobacter*. Contudo também há um aumento do teor em CO₂ que é produzido pelo metabolismo das leveduras, e por isso é criado um ambiente anaeróbio que teoricamente é uma condição desfavorável ao crescimento das bactérias acéticas. A temperatura à qual a fermentação alcoólica se processa depende do tipo de vinificação. As temperaturas que ocorrem durante a fermentação do vinho tinto são entre 25 e 30°C (Mas *et al.*, 2007) temperaturas ótimas de crescimento das bactérias acéticas e por isso não previnem o seu desenvolvimento. Pelo contrário, as temperaturas das fermentações do vinho branco e rosé variam entre 16 e 20°C, o que já dificulta o seu crescimento (Benito, 2005). O crescimento destas bactérias durante a fermentação alcoólica pode também estar ligado ao número de bactérias e leveduras presentes no mosto no início da fermentação sendo que as espécies mais predominantes durante a fermentação alcoólica são *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *Ga. liquefaciens* e *Ga. hansenii* (Du Toit e Lamberchta, 2002). As temperaturas das adegas durante o envelhecimento variam entre 10 a 15°C, temperaturas que parecem inibir o crescimento das bactérias acéticas (Joyeux *et al.*, 1984a), se bem que Drysdale e Fleet (1989b) observaram um fraco crescimento das bactérias acéticas a 10°C. Apesar destas condições adversas durante a fermentação alcoólica, alguns autores (Du Toit *et al.*, 2005) detetaram que as bactérias acéticas podem sobreviver e até crescer durante este processo. Durante o armazenamento, as principais espécies encontradas são *A. aceti* e *A. pasteurianus* (Mas *et al.*, 2007). Estas bactérias foram isoladas do topo, do meio e do fundo dos tanques e barris, o que sugere que as bactérias acéticas podem realmente sobreviver sob condições semi-anaeróbias que ocorrem nas cubas de vinho (Du Toit *et al.*, 2005). Nesta fase o principal produto obtido a partir da presença das bactérias acéticas é o ácido acético. Se o objetivo é que a qualidade dos vinhos seja boa, é de vital importância manter os números de bactérias acéticas reduzidos, isto pode ser feito usando uvas saudáveis, inoculando uma elevada quantidade de leveduras, adicionando SO₂, clarificando o mosto e baixando o pH, pela adição de ácido (Du Toit e Pretorius, 2002). Se o crescimento de bactérias acéticas for elevado nas primeiras etapas da fermentação alcoólica, as fermentações podem parar ou tornar-se mais lentas reduzindo a qualidade dos vinhos durante o seu armazenamento (Benito, 2005). Também se o crescimento for muito elevado no produto final por exposição ao ar, ou se

a quantidade de álcool for pouco elevada e a temperatura for adequada, o vinho transforma-se num meio apropriado ao crescimento de bactérias acéticas.

Outro problema associado com a contaminação por bactérias acéticas em alimentos são as aminas biogénicas. As principais encontradas em alimentos são a histamina, a tiramina, a putrescina e a cadaverina. Estas são bases orgânicas dotadas de atividade biológica que são produzidas como consequência da descarboxilação de aminoácidos livres durante a fermentação ou degradação dos alimentos (Karovičová e Kohajdová, 2003; Russo *et al.*, 2010). A histamina, a putrescina e a tiramina são as aminas mais frequentemente encontradas em vinhos (Smit *et al.*, 2008). As aminas biogénicas são indesejáveis em todos os alimentos e bebidas porque se forem consumidas em elevadas concentrações, podem constituir um risco na saúde dos consumidores devido à sua toxicidade. A produção destes compostos está normalmente associada com as bactérias do ácido láctico, e pouca atenção tem sido dada à responsabilidade de outros microrganismos incluindo as bactérias acéticas (Smit *et al.*, 2008). De acordo com a sua estrutura química as aminas biogénicas podem ser classificadas como alifáticas (putrescina, cadaverina), aromáticas (tiramina) ou heterocíclicas (histamina). E segundo o número de grupos amina podem ser divididos em monoaminas (tiramina), diaminas (histamina, putrescina e cadaverina) ou poliaminas (Karovičová e Kohajdová, 2003).

A produção de aminas biogénicas em alimentos é influenciada pela disponibilidade dos aminoácidos livres, pela atividade das descarboxilases, a disponibilidade de O₂, a temperatura, presença de cloreto de sódio, natureza dos microrganismos, pela natureza do substrato, etanol, SO₂ e pH (Smit, 2007; Smit *et al.*, 2008; Karovičová e Kohajdová, 2003).

A presença ou não de aminoácidos livres é muito importante na produção de aminas biogénicas. Os aminoácidos podem estar livres nos alimentos ou podem ocorrer através da proteólise, assim os microrganismos com alta atividade proteolítica aumentam o risco de produção de aminas biogénicas, ao aumentar a disponibilidade em aminoácidos livres. Também se removermos o grupo α -carboxil de um aminoácido leva a que se corresponda com uma amina biogénica, mas às vezes para a produção da mesma amina podem atuar duas descarboxilases diferentes (Smit *et al.*, 2008; Karovičová e Kohajdová, 2003).

A atividade das descarboxilases dos aminoácidos é maior em ambiente ácido (pH 4.0 a 5.5) e também as bactérias produzem mais destas enzimas como meio de

defesa contra a acidez. Também a presença de hidratos de carbono fermentescíveis, tais como, D-glucose, aumenta o crescimento e a atividade das enzimas descarboxilase nas bactérias (Karovičová e Kohajdová, 2003).

A quantidade de oxigênio disponível também influencia a síntese de aminas biogénicas, pois certas culturas aumentam a produção de aminas biogénicas se forem colocadas em diferentes condições de aerobiose (Smit *et al.*, 2008; Karovičová e Kohajdová, 2003).

A temperatura também é um fator importante sendo que as temperaturas entre os 20 e os 37°C são ótimas para o crescimento das bactérias que contém descarboxilases (Karovičová e Kohajdová, 2003).

A presença de cloreto de sódio favorece a atividade da tirosina descarboxilase e inibe a atividade da histidina descarboxilase (Silla Santos, 1996).

Uma grande quantidade de etanol inibe a produção de aminas biogénicas alterando as propriedades físicoquímicas da membrana atenuando o transporte da amina (Smit *et al.*, 2008).

Quanto maior a quantidade de SO₂ menor a formação de aminas biogénicas, contudo o efeito do SO₂ depende do pH, a um pH maior, um aumento de SO₂ causa a diminuição da produção de aminas, mas a pH mais baixo ficou demonstrado uma subida de produção de aminas (Smit, 2007).

Por último os fatores relacionadas com a viticultura, a variedade das uvas e da composição nutricional e química do vinho, a região geográfica, as práticas de produção de vinho, o grau de maturação das uvas e o tipo de solo influenciam as concentrações finais de aminas biogénicas. Também a maior parte dos compostos fenólicos presentes no vinho faz com que a produção de aminas biogénicas diminua (Smit, 2007; Smit *et al.*, 2008; Karovičová e Kohajdová, 2003).

1.7 Fatores que afetam o crescimento e a sobrevivência das bactérias acéticas nos vinhos

Os principais fatores que influenciam o desenvolvimento das bactérias acéticas, são a temperatura, a concentração de etanol, a presença ou ausência de oxigênio, o pH, o SO₂ e a influência da interação com outros microrganismos (Benito, 2005; Bartowsky e Henschke, 2008).

1.7.1 Temperatura

A temperatura ótima para o crescimento das bactérias acéticas situa-se entre 25°C e 30°C, tendo sido raramente observado o crescimento acima dos 37°C, exceto para algumas bactérias acéticas termotolerantes (Saeki *et al.*, 1997). Já foram isoladas bactérias acéticas termotolerantes a temperaturas entre 37°C e 40°C, sendo capazes de oxidar o etanol a 38°C e a 40°C, à mesma velocidade que as estirpes mesófilas a 30°C (Raspor e Goranovič, 2008). Já em 1980 Ohmori e os seus colaboradores, conseguiram isolar uma estirpe de *Acetobacter aceti* com o objetivo de se obter uma maior produção de vinagre a uma maior temperatura, apresentando uma completa atividade a 35°C e 45% de atividade aos 38°C. De acordo com De Ory *et al.*, (1998) a temperatura máxima de crescimento para a *Acetobacter aceti* é de cerca de 35°C. Recentemente Ndoye *et al.*, (2006) selecionaram estirpes de *Acetobacter tropicalis* e de *Acetobacter pasteurianus* e propuseram a sua utilização no fabrico de vinagre artesanal espiritual, pela sua capacidade de crescer a 40 °C e 45°C respetivamente. No entanto as bactérias acéticas, podem estar ativas a temperaturas mais baixas, por exemplo a 18°C, tendo sido já observado fraca atividade a 10°C (Joyeux *et al.*, 1984a). É essencial acrescentar que perante todos estes dados é muito difícil de definir qual o máximo e o mínimo de temperatura de crescimento devido à variabilidade das espécies e da composição do meio onde se encontram (Gullo e Giudici, 2008).

1.7.2 Etanol

O etanol é uma boa fonte de carbono para as bactérias acéticas, e a capacidade de oxidar o etanol é uma das principais características destas bactérias. Contudo, a capacidade destas bactérias em permanecer viáveis e até mesmo crescer a diferentes concentrações de etanol é dependente da espécie (Benito, 2005). Alguns géneros têm preferência na fonte de carbono, como por exemplo os géneros *Acetobacter* e *Gluconacetobacter* preferem o etanol como fonte de carbono, já o género *Gluconobacter* oxida mais facilmente açúcares, por isso cresce melhor em uvas sãs e os primeiros dois géneros prevalecem em uvas alteradas mecanicamente e microbiologicamente tornando-se predominantes durante a fermentação alcoólica (Joyeux *et al.*, 1984a). Drysdale e Fleet, (1988) verificaram que o máximo de álcool tolerado pelas bactérias acéticas variava entre 8 e 15% (v/v). Contudo, estas bactérias podem crescer no vinho normalmente com um conteúdo elevado de etanol, entre 10 a

14% (v/v) (Joyeux *et al.*, 1984a; Drysdale e Fleet 1989a). Num estudo realizado por Krisch e Szajáni (1997) em que foi testada a tolerância ao etanol da espécie *Acetobacter aceti*, verificou-se que na concentração mais elevada testada (20% v/v) houve uma sobrevivência de 60 a 70%. Também de acordo com Saeki *et al.*, (1997) as bactérias acéticas podem superar o efeito inibitório tornando-se tolerantes ao etanol. Contudo a tolerância ao etanol é uma característica dependente das espécies e estirpes condicionado ainda pela temperatura, pH e oxigénio (Drysdale e Fleet, 1988; Du Toit e Pretorius, 2002).

1.7.3 pH

O pH ótimo para o crescimento das bactérias acéticas situa-se entre 5,0 e 6,0 (De Ley *et al.*, 1984a), podendo sobreviver a valores de pH mais reduzidos. Algumas bactérias acéticas já foram isoladas em meios contendo acetato, durante a produção de vinagre a valores de pH muito reduzidos entre 2,0 e 2,3, mesmo com baixos valores de oxigénio. O pH é um fator muito importante pois até a sensibilidade ao etanol destas bactérias pode variar a diferentes valores de pH. Também tem um efeito sinérgico com o SO₂, fazendo com que o efeito antibacteriano do SO₂ seja maior, a reduzidos valores de pH (Benito, 2005). Krisch e Szajáni (1997) verificaram num estudo no qual foi testada a tolerância ao ácido acético da espécie *Acetobacter aceti* que o meio ácido se mostrou bastante tóxico sendo que a concentração letal foi de 7% (v/v). A tolerância ao reduzido pH é dependente da concentração de etanol e da disponibilidade de oxigénio, pois uma elevada concentração de etanol aumenta a sensibilidade ao pH (Du Toit e Pretorius, 2002) e uma reduzida disponibilidade de oxigénio causa a diminuição do número de células viáveis (Joyeux *et al.*, 1984a).

1.7.4 SO₂

O SO₂ é um agente antimicrobiano vulgarmente utilizado em enologia para prevenir o aparecimento das bactérias acéticas, das bactérias do ácido láctico e de algumas leveduras indesejáveis. Assim, a presença e o crescimento das bactérias acéticas só vão depender da concentração de SO₂ se a intenção for a produção de vinho. As formas livres consistem em dióxido de enxofre molecular, bissulfito e iões de sulfito mas apenas o SO₂ molecular tem efeito antimicrobiano (Bartowsky e Henschke, 2008). Drysdale e Fleet (1985) conseguiram isolar bactérias acéticas (10²-10³ ufc/mL) a partir

de vinhos armazenados que continham entre 17 e 77 mg/L de SO₂ total. Mais recentemente, de acordo com Du Toit *et al.*, (2005) que descrevem o efeito do SO₂ em *Acetobacter pasteurianus*, verificaram que a viabilidade das bactérias não era muito afetadas por baixas concentrações de SO₂ molecular livre (0,35 mg/L), mas maiores concentrações de SO₂ foram efetivas. Mesmo assim, as bactérias acéticas são capazes de crescer em vinhos contendo 20mg/L de SO₂ livre (Joyeux *et al.*, 1984a), o que quer dizer que os níveis comuns de SO₂ nos vinhos não são suficientes para inibir o crescimento de bactérias acéticas. A eficácia do SO₂ depende muito do pH do meio como já foi referido, pois quanto menor o pH, maior a quantidade de SO₂ na forma molecular que é a forma ativa, sendo a que atua nos microrganismos. Para uma prevenção eficaz do crescimento de *Acetobacter* spp. no vinho é aconselhado adicionar cerca de 50 a 75 mg/L de SO₂ (Montville e Matthews, 2008).

1.7.5 Ácido Acético

O ácido acético é o produto do metabolismo das bactérias acéticas e quando não é oxidado a H₂O e CO₂ acumula-se no meio e torna-se tóxico para as estirpes. As espécies do género *Gluconobacter* geralmente apresentam uma maior resistência ao ácido acético do que a espécie *Acetobacter aceti*. Este género desenvolveu características especiais para sobreviver e permanecer metabolicamente ativo em condições industriais extremas (pH reduzido e grandes concentrações de ácido acético) (Gullo e Giudici, 2008). A maior resistência ao ácido acético foi descrita para as espécies *Gluconacetobacter europaeus*, *Gluconacetobacter intermedius*, *Gluconacetobacter oboediens* e *Gluconacetobacter entanii* (Boesch *et al.*, 1998; Schüller *et al.*, 2000; Sievers e Teuber, 1995 e Sokollek *et al.*, 1998).

1.7.6 Oxigénio

O oxigénio é dos fatores mais limitantes para o crescimento das bactérias acéticas, uma vez que estas bactérias apresentam um metabolismo aeróbio obrigatório porque usam o O₂ como aceitador final de electrões durante a respiração (Matsushita *et al.*, 1994). Contudo alguns estudos mostraram que outros compostos como as quinonas e corantes redutores, podem ser usados como aceitadores finais de electrões pelas bactérias acéticas (Du Toit e Pretorius, 2002), sugerindo que estas bactérias podem sobreviver e crescer em ambientes aeróbios a semi-anaeróbios. Existem vários estudos

acerca da influência do oxigénio no desenvolvimento das bactérias acéticas. Du Toit *et al.*, (2005) sugeriram que a espécie *A. pasteurianus* pode sobreviver em estado viável mas não cultivável quando o O₂ é adicionado ao vinho. Drysdale e Fleet (1989a) verificaram num estudo com *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus* e *Gluconobacter oxydans*, que usando percentagens de oxigénio diferentes (100%, 70%, 50%) as duas primeiras espécies cresciam mais nas maiores percentagens, enquanto que a espécie *Gluconobacter oxydans* não apresentou crescimento em nenhuma das percentagens testadas. Mas Rubio-Fernández *et al.*, (2004) verificaram que um valor elevado de oxigénio dissolvido pode inibir o crescimento das bactérias acéticas e que uma boa concentração nos processos semi-contínuos seria de 1 a 3 mg/kg. A forma como o oxigénio é disponibilizado, para fazer vinagre, depende do método que está a ser utilizado, uma vez que uns têm um sistema de dissolução forçada de oxigénio. O método mais tradicional funciona apenas com o oxigénio que fica naturalmente dentro da pipa em contacto com a superfície formando a película de bactérias. Para além disso a taxa de penetração do oxigénio na madeira é cerca de 30 mg/L (Joyeux *et al.*, 1984a).

1.7.7 Outros microrganismos

Muitos microrganismos tolerantes ao etanol conseguem crescer no mosto de uvas estabelecendo interações muito complexas. Durante a fermentação alcoólica, a presença de leveduras não *Saccharomyces* e de espécies de bactérias acéticas influenciam o crescimento e o metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*. Foi mostrado que populações de bactérias acéticas superiores a $10^7 - 10^8$ ufc/mL no mosto de uva são suficientes para matar *Saccharomyces cerevisiae* (Drysdale e Fleet, 1989b). O crescimento simultâneo de bactérias acéticas com *Saccharomyces cerevisiae* produz sintomas clássicos de uma fermentação incompleta, com altos teores de açúcar residual e baixo teor em etanol, reduzidos teores de álcool isoamílico e de glicerol, teores elevados em ácidos acético e glucónico, acetaldeído e acetato de etilo (Drysdale e Fleet 1989b). Num estudo comparativo entre fermentação induzida (inoculação) e espontânea realizado em 2002, Guillamon e seus colaboradores observaram que um rápido início da fermentação alcoólica resultou num decréscimo da população de bactérias acéticas. Normalmente as uvas infetadas por fungos filamentosos, nomeadamente *Botrytis cinerea* estão também contaminadas por várias espécies de bactérias acéticas (Bartowsky e Henschke, 2008).

1.8 Resistência aos Antibióticos

Os antibióticos são moléculas que impedem o crescimento, provocam a morte e também a lise das células de microrganismos, bactérias ou fungos. Podem ser de origem sintética ou natural (produtos do metabolismo secundário dos microrganismos), sendo o grupo principal de bactérias produtoras os actinomicetos (Walsh, 2003). Existem várias formas de uma célula produzir um antibiótico, há os que são produzidos no interior das células sendo depois expulsos por bombas de efluxo, outros em que a maturação deste só ocorre extracelularmente e também existem aqueles em que a célula que produz modifica as suas estruturas para poder produzir o antibiótico.

A maioria dos antibióticos usados na terapêutica não se destinam a atuar sobre organismo humano (célula eucariota), pelo contrário, vão atuar especificamente no microrganismo infetante (célula procariota). Cada grupo de antibióticos tem um alvo na célula bacteriana, a fim de exercerem as suas propriedades de antibiose (figura 5). Assim os antibióticos têm uma grande afinidade para as células bacterianas e quase sem efeito nocivo para o Homem, nas doses apropriadas (Sousa, 2006).

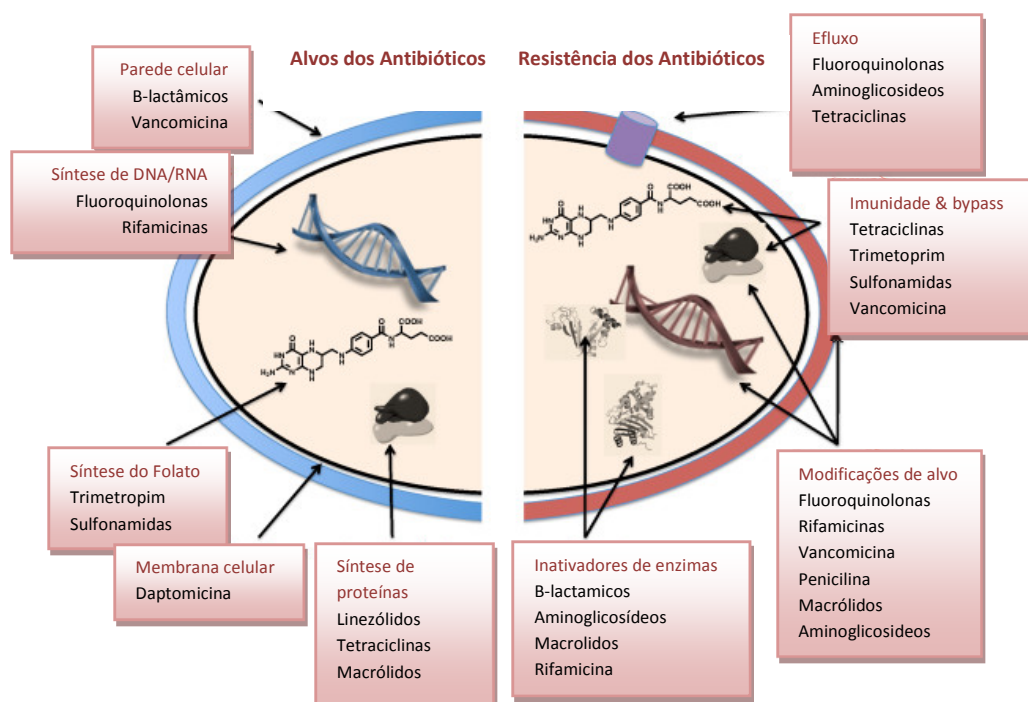


Figura 5 - Representação dos locais de atuação dos diferentes grupos de antibióticos (Adaptado de Wright, 2010)

Apesar da maioria das bactérias com capacidade infecciosa pertencerem essencialmente a outras famílias, recentemente, tem havido referências a infeções

oportunistas atribuídas a algumas espécies de bactérias acéticas, tais como o *Acetobacter cibiningensis* (Gouby *et al.*, 2007), *Acetobacter indonesiensis* (Bittar *et al.*, 2008) e *Gluconobacter* spp. (Alauzet *et al.*, 2010). É de salientar que algumas das estirpes responsáveis por estas infeções oportunistas mostraram ser multirresistentes.

1.8.1 Mecanismos de resistência

Ao longo dos anos têm sido produzidas várias classes de antibióticos e para cada classe existem muitas vezes mais do que um mecanismo de resistência. Na maioria dos casos devem-se a mudanças a nível genético, ocorrendo uma mutação levando a bactérias anteriormente sensíveis agora serem resistentes (Levy, 2004). As mutações podem ocorrer espontaneamente no DNA cromossómico ou plasmídico devido a erros de replicação. O fluxo de genes de resistência entre o cromossoma e elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposões ou integrões, leva a que esta se propague facilmente, sendo a ecologia genética da resistência a antibióticos muito complexa (Rhodes *et al.*, 2000; Kümmerer, 2004). A expressão dessas alterações genéticas na célula resulta de alterações em um ou mais mecanismos biológicos da bactéria afetada e, em última instância, determina o tipo de resistência que as bactérias desenvolvem, resultando numa infinidade de possíveis formas de resistência biológica (Levy, 2004).

Os mecanismos de resistência que se podem observar estão relacionados com a forma de ação dos antibióticos (Giroud *et al.*, 1988; Gilman *et al.*, 1996; Ferreira e Sousa, 1998), existindo quatro mecanismos principais (i) modificação dos alvos em que as bactérias, mediante diferentes mecanismos, transformam os alvos de ataque dos antibióticos para que este não se possa ligar e impedir o seu desenvolvimento ou provocar a sua morte. Um mecanismo comum é a criação de uma molécula semelhante, mas sem afinidade para a molécula de antibiótico, (ii) bombas de efluxo que são proteínas que existem na membrana citoplasmática, o seu papel consiste em expulsar ativamente as moléculas nocivas para a célula, como os antibióticos, para fora da célula por transporte ativo ou de sequestrá-las na membrana longe dos seus alvos de ação. Em geral estas proteínas são classificadas em famílias de acordo com a sua sequência de aminoácidos: ABC (*ATB-Binding-Cassete*); MFS (*Major Facilitator Superfamily*); RND (*Resistance-Nodulation – Division*); SMR (*Small Multidrug Resistance*) e MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) (iii) inativação enzimática, geralmente

mediada por plasmídeos, transposões e integrões, podem modificar as moléculas destes antibióticos, inativando-as ou reduzindo a sua afinidade para o alvo de ação e (iv) impermeabilização dos invólucros bacterianos, para que as moléculas de antibiótico atinjam os alvos de ação têm que atravessar até três invólucros celulares (parede celular, membrana externa e membrana celular), isto acontece por difusão passiva através de canais aquosos formados por proteínas designadas porinas (Nikaido, 1998). Uma modificação na permeabilidade destes invólucros, por mutações de genes estruturais ou reguladores, pode conduzir a uma incapacidade do antibiótico atingir a sua finalidade causando um certo grau de resistência inespecífica, que afeta compostos de várias famílias de antibióticos.

1.8.2 Antibióticos

1.8.2.1 Antibióticos antiparietais

Estes antibióticos são inibidores da síntese do peptidoglicano, que é o principal constituinte da parede celular que reveste a célula bacteriana. A partir do momento em que a célula cresce e ocorre a cisão binária, a parede celular fica com fragmentos velhos e fragmentos recém sintetizados no citoplasma. A célula bacteriana passa assim por três fases para a biossíntese do peptidoglicano:

- 1) Fase citoplasmática - síntese de N-acetilglucosamina (NAG) e de ácido N-acetilmurâmico (NAMA), as unidades do peptidoglicano em construção;
- 2) Fase membranar - transporte das unidades UDP-NAMA-pentapeptídeo e UDP-NAG pela membrana citoplasmática (bactoprenol), alterando-os formando o par NAG-NAMA-pentapeptídeo.
- 3) Fase parietal - consiste na colocação das unidades na parede celular da bactéria em crescimento e promoção da ligação entre as unidades e a parede existente, assim inicia-se com a inserção do precursor NAG-NAMA-pentapeptídeo no peptidoglicano formado, ocorrendo depois a ligação entre o 3º e o 4º aminoácido de cadeias peptídicas vizinhas formando assim as pontes interpeptídicas.

As características morfológicas e químicas da parede celular fazem também desta responsável pelas diferentes respostas que as bactérias Gram positivo e Gram negativo dão ao teste de Gram sendo assim possível dividi-las nestes dois grupos. A parede

celular das bactérias Gram positivo não coloca entrave à entrada destes antibióticos, mas das bactérias Gram negativo constitui uma barreira de permeabilidade. Dos antibióticos antiparietais vários atuam nas diferentes fases de síntese do peptidoglicano, por exemplo a fosfomicina na fase citoplasmática, os glicopetídeos na fase membranar e os β -lactâmicos na fase parietal (Sousa, 2006).

1.8.2.1.1 Fosfomicina

A fosfomicina é o ácido L-cis-1,2-epoxi-propilfosfônico e é um antibiótico bacteriolítico de baixo peso molecular, que atua nas fases iniciais da biossíntese do peptidoglicano (intracelular). Ocorre assim a inativação de forma irreversível à enzima bacteriana enolpiruvato-transferase ocupando o lugar do fosfoenolpiruvato (PEP). Assim a reação entre o UDP-N-acetilglucosamina e o PEP não se dá, consequentemente deixa de se poder realizar o primeiro passo da síntese da parede celular. Em termos de espectro antibacteriano este atua melhor nas bactérias Gram negativo do que nas bactérias Gram positivo. A resistência bacteriana está associada a mutações que afetam o sistema de transporte da fosfomicina (permeases) através da membrana citoplasmática (resistência cromossômica) e ao gene *fosA*, presente num grande plasmídeo, encontrado essencialmente em bactérias de Gram negativo e não em de Gram positivo (Sousa, 2006).

1.8.2.1.2 β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos, são dos grupos de antibióticos mais importantes devido à sua elevada eficácia terapêutica, baixa toxicidade para os animais, incluindo o Homem e larga diversidade de compostos. Estes impedem a biossíntese do peptidoglicano, atuando na fase parietal, ou seja na fase final. Os β -lactâmicos ligam-se às PBPs (*Penicillin-Binding-Proteins*), que são enzimas que promovem o estabelecimento de pontes interpeptídicas (*cross-linking*) entre as cadeias peptídicas vizinhas do peptidoglicano em crescimento, inibindo-as irreversivelmente e consequentemente impedindo a síntese do peptidoglicano, ocorrendo falha na sustentabilidade da parede e subsequente lise celular. Existem quatro grupos destes antibióticos distintos: as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenemos. A resistência, a estes antibióticos, é comum em bactérias Gram positivo e Gram negativo e é mediada por quatro etapas: modificação dos alvos (PBPs), impermeabilização da membrana externa, bombas de efluxo e hidrólise enzimática dos

β -lactâmicos por β -lactamases (etapa de resistência mais importante para este grupo) (Sousa, 2006). As β -lactamases caracterizam-se por um grupo heterogêneo de enzimas capazes de inativar as penicilinas, cefalosporinas e por vezes os monobactâmicos. Estas enzimas plasmídicas ou cromossômicas hidrolizam a ligação peptídica que caracteriza o anel β -lactâmico (ligação CO-N), inativando o antibiótico (Majiduddin *et al.*, 2002). O maior problema relativo à resistência mediada por β -lactamases são as ESBL (β -lactamases de espectro alargado) que constituem um grupo de enzimas que derivam das β -lactamases clássicas, TEM-1, TEM-2 e SHV-1, por mutações pontuais no seu centro ativo e foram assim denominadas devido ao facto da maioria dessas enzimas serem codificadas por genes localizados em plasmídeos (Jacoby e Sutton, 1991). Estes conferem assim resistência bacteriana a outros antibióticos como a penicilina, as cefalosporinas (1^a, 2^a e 3^a geração) e ao aztreonam pela hidrólise dos mesmos. Os inibidores de β -lactamases são o ácido clavulânico, o tazobactam e o sulbactam (Williams, 1999; Paterson e Bonomo, 2005; Sousa, 2006). Estes compostos têm estruturas idênticas (bicíclica) com o anel β -lactâmico que a enzima hidrolisa ficando unida, irreversivelmente, ao contrário do que se sucede com os antibióticos convencionais, não podendo voltar a atuar sobre outras moléculas β -lactâmicas, são considerados inibidores suicidas (Williams, 1999).

1.8.2.2 Antibióticos inibidores da síntese proteica

Estes antibióticos atuam no complexo ribossomal 70S bacteriano, tendo como alvos as subunidades 30S ou 50S, sendo inofensivos para a síntese proteica nas células eucarióticas.

1.8.2.2.1 Aminoglicosídeos

A gentamicina, a canamicina, a tobramicina e a estreptomicina pertencem a este grupo de antibióticos, que apresentam um anel aminoclitol, derivado do inositol, unido a açúcares aminados, através de ligações glicosídicas. Têm elevada atividade contra bacilos Gram negativos, aeróbios e têm efeitos pleiotrópicos sobre a célula bacteriana (inibição da síntese proteica, produção de proteínas anómalas *non sense*, alteração da permeabilidade celular e inibição da replicação do DNA). Estes antibióticos possuem bastantes vantagens como a estabilidade metabólica, rápida ação bacteriana, largo

espectro de ação antibacteriana, sinergismos com os antibióticos β -lactâmicos e raros fenômenos de hipersensibilidade. A inibição da síntese proteica é o principal mecanismo de morte celular, sendo que o recetor ribossomal para a maioria dos aminoglicosídeos é a subunidade 30S do rRNA 16S (Sousa, 2006).

1.8.2.2.2 Tetraciclinas

As tetraciclinas caracterizam-se por possuir um núcleo hidroxinaftaceno (formado por quatro anéis benzônicos fundidos) e inibem a síntese proteica, ao nível da subunidade 30S dos ribossomas. Impossibilitam a ligação dos aminoacil – tRNA (s) aos ribossomas, barrando a ligação codão-anticodão entre o tRNA e o local A dos ribossomas (Chopra e Roberts, 2001). Estes antibióticos são considerados de largo espectro, ativos contra bacilos Gram positivo e Gram negativo aeróbios-anaeróbios facultativos, no entanto, tem vindo a observar-se uma elevada prevalência de resistências às tetraciclinas (Sousa 2006). Frequentemente as resistências às tetraciclinas são devidas, à impermeabilização da membrana externa das bactérias Gram negativas, à mutação ribossômica, à fraca incorporação intracelular e ao elevado efluxo de antibiótico e à proteção ribossomal. Mas o principal mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos desta família são as bombas de efluxo que é especificado por diferentes determinantes genéticos de resistência, os genes *tet*, que codificam as proteínas TET (proteínas associadas à membrana citoplasmática que exportam as tetraciclinas para fora da célula bacteriana) (Sousa 2006).

1.8.2.2.3 Cloranfenicol

O cloranfenicol atua em bactérias tanto Gram negativo como Gram positivo. Tem efeito na subunidade 50S, barrando a atuação da transpeptidase, pois este antibiótico liga-se à subunidade, na cavidade da peptidiltransferase, impedindo assim a ligação do aminoacil-tRNA ao local do ribossoma interferindo com a transferência do resíduo peptidil do peptidil-tRNA para o aminoacil-tRNA, inativando a transpeptidase (Sousa, 2006). A modificação enzimática do cloranfenicol é o mecanismo de resistência mais comum, tornando-o inativo. O gene *cat* codifica para as O-acetiltransferases bacterianas que promovem a acetilação da molécula de cloranfenicol em C3 originando derivados acetoxi, destituídos de propriedades antibióticas (Yoo *et al.*, 2003). Estes genes podem ter localização plasmídica ou cromossômica.

1.8.2.2.4 Macrólidos

Os macrólidos (eritromicina) atuam ao nível da subunidade 50S dos ribossomas, bloqueando o local P, inibindo a transpeptidase/ translocação. Muitas bactérias de Gram negativo são intrinsecamente resistentes a este antibiótico e a sua forma de resistência mais frequente é a resistência cruzada aos Macrólidos-Lincosamidas-Streptogramina B (resistência MLSB). Esta resistência deve-se à N.N'-dimetilação da adenina na posição 2058 no rRNA 23S, mediada por uma metilase, produto do gene *erm* (Schwarz *et al.*, 2002). Outro mecanismo de resistência bacteriana aos macrólidos são as bombas de efluxo, geradas por produtos do gene *mef*, no entanto este mecanismo não é eficaz em todas as moléculas do grupo (Wierzbowski *et al.*, 2005)

1.8.2.3 Antibióticos inibidores da síntese dos ácidos nucleicos

1.8.2.3.1 Quinolonas

As quinolonas podem ser de primeira, segunda, terceira e quarta geração sendo classificadas de acordo com o seu espectro de atividade, assim, à medida que o espectro de atividade aumenta maior a atividade contra Gram positivas e menor contra Gram negativas. As quinolonas atuam mediante a inibição da DNA girase (Topoisomerase II) codificada pelos genes *gyrA* e *gyrB* (principal alvo nas bactérias Gram negativo). Estes antibióticos ligam-se especificamente ao extremo N-terminal de GyrA, mediante a proteína do centro ativo e impedem a união DNA-proteína – e da topoisomerase IV codificada pelos genes *parC* e *parE* (principal alvo das quinolonas de 3ª geração nas bactérias de Gram positivo). A sua atuação contra as topoisomerasas faz com que as quinolonas interfiram com o enrolamento do DNA, impedindo a replicação e a transcrição do mesmo. A forma de resistência mais comum para este grupo de antibióticos é a mutação das enzimas alvo (Topoisomerase II e IV) (Poole, 2000; Hooper, 2001). A ciprofloxacina, moxifloxacina, enrofloxacina, levofloxacina e ácido nalidíxico são exemplos desta família de antibióticos.

1.8.2.4 Antibióticos antimetabolitos

1.8.2.4.1 Sulfonamidas / Trimetropim

As sulfonamidas/Trimetropim impedem o crescimento bacteriano por privação de ácido fólico, indispensável para o crescimento celular. A célula bacteriana incorpora PABA e Pteridina no ácido dihidropteroico, por via da ação da enzima dihidropteroato sintetase (DHPS). O ácido dihidropteroico juntamente com o glutamato, graças à intervenção da enzima dihidrofolato sintetase (DHFS) vai produzir o ácido dihidrofólico (DHF) e pela ação da enzima dihidrofolato redutase (DHFR) produz o ácido tetrahidrofólico (THF). Quando o trimetropim e as sulfonamidas são usados em associação desenvolvem um efeito sinérgico e bactericida, reduzindo-se sobretudo, o desenvolvimento de resistência microbiana, em relação à monoterapia. O principal mecanismo de resistência são as mutações cromossômicas. A alteração da constituição enzimática da célula bacteriana, nomeadamente as estruturas DHPS (codificada pelo gene *dhps*) e DHFR (codificada pelo gene *dhfr*), conferem-lhes baixa afinidade para os compostos antibacterianos, sendo este um dos mecanismos principais para a aquisição de resistência a estes compostos (Sousa, 2006).

2. Objetivos

Um vinagre é o produto obtido exclusivamente pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, de produtos de origem agrícola, sendo que as bactérias acéticas são as responsáveis pela oxidação do etanol a ácido acético, o principal constituinte do vinagre. Este processo é tradicionalmente levado a cabo pela designada “mãe do vinagre” que se caracteriza por uma mistura desconhecida destas bactérias existentes na matéria-prima. A seleção de culturas *starter* para obtenção de vinagres de qualidade, com características sensoriais interessantes, tem ganho um crescente interesse, sendo que estas estirpes deverão ter capacidade de resistir às condições adversas, normalmente encontradas durante o processo. As características básicas reconhecidas de uma estirpe de BAA, para a produção de vinagre incluem a oxidação eficiente e preferencial do etanol, rápida produção de ácido acético, tolerância a elevadas concentrações de ácido acético sem oxidação completa, resistência a baixos valores de pH e capacidade de crescimento num grande intervalo de temperaturas.

Com este trabalho pretendeu caracterizar-se uma coleção de bactérias acéticas, com vista à seleção de potenciais culturas-*starter*. Para isso, 70 isolados naturais, provenientes de uvas, mostos, vinhos e vinagres, foram testados quanto à sua resistência a diferentes valores de etanol, SO₂, ácido acético, temperatura e pH. Adicionalmente, foi avaliada a sua capacidade de produção de aminas biogénicas (histamina, putrescina e tiramina), compostos importantes em termos de segurança alimentar, pela sua potencial toxicidade para o consumidor.

A identificação de bactérias acéticas por métodos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos é um processo moroso conduzindo por vezes a resultados ambíguos. Assim, foi também objetivo deste trabalho avaliar a aplicação da técnica de MSP-PCR *fingerprinting*, usando os *primers*, M₁₃, (GTG)₅, e ERIC1 ERIC2 com vista à identificação e/ou tipificação dos 70 isolados da coleção.

Atualmente existe muita informação sobre a prevalência de resistência a antibióticos em bactérias de origem clínica, mas pouco ou nada se sabe sobre a suscetibilidade aos antibióticos em bactérias comensais, aparentemente inofensivas, presentes nos alimentos como as bactérias acéticas. No entanto, recentemente têm surgido referências a infeções oportunistas em humanos, atribuídas a algumas espécies pertencentes à família *Acetobacteriaceae*. Assim, foi ainda objetivo deste trabalho avaliar a suscetibilidade de alguns dos isolados a diferentes grupos de antibióticos.

3. Material e Métodos

3.1 Estirpes bacterianas – Neste estudo foram utilizadas 70 isolados de uma coleção de bactérias acéticas pertencentes à unidade de Microbiologia de Biotecnologia dos Vinhos do IBB/CGB-UTAD, provenientes de amostras de uvas sãs, uvas podres, mostos, vinhos, vinhos alterados e vinagres. Os isolados foram anteriormente identificados presuntivamente a nível de género pela observação do seu crescimento em meio Carr, teste da catalase e coloração de gram (Martins 2010). Foram também incluídas 7 estirpes de referência pertencentes à Coleção Espanhola de Culturas Tipo - CECT (Quadro 6).

Quadro 6 - Lista das estirpes em estudo

Isolados	Amostra	Origem	Identificação Carr agar	Antibiograma
1	A5	Vinho alterado	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
2	A6 ^{*a}	Vinagre Caseiro	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
3	A6	Vinagre Caseiro	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
4	A7	Vinho alterado	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
5	A7	Vinho alterado	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
6	A6 ^{*a}	Vinagre Caseiro	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	Sim
7	A6'	Vinagre Caseiro	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	Sim
8	A14	Vinho alterado	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	Sim
9	A27	Vinagre caseiro	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
10	A27	Vinagre caseiro	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
11	A27	Vinagre caseiro	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	Sim
12	A29	Vinho alterado	<i>Gluconobacter</i>	Sim
13	A29	Vinho alterado	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
14	X1 ^{*a}	Vinho alterado	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
15	X1	Vinho alterado	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
16	X1	Vinho alterado	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
17	X1 ^{*a}	Vinho alterado	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
18	X1'	Vinho alterado	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
20	A31	Uvas sãs	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
21	A32 ^{*a}	Uvas podres	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
22	A32	Uvas podres	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
23	A32	Uvas podres	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
24	A32	Uvas podres	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
25	A32	Uvas podres	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
26	A32	Uvas podres	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
27	A32 ^{*a}	Uvas podres	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
28	A32'	Uvas podres	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
29	A33	Mosto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
30	A33	Mosto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	Sim
31	A36	Vinagre caseiro	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
32	A36	Vinagre caseiro	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
33	A36	Vinagre caseiro	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	Sim
34	A36	Vinagre caseiro	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
35	CECT 298 ¹ * ¹	REF 1		Sim
36	CECT 360 ^{*2}	REF 3		
37	CECT 824 ^{*3}	REF 5		Sim
38	CECT 944 ^{*4}	REF 6a		Sim
40	75PQCCII	Vinho tinto	<i>Gluconobacter</i>	Sim
41	14BADSI	Vinho tinto	<i>Gluconobacter</i>	Sim
42	76PQc	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
43	ALEX8f	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
44	7AQSf	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
45	5AQSb	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
46	17AQSf	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	Sim
47	19AQSe	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	

Quadro 6 – Lista das estirpes em estudo (continuação)

Isolados	Amostra	Origem	Identificação Carr agar	Antibiograma
48	24AQSe	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	Sim
49	7BAc	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	Sim
50	18'BAf	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
51	07BAa02	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
52	45'BAa00	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
53	45'BAa01	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	Sim
54	71PQc	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
55	71PQe	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	Sim
56	72PQa	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
57	14VRc	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
58	14'VRf	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
59	14'VRp	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
60	20VRb	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
61	72VRd	Vinho tinto	<i>Gluconobacter</i>	Sim
62	75VRb	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
63	14'VRh	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
64	6VIRGa	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
65	8VIRGd	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
66	14'VRh	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	Sim
67	QPcim1a	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
68	QPcim2g	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
69	QPcim2g	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	Sim
70	1QPa	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
71	3QPa	Vinho tinto	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	
72	9QPc	Vinho tinto	<i>Gluconobacter</i>	Sim
80	CECT 315 ^{*5}	REF 2		
81	CECT 473 ^{*6}	REF 4		
82	CECT5830 ^{*7}	REF 7		
83	15BAf	Vinho tinto	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	
84	14'VRf	Vinho tinto	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	
85	70PQc	Vinho tinto	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	
89	A31	Uvas sãs	<i>Acetobacter/Gluconacetobacter</i>	

*¹CECT 298[†] *Acetobacter aceti*; *² CECT 360 *Gluconobacter oxydans*; *³ CECT 824 *Acetobacter pasteurianus*; *⁴ CECT 944 *Acetobacter sp.*; *⁵ CECT 315 *Gluconobacter oxydans*; *⁶ CECT 473 *Gluconacetobacter xylinus*; *⁷ CECT5830[†] *Acetobacter oeni*.

*^a Nas amostras A6, A32 e X1 procedeu-se ao isolamento de bactérias acéticas em 2 tempos distintos, daí a designação A6 e A6', A32 e A32' e X1 e X1'.

3.2 Armazenamento das estirpes – Todas as estirpes foram mantidas a -80°C em criotubos em meio de cultura Carr suplementado com glicerol (20%). A composição deste meio é a seguinte (g/L): extrato de levedura 20, glucose 5, verde de bromocresol 0,022, agar 20. O pH foi acertado a 5,5 antes da esterilização a 121°C durante 15 minutos em autoclave. Após o arrefecimento do meio de cultura a 50°C, 2% de etanol foi adicionado em condições assépticas.

3.3 Caracterização fenotípica dos isolados

Neste trabalho, os isolados foram submetidos a testes de resistência/tolerância ao SO₂, ácido acético, etanol e pH. Para todos os ensaios a formulação original do meio Carr (0 mg/L de SO₂, 0% ácido acético, 2% etanol, pH 5.5) foi usada como controlo. O efeito cruzado da temperatura na resistência das bactérias acéticas aos diversos fatores testados foi avaliado por incubação das placas a três temperaturas diferentes. Antes de

cada ensaio as estirpes foram pré-cultivadas durante a noite em meio Carr líquido a 30°C. Para todos os testes de resistência, 3 µl de uma suspensão de células ($DO_{660nm}=0.010$) foram depositados na superfície dos diferentes meios a testar. As placas foram incubadas a 20°, 30° e 37°C durante 5 dias. Para cada uma das condições testadas foi atribuída uma classificação de um (crescimento ativo/normal) ou zero (sem crescimento), por comparação com o crescimento observado na condição controle. A classificação final de resistência dos isolados foi obtida pela atribuição do valor médio para cada uma das condições testadas.

3.3.1 Resistência ao SO₂ - A resistência ao SO₂ foi testada em meio Carr sólido (pH 3.5), suplementado com SO₂ a uma concentração final de 32, 64, 96 e 128 mg l⁻¹ de SO₂. O SO₂ foi incluído nos meios de cultura por adição de iguais volumes de soluções stock de metabissulfito de sódio em água, com pH ajustado a 3.5, por forma a obter as concentrações finais a serem testadas.

3.3.2 Resistência ao ácido acético - A resistência ao ácido acético, 1, 2, 4, e 7% (v/v) foi avaliada em meio Carr pela adição de uma solução de ácido acético com o pH acertado a 4,0.

3.3.3 Resistência ao etanol - A resistência ao etanol foi avaliada no meio Carr a pH 5,5 com diferentes concentrações de etanol (8, 12 e 20% (v/v)). Dado que o meio Carr já tem 2% de etanol na sua composição original, foi ainda testado o crescimento dos isolados neste meio não suplementado com etanol.

3.3.4 Resistência ao pH - A resistência ao pH foi avaliada fazendo variar o pH do meio Carr (2,5, 3,5, 4,5 e 6,5).

3.4 Produção de aminas biogénicas – Para a deteção da produção das aminas biogénicas (putrescina, histamina e tiramina), foram utilizados três meios de cultura diferentes, com as seguintes composições (g/L) (i) Ornitina descarboxilase agar (L-ornitina 5, extrato de levedura 3, glucose 1, púrpura de bromocresol 0,015, agar 20), (ii) Histidina descarboxilase agar (L-histidina 5, extrato de levedura 3, glucose 1, púrpura de bromocresol 0,015, agar 20) e (iii) Tirosina descarboxilase agar (L-tirosina 5, extrato de levedura 3, glucose 1, púrpura de bromocresol 0,015, agar 20). O pH de todos os

meios foi acertado a 6,8 e posteriormente procedeu-se à sua esterilização a 121°C durante 15 minutos. A capacidade de produção de aminas biogénicas foi avaliada pela observação de alteração de cor do indicador de reação. A atividade das descarboxilases e consequente produção de aminas biogénicas conduz a um aumento do pH, que faz com que o indicador púrpura de bromocresol, mude de amarelo para púrpura.

3.5 Perfil de suscetibilidade aos antibióticos – A avaliação da suscetibilidade aos antibióticos foi realizada através do método de difusão de Kirby-Bauer segundo as normas do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007) com as seguintes modificações: a utilização do meio Carr agar e a temperatura de incubação a 30°C durante 24 a 72 horas. Depois da incubação, as estirpes foram classificadas como sensíveis (S), intermédias (I) ou resistentes (R) de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006). Foram testados 27 antibióticos normalmente utilizados para as bactérias Gram negativo: Amoxicilina (AML₁₀), Amoxicilina + Ácido Clavulânico (AMC₃₀), Piperacilina (PRL₁₀₀), Piperacilina + Tazobactam (TZP₁₁₀), Ticarcilina (TIC₇₅), Ticarcilina + Ácido Clavulânico (TIM₈₅); Cefalotina (KF₃₀), Cefoxitina (FOX₃₀); Cefotaxima (CTX₃₀), Ceftazidima (CAZ₃₀), Ceftriaxona (CRO₃₀), Cefipima (FEP), Aztreonamo (ATM₃₀), Imipenemo (IPM₁₀), Meropenemo (MEM₁₀), Fosfomicina (FOS₅₀), Gentamicina (CN₁₀), Canamicina (K₃₀), Tobramicina (TOB₁₀), Amicacina (AK₃₀), Estreptomicina (S₁₀), Tetraciclina (TE₃₀), Ácido nalidíxico (NA₃₀); Ciprofloxacina (CIP₅), Eritromicina (E₁₅), Co-trimoxazol (SxT₂₅) e Cloranfenicol (C₃₀).

3.6 Extração de DNA – O DNA total foi extraído pelo método de tiocianato de guanidina (Pitchern *et al.*, 1989). Os *pellets* obtidos de cada cultura foram lavados duas vezes com tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e ressuspensos em 250 µl TE contendo lisozima (10 mg/ml) e incubadas *overnight* a 37 °C. A lise completa das células foi realizada pela adição de 500 µl de reagente GES (5M tiocianato de guanidina, 100 mM EDTA pH 8,0, 0,5% v/v sarcosil) misturado por inversão, seguida de incubação em gelo. Após a adição de 250 µl de 10 M acetato de amónio e mais 10 min de incubação em gelo, os ácidos nucleicos (fase aquosa) foram extraídos com 1 ml de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v:v). Após uma centrifugação (vmáx. 10 min.) o sobrenadante obtido foi transferido para um tubo *eppendorff* e precipitado com volume

igual de isopropanol frio. O *pellet* foi lavado com etanol 70% (v/v) e ressuspendido em 20 µl de tampão TE. A concentração de DNA foi determinada num biofotómetro pela leitura da absorvância a 260 nm e aplicando a relação: 1 UA = 50 ng/ml. As amostras de DNA foram armazenadas a 4-8 ° C. Para as reacções de PCR as amostras foram diluídas a uma concentração de $\approx 50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$.

3.7 Caracterização genotípica e identificação das estirpes

A caracterização genotípica foi realizada por PCR-*fingerprinting* utilizando-se os *primers*, M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'), (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGT G-3'), e ERIC1 (5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'), ERIC2 (5'- AAGTAAGT GACTGGGGTGAGCG-3'). Assim, após a extração de DNA, o DNA foi amplificado recorrendo aos *primers* obtendo-se os respetivos perfis de PCR-*fingerprinting*. Para a realização do PCR-*fingerprinting* com os *primers* M13 e (GTG)₅, seguiu-se o protocolo descrito por Meyer *et al.*, (1993). As reacções de PCR foram realizadas em misturas de 25µl contendo 50 ng de DNA genómico molde, 400 µM de cada desoxiribonucleótido, 2,5 mM de cloreto de magnésio, 50 pmoles do *primer* e 1U de Taq DNA polimerase em tampão apropriado. As amplificações foram realizadas num termociclador Biometra TGradient de acordo com o seguinte programa, desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 2 minutos de *annealing* a 50°C, 2 minutos de extensão a 72°C e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Para a realização do PCR-*fingerprinting* com os *primers* ERIC1 e ERIC2, seguiu-se o protocolo descrito por Versalovic *et al.*, (1991). As reacções de PCR foram realizadas em misturas de 25 µl contendo 50 ng de DNA genómico molde, 400 µM de cada desoxiribonucleótido, 2,5 mM de cloreto de magnésio, 50 pmoles de cada *primer* e 1 U de Taq DNA polimerase em tampão apropriado. Todos os reagentes foram adquiridos à Invitrogen. As amplificações foram efetuadas num termociclador Biometra TGradient de acordo com o seguinte programa, desnaturação inicial de 7 min a 95°C seguida de 30 ciclos de 1 min de desnaturação a 94°C, 1 min de *annealing* a 52°C e 8 min de extensão a 65°C e uma extensão final de 18 min a 65°C. Os perfis de ERIC-PCR *fingerprinting* foram resolvidos por electroforese (TBE 0,5X; 2,7 V/cm; 3h), em gel de 1,2% agarose (adicionado de brometo de etídeo, com concentração final de 0,1 µg/ml) em que se utilizou 1 Kb DNA Ladder TrackIt™ (Invitrogen) como marcador de massa molecular. Procedeu-se à aquisição de imagem utilizando o sistema Bio-Rad GelDOC

EQ. As imagens foram analisadas no *software* BioNumerics versão 6.1 (Applied Maths). Após extração dos perfis densitométricos aplicou-se o coeficiente de correlação linear de Pearson, para estimar as semelhanças entre os *fingerprints* obtidos, e procedeu-se ao agrupamento das estirpes pelo método de aglomeração baseado na distância média não ponderada (UPGMA).

3.7.1 Sequenciação parcial de rDNA 16S

A amplificação por PCR do rDNA 16S foi realizada utilizando os *primers* PA (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e PH (5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'). As reações de PCR foram realizadas em misturas de 50 µl contendo 20-30 ng de DNA genómico molde, 200 mM de cada desoxiribonucleótido, 2 mM de cloreto de magnésio, 50 pmoles de cada *primer* e 2 U de Taq DNA polimerase em tampão apropriado. O programa de amplificação consistiu num passo inicial de desnaturação de 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 56°C e 1 min a 72°C e de um ciclo final de extensão de 5 min a 72°C. As amplificações foram efetuadas num termociclador Biometra. A amplificação do rDNA 16S foi confirmada por electroforese em gel de 1,2% de agarose (TBE 0,5X; 3 V/cm; 1 h 30 min).

Os produtos amplificados foram purificados utilizando um sistema comercial baseado em colunas de sílica (JETQUICK *Spin Column Technique*; Genomed) e enviados para o Laboratório de Sequenciação da STABVIDA para sequenciação parcial do rDNA 16S utilizando o *primer* 907R (5' CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 3', Muyzer *et al.*, 1996). As sequências parciais de rDNA 16S editadas foram exportadas para ficheiros de texto e procedeu-se à comparação com sequências disponíveis nas bases de dados públicas (GenBank) utilizando o algoritmo BLASTN (Altschul *et al.*, 1990). A identificação a nível de espécie foi realizada de acordo com o critério de homologia máxima. Para cada sequência identificada foi seleccionada a sequência com que apresentava maior percentagem de homologia.

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização fenotípica

Um dos objetivos deste trabalho foi caracterizar a coleção de 70 isolados de bactérias acéticas de diferentes origens, quanto à sua capacidade de crescer em diferentes condições adversas, que estas bactérias terão que enfrentar durante a produção de vinagre.

4.1.1 Temperatura

A temperatura ótima para o crescimento das bactérias acéticas situa-se entre 25°C e 30°C, apesar de terem já sido encontradas estirpes capazes de crescer a temperatura de 40°C (Ndoye *et al* 2006, Saeki *et al.*, 1997) e inferiores a 10°C (Benito, 2005). Uma vez que a oxidação do etanol a ácido acético é um processo exotérmico, a utilização de estirpes termo-tolerantes poderá ser benéfica não só por se evitar paragens do processo quando a temperatura se eleva, mas também por permitir a redução dos custos de arrefecimento dos reatores (Gullo e Guidici 2008).

Neste trabalho todos os isolados testados cresceram em meio Carr (2% de etanol) às três temperaturas testadas (20, 30 e 37°C). No entanto, verificámos que a capacidade de crescer neste intervalo de temperaturas é condicionada pelos níveis de etanol, ácido acético, SO₂ e pH, como sugerido por Du Toit e Pretorius (2002).

4.1.2 Etanol

A presença de etanol inibe o crescimento e a viabilidade das células, afetando principalmente a membrana plasmática pela alteração da organização e permeabilidade da membrana que conduz à acumulação de solutos e o fluxo de protões. A tolerância ao etanol é uma característica tecnológica importante uma vez que os vinagres tradicionais são feitos a partir de vinhos cujo teor alcoólico poderá variar entre 4-10% (Gullo e Giudici, 2008), sendo que é reconhecida uma grande variabilidade entre estirpes de bactérias acéticas. Vários estudos limitam o crescimento de bactérias acéticas na presença de 9 a 13% de etanol (Moonmangmee *et al.*, 2012, Kappeng e Pathom-aree, 2009; Stoica *et al.*, 2009). De acordo com Stoica *et al.*, (2009), as bactérias acéticas podem ser classificadas em 3 grupos, de acordo com a sua resistência ao etanol:

bactérias acéticas de fraca resistência (6 a 7% de etanol), bactérias acéticas de média resistência (9 a 11% de etanol) e bactérias acéticas resistentes (11 a 13% de etanol)

Como pode ser observado na figura 6, os isolados estudados conseguiram crescer na presença de etanol até 8%, independentemente da temperatura de crescimento. Como esperado, o efeito da toxicidade do etanol foi mais evidente, à medida que se elevou a temperatura de incubação. Os nossos resultados mostram que para 12% de etanol 86, 83 e 49% dos isolados testados são resistentes conseguindo crescer a 20, 30 e 37°C, respectivamente.

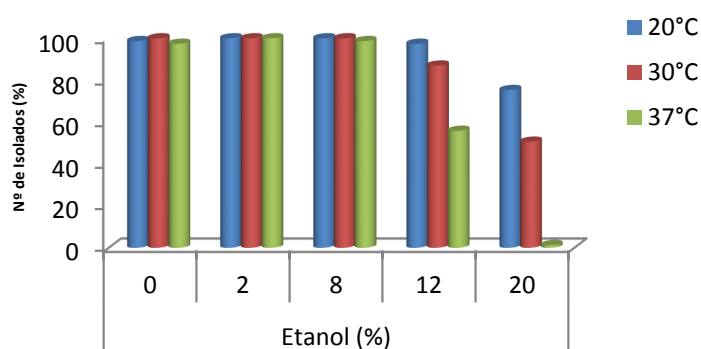


Figura 6 - Efeito do etanol no crescimento a diferentes temperaturas.

Num estudo anterior Krisch e Szajáni (1997) mostraram que a taxa de sobrevivência de uma estirpe de *Acetobacter aceti*, na presença de 20% de etanol era de 60 – 70%. Neste estudo, na presença de 20% de etanol, verificou-se uma redução significativa do número de isolados resistentes, diretamente relacionada com a temperatura de incubação, sendo que apenas o isolado 26 foi capaz de crescer a 37°C. Este isolado, pela sua capacidade de crescer a tão elevados níveis de etanol e temperatura poderá ser interessante para a aplicação industrial no fabrico de vinagres feitos a partir de vinhos generosos. É de salientar, contudo, que o facto de uma estirpe apresentar uma elevada tolerância ao etanol não significa que o seu potencial de oxidação do etanol a ácido acético seja o mais eficiente.

4.1.3 Ácido acético

O ácido acético é um produto da oxidação do etanol e inibe a fermentação acética de uma forma exponencial. Nas leveduras, os mecanismo da sua toxicidade envolve a acetificação do citoplasma e a modificação de certas enzimas da glicólise

(Pampulha e Loureiro-Dias, 1990). Nas bactérias acéticas, os mecanismos de resistência conhecidos a concentrações moderadas a elevadas de ácido acético, presentes no vinagre incluem (i) a assimilação de acetato através do ciclo de TCA (Fukaya *et al.*, 1993), (ii) a excreção de acetato por sistemas de efluxo (Matsushita *et al.*, 2005), e (iii) modificações na composição lipídica e polissacárido da parede celular bacteriana (Takemura *et al.*, 1991). Contudo, a adaptação das estirpes a elevadas concentrações de ácido acético parece ser um pré-requisito para uma elevada resistência a este composto (Lasko *et al.*, 2000). Assim o ácido acético produzido pelas bactérias acéticas durante a oxidação do etanol vai ser tóxico existindo, no entanto, uma adaptação a níveis crescentes deste ácido o que se poderá traduzir numa maior resistência ao mesmo (Kittelman *et al.*, 1989).

Como pode ser observado na figura 7 os isolados conseguiram crescer na presença de ácido acético até 2%, independentemente da temperatura de crescimento. Na presença de 4% verificamos um grande decréscimo no número de isolados resistentes, sendo que a 7% nenhum foi capaz de crescer independentemente da temperatura de incubação. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que limitavam o crescimento de BAA a meios contendo 6 a 7% de ácido acético (Krisch e Szajáni, 1997; Boesch *et al.*, 1997; Schüller *et al.*, 2000; Stoica *et al.*, 2009).

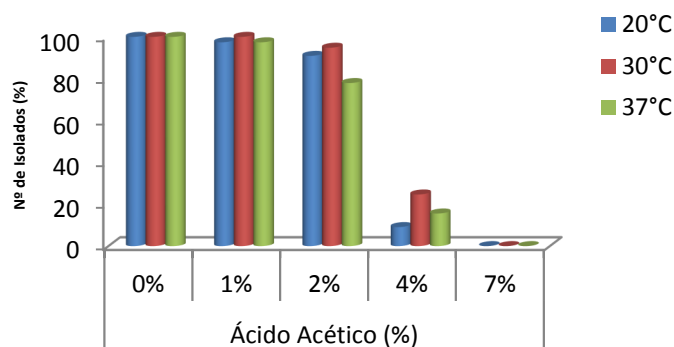


Figura 7 - Efeito do ácido acético no crescimento a diferentes temperaturas

Seria de esperar que as estirpes mais resistentes fossem provenientes de amostras de vinagre, contudo a resistência foi independente da origem dos isolados. Esta observação poderá ser devida ao facto das estirpes terem sido isoladas de amostras de vinagres caseiros e não comerciais, podendo na altura do isolamento ainda não ter sido atingido um teor elevado de ácido acético. Por outro lado, a resistência ao ácido acético pode também depender do meio onde as bactérias acéticas crescem, que pode não ser o

mais adequado para responder às suas necessidades, para se adaptarem a uma nova situação de *stress* (Shafiei e Thonart, 2012).

4.1.4 SO₂

Os efeitos do SO₂ no crescimento e sobrevivências das bactérias acéticas ainda não foram totalmente explorados (Drysdale e Fleet, 1988; Bartowsky e Henschke, 2008). No entanto sabe-se que as quantidades de SO₂ utilizadas nos vinhos não são suficientes para eliminar as bactérias acéticas (Joyeux *et al.*, 1984a). Estudos feitos por Watanabe e Lino (1984) verificaram que era necessário 100mg/L de SO₂ para controlar o crescimento das bactérias acéticas. Mais recentemente Du Toit *et al.*, (2005) demonstraram que apenas 75mg/L de SO₂ era suficiente para o efeito.

Na figura 8 apresentam-se os resultados obtidos sobre o efeito do SO₂ nos isolados de bactérias acéticas em estudo. Podemos observar que a percentagem de isolados capazes de crescer está inversamente relacionada com as concentrações de SO₂, presentes no meio de cultura. Este comportamento é mais evidente à temperatura de 37°C, onde à concentração mínima testada (32mg/L de SO₂), apenas 23% das estirpes cresceram. De salientar que para temperaturas mais baixas aproximadamente 40% das nossas estirpes apresentaram crescimento na presença de 128mg/L de SO₂. Valores mais elevados (250mg/L de SO₂) foram já referenciados por Wilker e Dharmadhikari (1997) como insuficientes para eliminar completamente este grupo de bactérias em pipas.

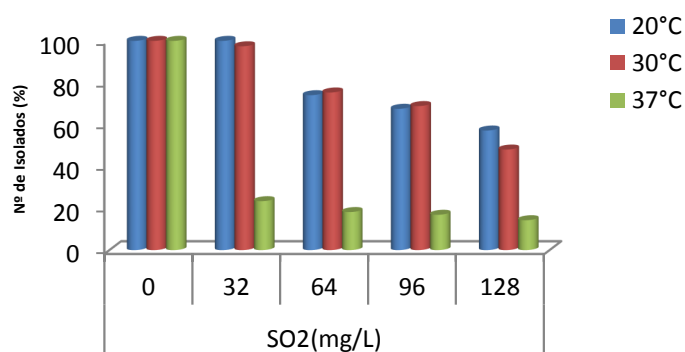


Figura 8 - Efeito do SO₂ no crescimento a diferentes temperaturas

4.1.5 pH

O pH ótimo para o crescimento das bactérias acéticas é de 5,5-6,3 (Holt *et al.*, 1994) sendo, no entanto, frequentemente encontradas em vinhos onde os valores de pH são bastante mais reduzidos entre 3,0 e 4,0. De acordo com Kittelmann *et al.*, (1989) as bactérias acéticas podem ser divididas em três grupos de acordo com a sua capacidade de crescimento a diferentes valores de pH: acetofílicas, que apenas crescem a valores de pH próximos de 3,5; acetofóbicas que apenas crescem a valores de pH superiores a 6.5 e acetotolerantes que crescem na gama intermédia dos valores de pH apresentados. De acordo com esta classificação 12% dos isolados estudados são acetofílicos, mostrando a capacidade de apenas crescer ao valor de pH mais reduzido testado, (pH 2,5). Os restantes (88%) cresceram a partir do pH 3,5 independentemente da temperatura de incubação, sendo classificados como acetotolerantes (figura 9).

O efeito do pH no crescimento das bactérias acéticas é muito influenciado pela concentração de etanol e pela disponibilidade de oxigénio no meio. Por exemplo, a um pH de 3,4 e a uma baixa concentração de oxigénio as bactérias acéticas começam a perder a viabilidade (Joyeux *et al.*, 1984b).

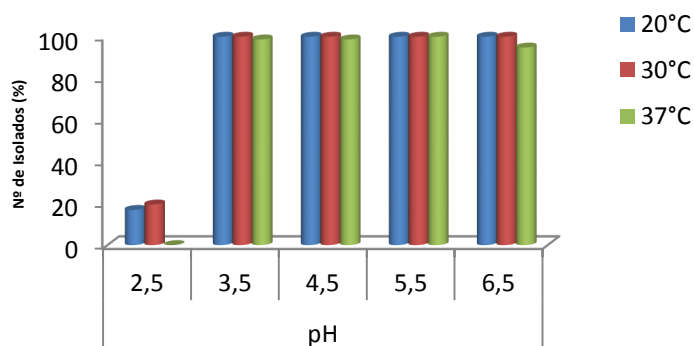


Figura 9 - Efeito do pH no crescimento a diferentes temperaturas

4.2 Análise global da caracterização fenotípica

O dendrograma apresentado na figura 10 foi elaborado com os valores médios dos resultados obtidos nos diferentes testes realizados aos isolados agrupando-os de acordo com a sua similaridade (quadro III.2). Podemos verificar que este dendrograma se divide em 5 grupos principais, os quais se distinguem por resistências mais ou menos elevadas dos isolados a certas condições de *stress*.

O primeiro grupo destaca-se pela elevada resistência aos vários valores de pH a 20° e a 30°C. O segundo grupo é o maior e contém isolados que apresentam uma elevada resistência ao etanol e SO₂ a 20° e 30°C. O terceiro grupo caracteriza-se pela elevada sensibilidade apresentada a SO₂ a 20° e a 30°C. O quarto grupo apresenta resistência ao SO₂ a 37°C e ao ácido acético a 20° e a 30°C. E o último grupo é constituído apenas por dois isolados e distingue-se pela elevada sensibilidade às condições testadas.

De acordo com os dados obtidos os isolados 23, 46, 49, 55, 62, 70, 72 parecem ser interessantes para utilização na produção de vinagre dada as suas elevadas resistências ao etanol, ácido acético e SO₂, incluindo a sua capacidade de crescimento a valores de pH mais baixos.

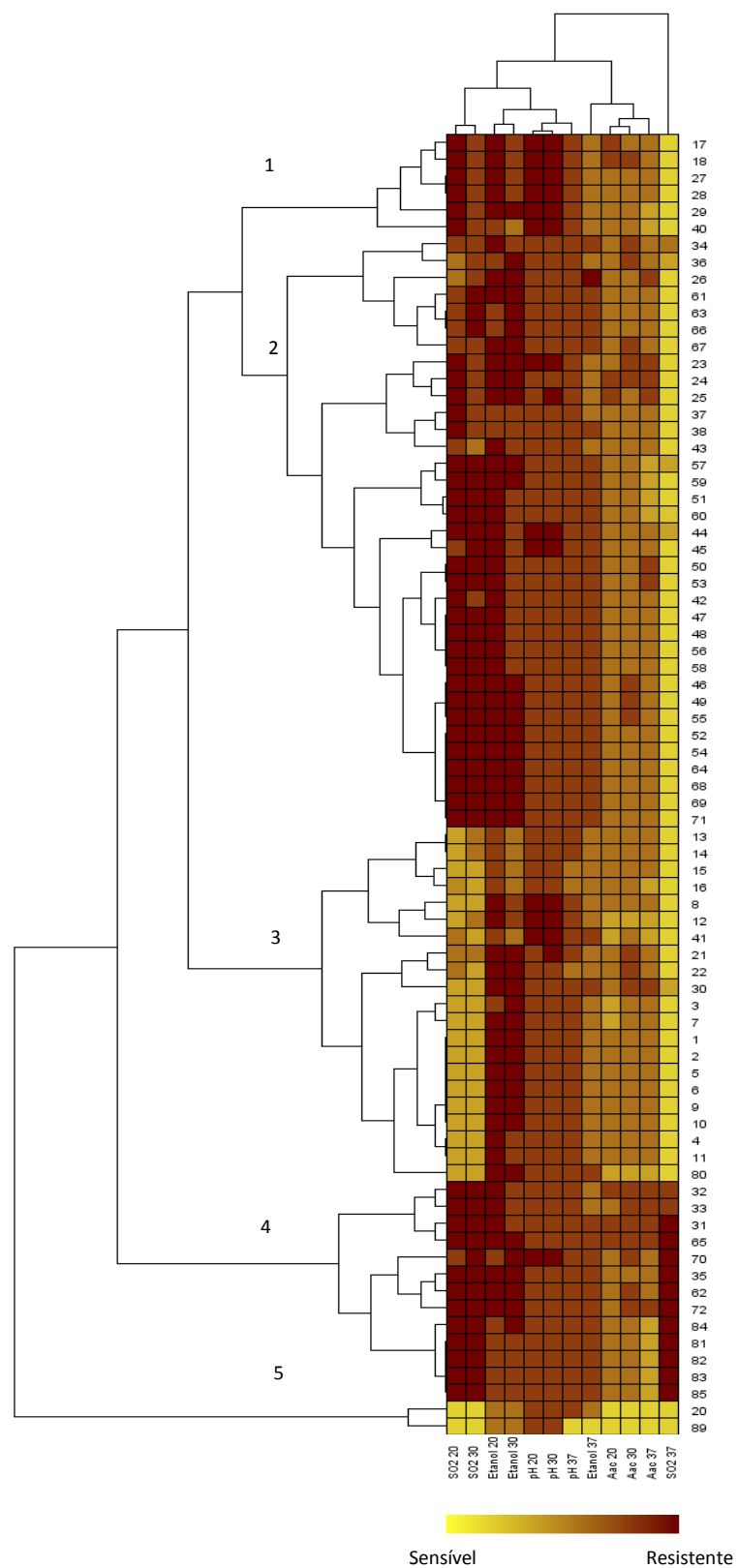


Figura 10 - Dendrograma referente aos testes fenotípicos de resistência/tolerância efetuados aos 70 isolados de bactérias acéticas e às 7 estirpes de referência CECT.

4.3 Caracterização genotípica

4.3.1 Identificação

As técnicas de PCR *fingerprinting* têm sido usadas por vários investigadores na caracterização de diversos microrganismos eucariotas (Capece, *et al.*, 2003; Hierro *et al.*, 2004; Gadanho e Sampaio, 2005) e procariotas (Valério *et al.*, 2005; Chambel *et al.*, 2007; Inês, 2007) de diferentes origens. Estas técnicas moleculares, normalmente com elevada reprodutibilidade, tornam-se instrumentos úteis na diferenciação de estirpes pertencentes a uma mesma espécie. Deste modo, para além do poder de diferenciação apresentam potencial de identificação a nível de espécie. A utilização de ERIC-PCR, por exemplo, foi usada por Nanda *et al.*, (2001) na identificação e caracterização de bactérias acéticas isoladas de vinagre de arroz. González *et al.*, (2004, 2005, 2006) aplicaram adicionalmente ao ERIC-PCR, REP-PCR na identificação e diferenciação de bactérias acéticas isoladas de mostos e vinhos. Mais recentemente Camu *et al.*, (2007) propuseram a utilização do *primer* (GTG)₅, obtendo uma boa discriminação com elevado grau de polimorfismos, em estirpes de bactérias acéticas isoladas de amostras de grãos de cacau fermentados. Resultados semelhantes foram obtidos por Papalexandratou *et al.*, (2009) quando submeteram 158 estirpes de referência representantes de 10 géneros e 48 espécies, à técnica de (GTG)₅-PCR *fingerprinting* na construção de um quadro de referência para uma rápida classificação e identificação de bactérias acéticas.

Na figura 11 apresenta-se o dendrograma obtido, após análise *in silico* dos perfis de M13-, ERIC- e (GTG)₅-PCR *fingerprinting* dos isolados em estudo, incluindo as estirpes de referência da CECT. Este dendrograma global foi construído com base nas matrizes de semelhança médias geradas a partir das matrizes de semelhança de cada técnica. Esta análise global, também designada por *composite* agrupa os dados referentes a dois ou mais tipos de experiência, traduzindo uma melhor e mais fidedigna análise das diferenças ou semelhanças entre os indivíduos. Com o objetivo de identificar os isolados em estudo, foram também introduzidos os perfis genotípicos obtidos para as estirpes de referência (35, 36, 37, 38, 80, 81 e 82) assinaladas na figura. Como consequência da elevada variabilidade genotípica observada, salienta-se a reduzida similaridade entre as estirpes de referência e os isolados em estudo.

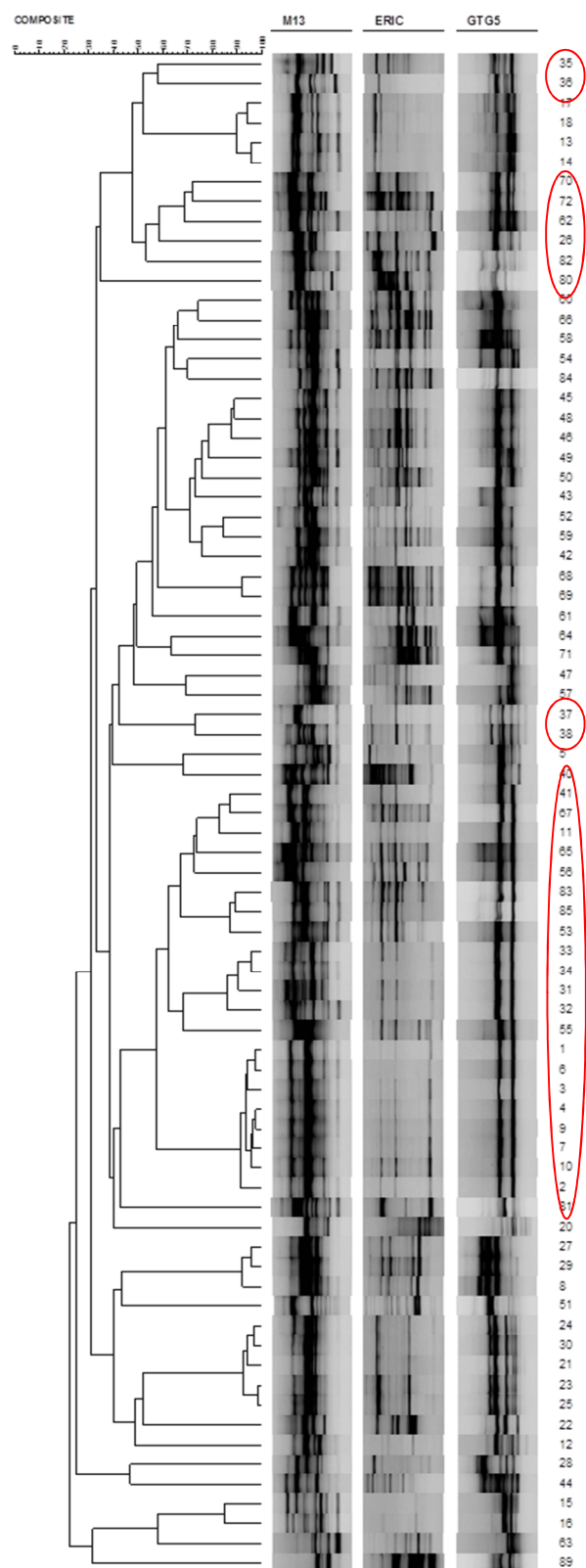


Figura 11 - Dendrograma construído a partir da matriz de semelhança média resultante da análise *in silico* dos perfis de M13, ERIC, GTG₅-PCR *fingerprinting* dos 70 isolados de bactérias acéticas em estudo e das 7 estirpes de referência da CECT

Assim:

- (i) As estirpes de referência 35 (*Acetobacter aceti* CECT 298^T) e 36 (*Gluconobacter oxydans* CECT 360) agruparam entre si com um nível de semelhança de 57.7%.
- (ii) A estirpe 82 (*Acetobacter oeni* CECT 5830^T) apresentou um nível de semelhança de 53.4% com os isolados 26, 62, 72 e 70.
- (iii) Externamente ao *cluster* anteriormente definido surge outra estirpe de referência, a estirpe 80 (*Gluconobacter oxydans* CECT 315) com um nível de semelhança de 34.8%.
- (iv) As estirpes de referência 37 (*Acetobacter pasteurianus* CECT 824) e 38 (*Acetobacter* sp CECT 944) agruparam entre si com um nível de semelhança de 73.0%.
- (v) A estirpe de referência 81 (*Gluconacetobacter xylinus* CECT 473) agrupou com um com um nível de semelhança de 48.0% com 21 estirpes.

Contrariamente, De Vuyst *et al.*, (2008) obtiveram bons resultados com a técnica de (GTG)₅ - PCR *fingerprinting* na classificação e identificação de 132 isolados de bactérias acéticas de grãos de cacau fermentados propondo a validação desta técnica de PCR *fingerprinting* como um método rápido para a classificação e identificação de bactérias acéticas. Deve salientar-se que no referido estudo, os autores utilizaram para validar o potencial desta metodologia na identificação a nível de espécie, 64 estirpes de referência, incluindo todas as espécies de *Acetobacter* até então descritas e validadas (35 estirpes), 12 espécies de *Gluconacetobacter* (25 estirpes), *Gluconobacter oxydans* (1 estirpe) e outras bacterias acéticas, nomeadamente *Asaia bogorensis*, *Asaia siamensis*, *Acidomonas methanolica*.

Como mencionado anteriormente, outros autores consideram ERIC-PCR *fingerprinting* como um método apropriado para a identificação e tipificação de bactérias acéticas (Nanda *et al.*, 2001; González *et al.*, 2005; Gullo *et al.*, 2009). No entanto, os nossos resultados mostraram também que os *clusters* formados pelos perfis de ERIC-PCR dos isolados apresentam reduzida correlação com as espécies de referência e com a origem do isolado. Resultados semelhantes foram observados por Fernández-Pérez *et al.*, (2010) que propõem análise de macrorestrição por PFGE como método eleito para a tipificação de isolados de bactérias acéticas.

Como consequência da limitada capacidade revelada pelas técnicas de PCR *fingerprinting* utilizadas na identificação dos isolados em estudo, no intuito de complementar a sua identificação a nível de espécie, procedeu-se à sequenciação parcial do rDNA 16S de alguns isolados selecionados aleatoriamente para o efeito.

No quadro 7 sumarizam-se os resultados da comparação das sequências parciais do rDNA 16S com as disponíveis na base de dados GenBank, utilizando o algoritmo BLASTN. Para cada sequência obtida e analisada, foi seleccionada a sequência da espécie com que apresentava maior semelhança e apresentam-se os correspondentes valores de homologia e (sobreposição) cobertura. Para além destes resultados, os parâmetros *score* (bits) e valor E traduzem a qualidade dos alinhamentos produzidos entre a sequência a identificar e as sequências disponíveis na base de dados.

Quadro 7 - Resultados da aplicação do algoritmo BLASTN para comparação das sequências parciais de rDNA 16S das estirpes seleccionadas com as disponíveis nas bases de dados públicas (GenBank, 2012).

Isolados BAA	Nº de acesso Gene Bank	Espécie	Pontuação máx.	Total de cobertura	Valor E	Identities	Máx. Ident.
7	NR_026107.1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1500	98%	0.0	821/825	99%
8	NR_040832.1	<i>Acetobacter lovaniensis</i>	1498	98%	0.0	820/825	99%
11	NR_026107.1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1500	98%	0.0	820/824	99%
12	NR_026224.1	<i>Gluconobacter frateurii</i>	1509	98%	0.0	822/824	99%
22	NR_025513.1	<i>Acetobacter malorum/cerevisiae</i>	1467	96%	0.0	801/804	99%
26	NR_026107.1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1500	98%	0.0	819/823	99%
33	NR_026107.1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1469	97%	0.0	812/819	99%
40	NR_026107.1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1402	98%	0.0	805/826	97%
41	NR_026107.1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1506	98%	0.0	820/823	99%
49	NR_026121.1	<i>Acetobacter aceti</i>	1489	98%	0.0	818/824	99%
52	NR_026107.1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	159	25%	7,00E-39	181/225	80%
55	NR_026107.1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1489	97%	0.0	816/821	99%
61	NR_026121.1	<i>Acetobacter aceti</i>	1483	98%	0.0	817/824	99%
66	NR_025513.1	<i>Acetobacter malorum/cerevisiae</i>	1480	96%	0.0	803/804	99%
69	NR_025513.1	<i>Acetobacter malorum/cerevisiae</i>	1480	96%	0.0	803/804	99%
72	NR_026107.1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1504	98%	0.0	821/824	99%
89	NR_026107.1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1483	98%	0.0	815/821	99%

Tendo em consideração as recomendações do Comité *ad hoc* para a re-avaliação da definição de espécie em Bacteriologia (Stackebrandt et al., 2002), isolados pertencentes à mesma espécie devem apresentar valores de homologia de rDNA 16S iguais ou superiores a 97%.

Pela análise dos resultados das sequências parciais do rDNA 16S dos 17 isolados, 10 isolados foram identificados como *Acetobacter pasteurianus*, 3 isolados identificados como *Acetobacter malorum*/*Acetobacter cerevisiae*, 2 isolados identificados como *Acetobacter aceti*, 1 isolado identificado como *Acetobacter lovaniensis*. Apenas 1 isolado (isolado 12) foi identificado como pertencente à espécie *Gluconobacter frateurii*. Este resultado corrobora a identificação a nível de género anteriormente realizada, obtida pelo cultivo dos isolados nos meios Carr e Frateur agar. Pelo contrário, com base nos resultados do crescimento nos referidos meios, os isolados (40, 41, 72 e 61) foram incorretamente identificados, como pertencentes ao género *Gluconobacter*. A sua identificação após análise dos resultados da sequenciação, revelou que os 3 primeiros isolados pertencem à espécie *Acetobacter pasteurianus* e o isolado 61 à espécie *Acetobacter aceti*. Os resultados da sequenciação parcial do rDNA 16S dos isolados (22, 66 e 69) não permitem atribuir-lhes uma identificação a uma única espécie, mas sim a duas, *Acetobacter malorum*/*Acetobacter cerevisiae*. De facto, os 2 isolados apresentavam todos os valores iguais para os diferentes parâmetros apresentados no quadro 7. De acordo com Prieto *et al.*, (2007) estas duas espécies diferem apenas em 5 pb em sequências com tamanhos de 600 bp.

Deve salientar-se que, a sequência parcial do rDNA 16S obtida para o isolado 52, de inferior qualidade e reduzida cobertura (sobreposição), apesar de não cumprir o critério anteriormente referido, foi considerada na identificação a nível de espécie do referido isolado para o estudo posterior na tipificação das estirpes da espécie *Acetobacter pasteurianus* (Figura 12). Verificámos que os 2 isolados (7, 33) provenientes de amostras de vinagres de vinho obtido por processos tradicionais pertenciam à espécie *Acetobacter pasteurianus*. De acordo com Hidalgo *et al.*, (2012) as espécies de *Acetobacter* estão sempre associadas com a produção de vinagre de vinho, enquanto que as espécies de *Gluconacetobacter* estão mais associadas com a produção de vinagre em sistema de submersão, onde as condições são mais extremas.

4.3.2 Tipificação

Pelo reduzido potencial das técnicas de PCR *fingerprinting* na identificação dos isolados, já referido anteriormente, e após sequenciação, optou-se por tipificar (caracterizar) apenas 26 estirpes de *Acetobacter pasteurianus*, cuja identificação foi obtida por sequenciação ((n=10), isolados 7, 11, 26, 33, 40, 41, 52, 55, 72, 89) e por

inferência pela elevada semelhança com as estirpes anteriores ((n=12), isolados: 1, 2, 3, 4, 6, 9, 10, 31, 32, 34, 53, 67) e as estirpes de referência ((n=4), 37, 83, 84 e 85).

Na Figura 27 apresenta-se o dendrograma obtido, após análise *in silico* dos perfis de M13-, ERIC- e GTG₅-PCR *fingerprinting* das estirpes de *Acetobacter pasteurianus* em estudo, incluindo a estirpe (37) de referência CECT 824.

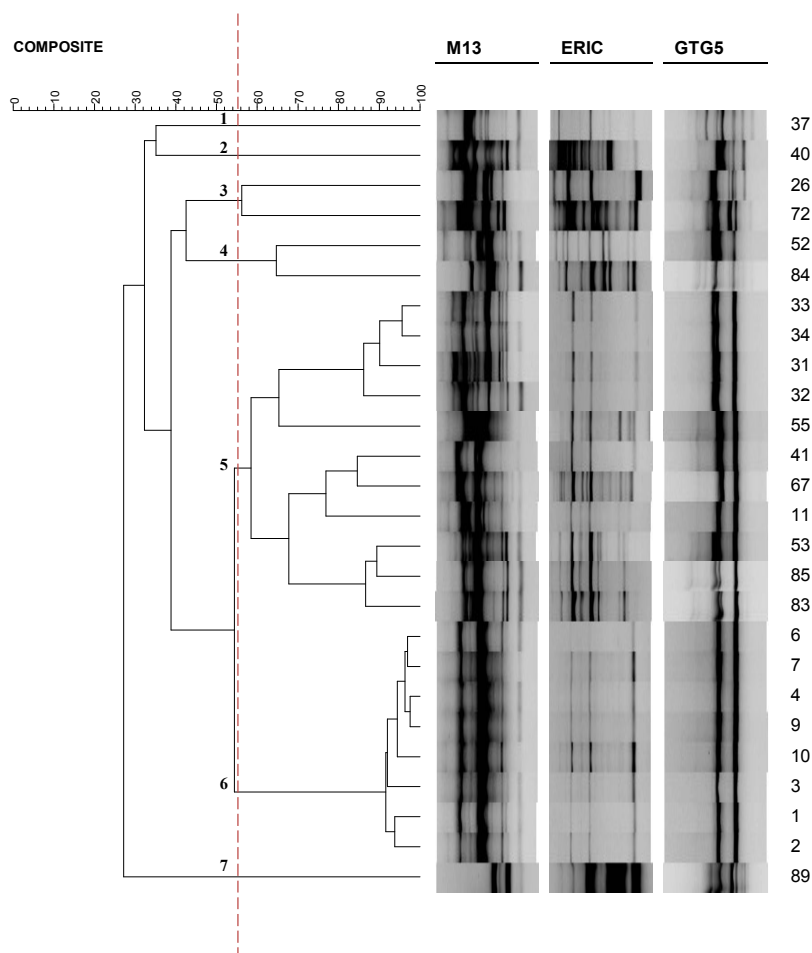


Figura 12 - Dendrograma construído a partir da matriz de semelhança média resultante da análise *in silico* dos perfis de M13, ERIC, GTG₅-PCR *fingerprinting* das estirpes identificadas como *Acetobacter pasteurianus* e a estirpe de referência

Se se considerar um nível de corte arbitrário a aproximadamente 55% de semelhança obtêm-se sete *clusters* (Figura 12), sendo os *clusters* 1, 2 e 7, constituídos por apenas 1 estirpe cada, os *clusters* 3 e 4 constituídos por 2 estirpes cada, e os *clusters* 5 e 6 englobam um maior número de estirpes de *Acetobacter pasteurianus* com maior similaridade, 11 e 8 respetivamente.

O *cluster* 5 é formado pelas estirpes (31, 32, 33 e 34) provenientes da mesma amostra de vinagre (amostra A36) e 1 estirpe (11) isolada de outra amostra de vinagre

(amostra A27), estando as restantes estirpes de *Ac. pasteurianus* isoladas a partir dessa amostra no *cluster* 6. As restantes estirpes foram isoladas de amostras de vinhos.

O *cluster* 6, é formado por estirpes que são muito semelhantes entre si (%id=91,6), as estirpes 6, 7, 2 e 3 provenientes da mesma amostra de vinagre (amostras A6 e A6'), estirpes 9 e 10 provenientes de outra amostra de vinagre (amostra A27 e as estirpes 1 e 4 isoladas de vinho azedo. Poderemos referir que as estirpes 6 e 7 provavelmente são clones da mesma estirpe, dada a elevada similaridade e mesma origem. Já as restantes estirpes apesar da elevada similaridade, provêm de amostras distintas de vinagres tradicionais recolhidos em locais geograficamente distantes e 1 amostra de vinho azedo. As restantes estirpes provenientes de amostras de vinhos (40, 72, 52, 84), a estirpe de referência (37), e as restantes 2 estirpes isoladas de uvas podres (estirpe 26) e de uvas sãs (89) apresentam perfis genotípicos mais diversos, agrupando-se em *clusters* constituídos por 1 ou 2 estirpes.

Agregando os perfis genotípicos e fenotípicos das estirpes de *Acetobacter pasteurianus* (figura 13), podemos estabelecer uma relação entre os grupos definidos pela caracterização genotípica com os perfis fenotípicos. A estirpe 89 afasta-se de todas as outras pelo seu perfil genotípico bem como pelo seu perfil fenotípico traduzido na elevada sensibilidade às condições de *stress* testadas. O grupo constituído por 8 isolados, mais homogêneo genotipicamente, é caracterizado por um perfil fenotípico também ele semelhante, traduzido na elevada sensibilidade ao SO₂ às três temperaturas testadas.

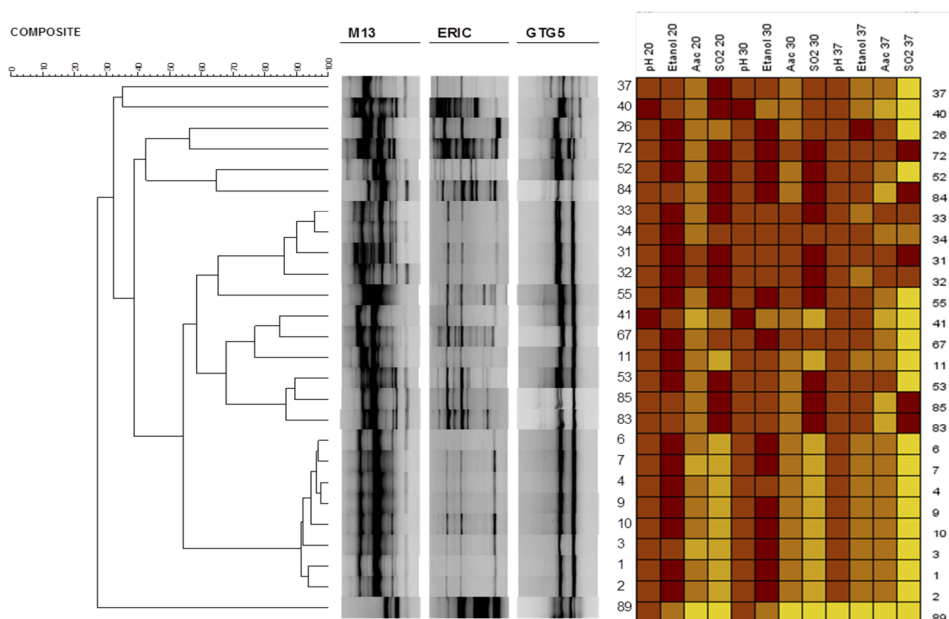


Figura 13 – Perfis genotípico e fenotípico das estirpes identificadas como *Acetobacter pasteurianus*

4.4 Aminas biogénicas

As aminas biogénicas são compostos biológicos presentes em alimentos fermentados que quando presentes em elevadas concentrações constituem um risco para a saúde humana. Neste trabalho, a capacidade de produção de aminas biogénicas (histamina, tiramina e putrescina) foi testada nos 70 isolados de bactérias acéticas. Apenas um número restrito de isolados demonstrou capacidade de produção de histamina (3%) e putrescina (5%) (figura 14), dos quais se destacam os isolados 22 e 89 que produziram ambas as aminas. Nenhum dos isolados da nossa coleção demonstrou capacidade para produzir tiramina.

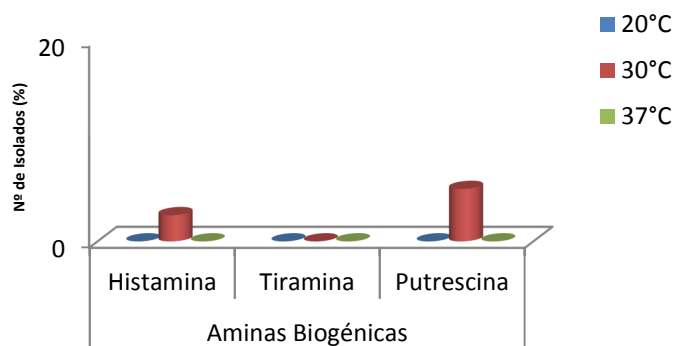


Figura 14 – Produção de aminas biogénicas (histamina, tiramina e putrescina) a diferentes temperaturas

Estudos anteriores (Smit 2007 e Landete *et al.*, 2007) sugerem que bactérias acéticas provenientes de vinho e mosto de uva, não são produtoras de aminas biogénicas. Contudo, em 2009, Chang *et al.*, verificou que *Acetobacter pasteurianus* conseguia produzir 18.2 mg / mL de histamina. Na figura 15 apresenta-se um resultado positivo obtido na produção de putrescina.

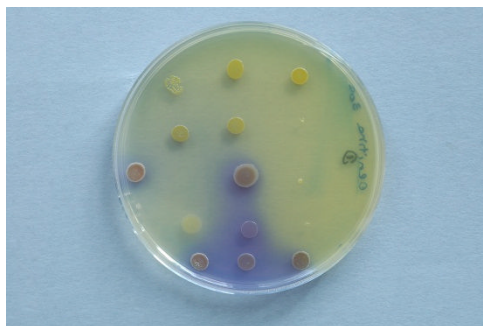


Figura 15 – Exemplo de resultado positivo da produção de putrescina

4.5 Perfil de suscetibilidade dos antibioticos

Recentemente têm surgido referências a infecções oportunistas atribuídas a algumas espécies de bactérias acéticas, nomeadamente, *Acetobacter cibiningensis* (Gouby *et al.*, 2007) *Acetobacter indonesiensis* (Bittar *et al.*, 2008) e *Gluconobacter* spp. (Alauzet *et al.*, 2010). A informação relativa à suscetibilidade destas bactérias a diferentes antibióticos é escassa, estando limitada a apenas algumas estirpes clínicas testadas *in vivo* (Snyder *et al.*, 2004; Gouby *et al.*, 2007; Bittar *et al.*, 2008) e *in vitro* (De Ley *et al.*, 1984; Greenberg *et al.*, 2006; Juretschko *et al.*, 2010; Alauzet *et al.*, 2010).

Neste trabalho, foi realizado o perfil de suscetibilidade de 21 estirpes de seleccionadas aleatoriamente dentro da nossa coleção de bactérias acéticas, a 27 antibióticos de diferentes grupos. O perfil de suscetibilidade dos isolados obtido é apresentado na figura 16. A tabela com os perfis individuais das estirpes em estudo encontram-se no anexo II.

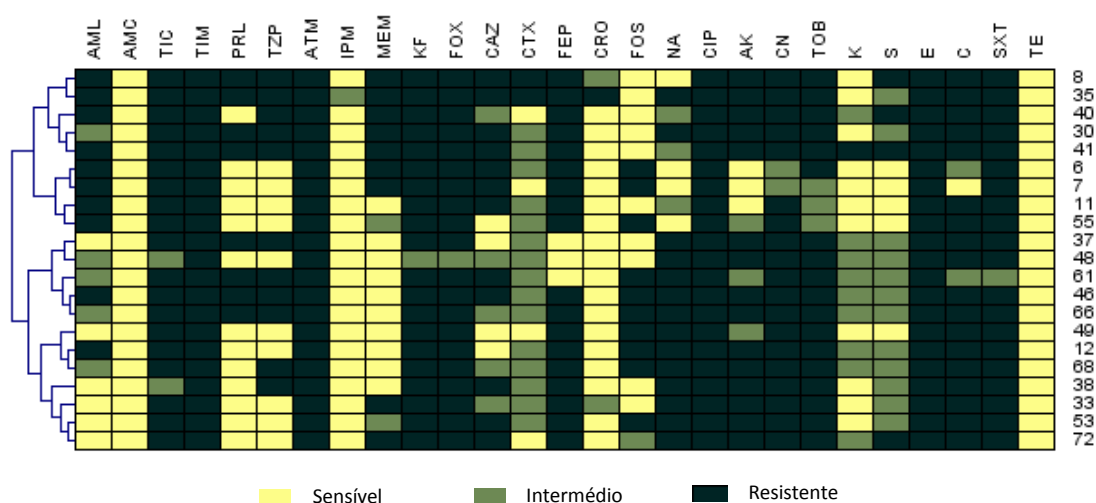


Figura 16 – Perfil de suscetibilidade de 21 isolados de bactérias acéticas

(Amoxicilina (AML₁₀), Amoxicilina + Ácido Clavulânico (AMC₃₀), Piperacilina (PRL₁₀₀), Piperacilina + Tazobactam (TZP₁₁₀), Ticarcilina (TIC₇₅), Ticarcilina + Ácido Clavulânico (TIM₈₅); Cefalotina (KF₃₀), Cefoxitina (FOX₃₀); Cefotaxima (CTX₃₀), Ceftazidima (CAZ₃₀), Ceftriaxona (CRO₃₀), Cefepima (FEP), Aztreonam (ATM₃₀), Imipenem (IPM₁₀), Meropenem (MEM₁₀), Fosfomicina (FOS₅₀), Gentamicina (CN₁₀), Canamicina (K₃₀), Tobramicina (TOB₁₀), Amicacina (AK₃₀), Estreptomicina (S₁₀), Tetraciclina (TE₃₀), Ácido Nalidixico (NA₃₀); Ciprofloxacina (CIP₅), Eritromicina (E₁₅), Co-trimoxazol (SxT₂₅) e Cloranfenicol (C₃₀)).

Pela análise da figura 16 podemos verificar que 62% das estirpes estudadas apresentaram resistência à amoxicilina. A administração de amoxilina mostrou ser eficaz no tratamento de uma infecção clínica por *Acetobacter cibinongensis* (Gouby *et*

al., 2007). Uma grande percentagem dos isolados (90%) foi resistente à ticarcilina sendo que dois isolados apresentaram fenótipo de classificação intermédia. Constatamos, que a associação do inibidor de β -lactamases, o ácido clavulânico com a amoxicilina, foi eficiente na eliminação de fenótipos de resistência. Pelo contrário, quando associado à ticarcilina este inibidor não foi eficiente, sendo que todos os isolados foram resistentes. Igualmente, verificamos que a associação de tazobactam à piperacilina resultou num aumento do número de isolados com resistência.

Relativamente à cefalotina e à cefoxitina, todas as estirpes foram resistentes a estes antibióticos exceto um isolado classificado como intermédio. Verificámos ainda que 100% das estirpes testadas foram resistentes à ticarcilina.

Estes isolados revelaram uma elevada percentagem de resistência de 90 e 71% respetivamente, para a cefepima e a ceftazidima. Quanto à ceftriaxona, as estirpes mostraram ter 91% de sensibilidade, já quanto à cefotaxima, as estirpes classificam-se maioritariamente como intermédias (71%).

Os nossos resultados revelaram que 100% das estirpes estudadas são resistentes ao aztreonamo.

Para os carbapenemos testados, o imipenemo e meropenemo, as estirpes mostraram ter perfis de suscetibilidade elevado (95% e 48% respetivamente). Estes resultados são de realçar pelo facto de este antibiótico ser de último recurso em estirpes nosocomiais multirresistentes. Esta sensibilidade demonstrada pelos isolados confirma-se em outros estudos (Alauzet *et al.*, 2010)

Quanto à tetraciclina os resultados revelaram que 100% das estirpes estudadas eram sensíveis, o que não se verificou no estudo realizado por De Ley *et al.* (1984b) pois apresentavam uma média de 42% de estirpes resistentes. Mas de acordo com os resultados de Alauzet e seus colaboradores (2010) foi a este antibiótico que as estirpes de *Gluconobacter* e de *Asaia bogoriensis* se mostraram mais sensíveis.

No presente trabalho observamos que para as quinolonas testadas todas as estirpes de bactérias acéticas eram resistentes à ciprofloxacina, enquanto a resistência revelada ao ácido naladixico foi de 67%, valor este que não se distancia muito dos resultados (77.5%) obtido por De Ley e seus colaboradores (1984b). No entanto os isolados deveriam ter sido mais sensíveis à ciprofloxacina do que ao ácido nalidixico, uma vez que a ciprofloxacina é uma fluoroquinolona, uma quinolona de 2ª geração.

As estirpes apresentaram uma elevada resistência aos aminoglicosídeos, ampicilina (71%), gentamicina (90%) e tobramicina (86%), sendo que para a canamicina

(5%), a sensibilidade predomina no perfil. De realçar que isolados clínicos foram sensíveis à gentamicina (Snyder *et al.*, 2004; Tuuminee *et al.*, 2006; Greenberg *et al.*, 2006; Abdel-Haq *et al.*, 2009; Juretschko *et al.*, 2010), e que embora nos nossos resultados não exista nenhuma estirpe sensível à tobramicina, Bittar e seus colaboradores (2008) utilizaram este antibiótico para o tratamento eficaz de um paciente.

Neste estudo, 81% das estirpes analisadas foram sensíveis à estreptomicina.

Quanto à eritromicina, 100% das estirpes foram resistentes. Resultados semelhantes foram obtidos por de Ley e seus colaboradores (1984b) que observaram que 96% das suas estirpes eram resistentes a este antibiótico.

Quanto à fosfomicina 48% das estirpes testadas, apresentaram resistência. Relativamente ao sulfametoxazol-trimetoprim, 95% das estirpes foram resistentes a este antibiótico.

No que se refere à tetraciclina verificou-se que todas as estirpes analisadas, foram sensíveis a este antibiótico. Quanto ao cloranfenicol, 95% das estirpes foram resistentes, semelhantes valores foram obtidos por De Ley *et al.*, 1984b.

Neste trabalho todas as estirpes estudadas apresentaram resistência a três ou mais antibióticos de grupos diferentes (multiresistência). Dos 21 isolados submetidos ao teste de sensibilidade a antimicrobianos, 14% apresentaram resistência a 17, a 16, a 15, a 14 e a 13 antibióticos, em combinações diferentes.

5. Considerações Finais

Os resultados deste trabalho permitiram classificar fenotipicamente os isolados da coleção em estudo, provenientes de uvas, mostos, vinhos alterados e vinagres caseiros, nos géneros *Gluconobacter* e *Acetobacter/Gluconacetobacter*, através da utilização do meio de cultura Carr agar.

A tolerância/ resistência ao etanol, ao ácido acético e ao SO₂ foi inversamente correlacionada com a temperatura de crescimento.

Foram detetadas em 6 estirpes a atividade da histidina e ornitina descarboxilases. Do nosso conhecimento é a primeira vez que se mostra a capacidade destas bactérias produzirem estas aminas biogénicas o que levanta questões de segurança alimentar que deverão ser consideradas em trabalhos futuros.

Não foi possível a identificação das espécies através de PCR-*fingerprinting* por comparação com 7 estirpes de referência da CECT. Isto pode dever-se ao elevado número de espécies, heterogeneidade e diversidade das estirpes da família *Acetobacteriaceae*. Assim a utilização da técnica PCR-*fingerprinting* com os *primers* M13, GTG₅ e ERIC permitiu apenas de forma simples tipificar os isolados, sendo possível detetar estirpes geneticamente semelhantes entre si e distintas. Como perspectiva futura poderíamos utilizar outras técnicas para ajudar na identificação tal como o ITS-ARDRA (Ruiz *et al.*, 2000, Trcek e Teuber, 2002, González *et al.*, 2006b e Trček e Raspor 1999).

Conseguimos constituir um grupo de estirpes apenas de *Acetobacter pasteurianus* que apresentaram os perfis genotipicos e fenotipicos semelhantes.

Pode-se ainda salientar que os isolados muito semelhantes estão presentes em várias etapas do processo de acetificação, pela observação de perfis genotipicos com elevada semelhança pertencentes a isolados da mesma amostra, retirados em tempos de amostragem diferentes.

No que se refere aos perfis de suscetibilidade aos antibióticos testados conclui-se que a piperaciclina, piperacilina + tazobactam, amoxicilina + ácido clavulânico, imepenemo, tetraciclina e a ceftriaxona apresentavam boa atividade contra as bactérias acéticas. Detetou-se multiresistência em todos os isolados, sendo de salientar que em 14% das estirpes analisadas foi observada multiresistência a dezassete antibióticos. Os resultados alertam para o facto de que isolados da mesma espécie podem apresentar comportamentos de suscetibilidade diferente aos grupos de antibióticos. Como

perspectiva futura seria interessante estudar a presença de genes associados aos mecanismos de resistência aos diferentes antibióticos. Para outras espécies bacterianas já se encontram os genes descritos como por exemplo, os genes *gyr A* e *gyr B* que codificam a topoisomerase II para as quinolonas, o gene *erm* mediado por uma metilase para a eritromicina, o gene *cat* para as O-acetiltransferases bacterianas para o cloranfenicol, os genes *dhps* e *dhfr* para estruturas enzimáticas que lhes conferem baixa afinidade para os compostos antibacterianos, para as sulfonamidas, o gene *aac(6')* que codifica a acetiltransferase e o gene *ant (4')* para os aminoglicosídeos e o gene *mecA* que codifica as PBPs (Penicilin-Binding-Proteins) para os β -lactâmicos.

6. Referências Bibliográficas

- Abdel-Haq, N., Savasan, S., Davis, M., Asmar, B. I., Painter, T. & Salimnia, H. (2009). *Asaia lannaensis* bloodstream infection in a child with cancer and bone marrow transplantation. *J Med Microbiol* **58**, 974–976.
- Adachi, O., Tanasupawat, S., Yoshihara, N., Toyama, H., and Matsushita, K. (2003). 3-Dehydroquinone production by oxidative fermentation and further conversion of 3-dehydroquinone to the intermediates in the shikimate pathway. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**: 2124–2131.
- Alauzet, C., Teyssier, C., Jumas-Bilak, E., Gouby, A., Chiron, R., Rabaud, C., Counil, F., Lozniewski, A. e Marchandin, H. (2010). *Gluconobacter* as Well as *Asaia* Species, Newly Emerging Opportunistic Human Pathogens among Acetic Acid Bacteria. *American Society for Microbiology*, **48**, 3935-3942.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. e Lipman, D. J. (1997) - Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25** (17), 3389-3402.
- Amoa-Awua, W.K., Sampson, E. e Tano-Debrah, K. (2006). Growth of yeasts, lactic and acetic acid bacteria in palm wine during tapping and fermentation from felled oil palm (*Elaeis guineensis*) in Ghana. *Journal of Applied Microbiology* **102**, 599-606.
- Bartowsky, E.J. e Henschke, P.A. (2008). Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine. *International Journal of Food Microbiology*, **125**, 60-70.
- Bartowsky, E.J., Xia, D., Gibson, R.L., Fleet, G.H. e Henschke, P.A. (2003). Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, **36**, 307-314.
- Belova, S.E., Pankratov, T.A., Detkova, E.N., Kaparullina, E.N. e Dedysh, S.N. (2009) *Acidisoma tundrae* gen. nov., sp. Nov. and *Acidisoma sibiricum* sp. Nov., two acidophilic psychrotolerant members of the *Alphaproteobacteria* from acidic northern wetlands. *International Journal of Systematic and evolutionary Microbiology*, **59**, 2283-2290.
- Benito, Á.G. (2005). Application of molecular techniques for identification and enumeration of acetic acid bacteria. PhD thesis Universitat Rovira I Virgili.
- Bittar, F., Reynaud-Gaubert, M., Thomas, P., Boniface, S., Raoult, D. e Rolain, JM. (2008). *Acetobacter indonesiensis* Pneumonia after Lung Transplant. *Emerging Infectious Diseases*, **14**, 997-998.
- Boehr, D. D., Thompson, P. R., e Wright, G. D. (2001). Molecular Mechanism of Aminoglycoside Antibiotic Kinase APH (3*) - IIIa. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 23929–23936.
- Boesch, C., Trcek, J., Sievers, M. e Teuber, M. (1998). *Acetobacter intermedius* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* **21**, 220-229.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., Vancanneyt, M., e De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1809–1824.
- Capece A., Salzano G., e Romano P., (2003). Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species, *Int. J. Food Microbiol.* **84**:33-39.

- Chambel, L.; Sol, M.; Fernandes, I.; Barbosa, M.; Zilhão, I.; Barata, B.; Jordan, S.; Perni, S.; Shama, G.; Adrião, A.; Faleiro, L.; Requena, T.; Peláez, C.; Andrew, P. e Tenreiro, R. (2007).** Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. *Int J Food Microbiol* **116**: 52-63.
- Chang, SC., Lin, CW., Jiang, CM., Chen HC., Shih, MK., Chen YY. e Tsai,YH. (2009)** Histamine production by bacilli bacteria, acetic bacteriaand yeast isolated from fruit wines. *Food Science and Technology* **42**, 280–285.
- Chopra, I. e Roberts, M. (2001)** Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviw*s. **65** (2): 232-260.
- Cleenwerck, I., Camu, N., Engelbeen, K., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., De Vos, P. e De Vuyst, L. (2007).** *Acetobacter gahnensis* sp. nov., a novel acetic acid bacteria isolated from traditional heap fermentation of Ghanaian cocoa beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 1647-1652.
- Cleenwerck, I. e De Vos, P. (2008).** Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: An overview of the currently applied methodology. *International Journal of Food Microbiology*, **125**, 2-14.
- Cleenwerck, I., González, A., Camu, N., Engelbeen, K., De Vos, P., e De Vuyst, L. (2008).** *Acetobacter fabarum* sp. nov., an acetic acid bacterium from a Ghanaian cocoa bean heap fermentation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 2180-2185.
- Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D., e Swings, J., (2002).** Reexamination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1551–1558.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2006).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI/NCCLS M100-S16. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA.
- Dellaglio, F., Cleenwerck, I., Felis, G.E., Engelbeen, K., Janssens, D. e Marzotto, M. (2005).** Description of *Gluconacetobacter swingsii* sp. nov. and *Gluconacetobacter rhaeticus* sp. nov., isolated from Italian apple fruit. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 2365–2370.
- De Ley, J., Gillis, M. e Swings, J. (1984a).** Family VI *Acetobacteraceae*. Em: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1, Williams e Wilkens, Maryland, U.S.A., 267-268.
- De Ley, J., Gosselé, F. e Swings, J. (1984b).** Genus I *Acetobacter*. Em: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1, Williams e Wilkens, Maryland, U.S.A., 268-274.
- De Ory, I., Romero, L. E. e Cantero, D. (1998).** Modelling the kinetics of growth of *Acetobacter aceti* in discontinuous culture: influence of the temperature of operation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **49**, 189-193.
- De Vero, L. e Giudici, P. (2008).** Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology*, **125**, 96-101.
- De Vuyst, L., Camu, N., De Vinter, T., Vandemeulebroecke, K., Van de Perre, V., Vacanneyt, M., De Vos, P., e Cleenwerck, I., (2008).** Validation of the (GTG)(5)-REP- PCR fingerprinting technique for

rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *Int. J. Food Microbiol.* **125**, 79e90.

De Wulf, P., Soetaert, W., e Vandamme, E. J. (2000). Optimized synthesis of L-sorbose by C(5)-dehydrogenation of D-sorbitol with *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol. Bioeng.* **3**: 339–343.

Drysdale, G. S. e Fleet, G.H. (1985). Acetic acid bacteria in some Australian wines. *Food Technology in Australia*, **37**(1).

Drysdale, G. S. e Fleet, G.H. (1988). Acetic acid bacteria in winemaking: A Review. *American Journal for Enology and Viticulture*, **39** (2).

Drysdale, G. S. e Fleet, G.H. (1989a). The growth and survival of acetic acid bacteria in wines at different concentrations of oxygen. *American Journal for Enology and Viticulture*, **40**, 99-105.

Drysdale, G. S. e Fleet, G.H. (1989b). The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeasts during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology*, **67**, 417-481.

Du Toit, W.J. e Lambrechts, M.G. (2002). The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* **74**, 57 – 64.

Du Toit W.J., Pretorius, I.S. e Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, **98**, 862–871.

Du Toit W.J., e Pretorius, I.S. (2002). The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Annals of Microbiology*, **52**, 155-179.

Dutta, D. e Gachhui, R. (2006). Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 1899-1903.

Dutta, D. e Gachhui, R. (2007). Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. Nov., isolated from Kombucha tea. *International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**, 353-357.

Fernández-Pérez, R., Torres, C., Sanz, S., e Ruiz-Larrea, F., (2010). Strain typing of acetic acid bacteria responsible for vinegar production by the submerged elaboration method. *Food Microbiol.* **27**(8):973-8. Epub 2010 Jun 1.

Ferrão, J.E.M. (2002). Cacau – Tecnologia Pós-Colheita. Ligalau edições: Lisboa. Pág. 173-184; 199-218.

Franke, I.H., Fegan, M., Hayward, C., Leonard, G., Stakebrandt, E. e Sly, L. I. (1999). Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf of sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 1681-1693.

Fuentes-Ramírez, L.E., Bustillos-Cristales, R., Tapia-Hernandez, A., Jimenez- Salgado, T., Wang, E.T., Martinez-Romero, E., e Caballero-Mellado, J., (2001). Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 1305–1314.

Fugelsang, K.C. e Edwards, C.G. (2007). *Wine Microbiology – Practical Applications and Procedures*. Springer. Páginas 254-271

- Fugelsang, K.C.** (1997). Wine Microbiology. The Chapman & Hall Enology Library. Páginas: 62-67.
- Garrity G.M., Lilburn T.G., Cole J.R., Harrison S.H., Euzéby J. e Tindall B.J.** (2007). Taxonomic outline of the Bacteria and Archaea., Release 7.7. Michigan State University Board of Trustees. DOI: 10.1601/Toba7.7.
- Fukaya, M., Takemura, H., Tayama, K., Okumura, H., Kamamura, Y., Horinouchi, S. e Beppu, T.** (1993) The *aarC* gene responsible for acetic acid assimilation confers acetic acid resistance on *Acetibacter aceti*. *J. Ferment. Bioengin.* **76**: 270-275.
- Gadanhó, M. e Sampaio, J.** (2005) Occurrence and diversity of yeasts in the mid-Atlantic ridge hydrothermal fields near the azores archipelago. *Microb. Ecol.* **50**: 408-417.
- Gilman, A. G., Goodman, L. S., e Gilman, A.,** (1996). *The Pharmacological basis of therapeutics*, 9ª Edition. New York. Macmillan Publishing Co., Inc.
- Giroud, J. P., Mathé, G., Meyniel, G., Advenier C., Benoist, J. M., Duchene-Marullaz, P., Loiseau, P., Montastrue, J. L., Philipon, A., Regoli, D., Simon, P., e Tillement, J. P.,** (1988). *Pharmacologie clinique. Bases de la thérapeutique*, Paris. Expansion Scientifique Française.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., e Guillamón, J.M.** (2006a). Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR. *FEMS Microbiology Letters* **254**, 123-128.
- González, A., Guillamón, J.M., Mas, A., e Poblet, M.** (2006b). Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **108**, 141-146.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., e Guillamón, J.M.** (2004). Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in red wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 853-860.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M.,** (2005). Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International Journal of Food Microbiology* **102**, 295-304.
- Gouby, A., Teyssier, C., Vecina, F., Marchandin, H., Granolleras, C., Zorogniotti, I. and Jumas-Bilak, E.** (2007) *Acetobacter cibinongensis* Bacteremia in Human. *Emerging Infectious Diseases* Vol. **13**, No. 5, 784-785.
- Greenberg, D.E., Porcella, S.F., Stock, F., Wong, A., Conville, P.S., Murray, P.R., Holland, S.M. e Zelazny, A.M.** (2006). *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family *Acetobacteraceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 2609-2616.
- Guillamón, J.M. e Mas, A.** (2009). Chapter 2: Acetic Acid Bacteria. Em: *Biology of microorganisms on grapes, in must and in the wine*. König, H., Unden, G. e Fröhlich, J. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Guillamon, J.M., Gonzales, A., Poblet, M. e Mas, A.,** (2002). Development of molecular techniques for the analysis of acetic acid bacteria in winemaking. *Proceedings of Yeast-bacteria interactions*, Biarritz Eds City, 45-49.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L. e Giudici, P.** (2006). Characterization of acetic acid bacteria in "traditional balsamic vinegar". *International Journal of Food Microbiology* **106**, 209-212.
- Gullo, M. e Giudici, P.** (2008). Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *International Journal of Food Microbiology* **125**, 46-53.

- Gullo, M., De Vero, L., e Giudici, P.,** (2009). Succession of selected strains of *Acetobacter pasteurianus* and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2585e2589.
- Hidalgo, C., Mateo, E., Mas, A., e Torija, M.J.,** (2012). Identification of yeast and acetic acid bacteria isolated from the fermentation and acetification of persimmon (*Diospyros kaki*). *Food Microbiol.*,30(1):98-104.
- Hierro, N., González, A. and Mas, A** 2004. New PCR-based methods for yeast identification. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 792-80.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T.** (1994). Genus *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed., 71–84. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Hooper, D. C.,** 2001. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clinical Infections Diseases*, 32 (Suppl. 1), 9–15.
- Hungund, B. e Gupta, S.G.** (2010) Improved Production of Bacterial Cellulose From *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 2, 127-133.
- Imagem dos fermentadores.** Consultado em 21/02/2009. Disponível na WWW: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinagre/SistemaProducaoVinagre/acetificacao.htm>>.
- Inês, A.F.H.,** 2007. Abordagem polifásica na caracterização e seleção de bactérias do ácido láctico de vinhos da Região Demarcada do Douro. UTAD. Vila Real.
- Jacoby, G. A. e Sutton, L.** (1991) Antimicrob agentes chemother. 35, 164-169.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S. e Ribéreau-Gayon, P.** (1984a). Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 153-156.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S. e Ribéreau-Gayon, P.** (1984b). Metabolism of acetic acid bacteria in grape must: consequences on alcoholic and malolactic fermentation. *Science Alim.*, 4, 247-255.
- Juretschko, S., Beavers-May, T.K. e Stovall, S.H.** (2010) Nosocomial infection with *Asaia lannensis* in two paediatric patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Medical Microbiology*, 59: 848-852.
- Kappeng, K. e Pathom-aree, W.** (2009) Isolation of acetic acid bacteria from honey. *Maejo International Journal of Science and technology*, 3 (01), 71-76.
- Karovičová, J. e Kohajdová, Z.** (2003) Biogenic Amines in Food. Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Food technology, Slovak University of Technology.
- Katsura, K., Yamada, Y., Uchimura, T., e Komagata, K.,** (2002). *Gluconobacter asaii* Mason and Claus 1989 is a junior subjective synonym of *Gluconobacter cerinus* Yamada and Akita 1984. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1635–1640.
- Kittelman, M., Stamm, W. W., Follmann, H., e Truper, H. G.** (1989). Isolation and classification of acetic acid bacteria from high percentage vinegar fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 47–52.
- Komagata, K. e Suzuki, K.** (1987). Lipid and cell wall analysis in bacterial systematics. *Methods in Microbiology* 19, 161-206. Consultado em 8/04/2009. Disponível na www: <http://www.google.com/books?hl=pt-PT&lr=&id=yvwDqC0xBuUC&oi=fnd&pg=PA161&dq=lipid+and+cell+analysis+in+bacterial>

+systematics&ots=-Fz_U_Oc6x&sig=4nbXzJBjy1nYlhBnTl-7OpRBk#v=onepage&q=lipid%20and%20cell%20analysis%20in%20bacterial%20systematics&f=false

Kommanee, J., Tanasupawat, S., Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. e Yamada, Y. (2011) *Gluconobacter nephelii* sp. nov., an acetic acid bacterium in the class Alphaproteobacteria. *Int J Syst Evol Microbio*, **61**:2117-2122.

Krisch, J. e Szajáni, B. (1997). Ethanol and acetic acid tolerance in free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti*. *Biotechnology Letters*, Vol **19**, No 6, 525–528.

Kümmerer, K., 2004. Resistance in the environment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54**, 311-320.

Lacasse, D. (1995). Introdução á Microbiologia Alimentar. Editora ciência e técnica. Páginas, 167-195.

Landete, J.M.; Ferrer, S. e Pardo, I. (2007) Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeasts isolated from wine. *Food control*. **18**: 1569-1574.

Lasko, D.R., Zamboni, N. e Sauer, U. (2000) Bacterial response to acetate challenge: A comparison of tolerance among species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 243-247.

Levy, S. B, Marshall B., (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, **10** (Suppl), 122–129.

Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., e Komagata, K., (2000). Systematic study of the genus *Acetobacter* with descriptions of *Acetobacter indonensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *Acetobacter lovaniensis* (Frater 1950) comb. nov., and *Acetobacter estunensis* (Carr 1958) comb. nov. *Journal of General and Applied Microbiology* **46**, 147–165.

Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. e Komagata, K. (2001). Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **47**, 119-131.

Lisdiyanti, P., Navarro, R.R., Uchimura, T., e Komagata, K., (2006). Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 2101–2111.

Macauley, S., McNeil, B. e Harvey, L.M. (2001). The genus *Gluconobacter* and its applications in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, **21**, 1-25.

Malimas T., Yukphan P., Takahashi M., Kaneyasu M., Potacharoen W., Tanasupawat S., Nakagawa Y., Tanticharoen M., e Yamada Y. (2007) *Gluconobacter kondonii* sp. Nov., na acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **53**, 301-307.

Malimas T., Yukphan P., Takahashi M., Muramatsu Y., Kaneyasu M., Potacharoen W., Tanasupawat S., Nakagawa Y., Tanticharoen M., e Yamada Y. (2008a). *Gluconobacter sphaericus* (Ameyama 1975) comb. nov., a brown pigment-producing acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria. *J Gen Appl Microbiol.*, **54**(4):211-20.

Malimas, T., Yukphan P., Takahashi M., Muramatsu Y., Kaneyasu M., Potacharoen, W., Tanasupawat S., Nakagawa Y., Tanticharoen M., e Yamada Y. (2008b) *Gluconobacter roseus* (es

Asai 1935) sp. Nov., nom. Ver., a pink-colored acetic acid bacterium in the *Alphaproteobacteria*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **54**, 119-125.

Malimas, T., Yukphan P., Takahashi M., Muramatsu Y., Kaneyasu M., Potacharoen, W., Tanasupawat S., Nakagawa Y., Tanticharoen M., e Yamada Y. (2009a) *Gluconobacter japonicus* sp. Nov., ana aceti acid bactirum in the *Alphaproteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59**, 466-471.

Malimas, T., Yukphan P., Lundaa, T., Muramatsu Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat S., Nakagawa Y., Suzuki, K., Tanticharoen M., e Yamada Y. (2009b) *Gluconobacter kanchanaburiensis* sp. Nov., a Brown pigmente-producing acetic acid bacterium for Thai isolates in the *Alphaproteobacteria*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **55**, 247-254.

Majiduddin F. K., Materon, I. C., e Palzkill, T. G., (2002). Molecular analysis of *b*-lactamase structure and function. *International Journal of Medical Microbiology*, **292**, 127–137.

Martínez-Martínez, L., (2006). Mecanismos de adquisición de Resistencia a los antibióticos. Jano 20-26 Octubre 2006. nº 1. 624.

Martins, C. (2010) Caracterização fenotípica e genotípica de bactérias do ácido acético isoladas de uvas, mostos, vinhos e vinagres. UTAD. Vila Real

Mas, A., Torija, M.J., González, A., Poblet, M. e Guillamón, J.M. (2007). Acetic acid bacteria in oenology. *Contributions to Sciense*, **3** (4), 511–521.

Mason, L.M., e Claus, G.W., (1989). Phenotypic characteristics correlated with deoxyribonucleic acid sequence similarities for three species of *Gluconobacter*: *G. oxydans* (Henneberg 1897) De Ley 1961, *G. frateurii* sp. nov., and *G. asaii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**, 174–184.

Matsushita, K., Honobe, M., Shinagawa, E., Adachi, G. e Ameyama, M. (1985). Isolation e characterization of outer and cytoplasmatic membranes from spheroplasts of *Acetobacter*. *Antoine van Leewenhoek* **20**, 102.

Matsushita, K., Toyama, H. e Adachi, G. (1994). Respiration chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Advanced Microbial Physiology* **36**, 247-301.Consultado em 8/05/2009. Disponível na www: <PT&lr=&id=1WVxarK4rzUC&oi=fnd&pg=PA247&dq=respiration+chains+and+bioenergetics+of+acetic+acid+bacteri&ots=n6SMvdB1ww&sig=TKEBoinO2CHUH75xozFLCU3T2ns>

Meunier, J.R. e Grimont, P. A. D. (1993). Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research in Microbiology* **144**, 373-379.

Meyer, W., Mitchell, T.G., Freedman, E.Z., Borner T. e Mitchell, T.G. (1993). Hybrization probes for conventional DNA fringerprinting can be used as single primers in the PCR to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, **31**, 2274-2280.

Muyzer, G.; Hottentrager, S.; Teske, A. e Wawer, C. (1996) - *Molecular Microbial Ecology Methods*, Kluwer Academic Publishers, chapter Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA – A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities., pp. 3.4.4: 1-23.

Myers, R.M., Fischer, S. G., Lerman, L. S. e Manistis, T. (1985). Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel elctrophoresis. *Nucleic Acids Research* **13**, 3131-3145.

- Moonmangmee, D., Taloadtaigong, R., Saowaro, S., Moonmangmee, S. e Tanasapawat, S.** Vinegar making from Thai traditional alcoholic beverage, satoh. (http://plantpro.doae.go.th/worldfermentedfood/P_2_Duangtip.pdf, consultado em julho 2012).
- Montville, T.J. e Matthews, K.R.** (2008). Food Microbiology: An introduction. ASM Press, Washington, DC. 2nd edition, pag. 342-343.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Seshadri, S. e Lakshminarasimhan, C.** (2002) *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science*, Vol. **83**, No. 2, 137-145.
- Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H. e Murooka, Y.** (2001). Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (Komesu) and unpolished rice vinegar (Kurosu) produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, **67** (2), 986-990.
- Ndoye, B., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Dubois-Dauphin, R., Guiro, A. T., Van Trappen, S., Willems, A. e Thonart, P.** (2007). *Acetobacter senegalensis* sp. nov., a thermotolerant acetic acid bacterium isolated in Senegal (sub-Sahara Africa) from mango fruit (*Mangifera indica* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 1576-1581.
- Ndoye, B., Lebecque, S., Dubois-Dauphin, R., Tounkara, L., Guiro, A.-T., Kere, C., Diamara, B. e Thomart, P.** (2006) Thermoresistance properties of acetic acid bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 916-923.
- Nikaido, H., 1998.** Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, **178**, 5853–5859
- Ohmori, S., Masai, H., Arima, k. e Beppu, T.** (1980). Isolation and identification af acetic acid bacteria for submerged acetic acid fermentation at high temperature. *Agriculture Biol. Chem.*, **44**(12), 2901-2906.
- Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W., e Hinrichs, W.,** (2000). Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Natural Structural and Molecular Biology*, **7**, 215–219
- Pampulha, M. E. e Loureiro-Dias, M.C.** (1990) Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 375-380.
- Papalexandratou, Z., Cleenwerck, I., De Vos, P., e De Vuyst, L.,** (2009). (GTG)₅- PCR reference framework for acetic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **301**, 44–49.
- Passmore, S. M. e Carr, J.C.** (1974). The Ecology of the Acetic Acid Bacteria with Particular Reference to Cider Manufacture. *University of Bristol, England* **38**, 151 – 158.
- Paterson, D.L. e Bonomo, R.A.** (2005) Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews* **18** (4), 657-686.
- Prieto, C., Jara, C., Mas, A., e Romero, J.** (2007). Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *Int. J. Food Microbiol.* **115**: 348–355.
- Pitchern, D.G.; Saunders, A. e Owenn, J.** (1989) Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, **8**, 151-156.

- Poblet, M., Rozès, N., Guillamón, J.M. e Mas, A.** (2000). Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *Letters in Applied Microbiology*, **31**, 63-67.
- Poole, K., 2000.** Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**, 2233–2241.
- Raspor, P. e Goranovič, D.** (2008). Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, **28**, 101-124.
- Rizzon, L. A.** (2006a). Sistema de Produção de Vinagre: Fermentação acética. Consultado a 24/05/2009. Disponível na WWW: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinagre/SistemaProducaoVinagre/fermentacao.htm>>
- Rizzon, L. A.** (2006b). Sistema de Produção de Vinagre: O vinagre na história. Consultado a 24/05/2009. Disponível na WWW: <<http://www.cnpv.embrapa.br/publica/sprod/Vinagre/historia.htm>>.
- Rubio-Fernández, H., Salvador, M. D. e Fregapane, G.** (2004) Influence of fermentation oxygen partial pressure on semicontinuous acetification for wine vinegar production. *Eur Food Res Technol*, **219**:393–397.
- Rhodes, G., Huys, G., e Swings, J., 2000.** Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between *Aeromonas* in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant *tet A*. *Applied and Environment Microbiology*, **66**, 3883 –3890.
- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., e Guillamón, J. M.** (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 1981-1987.
- Ryssel, H., Kloeters, O., Germann, G., Schäfer, Th., Wiedemann, G. e Oehlbauer, M.** (2009). The antimicrobial effect of acetic acid—An alternative to common local antiseptics?. *Burns*, **35**, 695 – 700.
- Russo, P., Spano, G., Arena, M.P., Capozzi, V., Fiocco, D., Grieco, F. e Beneduce, L.** (2010) Are consumers aware of the risks related to Biogenic Amines in food?
- Saeki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Toyama, H., Lotong, N. e Adachi, O.** (1997). Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **61**, 138-145.
- Schüller, G., Hertel, C., e Hammes, W.P.,** (2000). *Gluconacetobacter entanii* sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**, 2013–2020.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., e Ojo, K. K., 2002.** *Staphylococcus sciuri* Gene *erm*(33), Encoding Inducible Resistance to Macrolides, Lincosamides, and Streptogramin B Antibiotics, Is a Product of Recombination between *erm* (C) and *erm* (A). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**, 3621–3623.
- Shafiei, R. e Thonart, P.** (2012) The response of *Acetobacter senegalensis* to stressors: A study towards improvement of vinegar starter production. *Third International Conference on Acetic Acid Bacteria vinegar and other products, Cordoba, Spain, 17-20 April 2012*, Vol. 1 e Supp.1.
- Sievers, M., e Teuber, M.** (1995). The microbiology and taxonomy of *Acetobacter europaeus* in commercial vinegar production. *J. Appl. Bacteriol.* **79**: 84–95.

- Silla Santos, M.H.** (1996) Biogenic amines: their importance in food. *Int. J. Food Microbiol.* **29**, 213-231.
- Silva, L.R., Cleenwerck, I., Rivas, R., Swings, J., Trujillo, M.E., Willems, A., e Velázquez, E.,** (2006). *Acetobacter oeni* sp. nov., isolated from spoiled red wine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 21–24.
- Sokollek, S. J., Hertel C. e Hammes, W. P.** (1998). Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *Interntional Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 935 – 940.
- Smit, A.Y., Du Toit, W.J. e Du Toit, M.** (2008) Biogenic Amines in Wine: Understanding the Headache. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **29**, 109-127.
- Smit, A. Y.** (2007) Evaluating the influence of winemaking practices on biogenic amine production by wine microorganisms. Stellenbosch University.
- Snyder, R. W., J. Ruhe, S. Kobrin, A. Wasserstein, C. Doline, I. Nachamkin, e J. H. Lipschutz.** (2004). Asaia bogorensis peritonitis identified by 16S ribosomal RNA sequence analysis in a patient receiving peritoneal dialysis. *Am. J. Kidney Dis.* **44**:e15–e17.
- Soo-Hwan, Y., Lee, O., Lee, I.S., Kim, H.S., Yu, T.S., e Jeong, Y.** (2004) *Gluconobacter persimmonis* sp. Nov., isolated from Korean traditional Persimmon vinegar. *J. Microbiol. Biotechnology*, **14**, 276-283.
- Sousa, J. C., 2006.** Manual de Antibióticos Antibacterianos. Fundação Fernando Pessoa, Edições Universidade Fernando Pessoa. 2ª Edição.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. D., Kañmpfer, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Rossello´ -Mora, R., Swings, J., e other authors** (2002). Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043–1047.
- Stoica, F., Giurgiulescu, L. e Popescu, I.** (2009) Study of the acetic acid bactéria resistance at the diferente contentes in alcohol, acidity and sulphurous anhydride of the wines in vinegard technology. *University of Craiova*. Vol. **XIX**, 587-590.
- Suresh, B., Ritu,T., e Ravishankar,G.A.** (2006). Biotransformations as applicable to food industries. In: *Food Biotechnology*, 2nd ed.,1655–1690. Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., and Levin, R. E., eds. CRC Press, Taylor & Francis, New York.
- Takai, M., e Erata, T.** (1998). Biosynthesis and application of bacterial cellulose. *Biosci. Ind.* **56**: 808–812.
- Takemura, H., Horinouchi, S., e Beppu, T.** (1991). Novel insertion sequence IS1380 from *Acetobacter pastorianus* is involved in loss of ethanol-oxidizing ability. *J. Bacteriol.* **173**: 7070–7076.
- Tamaoka, J., Katayama-Fujimura, Y. e Kuraishi, H.** (1983). Analysis of bacterial menaquinone mixtures by high-performance liquid chromatography. *Journal of Applied Bacteriology* **54**, 31-36.
- Tanasupawat, S., Thawai, C., Yukphan, P., Moonmangmee, D., Itoh, T., Adachi, O., e Yamada, Y.,** (2004). *Gluconobacter thailandicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Journal of General and Applied Microbiology* **50**, 159–167.
- Tanasupawat, S., Kommanee, J., Yukphan, P., Moonmangmee, D., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. e Yamada, Y.** (2011) *Gluconobacter uchimurae* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **57**, 293-301

- Teoh, A.L., Heard, G. e Cox, J.** (2004) Yeast ecology of kombucha fermentation. *International Journal of food Microbiology*, **95**, 119-126.
- Trček, J. e Raspor, P.** (1999). Molecular characterization of Acid Acetic Isolated from Spirit Vinegar. *Food Technology and Biotechnology*, **37**, 113-116.
- Trcek, J. e Teuber, M.** (2002). Genetic restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions of acetic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **19**, 69-75.
- Tuuminen, T., Heinasmaki, T. e Kerttula, T.** (2006). First report of bacteremia by *Asaia bogorensis*, in a patient with a history of intravenous-drug abuse. *J Clin Microbiol* **44**, 3048–3050.
- Valério, E.; Pereira, P.; Saker, M.; Franca, S. e Tenreiro, R.** (2005) - Molecular characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Portuguese fresh waters. *Harmful Algae* **4**: 1044-1052.
- Vegas, C., Mateo, E., González, A., Jara, C., Guillamón, J.M., Poblet, M., Torija, M.J. e Mas, A.** (2010) Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production *International. Journal of Food Microbiology*, **138**, 130–136.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. e Swings, J.** (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, **60**, n° 2, 407-438
- Versalovic, J., Koeuth, T., e Lupski, J.R.** (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, **19**, 6823-6831.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J. Muiper, M. e Zabeau, M.** (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, Vol. 23, No. **21** 4407-4414
- Walsh, C.** (2003). Antibiotics: Actions, origins, resistance. Protein Science, **13**: 3059-3060. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Watanabe, M. e Lino, S.** (1984) Studies on bacteria from japanese wines. Part 2. Growth of the *Acetobacter* sp. A-1 during the fermentation and storage of grape must and red wine. **16**, 13-22.
- Wayne, L.G, Brenner, D.J, Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. e Trüper, H.G.** (1987). Report of the Ad Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Interntional Journal of Systematic Bacteriology*, **37**, 463-464.
- Wierzbowski, A. K., Boyd, D., Mulvey, M., Hoban, D. J., e Zhanel, G. G.,** (2005). Expression of the *mef(E)* Gene Encoding the Macrolide Efflux Pump Protein Increases in *Streptococcus pneumoniae* with Increasing Resistance to Macrolides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**, 4635-4640.
- Wilker K.L., e Dharmadhikari M.R.** (1997). Treatment of barrel wood infected with acetic acid bacteria. *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**: 516-520.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., e Livak, K. J.,** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**, 6531-6535
- Wright, G.D.** (2003) Mechanisms os resistance to antibiotics. *Current Opinion in Chemical Biology*, **7**, 563-569.
- Wright, G.D.** (2010) Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *Wright BMC Biology* **8**, 1-6.

- Yamada, Y., Hoshino, K., e Ishikawa, T.,** (1997). The phylogeny of acetic acidbacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluonoacetobacter* to the generic level. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* **61**, 1244–1251.
- Yamada, Y., Hoshino, K., e Ishikawa, T.,** (1998). *Gluconacetobacter* nom. corrig. (*Gluonoacetobacter* [sic]). Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List no. 64. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**, pp. 327–328.
- Yamada, Y., Hosono, R., Lisdyanti, P., Widyastuti, Y., Saono, S., Uchimura, T., e Komagata, K.** (1999). Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. *Journal of General and Applied Microbiology*, **45**, 23-28.
- Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Uchimura, T., e Komagata, K.,** (2000). *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 823–829.
- Yamada, Y., Aida, K. e Uemura, T.** (1969). Enzymatic studies on teh oxidation of sugar and sugar alcohol. V. Ubiquinone of acetic acid bacteria and its relation to classification of *Gluconobacter* and *Acetobacter*, especially of the so-called intermediate strains. *Journal of General and Applied Microbiology* **15**, 186-196.
- Yoo, M.H., Huh, M., Kim, E., Le., H. e Jeong, H.D.** (2003) Characterization of chloramphenicol acetyltransferase gene by multiplex polymerase chain reaction in multidrug-resistant strains isolated from aquatic environments. *Aquaculture* **217**, 11 –21.
- Yukphan, P., Takahashi, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M., e Yamada, Y.,** (2004). *Gluconobacter albidus* (ex Kondo and Ameyama 1958) sp. nov., nom. rev., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Journal of General and Applied Microbiology* **50**, 235–242.
- Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Potacharoen, W. e Yamada, Y.** (2008) *Tanticharoenia sakaeratensis* gen. Nov., sp. Nov., a new osmotolerant acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 672-676.
- Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Hamana, K., Tahara, Y., ., Suzuki, K., Tanticharoen, M. e Yamada, Y.** (2010a) *Ameyamaea chiangmaiensis* gen. Nov., sp. Nov., na acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2156-2162.
- Yukphan, P., Malimas, T., Lundaa, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Tanticharoen, M. e Yamada, Y.** (2010b) *Gluconobacter wancherniae* sp. nov., an acetic acid bacterium from Thai isolates in the α -Proteobacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **56**, 67-73.
- Yukphan, P., Malimas, T., Lundaa, T., Muramatsu, Y., Potacharoen, W. Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Tanticharoen, M. e Yamada, Y.** (2011) *Neokomagataea* gen. Nov., with descriptions of *Neokomagataea thailandica* sp. Nov and *Neokomagataea tanensis* sp. Nov., osmotolerant acetic acid bactéria of the α -Proteobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 419-426.

ANEXO I

Quadro I.1 – Resultados dos testes de resistência/tolerância das estirpes a 30°C.

Isolados	pH				Etanol (%)				Ácido Acético (%)				Sulfuroso (mg/L)				Produção de aminas biogênicas			
	2,5	3,5	4,5	6,5	0	8	12	20	1	2	4	7	32	64	96	128	Histamina	Tiramina	Putrescina	Controlo
1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
4	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
8	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
10	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
11	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
12	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
13	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
14	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
15	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
16	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
17	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
18	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
20	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
22	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
24	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
26	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
28	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
30	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
31	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
32	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
33	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
34	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
35	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
36	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+

Quadro I.1 – Resultados dos testes de resistência/tolerância das estirpes a 30°C (continuação).

Isolados	pH				Etanol (%)				Ácido Acético (%)				Sulfuroso (mg/L)				Produção de aminas biogénicas			
	2,5	3,5	4,5	6,5	0	8	12	20	1	2	4	7	32	64	96	128	Histamina	Tiramina	Putrescina	Controlo
37	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
38	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
40	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
41	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
42	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
43	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
44	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
45	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
46	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
47	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
48	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
49	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
50	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
51	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
52	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
53	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
54	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
55	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
56	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
57	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
58	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
59	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
60	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
61	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
62	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
63	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
64	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
65	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
66	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
67	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
68	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
69	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
71	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+

Quadro I.1 – Resultados dos testes de resistência/tolerância das estirpes a 30°C (continuação).

Isolados	pH				Etanol (%)				Ácido Acético (%)				Sulfuroso (mg/L)				Produção de aminas biogénicas			
	2,5	3,5	4,5	6,5	0	8	12	20	1	2	4	7	32	64	96	128	Histamina	Tiramina	Putrescina	Controlo
72	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
80	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
81	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
82	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
83	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
84	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
85	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
89	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Quadro I.2 – Resultados dos testes de resistência/tolerância das estirpes a 37°C

Isolados	pH				Etanol (%)				Ácido Acético (%)				Sulfuroso (mg/L)				Produção de aminas biogénicas			
	2,5	3,5	4,5	6,5	0	8	12	20	1	2	4	7	32	64	96	128	Histamina	Tiramina	Putrescina	Controlo
1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
3	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
4	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
6	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
8	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
9	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
10	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
11	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
12	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
13	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
14	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
15	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
16	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
17	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
18	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
20	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
21	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
22	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
23	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
24	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
25	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
26	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
27	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
28	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
29	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
30	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
31	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
32	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
33	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
34	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
35	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
36	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
37	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Quadro I.2 – Resultados dos testes de resistência/tolerância das estirpes a 37°C (continuação).

Isolados	pH				Etanol (%)				Ácido Acético (%)				Sulfuroso (mg/L)				Produção de aminas biogênicas			
	2,5	3,5	4,5	6,5	0	8	12	20	1	2	4	7	32	64	96	128	Histamina	Tiramina	Putrescina	Controlo
38	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
40	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
41	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
42	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
43	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
44	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
45	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
46	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
47	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
48	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
49	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
50	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
51	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
52	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
53	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
54	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
55	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
56	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
57	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
58	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
59	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
60	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
61	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
62	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
63	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
64	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
65	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
66	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
67	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
68	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
69	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Quadro I.2 – Resultados dos testes de resistência/tolerância das estirpes a 37°C (continuação).

Isolados	pH				Etanol (%)				Ácido Acético (%)				Sulfuroso (mg/L)				Produção de aminas biogénicas			
	2,5	3,5	4,5	6,5	0	8	12	20	1	2	4	7	32	64	96	128	Histamina	Tiramina	Putrescina	Controlo
70	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
71	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
72	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
80	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
81	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
82	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
83	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
84	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
85	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Quadro I.3 – Resultados dos testes de resistência/tolerância das estirpes a 20°C.

Isolados	pH				Etanol (%)				Ácido Acético (%)				Sulfuroso (mg/L)				Produção de aminas biogénicas			
	2,5	3,5	4,5	6,5	0	8	12	20	1	2	4	7	32	64	96	128	Histamina	Tiramina	Putrescina	Controlo
1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
3	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
10	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
11	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
13	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
14	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
15	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
16	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
20	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
21	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
22	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
24	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
25	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
26	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
30	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
31	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
32	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
33	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
34	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
35	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
36	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
37	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+

Quadro I.3 – Resultados dos testes de resistência/tolerância das estirpes a 20°C (continuação).

Isolados	pH				Etanol (%)				Ácido Acético (%)				Sulfuroso (mg/L)				Produção de aminas biogénicas			
	2,5	3,5	4,5	6,5	0	8	12	20	1	2	4	7	32	64	96	128	Histamina	Tiramina	Putrescina	Controlo
38	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
40	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
41	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
42	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
43	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
46	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
47	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
48	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
49	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
50	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
51	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
52	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
53	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
54	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
55	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
56	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
57	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
58	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
59	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
60	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
61	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
62	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
63	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
64	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
65	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
66	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
67	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
68	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
69	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+

Quadro I.3 – Resultados dos testes de resistência/tolerância das estirpes a 20°C (continuação).

Isolados	pH				Etanol (%)				Ácido Acético (%)				Sulfuroso (mg/L)				Produção de aminas biogénicas			
	2,5	3,5	4,5	6,5	0	8	12	20	1	2	4	7	32	64	96	128	Histamina	Tiramina	Putrescina	Controlo
70	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
71	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
72	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
80	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
81	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
82	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
83	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
84	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
85	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
89	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Anexo II

Quadro II.1 – Halos de inibição (mm) e categorias de avaliação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos de algumas estirpes das bactérias acéticas.

Isolados	AML	AMC	TIC	TIM	PRL	TZP	ATM	IPM	KF	FOX	CAZ	CTX	CRO	MEM	FEP	FOS	NA	CIP	AK	CN	TOB	K	S	E	C	SXT	TE
6	R ^{12*}	S	R	R	S ²²	S ²²	R	S ²⁸	R	R	R	I ²⁰	S ²⁶	R	R	R	S ³⁰	R	S ¹⁸	I ¹⁴	R ¹²	S ²⁶	S ²⁰	R	I ¹⁶	R	S
7	R	S	R	R	S ²²	S ²²	R	S ²⁶	R	R	R	S ²⁴	S ²⁶	R	R	R	S ³⁰	R	S ²²	I ¹⁴	I ¹⁴	S ²⁶	S ²⁰	R	S ²²	R	S
8	R	S	R	R	R	R	R	S ^{18*}	R	R	R	R	I ^{16*}	R	R	S ^{24*}	S ²⁰	R	R ¹¹	R ¹⁰	R ¹²	S ¹⁸	R ⁸	R	R	R	S
11	R ¹²	S	R ^{10*}	R ^{10*}	S ³⁰	S ²⁸	R	S ²²	R	R	R ^{10*}	I ²²	S ³⁰	S ¹⁶	R	S ³⁰	I ¹⁸	R	S ¹⁸	R ¹²	I ¹³	S ²²	S ²⁰	R	R ^{12*}	R	S
12	R	S	R ¹⁰	R	S ²²	S ²⁴	R	S ²⁴	R	R	S ¹⁸	I ¹⁸	S ²²	S ²⁴	R	R ^{12*}	R ⁸	R	R ¹⁴	R ⁸	R ⁹	I ¹⁶	I ¹⁴	R	R	R	S
30	I ¹⁴	S	R	R	R ^{16*}	R ^{14*}	R	S ^{16*}	R	R	R	I ²⁰	S ²⁴	R	R	S ^{28*}	R ¹⁰	R	R ¹²	R ⁸	R ⁸	S ²⁰	I ¹²	R	R	R	S
33	S ³²	S	R	R	S ²⁶	S ³²	R	S ^{24*}	R	R	I ^{16*}	I ²²	I ²⁰	R	R	S ^{28*}	R ^{12*}	R	R ¹⁴	R ¹⁰	R ¹¹	S ¹⁸	I ¹⁴	R	R	R	S
35	R	S	R	R	R ^{12*}	R ^{12*}	R	I ^{14*}	R	R	R	R	R	R	R	S ²⁸	R ¹²	R	R ¹⁴	R ¹⁰	R ¹¹	S ¹⁸	I ¹⁴	R	R	R	S
37	S	S ²⁶	R ¹²	R	R ¹⁵	R ¹⁴	R	S ²⁶	R	R	S ¹⁸	I ²¹	S ²⁴	S ²⁰	S ²⁰	S ³⁰	R	R	R ¹³	R ⁸	R ⁸	I ¹⁶	I ¹⁴	R	R	R	S
38	S ¹⁸	S ²⁶	I ¹⁶	R ⁸	S ¹⁸	R ¹⁶	R	S ²⁶	R	R	R	I ²⁰	S ²²	S ²⁰	R ¹²	S ³⁰	R	R	R ¹²	R ⁸	R ⁸	S ¹⁸	I ¹⁴	R	R	R	S
40	R ¹²	S ²⁸	R ¹¹	R ¹²	S ¹⁸	R ¹⁶	R	S ²⁶	R	R	I ¹⁶	S ²⁴	S ²²	R ¹²	R ¹¹	S ²²	I ¹⁶	R	R ¹²	R ¹⁰	R ¹⁰	I ¹⁵	R ⁸	R	R	R	S
41	R ¹⁰	S ²²	R ¹⁰	R ¹¹	R ¹⁴	R ¹⁴	R	S ²⁴	R	R	R ¹⁴	I ¹⁸	S ²²	R ¹³	R ¹⁰	S ²²	I ¹⁶	R	R	R	R ⁸	R ¹²	R	R	R	R	S
46	R ⁸	S ²²	R ¹⁰	R ¹¹	R ¹⁴	R ¹⁴	R	S ²⁴	R	R	R ¹⁴	I ¹⁸	S ²²	S ¹⁶	R ¹²	R ⁸	R	R	R ^{12*}	R ⁸	R ⁸	I ¹⁴	I ^{12*}	R	R ^{12*}	R	S
48	I ¹⁶	S ³⁰	I ¹⁶	R ¹⁴	S ^{20*}	S ^{22*}	R	S ²⁶	I ^{16*}	I ^{16*}	I ^{16*}	I ²²	S ²⁴	S ^{22*}	S ^{18*}	S ^{24*}	R	R	R ^{12*}	R ⁷	R ⁸	I ¹³	I ¹²	R	R	R	S
49	S ²⁰	S	R ¹⁴	R ¹⁴	S ²⁰	S ²⁴	R	S	R	R	S ²⁶	S ²⁴	S ³⁰	S ¹⁶	R ¹²	R ¹⁰	R	R	I ^{16*}	R ⁹	R ¹⁰	S ^{18*}	S ^{16*}	R	R	R	S
53	S ^{22*}	S ²²	R	R	S ^{22*}	S ^{22*}	R	S ²⁰	R	R	R ^{10*}	I ²²	S ³⁰	I ^{14*}	R	R ¹⁰	R ¹¹	R	R ¹⁴	R ¹²	R ¹²	S ²⁰	I ¹³	R	R	R	S
55	R ^{8*}	S ³⁰	R	R	S ^{24*}	S ^{26*}	R	S ¹⁶	R	R	S ^{22*}	I ²⁰	S ³²	I ^{14*}	R	R ¹¹	S ²⁴	R	I ¹⁶	R ¹²	I ¹³	S ²²	S ¹⁵	R	R	R	S
61	I ^{14*}	S ³⁰	R	R	R ¹⁶	R ¹⁶	R	S ²⁶	R	R	R	I ²²	S ²²	S ²⁰	S ²⁰	R	R	R	I ¹⁶	R ⁹	R ¹⁰	I ¹⁷	I ¹⁴	R	I ¹⁴	I ¹⁴	S
66	I ^{14*}	S ²²	R ¹⁰	R ¹⁴	R ¹⁵	R ¹⁴	R	S ²⁶	R	R	I ¹⁶	I ¹⁶	S ²²	S ¹⁸	R ¹¹	R ¹⁰	R	R	R ¹³	R ⁷	R ⁸	I ¹⁴	I ¹²	R	R	R	S
68	I ¹⁴	S	R ¹³	R ¹⁰	S ¹⁸	R ¹⁶	R	S ²⁶	R	R	I ¹⁶	I ¹⁸	S ²⁴	S ²⁰	R ¹⁴	R ¹²	R	R	R ^{14*}	R ⁷	R ⁸	I ¹⁶	I ¹²	R	R ¹⁰	R	S
72	S ³⁰	S	R	R	S ^{26*}	S ^{26*}	R	S ¹⁸	R	R	R ^{14*}	S ²⁹	S ²⁹	R	R	I ¹⁵	R ¹²	R	R ¹²	R ¹⁰	R ¹⁰	I ¹⁶	R ¹⁰	R	R	R	S

Legenda: Resistente (R), Intermédio (I), Sensíveis (S), Amoxicilina (AML₁₀), Amoxicilina + Ácido Clavulânico (AMC₃₀), Piperacilina (PRL₁₀₀), Piperacilina + Tazobactam (TZP₁₁₀), Ticarcilina (TIC₇₅), Ticarcilina + Ácido Clavulânico (TIM₈₅); Cefalotina (KF₃₀), Cefoxitina (FOX₃₀); Cefotaxima (CTX₃₀), Ceftazidima (CAZ₃₀), Ceftriaxona (CRO₃₀), Cefepima (FEP), Aztreonam (ATM₃₀), Imipenem (IPM₁₀), Meropenem (MEM₁₀), Fosfomicina (FOS₅₀), Gentamicina (CN₁₀), Canamicina (K₃₀), Tobramicina (TOB₁₀), Amicacina (AK₃₀), Estreptomicina (S₁₀), Tetraciclina (TE₃₀), Ácido nalidixico (NA₃₀); Ciprofloxacina (CIP₅), Eritromicina (E₁₅), Co-trimoxazol (SxT₂₅) e Cloranfenicol (C₃₀).

Anexo III

Quadro III.1 – Dados estatísticos dos resultados das tolerâncias/resistências e das aminas biogénicas.

Ethanol (%)						Acetic acid (%)					
	0	2	8	12	20		0%	1%	2%	4%	7%
20°C	76	77	77	75	58	20°C	77	75	70	7	0
30°C	77	77	77	67	39	30°C	77	77	73	19	0
37°C	75	77	76	43	1	37°C	77	75	60	12	0
Nº de isolados que cresceram						Nº de isolados que cresceram					
Etanol (%)						Ácido Acético (%)					
	0	2	8	12	20		0%	1%	2%	4%	7%
20°C	88.0%	100.0%	90.0%	86.0%	71.0%	20°C	100.0%	86.0%	81.0%	9.0%	0.0%
30°C	95.0%	100.0%	95.0%	83.0%	45.0%	30°C	100.0%	91.0%	88.0%	24.0%	0.0%
37°C	79.0%	100.0%	79.0%	49.0%	1.0%	37°C	100.0%	86.0%	72.0%	15.0%	0.0%
Percentagem dos isolados que cresceram						Percentagem dos isolados que cresceram					
SO2(mg/L)						pH					
	0	32	64	96	128		2,5	3,5	4,5	5,5	6,5
20°C	77	77	57	52	44	20°C	13	77	77	77	77
30°C	77	75	58	53	37	30°C	15	77	77	77	77
37°C	77	18	14	13	11	37°C	0	76	76	77	73
Nº de isolados que cresceram						Nº de isolados que cresceram					
SO2(mg/L)						pH					
	0	32	64	96	128		2,5	3,5	4,5	5,5	6,5
20°C	100.0%	86.0%	68.0%	62.0%	50.0%	20°C	17.0%	91.0%	91.0%	100.0%	91.0%
30°C	100.0%	91.0%	74.0%	69.0%	47.0%	30°C	19.0%	96.0%	96.0%	100.0%	96.0%
40°C	100.0%	18.0%	12.0%	10.0%	8.0%	37°C	0.0%	81.0%	81.0%	100.0%	77.0%
Percentagem dos isolados que cresceram						Percentagem dos isolados que cresceram					
Aminas Biogénicas											
	Histamina	Tiramina	Putrescina								
20°C	0	0	0								
30°C	2	0	4								
37°C	0	0	0								
Nº de isolados que cresceram											
Aminas Biogénicas											
	Histamina	Tiramina	Putrescina								
20°C	0%	0%	0%								
30°C	3%	0%	5%								
37°C	0%	0%	0%								
Percentagem dos isolados que cresceram											

Anexo III

Quadro III.2 – Dados estatísticos da análise global da caracterização fenotípica.

Estirpe	pH 20	Etanol 20	Aac 20	SO2 20	pH 30	Etanol 30	Aac 30	SO2 30	pH 37	Etanol 37	Aac 37	SO2 37
1	0,8	1	0,6	0,4	0,8	1	0,6	0,4	0,8	0,6	0,6	0,2
2	0,8	1	0,6	0,4	0,8	1	0,6	0,4	0,8	0,6	0,6	0,2
3	0,8	0,8	0,4	0,4	0,8	1	0,6	0,4	0,8	0,6	0,6	0,2
4	0,8	1	0,6	0,4	0,8	0,8	0,6	0,4	0,8	0,6	0,6	0,2
5	0,8	1	0,6	0,4	0,8	1	0,6	0,4	0,8	0,6	0,6	0,2
6	0,8	1	0,6	0,4	0,8	1	0,6	0,4	0,8	0,6	0,6	0,2
7	0,8	1	0,4	0,4	0,8	1	0,6	0,4	0,8	0,6	0,6	0,2
8	1	1	0,6	0,4	1	0,8	0,6	0,4	0,8	0,6	0,6	0,2
9	0,8	1	0,6	0,4	0,8	1	0,6	0,4	0,8	0,6	0,6	0,2
10	0,8	1	0,6	0,4	0,8	1	0,6	0,4	0,8	0,6	0,6	0,2
11	0,8	1	0,6	0,4	0,8	0,8	0,6	0,4	0,8	0,6	0,6	0,2
12	1	1	0,4	0,4	1	0,8	0,4	0,6	0,8	0,6	0,4	0,2
13	0,8	0,8	0,6	0,4	0,8	0,6	0,6	0,6	0,8	0,6	0,6	0,2
14	0,8	0,8	0,6	0,4	0,8	0,6	0,6	0,6	0,8	0,6	0,6	0,2
15	0,8	0,8	0,6	0,4	0,8	0,6	0,6	0,4	0,6	0,6	0,6	0,2
16	0,8	0,8	0,6	0,5	0,8	0,6	0,6	0,4	0,6	0,6	0,4	0,2
17	1	1	0,8	1	1	0,8	0,6	0,8	0,8	0,6	0,6	0,2
18	1	1	0,8	1	1	0,8	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6	0,2
20	0,8	0,6	0,2	0,2	0,8	0,6	0,2	0,2	0,8	0,6	0,2	0,2
21	0,8	1	0,6	0,6	1	1	0,8	0,6	0,8	0,6	0,6	0,2
22	0,8	1	0,6	0,6	0,8	1	0,8	0,4	0,6	0,6	0,6	0,2
23	1	1	0,6	1	1	1	0,8	0,8	0,8	0,6	0,8	0,2
24	0,8	1	0,8	1	0,8	1	0,8	0,8	0,8	0,6	0,8	0,2
25	0,8	1	0,8	1	1	1	0,6	0,8	0,8	0,6	0,8	0,2
26	0,8	1	0,6	0,6	0,8	1	0,6	0,8	0,8	1	0,8	0,2
27	1	1	0,6	1	1	0,8	0,6	0,8	0,8	0,6	0,6	0,2
28	1	1	0,6	1	1	0,8	0,6	0,8	0,8	0,6	0,6	0,2
29	1	1	0,6	1	1	1	0,6	0,8	0,8	0,6	0,4	0,2
30	0,8	1	0,6	0,4	0,8	1	0,8	0,4	0,8	0,8	0,8	0,4
31	0,8	1	0,8	1	0,8	0,8	0,8	1	0,8	0,8	0,8	1
32	0,8	1	0,8	1	0,8	0,8	0,8	1	0,8	0,6	0,8	0,8
33	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,8	1	0,8	0,6	0,8	0,8
34	0,8	1	0,6	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6
35	0,8	1	0,6	1	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	1
36	0,8	0,8	0,6	0,6	0,8	1	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6	0,4
37	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,8	0,8	0,6	0,6	0,2
38	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,8	0,8	0,8	0,6	0,2
40	1	0,8	0,6	1	1	0,6	0,6	0,8	0,8	0,6	0,4	0,2
41	1	0,8	0,4	0,6	1	0,6	0,6	0,4	0,8	0,8	0,4	0,2
42	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,8	0,8	0,8	0,6	0,2
43	0,8	1	0,6	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6	0,8	0,6	0,6	0,2
44	1	1	0,6	1	1	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,4
45	1	1	0,6	0,8	1	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,2
46	0,8	1	0,6	1	0,8	1	0,8	1	0,8	0,8	0,6	0,2
47	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,2

Quadro III.2 – Dados estatísticos da análise global da caracterização fenotípica (continuação).

Estirpe	pH 20	Etanol 20	Aac 20	SO2 20	pH 30	Etanol 30	Aac 30	SO2 30	pH 37	Etanol 37	Aac 37	SO2 37
48	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,2
49	0,8	1	0,6	1	0,8	1	0,8	1	0,8	0,8	0,6	0,2
50	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,8	0,2
51	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,4	0,2
52	0,8	1	0,6	1	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,2
53	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,8	0,2
54	0,8	1	0,6	1	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,2
55	0,8	1	0,6	1	0,8	1	0,8	1	0,8	0,8	0,6	0,2
56	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,2
57	0,8	1	0,6	1	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,4	0,4
58	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,2
59	0,8	1	0,6	1	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,4	0,2
60	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,4	0,25
61	0,8	1	0,6	0,8	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,2
62	0,8	1	0,6	1	0,8	1	0,8	1	0,8	0,8	0,6	1
63	0,8	0,8	0,6	0,8	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,2
64	0,8	1	0,6	1	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,2
65	0,8	1	0,8	1	0,8	1	0,8	1	0,8	0,8	0,8	1
66	0,8	0,8	0,6	0,8	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,2
67	0,8	1	0,6	0,8	0,8	1	0,8	0,8	0,8	0,8	0,6	0,2
68	0,8	1	0,6	1	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,2
69	0,8	1	0,6	1	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,2
70	1	0,8	0,6	0,8	1	1	0,8	1	0,8	0,8	0,6	1
71	0,8	1	0,6	1	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,6	0,2
72	0,8	1	0,6	1	0,8	1	0,8	1	0,8	0,8	0,8	1
80	0,8	1	0,4	0,4	0,8	1	0,4	0,4	0,8	0,8	0,4	0,2
81	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,4	1
82	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,4	1
83	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,4	1
84	0,8	0,8	0,6	1	0,8	1	0,6	1	0,8	0,8	0,4	1
85	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,6	1	0,8	0,8	0,4	1
89	0,8	0,6	0,2	0,2	0,8	0,6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

*Estes valores foram calculados através da média dos fornecidos no anexo I, em que a classificação dos resultados foi feita da seguinte forma: a um resultado positivo atribuímos o valor 1 e ao resultado negativo atribuímos o valor 0.