



Universidade Federal do Amazonas  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Potencial de degradação do glúten por estirpes de *Paenibacillus* sp.**

FABIANA DA ROCHA OLIVEIRA

Manaus  
2014



Universidade Federal do Amazonas  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia

FABIANA DA ROCHA OLIVEIRA

**Potencial de degradação do glúten por estirpes de *Paenibacillus* sp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, área de concentração Ciências Biológicas.

Orientador: Ph.D. Luiz Antonio de Oliveira

Manaus  
2014

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

O48p Oliveira, Fabiana da Rocha  
Potencial de degradação do glúten por estirpes de *Paenibacillus*  
sp. / Fabiana da Rocha Oliveira. 2014  
90 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Luiz Antonio de Oliveira  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do  
Amazonas.

1. *Paenibacillus*. 2. Metabolismo microbiano. 3. Ecologia  
microbiana. 4. Doença celíaca. 5. Glúten. I. Oliveira, Luiz Antonio  
de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

FABIANA DA ROCHA OLIVEIRA

**Potencial de degradação do glúten por estirpes de *Paenibacillus* sp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, área de concentração Ciências Biológicas.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Luiz Antonio de Oliveira, Presidente  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. José Odair Pereira, Membro  
Universidade Federal do Amazonas

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes, Membro  
Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. André Luis Willerding, Membro  
Centro de Biotecnologia da Amazônia

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Antonia Queiroz Lima de Souza, Membro  
Universidade Federal do Amazonas

Dedico às mulheres especiais na minha vida:  
Ana Tereza, Maria, Sissi, Heloisa e Socorro.  
Aos meus irmãos (as) e sobrinhos (as).

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família. Entidade sagrada, extremamente importante para mim e que possibilitou essa conquista.

Ao meu grande amigo e orientador Dr. Luiz Antonio de Oliveira. Você foi o anjo que cruzou o meu caminho e que me mostrou a luz no fim do túnel. Na hora mais exata você apareceu! Sem você essa tese não existiria.

Com grande estima agradeço àqueles que fizeram parte dessa história nesses longos cinco anos: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Jorge Luis López Lozano, com quem comecei a pós-graduação e que me ensinou como é maravilhoso o conhecimento; Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. José Odair Pereira que abriu essa porta quando na época era o coordenador do curso de Biotecnologia, que viu as minhas angústias e me confortou com suas palavras, mostrando que havia alternativas; Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Jorge Ivan Rabelo Porto, um amigo que acreditou no meu potencial e na minha vontade de vencer; Profa. Dra. Eliana Feldberg, Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Sergio Ricardo Nozawa, Profa. Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val, Profa. Dra. Andréa Belém Costa e Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Spartaco Astolfo Filho por terem cedido seus laboratórios para as pesquisas com peptídeos antimicrobianos.

A toda equipe da Microbiologia de Solos do INPA:

- Aos mestres Francisco Wesen Moreira e Bianca Galúcio Pereira Araújo, funcionários sempre dispostos a ajudar.

- D. Dulce e todas as outras que ali passaram e sempre deixaram o Lab limpo, organizado e bem cuidado. Sem vocês aquele lugar seria o verdadeiro caos com tantas mulheres juntas!

- Às amigas que conquistei: Cassiane Minelli de Oliveira, sempre meiga e boazinha, sua disposição no auxílio com os experimentos foi essencial para o término desse trabalho; Karen Kely Carvalho de Oliveira você foi muito importante na revisão bibliográfica e nos detalhes dos resultados e das metodologias, só você mesmo com tanta perfeição; Nadionara Costa Menezes e Edilaine D'Ávila da Silva pela ajuda com as tabelas, na leitura de placas e tantas outras coisas que não vou lembrar, e claro, pela companhia até tarde da noite e nos finais de semana; Mirna Sayuri Farias Miyamoto pelos experimentos em genética molecular e por sua disposição sempre; Tatiana Paulain da Costa, Anne Caroline Dantas Tavares e Ellen

Paula da Costa Andion pelas conversas infundáveis nas tardes de lanche no Lab, momentos de descontração. Enfim, vou levar essa amizade para a vida toda, pois guardo vocês no coração!

À Universidade Federal do Amazonas, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade.

Ao Centro de Apoio Multidisciplinar da UFAM e a toda a sua equipe por ceder o laboratório de Genética Molecular e proporcionar o sequenciamento dos micro-organismos, muito útil para a finalização desta pesquisa.

À FAPPEAM e CNPq pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

A Doença Celíaca é uma intolerância à ingestão de glúten, contido em cereais como cevada, aveia, centeio, trigo e malte, caracterizada por um processo inflamatório que envolve a mucosa do intestino delgado, levando à atrofia das vilosidades intestinais e má absorção dos alimentos. Cerca de 1-2 % da população mundial tem essa doença. A obtenção de algum bioproduto que possa ser usado junto com a alimentação por essas pessoas pode ser uma solução capaz de dar a elas uma vida sem a preocupação de consumir alimentos que contenham essa proteína. Os micro-organismos, por sua alta diversidade genética, podem ser uma fonte desses bioprodutos. Entre eles, pode-se destacar as rizobactérias encontradas nas rizosferas das plantas e dentro de nódulos de leguminosas, por apresentarem uma gama de enzimas e metabólitos de valores biotecnológicos e por não serem patogênicas a plantas e animais, inclusive ao homem. Em vista disso, foram realizados experimentos em condições de laboratório para obter rizobactérias capazes de degradar o glúten, visando suas utilizações futuras em benefício das pessoas que tenham a doença celíaca. Cerca de 10 % de um total de 115 rizobactérias testadas apresentaram a habilidade de quebra do glúten (INPA\_Ps007, INPA\_Ps020, INPA\_Ps021, INPA\_Ps024, INPA\_Ps028, INPA\_Ps076, INPA\_Ps178, INPA\_Ps183, INPA\_Ps225, INPA\_Ps572). As seis melhores (INPA\_Ps020, Ps021, Ps028, Ps076, Ps178, Ps225) foram identificadas taxonomicamente como *Paenibacillus* sp. Essas *Paenibacillus* sp. apresentaram melhores condições de crescimento em meio contendo manitol e glúten, quando comparadas nos meios somente com glúten ou somente com manitol. A presença do glúten no meio de cultura contendo o manitol foi essencial para que essas seis estirpes produzissem extratos com atividade degradadora dessa proteína. Apenas os extratos produzidos pelas estirpes INPA\_Ps076 e Ps178 em meio contendo somente glúten apresentaram a capacidade de degradar essa proteína. A maioria dos extratos brutos das *Paenibacillus* sp. apresentaram ação degradadora do glúten até na diluição de oito vezes aos oito dias de crescimento em meio de cultura. O extrato bruto da estirpe INPA\_Ps178 mostrou atividade degradadora do glúten até na diluição de quatro vezes e o da INPA\_Ps225, até na diluição de 16 vezes aos oito dias de crescimento em meio de cultura. Os extratos brutos das seis estirpes de *Paenibacillus* sp. também apresentaram ação degradadora do glúten entre as temperaturas de 36° a 56° C, mas perderam essa habilidade entre 66° a 96° C. Houve influência do pH na capacidade desses extratos brutos em degradarem o glúten, com o pH neutro (7,0) sendo o mais adequado para todos eles. As melhores bactérias serão estudadas com mais intensidade, visando avaliar se podem servir como supridoras de enzimas ou metabólitos degradadores do glúten em benefício das pessoas que tenham a doença celíaca.

**Palavras-chave:** *Paenibacillus*, metabolismo microbiano, ecologia microbiana, doença celíaca, glúten.



## ABSTRACT

Celiac Disease is an intolerance to gluten ingestion, contained in cereals such as barley, oats, rye, wheat and malt, characterized by an inflammatory process involving the mucosa of the small intestine, leading to intestinal villous atrophy and bad absorption. Approximately 1-2 % of the world population has this disease. Obtaining a byproduct that can be used along with food for these people can be a solution that would give them a life without the worry of consuming foods containing this protein. Microorganisms, for their high genetic diversity, can be one source of these bioproducts. Among them, we can highlight the rhizobacterias found in the rhizosphere of plants and within nodules of legumes, by presenting a range of enzymes of biotechnological value and are not pathogenic to plants and animals, including human being. Experiments were conducted under laboratory conditions to find rhizobacterias able to degrade gluten aiming their future use as enzymes suppliers for the benefit of people who have celiac disease. About 10 % of a total of 115 tested rhizobacterias had this ability: INPA\_Ps007, INPA\_Ps020, INPA\_Ps021, INPA\_Ps024, INPA\_Ps028, INPA\_Ps076, INPA\_Ps178, INPA\_Ps183, INPA\_Ps225, INPA\_Ps572. The top six (INPA\_Ps020, Ps021, Ps028, Ps076, Ps178, Ps225) were taxonomically identified as *Paenibacillus* sp. These *Paenibacillus* sp. showed better growth in medium containing mannitol and gluten compared to the media only with gluten or only with mannitol. The ability of these *Paenibacillus* sp. in degrading gluten was higher at the temperature of 36.5° C than at 26.5° C. The presence of gluten in the culture medium containing mannitol was essential for the strains of *Paenibacillus* sp. INPA\_Ps020, Ps021, Ps028 and Ps225 extracts to produce degrading activity of this protein. Only the extracts produced by the strains of INPA\_Ps076 and Ps178 in the medium containing only gluten showed the ability to degrade this protein. Most of the crude extracts of these *Paenibacillus* sp. presented degrading action against gluten until the dilution of eight times, after eight days of growth in culture. The crude extract of INPA\_Ps178 showed degrading gluten activity until the dilution of four times and from the INPA\_Ps225, until the dilution of 16 times at eight days of growth in culture. The crude extracts of these *Paenibacillus* sp. showed gluten degrading action at the temperatures between 36-56° C, but lost this ability at the temperatures between 66-96° C. There was an influence of pH on their ability to degrade gluten, with neutral pH (7.0) being the most suitable for all the bacterial extracts. The best bacteria will be studied more intensively to evaluate whether they can serve as gluten degrading enzymes suppliers for the benefit of people who have celiac disease.

**KEYWORDS:** *Paenibacillus*, microbial metabolism, microbial ecology, celiac disease, gluten.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> Conseqüências da DC: <b>a</b> Homem de 47 anos de idade diagnosticado com doença celíaca; <b>b</b> após 4 meses de tratamento com dieta isenta de glúten (aumento de peso de 50 kg para 70 kg).....	17
<b>Figura 2</b> Ativação do sistema imunológico pela gliadina do glúten. A) Fase inicial de ativação do sistema imune pelas frações peptídicas do glúten (gliadinas). B) Esses peptídeos atravessam a barreira epitelial após o aumento da permeabilidade intestinal ativando as células T glúten-específicas e células B na liberação de anticorpos, causando danos nas células epiteliais e remodelação do tecido.....	20
<b>Figura 3</b> Imagem endoscópica evidenciando: a) Vilosidades normais e b) Atrofiamento das vilosidades. Imagem histopatológica evidenciando: a) Atrofiamento das vilosidades e b) Vilosidades normais.....	22
<b>Figura 4</b> Iceberg celíaco e o espectro da doença. *Ausência de atrofiamento das vilosidades intestinais, mas aumento de linfócitos intraepiteliais. **Infertilidade, convulsões, ataxia, dor óssea, alterações bioquímicas e hematológicas. ***Podem ser identificados por histórico familiar positivo.....	24
<b>Figura 5</b> Estrutura hierárquica da rede de glúten: na escala atômica as proteínas do glúten interagem entre si por meio de interações químicas que formam uma rede; em nanoescala essa rede forma uma estrutura em $\beta$ -folha, formando nanoporos, responsáveis pela característica química do glúten.....	28
<b>Figura 6</b> Eletromicrografia de células de <i>Paenibacillus polymyxa</i> . A) Visão geral dos bastonetes (TIMMUSK <i>et al.</i> , 2003), B) e C) em forma de esporos. Barra = 2 $\mu$ m.....	32
<b>Figura 7</b> Polimixinas na sua forma comercial gotas, injetável e de uso tópico.	33
<b>Figura 8</b> Procedimento de inoculação das bactérias nas placas de Petri com meio YMA modificado.....	39
<b>Figura 9</b> Pontuações (notas) aplicadas para o crescimento das bactérias.....	39

<b>Figura 10</b>	Colônias dos isolados bacterianos e os respectivos halos em meio sólido contendo 1,0 % de glúten após incubação a 36,5° C por cinco dias.....	49
<b>Figura 11</b>	Perfil eletroforético do DNA genômico dos isolados bacterianos: 1- INPA_Ps020, 2- Ps021, 3- Ps028, 4- Ps076, 5- Ps178, 6- Ps225, observados em gel de agarose a 0,8%.....	50
<b>Figura 12</b>	Perfil eletroforético do gene 16S do DNAr dos isolados bacterianos: 1- Marcador de 1kb ( <i>ThermoScientific</i> ), 2- INPA_Ps020, 3- Ps021, 4/5- Ps028, 6- Ps076, 7- Ps178, 8- Ps225, 9- controle negativo (água deionizada, observados em gel de agarose a 0,8%.....	50
<b>Figura 13</b>	Perfil eletroforético da purificação das amostras com PEG 8000: 1- Marcador de 1kb ( <i>ThermoScientific</i> ), 2- INPA_Ps020, 3- Ps021, 4- Ps028, 5- Ps076, 6- Ps178, 7- Ps225, observados em gel de agarose a 0,8%.....	50
<b>Figura 14</b>	Crescimento das estirpes de <i>Paenibacillus</i> sp. em três meios líquidos: A) manitol 1,0 % (M), B) glúten 0,2 % (G) e C) manitol 1,0 % + glúten 0,2 % (MG). Populações de células x10 <sup>5</sup> /mL <sup>-1</sup> .....	53
<b>Figura 15</b>	Halos de degradação do glúten da estirpe INPA_Ps225 a diferentes concentrações celulares (10 <sup>1</sup> , 10 <sup>3</sup> , 10 <sup>5</sup> e 10 <sup>7</sup> / mL <sup>-1</sup> ) em meio sólido contendo 1,0% de glúten e incubadas a 26,5° C e 36,5° C. M: cultivo da bactéria em meio líquido contendo 1,0 % de manitol; MG: cultivo da bactéria em meio líquido contendo 0,2 % de glúten + 1,0 % de manitol.....	56
<b>Figura 16</b>	Halos de degradação do glúten pelos extratos brutos das estirpes de <i>Paenibacillus</i> sp. após 8 dias de cultivo em meio líquido MG (1,0% manitol + 0,2% glúten); incubação a 36,5° C em meio sólido contendo 1,0 % de glúten.....	57
<b>Figura 17</b>	Halos de degradação do glúten em meio sólido a partir de diferentes diluições (2x, 4x, 8x e 16x) dos extratos brutos das estirpes de <i>Paenibacillus</i> sp.....	59
<b>Figura 18</b>	Halos de degradação do glúten pelos extratos brutos das estirpes de <i>Paenibacillus</i> sp. após choques térmicos em diferentes temperaturas	61

<b>Figura 19</b>	Halos de degradação do glúten a partir dos extratos brutos das estirpes de <i>Paenibacillus</i> sp. submetidos a diferentes pHs.....	62
<b>Figura 20</b>	Estirpes de <i>Paenibacillus</i> sp. estriadas em diferentes meios: ágar-Glúten (YGA), ágar-Manitol (YMA) e ágar-Manitol + azul de bromotimol (YMA-B) a uma temperatura de 36,5° C e pH 7.....	65
<b>Figura 21</b>	Fotomicrografia de células Gram-positivas em forma de bastonete de <i>Paenibacillus</i> sp. (aumento total de 1000x em microscópio optico.....	66
<b>Figura 22</b>	Característica morfológica das colônias: A) <i>Paenibacillus</i> sp. (estirpe Ps_020, presente trabalho) em ágar manitol; incubação a 36,5° C por 7 dias; B) <i>Paenibacillus</i> sp. Y412MC10 em ágar triptona; incubação a 37° C por 7 dias (MEAD et al., 2012).....	66
<b>Figura 23</b>	Colônias de <i>Paenibacillus</i> sp. (estirpe INPA_Ps076) evidenciando a presença de exopolissacarídeos, muco, em placa com meio YMA (aumento total de 5x).....	67

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> Cereais tóxicos para a Doença Celíaca.....	18
<b>Tabela 2</b> Amostras de rizobactérias e locais de coleta.....	37
<b>Tabela 3</b> Faixas de pontuação para avaliação do crescimento das bactérias em meio sólido contendo glúten.....	39
<b>Tabela 4</b> Índice de degradação do glúten (IDG) dos isolados bacterianos em meio sólido contendo 1,0% de glúten após incubação a 36,5° C.....	48
<b>Tabela 5</b> Índice de degradação do glúten obtido pela atividade das estirpes de <i>Paenibacillus</i> sp. em diferentes concentrações celulares (mL <sup>-1</sup> ) incubadas em meio sólido contendo 1,0% de glúten.....	55
<b>Tabela 6</b> Degradação do glúten em meio sólido pelos extratos brutos das estirpes de <i>Paenibacillus</i> sp., incubação à temperatura de 36,5° C.....	57
<b>Tabela 7</b> Diâmetros dos halos de degradação do glúten a partir de diferentes diluições dos extratos brutos das estirpes de <i>Paenibacillus</i> sp. cultivadas em meio líquido MG e obtidos a partir de diferentes tempos de incubação.....	59
<b>Tabela 8</b> Degradação do glúten pelos extratos brutos das estirpes de <i>Paenibacillus</i> sp. cultivadas em dois meios líquidos e em condições de centrifugação diferente (precipitado e sobrenadante).....	60
<b>Tabela 9</b> Diâmetros dos halos de degradação do glúten a partir dos extratos brutos das estirpes de <i>Paenibacillus</i> sp. submetidos a diferentes temperaturas.....	61
<b>Tabela 10</b> Diâmetros dos halos de degradação do glúten a partir dos extratos brutos das estirpes de <i>Paenibacillus</i> sp. submetidos a diferentes pHs.....	62
<b>Tabela 11</b> Caracterização morfológica das estirpes de <i>Paenibacillus</i> sp. após 7 dias de incubação à temperatura de 36,5° C.....	63

# SUMÁRIO

	Página
<b>1</b> INTRODUÇÃO.....	16
<b>1.1</b> Visão geral sobre a Doença Celíaca (DC).....	17
<b>1.2</b> Mecanismos patológicos da DC.....	19
<b>1.3</b> Métodos para diagnóstico e tipos de manifestações da DC.....	21
<b>1.4</b> Formas de tratamento da DC.....	25
<b>1.5</b> Glúten - o grande vilão da DC.....	27
<b>1.6</b> Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas - <i>Paenibacillus</i> sp..	30
<b>2</b> OBJETIVOS.....	34
<b>2.1</b> Objetivo Geral.....	35
<b>2.2</b> Objetivos Específicos.....	35
<b>3</b> MATERIAL E MÉTODOS.....	36
<b>3.1</b> Obtenção dos isolados bacterianos e locais de coleta.....	37
<b>3.2</b> Teste de crescimento bacteriano em meio ágar-glúten.....	38
<b>3.3</b> Teste de crescimento bacteriano em diferentes meios líquidos.....	40
<b>3.4</b> Detecção de metabólitos degradadores de glúten nos extratos brutos dos isolados bacterianos.....	41
<b>3.5</b> Caracterização dos metabólitos dos extratos brutos de isolados bacterianos em diferentes temperaturas e pHs.....	42
<b>3.6</b> Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos.....	42
<b>3.6.1</b> Coloração de Gram.....	43
<b>3.6.2</b> Teste da catalase.....	43
<b>3.7</b> Caracterização genética dos isolados bacterianos.....	43
<b>3.7.1</b> Extração do DNA cromossomal.....	43
<b>3.7.2</b> Amplificação do gene 16S DNAr.....	44
<b>3.7.3</b> Sequenciamento e análise das sequências parciais do gene 16S rRNA.....	45
<b>4</b> RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
<b>4.1</b> Crescimento dos isolados bacterianos em meio com glúten.....	47
<b>4.2</b> Caracterização genética dos isolados bacterianos.....	50
<b>4.3</b> Caracterização biológica das estirpes de <i>Paenibacillus</i> sp.....	52
<b>4.4</b> Caracterização fenotípica das estirpes de <i>Paenibacillus</i> sp.....	63

<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>

# 1. INTRODUÇÃO





## 1.1 Visão geral sobre a Doença Celíaca (DC)

A doença celíaca (DC) ou enteropatia sensível ao glúten é uma das doenças inflamatórias mais comuns do intestino delgado (SZIKSZ et al., 2013). Caracteriza-se pela combinação de manifestações clínicas dependentes da ingestão do glúten, que provocam lesões na mucosa intestinal como, o atrofiamento das vilosidades e hiperplasia das criptas, levando à má absorção de nutrientes e subsequente desnutrição (Figura 1) (NEVORAL, 2014).



Figura 1. Consequências da DC: **a** Homem de 47 anos de idade diagnosticado com doença celíaca; **b** após 4 meses de tratamento com dieta isenta de glúten (aumento de peso de 50 kg para 70 kg). Fonte: WOODWARD, 2010.

A DC manifesta-se somente após o consumo de algumas proteínas presentes em cereais, como o trigo, centeio, cevada e aveia, sendo que a principal proteína é o glúten do trigo (LITWINEK et al., 2014).

Uma característica comum do glúten do trigo é o alto conteúdo de resíduos de aminoácidos glutamina (>30%) e prolina (>15%), que constituem o grupo das prolaminas, tóxicas para os celíacos. As prolaminas são subdivididas em duas frações protéicas, as gluteninas, que são classificadas como de alta e baixa massa molecular, e as gliadinas, que são geralmente monoméricas e classificadas como do tipo  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\omega$ , com massa molecular de 20-70 kDa, ricas em sequências repetitivas Pro-Ser-Gln-Gln / Gln-Gln-Gln-Pro (SCHUPPAN, 2000).

O trigo (*Triticum aestivum*) é o único cereal que apresenta glutenina e gliadina em quantidade adequada para formar o glúten. No entanto, essas proteínas podem estar presentes em outros cereais, como a cevada (*Hordeum vulgare*), o centeio (*Secale cereale*), e a aveia (*Avena sativa*), nas formas, respectivamente, de hordeína, secalina e avenina. Entre as proteínas do glúten, as gliadinas são as mais imunogênicas para os celíacos (Tabela 1) (STOVEN et al., 2012; ARAUJO et al., 2010; WIESER, 2007).

Tabela 1. Cereais tóxicos para a Doença Celíaca.

Cereal	Prolamina	Composição	Toxicidade
Trigo	$\alpha$ -Gliadina	36% Q, 17%–23% P	+++
Centeio	Hordeínas	36% Q, 17%–23% P	++
Cevada	Secalinas	36% Q, 17%–23% P	++
Aveia	Aveninas	alta Q, baixa P	+
Milho	Zeínas	baixa Q, alta A, L	-
Arroz	-	baixa Q, alta A, L	-

Obs. As principais prolaminas que induzem resposta imune aos celíacos são ricas em glutamina e prolina. A (alanina), L (leucina), P (prolina) e Q (glutamina). Fonte: SCHUPPAN, 2000.

Quando o glúten é ingerido, proteases gástricas e pancreáticas clivam-no em fragmentos peptídicos/epítomos que são imunogênicos para os celíacos. Os resíduos de glutamina dos fragmentos gerados são transformados em ácido glutâmico pela enzima transglutaminase tecidual (tTG) das células epiteliais do intestino, que então, são reconhecidos pelo sistema imunológico por intermédio das células apresentadoras de antígeno – HLA do tipo DQ2 ou DQ8. Após a apresentação desses epítomos às células T ocorre o desencadeamento do processo inflamatório (lesão do intestino delgado, caracterizada pelo atrofiamento das vilosidades, hiperplasia das criptas e aumento da leucocitose intra-epitelial). A continuidade da exposição ao glúten inclui o aumento do risco de linfoma, osteoporose, anemia, infertilidade, problemas neurológicos e câncer (STOVEN et al., 2012).

Portanto, o glúten é um composto parcialmente digerido por não haver enzimas específicas para a sua completa digestão, e também, não é totalmente assimilado pelo organismo, sendo uma porção eliminada no intestino grosso servindo como substrato para proteases microbianas (CAMINERO et al., 2012; ROSSI e SCHWARTZ, 2010).

## 1.2 Mecanismos patológicos da DC

Três patologias estão associadas à ingestão de glúten: i) alergia alimentar que afeta 0,2-0,5% da população; ii) doença celíaca, que afeta crianças e adultos em todo o mundo (de 0,1% a >1,6%); iii) sensibilidade ao glúten, uma patologia de intolerância ao glúten que foi recentemente descoberta, com uma prevalência estimada de 6% da população dos EUA (RIBEIRO et al., 2014).

A presença do glúten no organismo dos celíacos ativa as enzimas transglutaminases teciduais (tTG) no intestino delgado após a sua digestão parcial pelas proteases gástricas e pancreáticas. Os fragmentos gerados não são absorvidos e permanecem no lúmen do intestino podendo atravessar a barreira epitelial por meio de perturbações na permeabilidade intestinal. As tTG da lâmina própria se tornam ativas e catalisam preferencialmente o substrato gliadina, nas regiões ricas em glutamina, provocando a desaminação dessa proteína, convertendo os resíduos de glutamina em ácido glutâmico, e gerando, assim, peptídeos carregados negativamente que serão reconhecidos pelas células apresentadoras de antígeno (SZIKSZ et al., 2013; SCHUPPAN, 2009).

Frações de gliadina desaminadas ativam as células apresentadoras de antígenos que acionam, então, os linfócitos T na lâmina própria do intestino, provocando danos teciduais (RE et al., 2013).

As células T reconhecem exclusivamente os peptídeos/epítomos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos - HLA DQ2 ou DQ8. Os peptídeos gerados são excepcionalmente resistentes à proteólise gástrica, pancreática e intestinal, conseqüentemente, a sua elevada concentração resulta em uma reação imunológica. Esta estimulação imunológica é que leva a uma série de reações inflamatórias típicas da doença celíaca (SOLLID e LIE, 2005).

As células T ativadas expressam citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), que desencadeiam a liberação das metaloproteinases da matriz pelos fibroblastos locais causando danos nas células e remodelação do tecido, respectivamente; as células T CD4<sup>+</sup> específicas na lâmina própria estimulam, por sua vez, a produção de auto-anticorpos na forma de anticorpos antitransglutaminase (anti-tTG) e antiendomísio (anti-EDM). A ativação das células T é acompanhada pela produção de citocinas que podem promover a inflamação e dano nas vilosidades do intestino delgado (Figura 2) (BRIANI et al., 2008; NIEWINSKI, 2008).

A ativação do sistema imune inato pelos macrófagos e células dendríticas leva ao aumento da expressão do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. A resposta imune inata induzida também é caracterizada pelo aumento da expressão de interleucina-15 produzida principalmente por enterócitos, que ativa os linfócitos T CD8<sup>+</sup> (T citotóxico) intra-epiteliais conduzindo à destruição das células epiteliais (Figura 2) (SZIKSZ et al., 2013; STEPNIAK e KONING, 2006).

A exposição dos enterócitos à gliadina resulta também no aumento da atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> citosólica (cPLA<sub>2</sub>), liberando ácido araquidônico (AA) e prostaglandina E<sub>2</sub>, sugerindo que as células epiteliais intestinais co-atuam no processo inflamatório (XU et al., 2013; VINCENTINI et al., 2011).

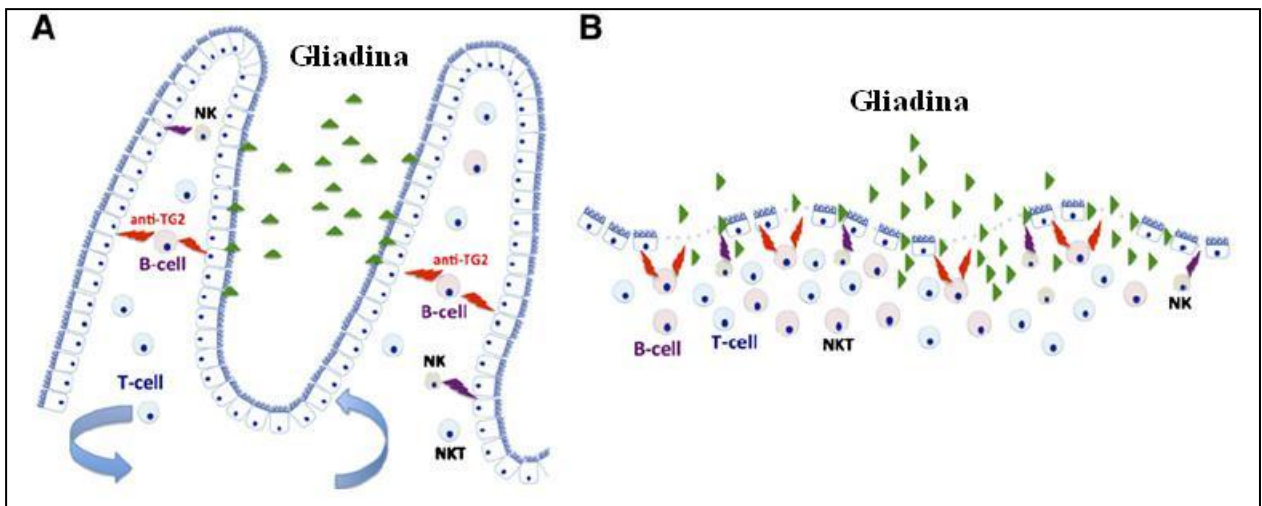


Figura 2. Ativação do sistema imunológico pela gliadina do glúten. A) Fase inicial de ativação do sistema imune pelas frações peptídicas do glúten (gliadinas). B) Esses peptídeos atravessam a barreira epitelial após o aumento da permeabilidade intestinal ativando as células T glúten-específicas e células B na liberação de anticorpos, causando danos nas células epiteliais e remodelação do tecido. Fonte: XU et al., 2013.

A DC está associada, portanto, a fatores ambientais, genéticos e imunológicos, pois os indivíduos só manifestam a doença pela presença do glúten e possuem genes específicos, HLA-DQ2 e/ou DQ8, que ao expressarem-se manifestam todo o mecanismo patogênico descrito anteriormente. Esses genes nas células apresentadoras de antígenos expressam proteínas específicas de membrana capazes de reconhecerem e se ligarem aos peptídeos/epítomos do glúten (STEPNIAK e KONING, 2006).

Fortes evidências demonstram que ambos os genes HLA-DQ2 e HLA-DQ8 estão envolvidos no desenvolvimento da DC. Mais de 97% dos celíacos são portadores de pelo menos um desses dois genes, sendo a maioria dos pacientes portadores da variante DQ2

(>90%) e uma minoria, DQ8. O papel das moléculas de HLA é de se ligar a fragmentos de peptídeos do glúten e apresentarem às células T. As moléculas HLA de classe II (DQ2) apresentam peptídeos para as células T CD4<sup>+</sup>, enquanto que as HLA de classe I (DQ8) apresentam os peptídeos para as células T CD8<sup>+</sup> (STEPNIAK e KONING, 2006; SOLLID e LIE, 2005).

Para que a DC se manifeste, além do consumo do glúten e da predisposição genética, algumas vezes, pode ser influenciada por outros fatores ambientais. Dentre estes fatores, está o processo de infecção causado pelo adenovírus sorotipo 12, em que os anticorpos reconhecem os epítomos da proteína E1B desse vírus e as gliadinas do glúten, ambos como antígenos, desencadeando respostas imunológicas cruzadas e, conseqüentemente, resultando no desenvolvimento da enteropatia (NASCIMENTO et al., 2012).

Além da inflamação na mucosa intestinal, a DC quando não tratada provoca manifestações clínicas que podem envolver a pele, o fígado, os sistemas nervoso, reprodutivo, endócrino e ósseo. Os celíacos também estão propensos a desenvolver várias doenças imunológicas, entre elas, *diabetes mellitus* tipo 1, doença de Addison, lupus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, síndrome de Sjögren, hepatite autoimune, cirrose biliar primária e estomatite de repetição (MOONEY et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2012; SILVA; FURLANETTO, 2010).

### **1.3 Métodos para diagnóstico e tipos de manifestações da DC**

O diagnóstico da Doença Celíaca deve ser baseado em três pilares principais: exame clínico, análise histopatológica do intestino delgado e investigação dos marcadores séricos (HERNANDEZ-LAHOZ e RODRIGO, 2013; WALKER e WOODWARD, 2012).

Os principais marcadores sorológicos descritos são os anticorpos anti gliadina, antiendomísio e antitransglutaminase, os quais têm mostrado um alto grau de especificidade e sensibilidade nas várias fases da doença, o que permitiu que um número crescente de pacientes com DC, inclusive os assintomáticos, fossem identificados (TONUCCI e BIZZARO, 2014).

O exame histopatológico do intestino delgado, preferencialmente da junção duodeno-jejunal, revela mucosa anormal, com vilosidades atrofiadas ou ausentes, aumento no comprimento das criptas (hiperplasia) e no número de linfócitos intraepiteliais (Figura 3) (NASCIMENTO et al., 2012; SILVA et al., 2006).

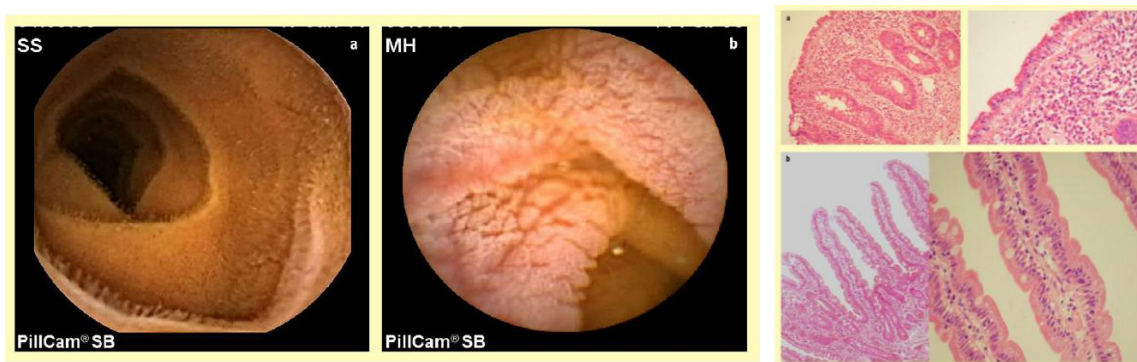


Figura 3. Imagem endoscópica evidenciando: a) Vilosidades normais e b) Atrofiamento das vilosidades. Imagem histopatológica evidenciando: a) Atrofiamento das vilosidades e b) Vilosidades normais. Fonte: WALKER e WOODWARD, 2012.

Testes genéticos, por meio dos marcadores HLA-DQ2 ou HLA-DQ8, também confirmam a doença (>99%). Técnicas como ultrassom e tomografia computadorizada do abdômen, ressonância magnética e endoscopia gastro-duodenal também podem ser utilizadas (HADITHI e PEÑA, 2010).

No entanto, existem pacientes que não apresentam nenhum diagnóstico (negativo na sorologia e na biópsia), tornando a investigação da doença demorada e difícil. A maioria dos pacientes queixa-se inicialmente de longos períodos de sintomas inexplicáveis, frequentando vários médicos até encontrar um diagnóstico conclusivo, além da profunda frustração com a propensão dos médicos na indicação de sintomas psicológicos. Tudo isso, muitas vezes, leva o paciente a buscar o auto-diagnóstico, pesquisando a respeito da doença antes mesmo da procura de um médico especialista (COPELTON e VALLE, 2009).

Apenas 11% dos casos de pacientes com DC são diagnosticados de maneira adequada devido à variação da apresentação clínica da doença, que é bastante complexa. Comumente são reportados sintomas como fadiga, depressão, flatulência, perda de peso, anemia, náusea, distensão abdominal, diarreia ou constipação e ainda pode estar associado a anomalias intestinais como a síndrome do intestino irritável, colite e infecções gastroentéricas (THOM et al., 2009).

Existe a possibilidade de complicações graves quando a doença não é tratada, tais como: esterilidade, osteoporose, endocrinopatias, distúrbios neurológicos/psiquiátricos, doenças hepáticas e auto-imunes. Podendo ser considerada, mundialmente, um problema de saúde pública, principalmente devido à alta prevalência, morbidade e, em longo prazo, à probabilidade de mortalidade por várias causas, entre elas, linfoma, câncer no intestino e

causas combinadas, sendo a maior parte por deficiência imune (NASCIMENTO et al., 2012; STOVEN et al., 2012; SILVA e FURLANETTO, 2010; SILVA et al., 2006).

Aproximadamente 30% dos celíacos têm uma ou mais doenças autoimunes, entre elas, a mais comum é a dermatite herpetiforme (NASCIMENTO et al., 2012; NIEWINSKI, 2008).

A DC pode se manifestar em qualquer idade, sendo mais comum na infância, logo após a introdução do glúten na dieta, prevalecendo o sexo feminino. Os sintomas mais comuns nessa fase são diarreia, distensão abdominal, anorexia, atraso de crescimento, atrofia muscular, hipotonia e irritabilidade. Na adolescência, a doença pode ocasionar atraso no desenvolvimento estato-ponderal e pubertário, raquitismo, diarreia, anemia recorrente e desempenho escolar deficiente. Em adultos, a severidade e o quadro da doença alteraram substancialmente nos últimos anos, com um vasto leque de manifestações clínicas, muitas vezes assintomáticas (NEVORAL, 2014; HERNANDEZ-LAHOZ e LUIS RODRIGO, 2013; WOODWARD, 2010).

A DC pode manifestar-se de diferentes maneiras (MALAMUT et al., 2014; SILVA e FURLANETTO, 2010; NOBRE et al., 2007):

- Forma clássica: é a mais freqüente e manifesta-se nos primeiros anos de vida, com quadros clínicos de diarreia crônica, vômitos, irritabilidade, anorexia, emagrecimento, déficit de crescimento, dor e distensão abdominal, diminuição do tecido subcutâneo, comprometimento variável do estado nutricional e anemia ferropriva devido à má absorção intestinal;
- Forma atípica/não-clássica: apresenta-se mais tardiamente e as manifestações gastrointestinais estão ausentes ou, quando presentes, são pouco relevantes. Os indivíduos acometidos podem apresentar manifestações isoladas como baixa estatura, anemia por deficiência de ferro, artralgia ou artrite, constipação intestinal, hipoplasia do esmalte dentário, osteoporose e infertilidade;
- Forma silenciosa/assintomática: Diagnóstico ocasional, histológico ou sorológico, em indivíduos assintomáticos, identificados pela existência de fatores de risco, que apresentam atrofiamento das vilosidades nas biópsias duodenais.
- Forma latente: Há duas formas: 1- Pacientes com diagnóstico prévio que responderam à dieta isenta de glúten, e apresentam histologia normal ou apenas aumento de linfócitos intraepiteliais; 2- indivíduos assintomáticos com anticorpos circulantes e presença de linfocitose intra-epitelial nas biópsias do duodeno, que podem desenvolver a doença após exposição prolongada ao glúten.

- Forma refratária: Pacientes com DC que não respondem à dieta isenta de glúten, ou seja, enteropatia com atrofiamento das vilosidades e linfocitose intra-epitelial, apesar da restrição de glúten por mais de 12 meses. A DC refratária do tipo I caracteriza-se pela presença de linfócitos intra-epiteliais normais e concomitância de doenças auto-imunes. No tipo II, a população linfocitária exibe alterações fenotípicas, o que acarreta um elevado risco de progressão para linfoma.

Essas diferentes formas de apresentação da DC colocam-na em comparação a um *iceberg*, em que a forma clássica encontra-se na ponta e a forma silenciosa, na parte submersa, que ainda não foi diagnosticada. Prevendo, portanto, para essa doença uma incidência mundial muito maior do que se supunha (Figura 4) (FARRELL e KELLY, 2001).

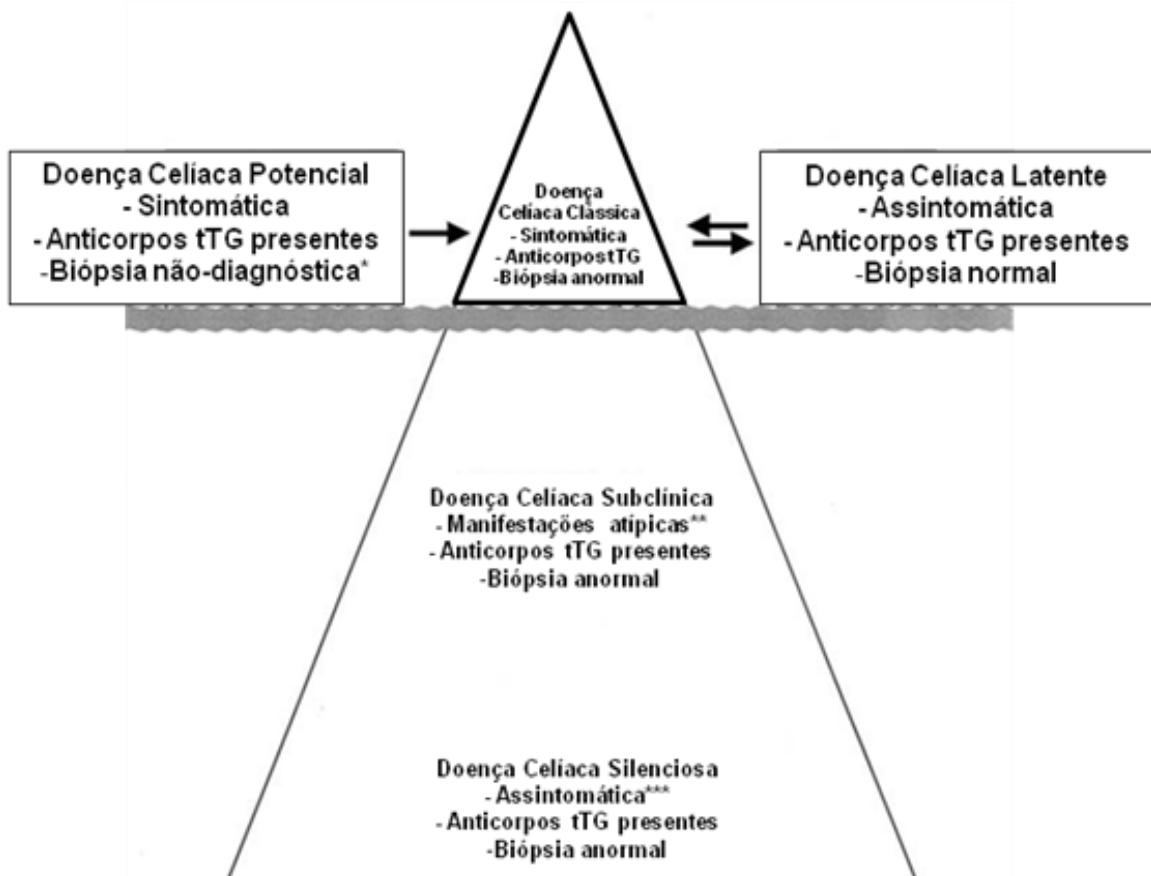


Figura 4. Iceberg celíaco e o espectro da doença. \* Ausência de atrofiamento das vilosidades intestinais, mas aumento de linfócitos intraepiteliais. \*\* Infertilidade, convulsões, ataxia, dor óssea, alterações bioquímicas e hematológicas. \*\*\* Podem ser identificados por histórico familiar positivo. Fonte: FARRELL e KELLY, 2001.



Uma nova condição clínica associada ao glúten, chamada ‘sensibilidade ao glúten não-celiaca’, também descrita na literatura como hipersensibilidade ou intolerância ao glúten, foi recentemente identificada. Esta condição é caracterizada por sintomas gastrointestinais ou extra-intestinais comparáveis, em muitos casos, aos de pacientes com DC. No entanto, até o momento nenhum mecanismo imunológico específico ou marcadores sorológicos foram identificados para esta desordem. O diagnóstico é feito por exclusão da DC ou de alergia mediada por IgE de trigo, e é baseada na relação direta entre a ingestão de glúten e o aparecimento de sintomas (TONUCCI e BIZZARO, 2014).

#### **1.4 Formas de tratamento da DC**

Até o ano de 1970, acreditava-se que a prevalência da DC na população geral fosse de 0,03%. No entanto, este valor aumentou significativamente e encontra-se em torno de 1-2%, com uma distribuição bastante homogênea em todo o mundo (SAEZ et al., 2011; TACK et al., 2010).

Sua incidência está aumentando e parece ser maior do que o esperado na população. Uma das razões para este aumento é a maior sensibilidade dos métodos diagnósticos, no entanto, a única forma de tratamento da doença consiste na total exclusão do glúten na dieta, onde os alimentos sem esse componente devem satisfazer as necessidades nutricionais do paciente. E, ao aderir à dieta, o paciente poderá até levar uma vida normal, mas as deficiências nutricionais são comuns, principalmente, em fibras, ferro, folato, cálcio, magnésio, zinco, vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina e vitamina B12) e vitamina D (LEBWOHL et al., 2014; ANDREOLI et al., 2013; FRIC et al., 2011; RUBIO-TAPIA et al., 2010).

Uma dieta livre de glúten é diferente para cada pessoa, mas a melhora clínica é evidente geralmente dentro de semanas após o tratamento. A sorologia específica normaliza para a maioria dos pacientes em 6-12 meses e a recuperação da mucosa pode demorar mais de 1 ano (RUBIO-TAPIA et al., 2011).

Porém, cumprir uma dieta livre de glúten é difícil, pois há uma pressão social, especialmente em pacientes jovens; produtos sem glúten não são amplamente disponíveis e geralmente são mais caros; não há consenso sobre a quantidade mínima de glúten permitida nos alimentos; alguns produtos rotulados sem glúten incluem traços desse composto; uma dieta de exclusão não é eficaz no caso de DC refratária (LERNER, 2010).

Além disso, a restrição alimentar influencia a qualidade de vida dos pacientes, onde muitos apresentam quadros clínicos psicossomáticos como estresse, ansiedade e depressão (SAINSBURY et al., 2013; ARAÚJO et al., 2010).

No Brasil, em virtude das dificuldades para garantir a prática da dieta isenta de glúten, foi promulgada, em 1992, a Lei Federal número 8.543, que determina a impressão da advertência “*contém glúten*” nos rótulos e embalagens de alimentos industrializados. Assim, os portadores de DC podem identificar os alimentos que não devem consumir (SILVA et al., 2006). Posteriormente, em 2003, foi publicada a Lei nº 10.674, que obriga os produtos alimentícios comercializados a portarem informação sobre a presença de glúten como medida preventiva e de controle da doença celíaca.

Nota-se, porém, que somente essa forma de tratamento não é suficiente e há uma necessidade urgente de desenvolver uma terapia alternativa segura, eficaz e acessível. Novas estratégias terapêuticas estão sendo visadas e em fase de desenvolvimento (RIBEIRO et al., 2014; SZIKSZ et al., 2013; SOLLID e LIE, 2005):

- Imunização com peptídeos de glúten (produção de vacinas);
- Suplementação enzimática oral que visam destruir os epítomos tóxicos das prolaminas;
- Inativação do gene HLA-DQ por mutação sítio-dirigida;
- Uso de variedades de trigo geneticamente alterados, sem epítomos nocivos do glúten;
- Tratamento da farinha do trigo com proteases para a hidrólise completa do glúten.

Até o momento, poucas são os experimentos que tenham sido testados em ensaios clínicos, podendo-se citar alguns deles: **AT-1001** (*Alba Therapeutics*), acetato de larazotide, é um octapeptídeo derivado da toxina do cólera e usado para evitar a passagem de peptídeos de glúten através do epitélio intestinal nas junções de regulação da permeabilidade celular; as peptidases **ALV003** (*Alvine Pharmaceuticals*) e **AN-PEP** (*DSM* - empresa alimentar) são usadas para digerir os peptídeos tóxicos do glúten. ALV003 é uma combinação de duas proteases (uma cisteína-endoprotease, derivada da semente de cevada e uma prolil-endopeptidase de *Sphingomonas capsulatum*), AN-PEP é uma prolil-endoprotease derivada de *Aspergillus niger*; **Nexvax2** (*ImmusanT*), uma vacina terapêutica que utiliza três peptídeos do glúten reconhecidos pelas células T e que se destina a restaurar a tolerância imunológica ao glúten (PÉREZ et al., 2012).

A secalina, tipo de proteína tóxica aos celíacos encontrada no centeio (*Secale cereale*), também contém epítomos capazes de prevenir a resposta imunológica na mucosa intestinal *in*

*in vitro*, um decapeptídeo (QQPQDAVQPF) foi isolado e caracterizado como tendo efeito antagonista na ativação das células T; essa porção controla o processo inflamatório mediado pelas células do sistema imune na mucosa após exposição à gliadina (VITA et al., 2012).

A proteólise de peptídeos imunogênicos do glúten usando endoproteases específicas, que atuam diretamente nas regiões tóxicas ricas em prolina e glutamina, podem ser usadas como um complemento na dieta dos celíacos, e atuar como um agente terapêutico de uso oral (TYE-DIN et al., 2010; HARTMANN et al., 2006). Já a desintoxicação do trigo via manipulação genética, alterando ou removendo os peptídeos tóxicos do glúten, apesar de poder auxiliar no tratamento dos celíacos, ainda é uma problemática já que a capacidade de elasticidade nos produtos alimentícios à base de farinha de trigo se dá por meio das propriedades químicas dessa proteína (LERNER, 2010; GIANFRANI et al., 2007).

No presente trabalho, pretende-se utilizar uma nova alternativa no tratamento da DC além da isenção do glúten na dieta, como o uso de micro-organismos não patogênicos na produção de probióticos, por exemplo; ou mesmo a formulação de um novo produto capaz de degradar o glúten de forma eficaz a ponto de não gerar as manifestações clínicas típicas da doença.

## **1.5 Glúten - o grande vilão da DC**

O glúten, o causador da manifestação da Doença Celíaca, é uma mistura de quatro tipos de proteínas: albuminas, globulinas, gliadinas e gluteninas. As albuminas e globulinas representam aproximadamente 15% das proteínas, o restante corresponde às gliadinas e gluteninas. Essas duas últimas encontram-se em quantidades aproximadamente idênticas, e podem ser diferenciadas tendo-se em conta a solubilidade de cada fração em etanol: as gliadinas são solúveis, enquanto as gluteninas são insolúveis. Estas duas frações são caracterizadas por elevadas quantidades dos aminoácidos glutamina e prolina e por baixas quantidades de aminoácidos com grupos laterais eletricamente carregados (ARAÚJO et al., 2010; WIESER, 2007).

As gliadinas são classificadas em quatro grupos moleculares distintos, de acordo com sua mobilidade eletroforética:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - ou  $\omega$ -gliadinas. São proteínas monoméricas que interagem principalmente não-covalentemente, tendo como característica química principal, elasticidade e plasticidade. As gluteninas são moléculas constituídas por duas subunidades - alta e baixa massa molecular ligadas por pontes dissulfeto, que conferem as propriedades viscoelásticas do glúten. Essas proteínas apresentam uma estrutura tridimensional na forma de

fibrila (morfologia  $\beta$ -folha) que se dá devido à formação de pontes de hidrogênio entre seus aminoácidos, formando uma rede de nanoporos (Figura 5) (KONTOGIORGOS, 2011).

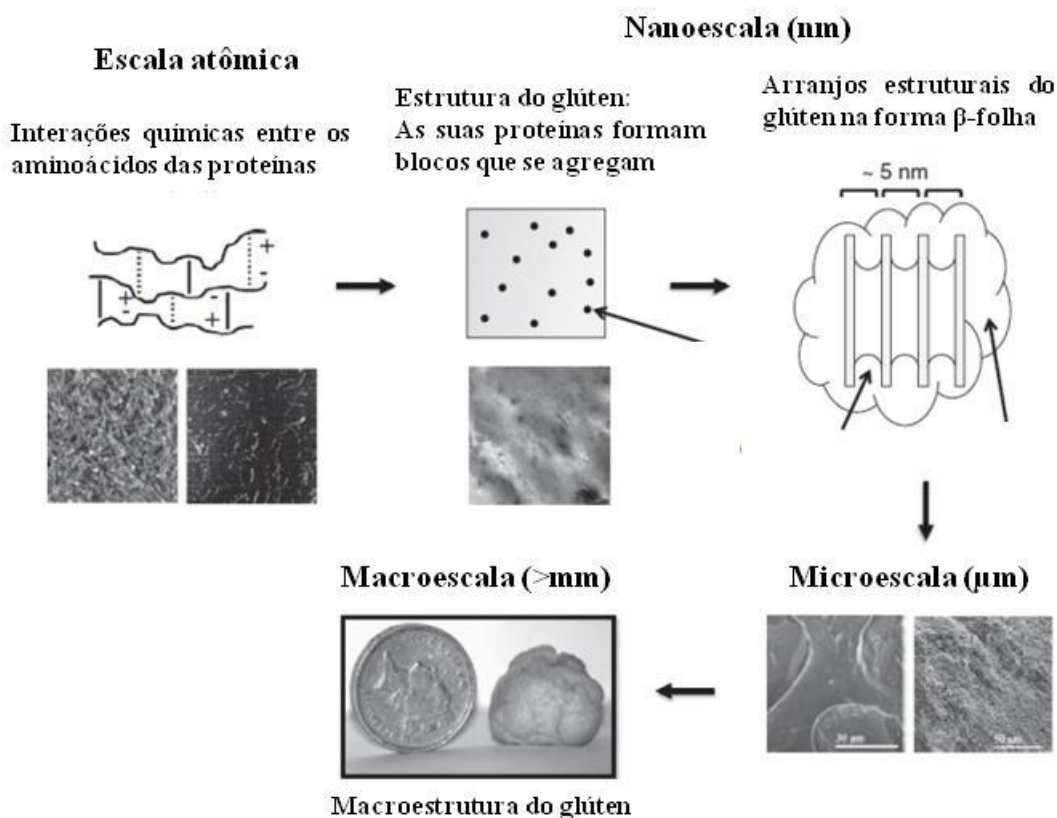


Figura 5. Estrutura hierárquica da rede de glúten: na escala atômica as proteínas do glúten interagem entre si por meio de interações químicas que formam uma rede; em nanoescala essa rede forma uma estrutura em  $\beta$ -folha, formando nanoporos, responsáveis pela característica química do glúten. Fonte: KONTOGIORGOS, 2011.

Portanto, quando gluteninas e gliadinas estão combinadas proporcionam as características coesa, viscosa e elástica, responsáveis pela extensibilidade da massa de farinha do trigo, extremamente importante para a indústria alimentícia (RIBEIRO et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2012).

As propriedades viscoelásticas da gliadina e da glutenina são fortemente dependentes de sua concentração. As gliadinas, dependendo da concentração muda de viscosa à viscoelástica. Já as gluteninas apresentaram um comportamento sólido viscoelástico em todas as concentrações testadas (XU et al., 2007). E um excelente volume de massa ou farinha é possível devido a essas características do glúten (ZHAO et al., 2010).

O consumo de cereais em todo o mundo é bastante elevado devido a sua importância nutricional. O trigo é um cereal de suma importância para a produção de pães e massa em geral. Além do alto teor de amido como fonte de energia (50-80%), contém fibras insolúveis, proteínas (8-12%), lipídeos e vitaminas, especialmente as do complexo B, além de minerais, sendo importante fonte de selênio e antioxidantes. Fornecendo, em geral, quantidades significativas da maioria dos nutrientes (DEWETTINCK et al., 2008).

Os produtos de panificação são tradicionalmente a base da alimentação e os mais consumidos na população em geral, proporcionando nutrientes importantes da dieta (LITWINEK et al., 2014). Por isso, o trigo é o cereal com a segunda maior safra produzida e consumida anualmente (~700 milhões de toneladas); fornece cerca de 20% das calorias do mundo; tem a maior área mundial de produção (~ 40 milhões de ha) e o maior volume de uma única cultura comercializado internacionalmente (~140 milhões de toneladas) (RIBEIRO et al., 2014).

Contudo, os portadores da DC são terminantemente proibidos de consumirem alimentos que contenham glúten presente nesse cereal. Existem, portanto, produtos industrializados sem adição desse componente, assim como os pães.

Mas produção de pão sem glúten, por exemplo, é muito mais complicado do que o tradicional, por causa do ajuste demorado de matérias-primas e método de processamento. Há necessidade de aditivos nutricionais, pois pão sem glúten é geralmente baixo em proteínas, fibras e minerais, em comparação com o pão de trigo. Além disso, esses produtos são significativamente mais caros e nem sempre estão disponíveis em supermercados (LITWINEK et al., 2014).

Outra forma comercial é o pré-tratamento enzimático e modificação do glúten, evitando ou reduzindo, desse modo, a ativação imunológica observada em pacientes com DC. O pré-tratamento enzimático de alimentos é um procedimento difuso na indústria alimentar, mas que pode ser amplamente utilizada para melhorar o aspecto e a consistência dos alimentos, tornando o produto mais competitivo no mercado (ELLI et al., 2012; CABRERA-CHÁVEZ e BARCA, 2010).

Em testes *in vivo* a fabricação de pães e massas com lactobacilos e proteases fúngicas diminuiu significativamente a toxicidade do glúten (GRECO et al., 2011).

Estudos *in vitro* com proteases de *Aspergillus oryzae* mostraram degradação eficaz do glúten, porém tornou a farinha ineficaz no uso para fabricação de alimentos, pois sem o glúten a massa foi incapaz de formar viscosidade (SUSANNA e PRABHASANKAR, 2011).

Está muito claro que esses processos químicos de tratamento do glúten levam a mudanças nas suas propriedades estruturais, conseqüentemente, alterando sua funcionalidade na produção de alimentos (LIAO et al., 2013). Uma alternativa é o uso de outros compostos que recuperem essa viscosidade como a proteína da soja que mostrou uma consistência gelatinosa e viscosa quando associada à farinha do trigo com glúten desnaturado. Há, portanto, um efeito cooperativo entre as proteínas da soja e o glúten durante o aquecimento das amostras, sugerindo uma possível adição das proteínas da soja para a melhoria das propriedades do glúten (viscosidade e gel coesivo) após tratamento de desnaturação (BAINY et al., 2010). Tornando, assim, o produto acessível no mercado e seguro para os celíacos.

## **1.6 Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas – *Paenibacillus* sp.**

Muitos micro-organismos, tais como, rizobactérias promotoras do crescimento de plantas foram identificados como não patogênicos para seres humanos e são bastante estudados devido a sua capacidade na produção de moléculas com inúmeras funções bioativas.

As rizobactérias podem ser de vida livre ou endofíticas. Quando habitam o interior de algum hospedeiro, como os vegetais, por exemplo, exercem muitas vezes efeitos benéficos: estimulam a produção de fitormônios, atuam na fixação do nitrogênio e na liberação de micronutrientes, fornecem resistência a um amplo espectro de patógenos (fungos, bactérias, vírus, insetos e nematoides), enfim, ocasiona uma significativa melhoria no estado fisiológico da planta e no seu crescimento (ANTOUN e PRÉVOST, 2005), por isso são definidas como promotoras do crescimento ou RPCP.

Essas bactérias alcançam as superfícies das raízes por meio da mobilidade ativa dos seus flagelos e são guiadas por respostas quimiotáticas advindas dos exsudatos radiculares (COMPANT et al., 2005). As raízes das plantas produzem e segregam continuamente íons e compostos orgânicos na rizosfera, que tornam o ambiente altamente rico em nutrientes e auxiliam a população de diversos grupos de bactérias. Esse fenômeno, contudo, propicia interações planta-micróbio de forma eficiente (NARULA et al., 2009; BAIS et al., 2006).

No solo essas bactérias têm funções extremamente importantes para o ecossistema, incluindo, a ciclagem de carbono e nitrogênio, a habilidade na quebra de celulose e quitina, e a síntese de várias outras enzimas de importância ambiental (KAMBLE et al., 2013; MANDIC-MULET e PROSSER, 2011).

A principal fonte de N está na forma de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), e devido à complexidade e dinâmica do solo, as bactérias promotoras de crescimento na rizosfera atuam fortemente na transformação desses compostos (ZHANG e HAN, 2012; POLACCO e TODD, 2011). Essas bactérias possuem, naturalmente, genes funcionais fixadores de nitrogênio que são estritamente regulados pelo meio ambiente, na presença de compostos como o carbono e o nitrogênio (HONG et al., 2012).

Devido às inúmeras vantagens desses micro-organismos e por serem amplamente encontrados na natureza são bastante visados na área agrícola por sua importância agroeconômica sustentável, pois ao exercerem suas funções biológicas naturais no controle de doenças de plantas e na remediação ambiental, levam a uma diminuição do uso de produtos químicos sintéticos, favorecendo o meio ambiente (GÜNES et al., 2014; FIGUEIREDO et al., 2011, 2010).

O uso das rizobactérias promotoras de crescimento é uma realidade atual. Vários países em desenvolvimento estão utilizando-as com base na agricultura orgânica (GLICK, 2012). Nos Estados Unidos, os organismos usados para atuar no biocontrole de plantas ou de outros organismos são supervisionados e liberados pelo EPA (*Environmental Protection Agency*, <http://www.epa.gov/>).

O número de espécies identificadas vem aumentando cada vez mais e com representantes de diversos táxons bacterianos. Entre as diversas RPCPs identificadas estão as do gênero *Paenibacillus* (ANTOUN e PRÉVOST, 2005).

As espécies do gênero *Paenibacillus* (ASH et al., 1994) pertencem ao Reino Bacteria, Filo Firmicutes, Classe Bacilli, ordem Bacillales e família Paenibacillaceae. São bactérias gram-positivas, em forma de bastonete, dotadas de mobilidade, formadoras de esporos, aeróbias ou anaeróbias facultativas (Figura 6). São abundantes em solos rizosféricos e tem boa capacidade em colonizar as raízes de plantas, podendo produzir naturalmente hormônio de crescimento vegetal e várias enzimas hidrolíticas, além das funções típicas das rizobactérias (GOVINDASAMY et al., 2011; KO et al., 2010; HOON et al., 2005; BERGE et al., 2002; WEID et al., 2000). Segundo o site LPSN (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* - <http://www.bacterio.net/paenibacillus.html>) existem cerca de 150 espécies de *Paenibacillus* registradas.

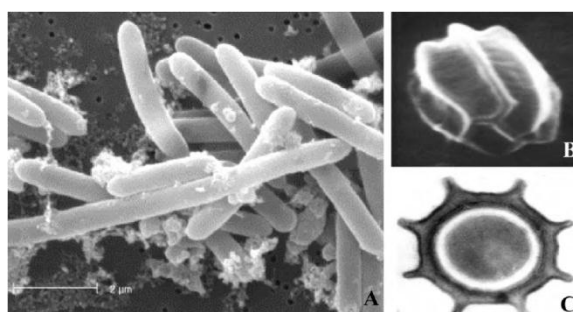


Figura 6 - Eletromicrografia de células de *Paenibacillus polymyxa*. A) Visão geral dos bastonetes (TIMMUSK *et al.*, 2003), B) e C) em forma de esporos. Barra = 2  $\mu$ m. Fonte: DONDERO e HOLBERT, 1957.

Em geral, essas bactérias não são patogênicas para plantas ou animais e têm grande potencial para aplicações agrícolas, médicas e industriais. Estudos têm demonstrado inúmeras funções biológicas desempenhadas por esses micro-organismos com alto padrão biotecnológico:

1- Atividade xilanolítica. Produzem xilanase extracelular que degrada eficientemente a hemicelulose encontrada em madeira, tornando-se um organismo potencialmente útil para a conversão de biomassa lignocelulósica em combustíveis alternativos (HWANG *et al.*, 2010; NONG *et al.*, 2009);

2- Atividade antifúngica. Produzem uma variedade de moléculas bioativas, a maioria peptídeos antimicrobianos e metabólitos secundários que atuam contra fungos fitopatogênicos (GU *et al.*, 2010; SON *et al.*, 2009; WHIPPS, 2001);

3- Atividade antibacteriana. Foram isoladas e identificadas moléculas com propriedades potentes contra bactérias patogênicas Gram-negativas e Gram-positivas (HE *et al.*, 2007);

4- Atividade fibrinolítica e anticoagulante (LU *et al.*, 2010), entre outros.

O interesse por esses micro-organismos aumentou bastante nos últimos anos. Vários são os estudos moleculares para a identificação de genes envolvidos na biossíntese de antibióticos (bacitracina, surfactina, polimixina, fusaricidina) e de outras moléculas de interesse. No banco de dados do NCBI estão depositados os genomas de algumas espécies de *Paenibacillus* (CHAUDHRY *et al.*, 2013; JEONG *et al.*, 2011; NIU *et al.*, 2011).

Uma propriedade marcante dessas bactérias é a sua capacidade de produzir inúmeras moléculas com atividade antimicrobiana. Muitas foram isoladas e caracterizadas, sendo que algumas já são comercializadas no mercado farmacêutico, como a polimixina (Figura 7) (DENG *et al.*, 2011b).





Figura 7 - Polimixinas na sua forma comercial gotas, injetável e de uso tópico.  
FONTES: <http://www.walgreens.com/>; <http://www.pharmaceutical-drug-manufacturers.com/>;  
<http://www.nursingconsult.com/>

Várias estirpes dessa espécie são capazes de produzir inúmeras enzimas hidrolíticas que desempenham um papel importante no controle biológico de patógenos de plantas. Porém, além dessas enzimas muitos outros compostos ainda são indefinidos estruturalmente ou desconhecidos (LAL e TABACCHIONI, 2009).

Essas bactérias produzem também uma grande quantidade de exopolissacarídeo, um composto de consistência mucosa, constituído, principalmente, por monossacarídeos do tipo manose, galactose, frutose, glicose, ácido glucurônico e outros. O muco apresenta função antioxidante, antitumoral e baixa toxicidade, quando testado *in vitro* e *in vivo*, podendo ser fonte de produtos terapêuticos naturais, utilizados na alimentação e saúde (RAZA et al., 2011; LIU et al., 2010; RUIZ-BRAVO et al., 2001). Também se revelou eficiente na absorção de metais pesados tóxicos (Pb, Cd, Co, Ni, Zn e Cu), podendo ser utilizado como um biossorvente para recuperação de metais e remediação do ambiente (PÉREZ et al., 2008).

Pode-se perceber, portanto, que essas bactérias participam de importantes funções: atuam como biofertilizantes, suprindo a planta com nutrientes; ou como rizomediadores ao degradar os poluentes do solo; são fitoestimuladores ao produzir hormônios vegetais de crescimento; e ainda antibióticos no controle de doenças de plantas, gerando, inclusive patentes (EP1788074A1/2007) (ZEIGLER, 2013). Assim, as bactérias do gênero *Paenibacillus* mostram-se bastante promissoras nos estudos com âmbito biotecnológico, principalmente na sua potencial produção de proteases que podem, porventura, atuar na degradação do glúten.

## **2. OBJETIVOS**



## **2.1 Objetivo Geral**

Obter rizobactérias capazes de degradar o glúten, visando utilizá-las como supridoras de metabólitos ou enzimas, em benefício das pessoas com doença celíaca.

## **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a capacidade de rizobactérias em consumir o glúten, em meios de cultura, para seu metabolismo e crescimento;
- Identificar taxonomicamente as rizobactérias mais promissoras;
- Avaliar o efeito da temperatura na capacidade dessas rizobactérias e de seus extratos brutos em degradarem o glúten;
- Avaliar o efeito do pH na capacidade dessas rizobactérias e de seus extratos brutos em degradarem o glúten.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**



Os estudos microbiológicos foram realizados no Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia (LEBAM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA e a identificação molecular foi realizada no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM), da Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

### 3.1 Obtenção dos isolados bacterianos e locais de coleta

Cento e quinze isolados de rizobactérias foram obtidos do banco de micro-organismos do LEBAM/INPA. Cada isolado foi reativado em placas de Petri contendo meio YMA (10 g manitol, 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>, 0,1 g NaCl, 0,5 g extrato de levedura, 15 g ágar em 1 L de água destilada) (VINCENT, 1970) e incubados a  $\pm 26,5^{\circ}$  C até o crescimento das colônias (cerca de 3 dias) para posteriores estudos e análises com glúten.

O meio de cultivo YMA é historicamente utilizado para o isolamento, purificação e crescimento de bactérias indutoras de nódulos em leguminosas, genericamente denominadas de rizóbios. As bactérias utilizadas foram isoladas dos nódulos das raízes de plantas e de solos da rizosfera coletados em diferentes localidades de Manaus/AM e municípios próximos (Tabela 2).

Tabela 2 - Amostras de rizobactérias e locais de coleta.

Isolados	Local de coleta	Solo/Planta
INPA_Ps007, Ps020, Ps021, Ps022, Ps024, Ps028, Ps031	Novo Ayrão	Floresta
Ps050, Ps065, Ps076, Ps088	Brasileirinho	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
Ps139, Ps151, Ps157, Ps161	Careiro da Várzea	<i>Acaciamangium</i> (Acácia)
Ps178, Ps183, Ps655, Ps656	Brasileirinho	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
Ps546, Ps548, Ps549, Ps550, Ps552, Ps553, Ps554, Ps558, Ps560, Ps563, Ps564, Ps565, Ps568, Ps569, Ps572, Ps573, Ps574, Ps575, Ps576, Ps077, Ps578, Ps579, Ps580, Ps581, Ps582, Ps583, Ps584, Ps585, Ps586, Ps587, Ps588, Ps589, Ps637, Ps639, Ps640, Ps642, Ps643, Ps644, Ps645, Ps646, Ps647, Ps648, Ps649, Ps650, Ps651, Ps652, Ps653, Ps654	Ramal do Caldeirão, Terra firme, km 3	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Puerária)

Continua...

Continuação...

Ps596, Ps598, Ps600, Ps602, Ps603, Ps604, Ps605, Ps606, Ps607, Ps610, Ps611, Ps612, Ps613, Ps614, Ps615, Ps616, Ps617, Ps618, Ps619, Ps664	Estrada de terra para Jandira; Beira do Rio Solimões, Várzea	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
Ps620, Ps621, Ps622, Ps623, Ps624, Ps629, Ps627, Ps628, Ps630, Ps631, Ps632, Ps635	Jandira, propriedade São João	<i>Vigna unguiculata</i> (Feijão Caupi)
Ps665, Ps666, Ps662, Ps663, Ps660, Ps661	INPA, campus 3	<i>Swartzia polyphylla</i> (Arabá)
Ps667, Ps668, Ps669, Ps672, Ps674, Ps675, Ps676, Ps677, Ps657, Ps659	Viveiro de Urucu	<i>Cedrelinga catenaeformis</i> (Cedrorana)

---

### 3.2 Teste de crescimento bacteriano em meio ágar-glúten

Os 115 isolados de rizobactérias foram testados quanto ao crescimento em meio YMA, onde se substituiu o manitol pelo glúten (10 g glúten, 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>, 0,1 g NaCl, 0,5 g extrato de levedura, 15 g ágar em 1 L de água destilada – pH 7,0). O meio foi esterilizado a 120° C por 15 min e, posteriormente, colocado em placas de Petri. Nas placas, cada um dos isolados foi estriado, realizando-se quatro repetições, e avaliados segundo o método de Oliveira e Magalhães (1999) (Figura 8 e 9; Tabela 3). O processo de avaliação consistiu na atribuição de notas de 1,00 (sem crescimento visível) a 4,00 (máximo crescimento). A Figura 8 esquematiza o procedimento geral de estriagem nas placas, enquanto que a Figura 9 apresenta o sistema de pontuações de crescimento. Foram também atribuídas notas intermediárias, subdivididas em 0,25, ou seja, 1,00, 1,25, 1,50, 1,75, 2,00 e etc., até 4,00, objetivando aumentar a precisão do método. Consideraram-se como os de melhores crescimentos, os que apresentaram notas médias acima de 3,06 (Tabela 3).

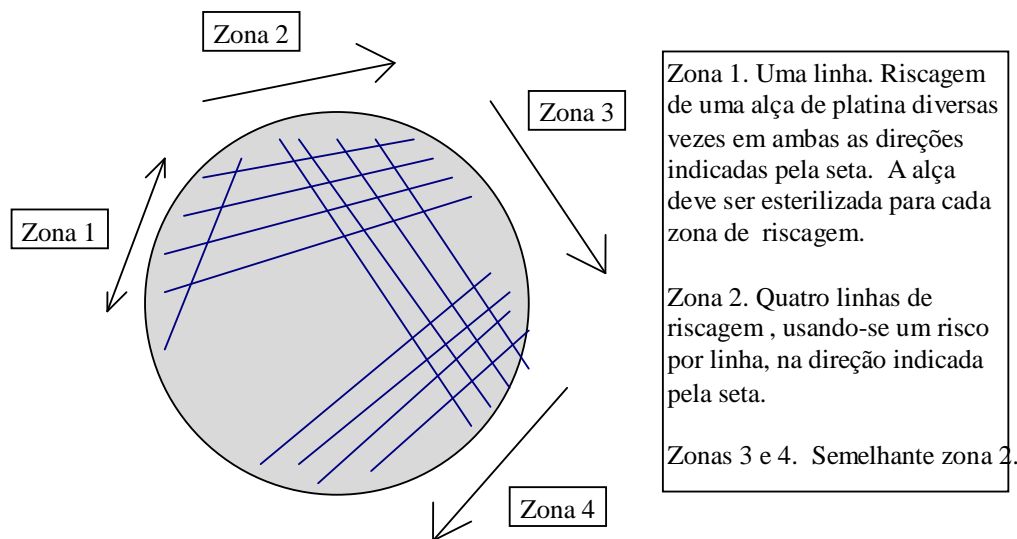


Figura 8 - Procedimento de inculação das bactérias nas placas de Petri com meio YMA modificado.

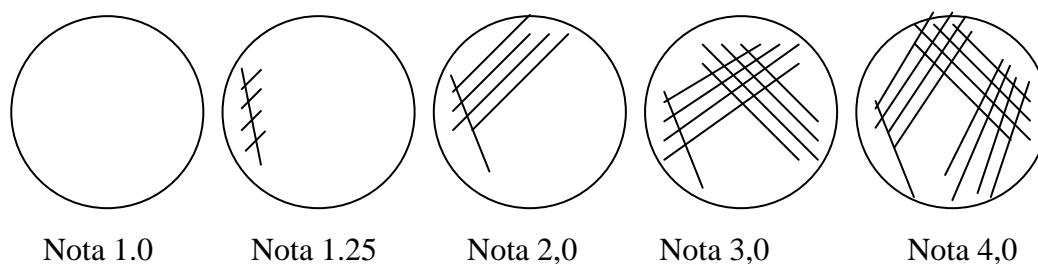


Figura 9 - Pontuações (notas) aplicadas para o crescimento das bactérias.

Tabela 3 - Faixas de pontuação para avaliação do crescimento das bactérias em meio sólido contendo glúten.

GRAU DE CRESCIMENTO	FAIXA DE PONTUAÇÃO
Baixo	1,00 – 2,00
Médio	2,06* - 3,00
Alto	3,06** - 4,00

\* Três repetições com nota 2,0 e uma com 2,25. \*\* Três repetições com nota 3,0 e uma com 3,25.

Os isolados também foram inoculados em placas de Petri contendo YMA (adicionado com gluten) para visualização de halo de degradação do glúten (região transparente ao redor das colônias, conforme mostrado nas figuras dos resultados). Com o auxílio de uma alça de platina, foi retirada uma porção da colônia bacteriana, realizando-se um leve toque no meio de cultura; cada placa conteve cinco colônias como repetições. As placas foram incubadas a  $\pm 26,5^\circ$  C e avaliadas diariamente quanto ao crescimento microbiano. Os micro-organismos que cresceram nessas condições foram novamente inoculados e incubados a  $36,5^\circ$  C em BOD e avaliados a cada três dias até o 10º dia de incubação. A avaliação nessa última temperatura foi realizada para verificar a capacidade desses micro-organismos em crescer e produzir metabólitos capazes de degradar o glúten a temperatura corporal humana.

O diâmetro do halo de degradação foi medido a cada três dias, utilizando-se um paquímetro digital, por um período de 9 dias. A partir dessas medidas, foram obtidos os Índices de Degradação do Glúten (IDG) para cada isolado, pela fórmula:  $DD$  (diâmetro da zona de degradação em mm) /  $DC$  (diâmetro da colônia em mm), adaptando-se os critérios e cálculos de Berraquero et al. (1976). Com base nos índices, os isolados foram classificados, de acordo com a capacidade de degradação do glúten, em: baixa ( $IDG < 2$ ), média ( $2 \leq IDG < 4$ ) e alta ( $IDG \geq 4$ ).

### **3.3 Teste de crescimento bacteriano em diferentes meios líquidos**

Com o objetivo de selecionar o melhor meio de cultivo, tanto para crescimento como para produção de metabólitos degradadores de glúten, os micro-organismos que foram positivos no teste anterior foram testados quanto ao crescimento em meio líquido com três diferentes formulações de fontes de carbono:

- a) 0,2 % de glúten (meio G) (0,2 % glúten, 0,5 g  $K_2HPO_4$ , 0,2 g  $MgSO_4$ , 0,1 g NaCl, 0,5 g extrato de levedura em 1 L de água destilada);
- b) 1,0 % de manitol + 0,2 % de glúten (meio MG);
- c) meio YM original, contendo 1,0 % de manitol (meio M).

Um volume de 50 mL de cada meio foi adicionado em erlenmeyers com capacidade de 125 mL e esterilizados a  $120^\circ$  C por 15 min. Após o esfriamento, cada um dos micro-organismos (concentração de  $10^3 / mL^{-1}$ ) foi inoculado em triplicata e colocados em agitador constante sob temperatura ambiente ( $\pm 26,5^\circ$  C). Uma alíquota de 2 mL do caldo foi retirada a cada 24 h por um período de 10 dias e armazenadas a  $- 20^\circ$  C para posterior detecção de metabólitos degradadores do glúten e contagem de células em câmara de *Neubauer*.



A partir das alíquotas, foram realizadas diluições com solução salina estéril (0,9 %) até a obtenção das seguintes concentrações:  $10^1$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  UFC/mL<sup>-1</sup>. Em seguida, cada uma das concentrações dos diferentes isolados foram adicionados em placas contendo meio ágar-glúten. Cada placa foi constituída de 5 réplicas e incubadas em duas temperaturas distintas: 26,5° C e 36,5° C, ambas por 7 dias. Os halos foram medidos com auxílio de paquímetro digital a cada 3 dias.

### **3.4 Detecção de metabólitos degradadores de glúten nos extratos brutos dos isolados bacterianos**

As alíquotas de 2 mL contendo os diferentes meios com os isolados bacterianos (tópico 3.3) foram utilizadas em ensaios para detecção de metabólitos capazes de degradar o glúten em meio sólido. Foram utilizadas as alíquotas com 24h, 4 dias e 8 dias de cultivo, com a finalidade de verificar a produção de moléculas degradadoras de glúten.

Primeiramente, as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 min. Em seguida, foram filtradas em membrana *Millipore* 0,22 µm e armazenadas em microtubos. Um total de 100 µL de cada amostra (extrato bruto) foi depositado em 4-5 poços (6 mm de diâmetro) perfurados em placas com meio ágar-glúten, as quais foram incubadas a 36,5° C. A primeira avaliação foi realizada após 24h, e depois a cada 3 dias, até o 10° dia de incubação. Avaliou-se a presença/ausência de halos e feitas as devidas medições com um paquímetro digital.

A partir dos extratos brutos foi realizada diluição seriada utilizando água destilada estéril, até a obtenção das diluições: 2x, 4x, 8x, 16x, 32x, 64x e 128x, para verificar quais diluições seriam capazes de degradar o glúten. Após a realização das diluições, 100 µL de cada extrato foram depositados em 4-5 poços (6 mm) perfurados em placas com meio ágar-glúten, as quais foram incubadas a 36,5°C. A avaliação foi realizada da mesma forma que o teste anterior.

Os extratos brutos (centrifugados a 4000 rpm) que apresentaram halos foram novamente centrifugados, desta vez a 14000 rpm por 10 min. Após a centrifugação foram obtidas duas frações distintas: sobrenadante e precipitado. De cada uma dessas frações foram retiradas alíquotas de 100 µL e inoculadas em 4-5 poços (6 mm) perfurados em placas com meio ágar-glúten, as quais foram incubadas a 36,5° C. A avaliação foi realizada da mesma forma que o teste anterior.

### **3.5 Caracterização dos metabólitos dos extratos brutos de isolados bacterianos em diferentes temperaturas e pHs**

A ação dos metabólitos degradadores do glúten foi caracterizada quanto a diferentes valores de temperatura (36°, 46°, 56°, 66°, 76°, 86° e 96° C) e pH (2 até 9), com a finalidade de detectar moléculas capazes de atuar em temperaturas e pHs extremos, visando seu uso industrial e biotecnológico.

Um total de 500 µL de cada extrato foi adicionado em microtubos de 1,5 mL e incubados separadamente em *Thermomixer* em cada uma das temperaturas citadas por 10 min. Logo após, 100 µL de cada extrato foram adicionados em 4-5 poços (6 mm) distribuídos em meio ágar-glúten e incubados a 36,5°C. A avaliação foi realizada após 12-24, 96 e 168h, observando a presença/ausência de halos e feitas as devidas medições com o auxílio de paquímetro.

Para o teste do efeito da acidez/alcalinidade nos metabólitos dos isolados bacterianos, 500 µL de cada extrato foram adicionados em microtubos de 1,5 mL e em seguida o pH foi ajustado com a solução ácida HCl 0,1N (ácido clorídrico) ou com a solução básica NaOH 0,1N (hidróxido de sódio), até a obtenção dos pHs desejados. Logo após, os extratos (100 µL) foram colocados em 4-5 poços distribuídos em placas com meio ágar-glúten e incubados a 36,5°C. A avaliação foi realizada após 12-24, 96 e 168h, observando a presença/ausência de halos e feitas as devidas medições com o auxílio de paquímetro.

### **3.6 Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos**

Os isolados que foram positivos para a quebra do glúten foram caracterizados quanto à morfologia celular e colonial. As colônias bacterianas foram inoculadas em dois meios diferentes: ágar manitol (YMA) e ágar-glúten com incubação a 36,5° C. A caracterização foi realizada segundo as metodologias de Vincent (1970) e Hungria e Araújo (1994).

Avaliou-se cada um dos isolados em meio sólido como: bactérias de crescimento lento (quatro a dez dias) e rápido (até três dias), diâmetro e forma da colônia (circular ou irregular), borda (inteira ou irregular), transparência, coloração, consistência do muco (pastosa, aquosa ou viscosa) e modificação do pH do meio com azul de bromotimol (5 mL L<sup>-1</sup>). As bactérias foram visualizadas em lâmina no microscópio óptico de luz nas lentes objetivas de 100x e fotodocumentadas.

### **3.6.1 Coloração de Gram**

A identificação da morfologia bacteriana foi realizada pela técnica de coloração de Gram. Para a realização desse teste, foi adicionada uma gota de 10 µL de água destilada em uma lâmina de vidro e com o auxílio de uma alça bacteriológica, a colônia bacteriana foi homogeneizada por esfregação na lâmina e fixada por aquecimento no bico de Bunsen. Depois disso, a lâmina foi tratada com o reagente cristal violeta por 1 minuto, seguido de lavagem com água corrente e adicionado o reagente Lugol por 1 minuto. Passado 1 minuto, a lâmina foi descorada com álcool-cetona. E finalizando o processo, adição de Fucsina básica por 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, secadas a temperatura ambiente e visualizadas em microscópio óptico na objetiva de 100x.

### **3.6.2. Teste da catalase**

Com o auxílio de uma alça de platina foi coletada uma colônia isolada e esfregada em uma lâmina de vidro. Sobre o esfregado foi colocada uma gota de água oxigenada a 3% e observada a formação de bolhas.

## **3.7. Caracterização genética dos isolados bacterianos**

### **3.7.1. Extração do DNA cromossomal**

A extração do DNA cromossomal dos isolados bacterianos foi realizada segundo protocolo para caracterização genética de bactérias promotoras do crescimento de plantas da EMBRAPA (ISSN 1516-1752, 2008), com adaptações. As bactérias foram crescidas em 50 mL de meio YM a 37° C, sob agitação constante (150 rpm) durante 24 h. Após o cultivo, as bactérias foram centrifugadas a 12000g por 2 min; em seguida, descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso em 100 µL de tampão SET (Sacarose 0,3 M, EDTA, Tris-HCl 1 M). Foram seguidos 3 tempos de incubação: com lisozima (10 mg/mL) a 37° C por 30 min, com proteinase K (10 mg/mL) a 50° C por 30 min e com SDS 10% (0,1V) a 55° C por 30 min. Em seguida, foram adicionados 300 µL de acetato de potássio 5 M, incubando-se em gelo por 30 min e centrifugando-se por 10 min na máxima rotação por minuto. Recuperou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de isopropanol 100%. Incubou-se em gelo por 20 min e centrifugou-se por 10 min na máxima velocidade de centrifugação. Descartou-se o

sobrenadante e lavou-se com etanol 70% com máxima velocidade de centrifugação por mais 10 min. Descartou-se o sobrenadante e o material foi posto para secar na estufa a 37° C. O DNA foi solubilizado em 50 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) e uma alíquota de 5 µL desse material foi aplicada em gel de agarose 0,8% para observar a integridade do DNA extraído. A corrida eletroforética foi conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3) a 80V. Logo após as amostras foram visualizadas sob luz UV e fotodocumentadas.

### **3.7.2. Amplificação do gene 16S do DNAr**

Primeiramente, foi feita a quantificação do DNA para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O gene 16S do DNAr dos micro-organismos selecionados foi amplificado utilizando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores 530F (5' - TGA CTG ACT GAG TGC CAG CMG CCG CGG - 3') e 1492R (5' - TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT - 3'). Como controle de teste, foi utilizado o DNA bacteriano de uma estirpe de rizóbio. A reação de PCR teve um volume de 50 µL (2,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,25 mM de dNTPs; 0,2 pmol/µL de cada iniciador; 0,06 U/µL de *Taq*DNA polimerase; e tampão 1X). O sistema de amplificação foi realizado em termociclador BIO-RAD T100™ (*ThermalCycler*), e o perfil térmico de PCR foi de um ciclo inicial de desnaturação a 95° C por 1 min, seguido por 30 ciclos, como segue: desnaturação das fitas-molde a 95° C por 40 seg, pareamento dos iniciadores a 58° C por 40 seg e extensão a 72° C por 1 min. E, um ciclo final de extensão a 72° C por 5 min. Ao término das ciclagens, os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados utilizando PEG 8000 20% NaCl 2,5M, incubados a 37° C por 30 minutos, seguido de centrifugação a 13400 rpm por 20 minutos, logo após foi retirado o sobrenadante, adicionado 125 µL de etanol 80%, incubado por 1 minuto e centrifugados por 2 minutos a 13400 rpm. O sobrenadante foi descartado e repetiu-se o procedimento anterior. A seguir, deixou-se evaporar o etanol residual sobre a bancada. Depois de seco, o sedimento foi ressuspendido com água deionizada em um volume igual ao inicial de amostra. Incubou-se a amostra por 18 horas a -20° C. O produto purificado foi quantificado em gel de agarose 0,8% e corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

### 3.7.3. Sequenciamento e análise das sequências parciais do gene 16S rRNA

O material genético foi submetido à reação de amplificação com o kit “*BigDyeTerminator v3.1 CycleSequencing Kit*” (Applied Biosystems®) e o sequenciamento realizado em sequenciador automático *Applied Biosystems 3130 XL Genetic Analyzer*. A programação para amplificação em termociclador compreendeu os seguintes ciclos: etapa inicial a 96°C por 1 minuto, 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. O DNA amplificado e marcado foi purificado antes do sequenciamento pela adição de 10 µL de água ultrapura esterilizada, 2 µL de acetato de amônio 7,5 M e 60 µL de etanol absoluto. A solução foi centrifugada a 20.000 rpm por 15 minutos, e o material precipitado lavado com 500 µL de etanol a 70%, centrifugado (20.000 rpm) por 15 minutos e seco *overnight* a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras de DNA foram solubilizadas em solução tampão com formamida, desnaturadas (96°C, 5 minutos) e analisadas no sequenciador automático.

As sequências do gene 16S rRNA obtidas foram submetidas “on-line” aos aplicativos “*Classifier*” e “*SEQ MATCH*”, pertencentes ao “*Ribosomal Database Project-RDP*” (<http://rdp.cme.msu.edu/>) - banco de sequências ribossomais e aplicativos de análise e alinhamento de sequências 16S rRNA de bactérias e arqueas.

A análise dos eletroferogramas foi realizada por meio dos programas "Phred, Phrap and Consed" (GORDON et al., 1998), através do ContGEN, com um mínimo de 200 bases e qualidade "Phred" superior a 20. As sequências de nucleotídeos geradas foram comparadas com outras previamente depositadas no banco de dados internacional "GenBank" do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), usando a ferramenta BLASTN.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**



#### **4.1 Crescimento dos isolados bacterianos em meio sólido com glúten**

Dos 115 isolados de rizobactérias avaliados no meio sólido com glúten, 10 cresceram e formaram halos a partir de 24h (INPA\_Ps007, Ps020, Ps021, Ps024, Ps028, Ps076, Ps178, Ps183, Ps225 e Ps572). Após cinco dias, o crescimento das colônias foi estabilizado e os halos atingiram a borda da placa (Tabela 4 e Figura 10). Nas duas temperaturas testadas (26,5° C e 36,5° C) os isolados foram capazes de crescer e não houve diferença aparente quanto à capacidade de degradação do glúten.

Observa-se, com isso, que entre os micro-organismos estudados, os dez mostraram habilidade no crescimento e na quebra desse composto em ambas as temperaturas.

Esses dados foram corroborados após a avaliação pelo método de Oliveira e Magalhães (1999), em que se pode observar que a maioria dos isolados apresentaram um ótimo crescimento (valores >3,06) e pelo bom Índice de Degradação do Glúten (IDG) que foram maiores que 2 (Tabela 4). Portanto, esses isolados utilizam o glúten como fonte de carbono para o seu metabolismo e de forma eficiente. Trata-se de um trabalho inédito, pois não há na literatura dados que mostram atividade na quebra do glúten por rizobactérias ou por outros micro-organismos de solos.

A Figura 10 mostra os aspectos das colônias e seus respectivos halos de degradação do glúten, observando-se, claramente, que o meio fica transparente nas regiões onde houve quebra da proteína. Quando se compara visualmente os halos ao redor das colônias, nota-se nitidamente que os isolados INPA\_Ps007, Ps020, Ps021, Ps028, Ps076, Ps178, Ps183 e Ps225 mostraram uma degradação bem visível, ao contrário de INPA\_Ps024 e Ps572, sem halos perceptíveis.

Esses dois últimos isolados, apesar de terem apresentado um bom crescimento (nota 3,2) nos sete dias de incubação, mostraram baixo IDG (<1,0 e 1,3 respectivamente). Devido a isso, esses dois isolados não foram usados nos testes subsequentes, concentrando-se os esforços de pesquisas nos seis melhores.

Os 10 isolados de rizobactérias foram submetidos à caracterização genética para identificação a nível de gênero (INPA\_Ps007, Ps020, Ps021, Ps024, Ps028, Ps076, Ps178, Ps183, Ps225 e Ps572).

Tabela 4 - Índice de degradação do glúten (IDG) dos isolados bacterianos em meio sólido contendo 1,0% de glúten após incubação a 36,5° C.

Isolados bacterianos	Nota <sup>1</sup>	<u>24h</u>			<u>72h</u>			<u>120h</u>		
		DD	DC	IDG	DD	DC	IDG	DD	DC	IDG
----- mm -----										
<b>INPA_Ps007</b>	3,3	8,1	3,8	2,1	12,3	5,5	2,2	16,7	7,8	2,1
<b>INPA_Ps020</b>	2,7	10,4	3,7	2,8	12,7	5,1	2,5	14,3	6,4	2,2
<b>INPA_Ps021</b>	3,4	9,3	3,6	2,6	13,5	5,7	2,4	16,1	7,6	2,1
<b>INPA_Ps024</b>	3,2	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	3,3	<1,0	<1,0	4,3	<1,0
<b>INPA_Ps028</b>	3,2	9,0	3,2	2,8	12,0	4,5	2,7	16,0	7,2	2,2
<b>INPA_Ps076</b>	3,7	9,9	4,3	2,3	13,7	6,0	2,3	16,0	7,7	2,0
<b>INPA_Ps178</b>	3,7	6,8	3,4	2,0	14,1	6,0	2,3	16,7	8,4	2,0
<b>INPA_Ps183</b>	2,6	8,0	3,7	2,1	13,0	5,8	2,2	16,6	7,4	2,2
<b>INPA_Ps225</b>	3,9	7,8	2,9	2,7	15,5	6,3	2,5	>17,0	>10,0	≥3,0
<b>INPA_Ps572</b>	3,2	5,4	2,7	2,0	12,9	10,0	1,3	13,0	10,0	1,3

Obs: DD: Diâmetro da zona de degradação, DC: Diâmetro da colônia, IDG: Índice de degradação do glúten.

<sup>1</sup>. Segundo Oliveira e Magalhães (1999), aos 7 dias de crescimento.



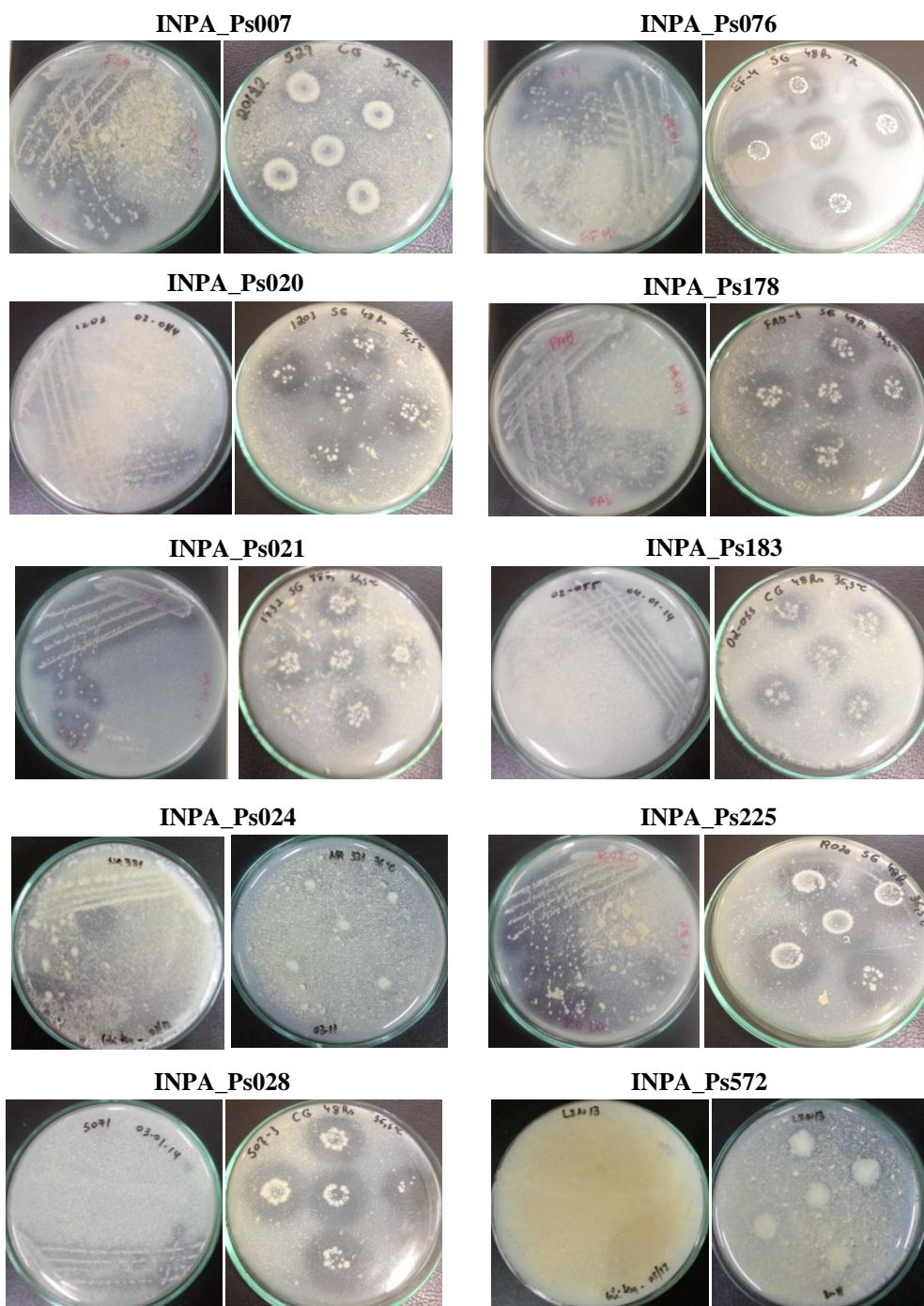


Figura 10 - Colônias dos isolados bacterianos e os respectivos halos em meio sólido contendo 1,0% de glúten após incubação a 36,5° C por cinco dias.

## 4.2. Caracterização genética dos isolados bacterianos

Foi realizada a identificação genética dos 10 isolados que apresentaram atividade de degradação do glúten (INPA\_Ps007, Ps020, Ps021, Ps024, Ps028, Ps076, Ps178, Ps183, Ps225 e Ps572). Primeiramente foram caracterizados os seis melhores isolados e, posteriormente, os demais. Após a extração do DNA genômico, as amostras foram visualizadas em gel de agarose 0,8% (Figura 11). Em seguida, foi realizada a PCR para o gene 16S do DNAr (Figura 12) e a purificação das amostras (Figura 13) para posterior sequenciamento e identificação a nível de gênero.

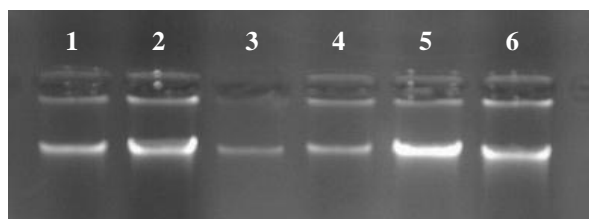


Figura 11 – Perfil eletroforético do DNA genômico dos isolados bacterianos: 1- INPA\_Ps020, 2- Ps021, 3- Ps028, 4- Ps076, 5- Ps178, 6- Ps225, observados em gel de agarose a 0,8%.

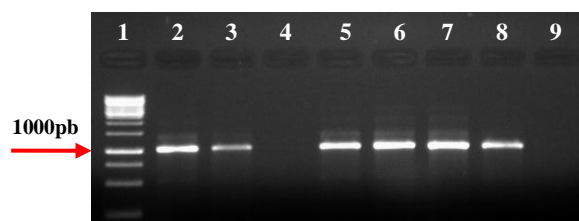


Figura 12 – Perfil eletroforético do gene 16S do DNAr dos isolados bacterianos: 1- Marcador de 1kb (*ThermoScientific*), 2- INPA\_Ps020, 3- Ps021, 4/5- Ps028, 6- Ps076, 7- Ps178, 8- Ps225, 9- controle negativo, água deionizada, observados em gel de agarose a 0,8%.

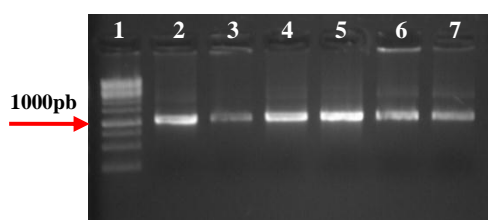


Figura 13 – Perfil eletroforético da purificação das amostras com PEG 8000: 1- Marcador de 1kb (*ThermoScientific*), 2- INPA\_Ps020, 3- Ps021, 4- Ps028, 5- Ps076, 6- Ps178, 7- Ps225, observados em gel de agarose a 0,8%.

Com base nos resultados obtidos, após o sequenciamento do gene 16S do DNAr e a comparação nos bancos de dados do “GeneBank” e do “RDP Ribossomal”, os seis melhores isolados (INPA\_Ps020, Ps021, Ps028, Ps076, Ps178, Ps225) foram classificados como do gênero *Paenibacillus* sp. (*contigs* e análise dos dados em anexo).

Por apresentarem características morfológicas e biológicas diferentes entre si, conforme poderá ser comprovado com os resultados deste trabalho, as seis rizobactérias caracterizadas geneticamente serão consideradas, a partir deste ponto da tese, para fins de discussão dos resultados, como “estirpes de *Paenibacillus* sp.”

Essas bactérias são bastantes estudadas, prova disso está no banco de dados do NCBI, onde estão depositados mais de 30 mil sequências de nucleotídeos associadas a diversas espécies do gênero *Paenibacillus* e, cerca de 50 genomas sequenciados. Além de sequências de aminoácidos associadas a inúmeras proteínas relacionadas as suas funções metabólicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=Paenibacillus>).

*Paenibacillus polymyxa*, uma das rizobactérias mais importantes na área agrícola e biotecnológica, consiste de um cromossomo circular com ~6Mb e um plasmídeo com ~400.000 pb (algumas estirpes não possuem plasmídeo). Apresenta em seu cromossomo milhares de genes, a maioria deles envolvidos na síntese de enzimas hidrolíticas, enquanto que no seu plasmídeo, 345 genes foram caracterizados, entre eles os que codificam proteínas envolvidas nos processos vitais desse micro-organismo. Possuem também moléculas não-ribossomais, ou seja, aquelas geradas a partir do metabolismo secundário, incluindo a polimixina e a fusaricidina, potentes agentes antimicrobianos (JEONG et al., 2011; MA et al., 2011; NIU et al., 2011; KIM et al., 2010).

As espécies desse gênero são bastante visadas por tratarem-se de rizobactérias altamente eficientes para o crescimento de plantas e por sua qualidade na produção de moléculas com inúmeras funções biológicas, que podem ser utilizadas em várias áreas no âmbito biotecnológico (agricultura e saúde) (GLICK, 2014; VESSEY, 2003). E o presente trabalho, no entanto, revela mais uma nova função biológica para esse gênero.

Os isolados bacterianos INPA\_Ps007 e Ps572 foram caracterizados geneticamente como do gênero *Burkholderia* sp., o isolado INPA\_Ps024 foi caracterizado como pertencente ao gênero *Rothia* sp. e o isolado INPA\_Ps183 pertencente ao gênero *Bradyrhizobium* sp. Os dois primeiros gêneros são conhecidos na área médica devido a sua patogenicidade em

humanos, portanto, não são de interesse para o presente trabalho. Enquanto que o último gênero, comumente conhecido como rizóbio, são rizobactérias muito comuns em leguminosas e de utilidade na agricultura.

Portanto, para os demais estudos foram utilizadas somente as seis estirpes de *Paenibacillus* sp. (INPA\_Ps020, Ps021, Ps028, Ps076, Ps178, Ps225).

### 4.3. Caracterização biológica das estirpes de *Paenibacillus* sp.

As seis melhores estirpes de *Paenibacillus* sp. (INPA\_Ps020, Ps021, Ps028, Ps076, Ps178 e Ps225) foram avaliadas quanto à sua função biológica na degradação do glúten.

As estirpes mostraram crescimento diferente nos três meios líquidos testados, em que o melhor meio foi o MG. Essas diferenças podem ser observadas pelas escalas das concentrações de células bacterianas nos três meios. No meio com manitol (Figura 14A), as concentrações das bactérias não atingiram  $7 \times 10^5$  cel/mL<sup>-1</sup> até o oitavo dia de crescimento, enquanto que no meio com glúten (Figura 14B), todas, exceto a INPA\_Ps076 apresentaram concentrações de células superiores a  $40 \times 10^5$  cel/mL<sup>-1</sup> no quarto dia, com a INPA\_Ps225 ultrapassando  $140 \times 10^5$  cel/mL<sup>-1</sup>. No meio contendo manitol e glúten (Figura 14C), todas as seis bactérias cresceram melhor, com duas delas (Ps\_020 e Ps\_178) ultrapassando a concentração de  $200 \times 10^5$  cel/mL<sup>-1</sup>.

Gu et al. (2010), ao estudarem diferentes cepas de *P. polymyxa* cultivadas em meio líquido propício (ricas fontes de carbono e nitrogênio) verificaram um rendimento máximo ( $6,5 \times 10^9$ /mL UFC) dessas bactérias em até 15 horas a uma temperatura de 28-32° C. Talvez as seis estirpes de *Paenibacillus* sp. estudadas não cresceram tão eficientemente por terem sido cultivadas a temperatura de 26,5° C, sendo que o ideal seria acima de 30° C.

Naturalmente, compostos químicos que possuem carbono e nitrogênio em sua composição podem ser fonte de nutrientes para o crescimento microbiano presente na rizosfera (BAIS et al., 2006). Esses nutrientes são encontrados em abundância nos solos das florestas favorecendo a diversidade de micro-organismos, que podem ter inúmeras funções biológicas, incluindo, as interações com plantas que mostram muitas vezes um efeito positivo (FIGUEIREDO et al., 2007).

Com toda essa diversidade, a possibilidade da existência de genes com propriedades funcionais novas são gigantescas, principalmente quando se compara micro-organismos dos

solos amazônicos, onde a luta por sobrevivência é maior (VALE JÚNIOR et al., 2011). Por isso, a qualidade destes organismos que apresentam características diferenciadas se destaca.

De acordo com os dados do presente trabalho, as estirpes de *Paenibacillus* sp. tiveram um melhor crescimento no meio que havia dois tipos diferentes de fontes de carbono (carboidrato e proteína), isto é, o meio com manitol e glúten. A presença não só de carbono, mas também de nitrogênio favoreceu para um ambiente rico e diverso, inclusive mais parecido com o ambiente natural das rizobactérias, possibilitando, provavelmente, um metabolismo mais rápido para essas bactérias.

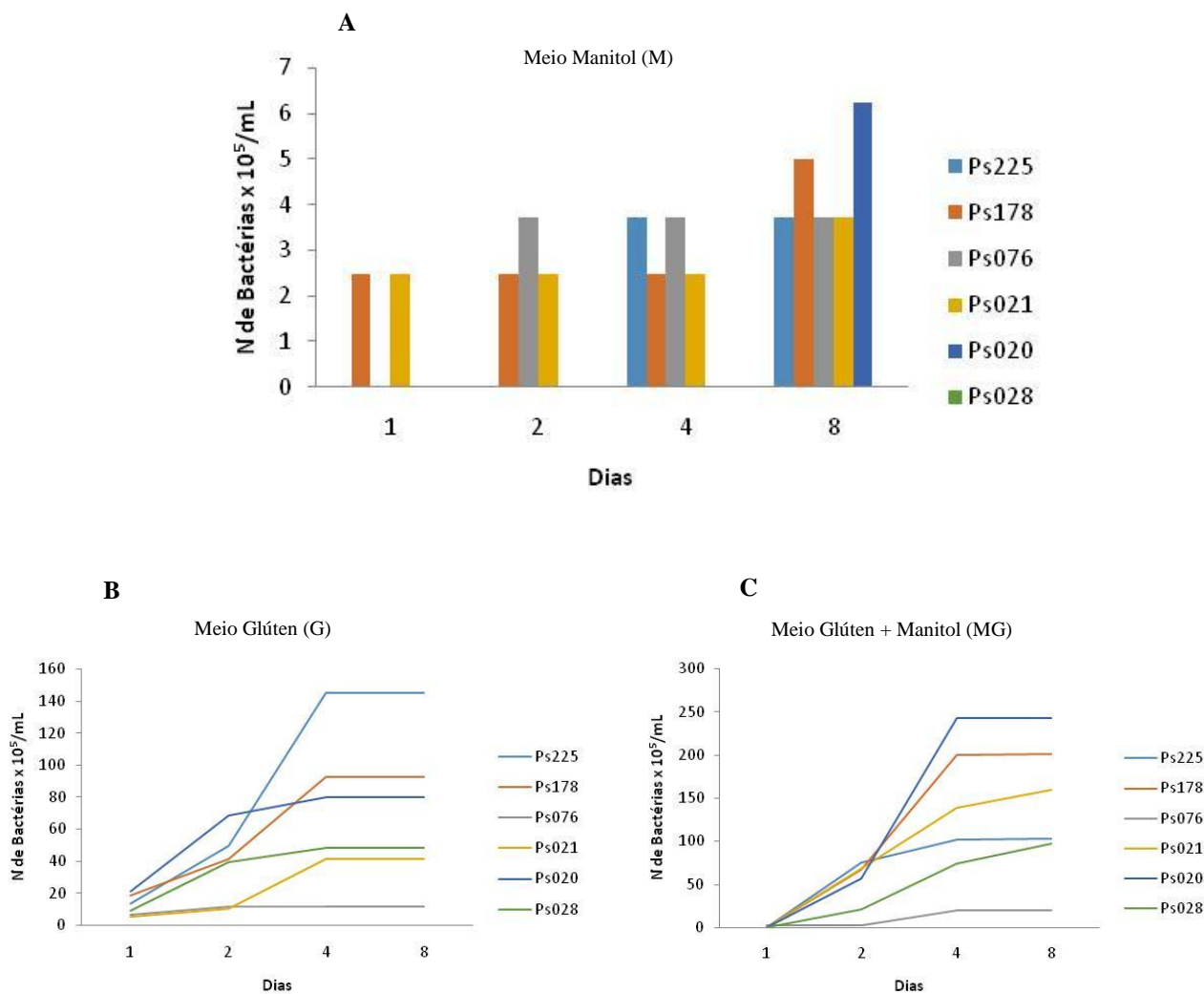


Figura 14. Crescimento das estirpes de *Paenibacillus* sp. em três meios líquidos: A) manitol 1,0% (M), B) glúten 0,2% (G) e C) manitol 1,0% + glúten 0,2% (MG). Populações de células  $\times 10^5/\text{mL}^{-1}$ .

As bactérias cultivadas nos meios M e MG mostraram uma pequena diferença quanto à capacidade de degradação do glúten nas diferentes concentrações celulares quando incubadas em meio ágar-glúten em temperaturas distintas (26,5° e 36,5° C). Provavelmente, a presença do glúten no meio MG durante a incubação dessas bactérias resultou em uma produção de metabólitos capazes de degradar essa proteína e que já estava presente no meio, diferente daquelas que foram incubadas somente com manitol (Tabela 5; Figura 15).

Song et al. (2012) quando incubaram cepas de *Paenibacillus* em meios diferentes (com quitina e sem quitina) detectaram um maior número de isozimas quitinases no meio com quitina. Possivelmente, essa proteína atua como um indutor na expressão de genes para a quitinase.

O que se sugere para o presente trabalho é que as bactérias quando cultivadas em meio líquido MG produziram metabólitos capazes de degradar o glúten e os liberaram para o meio extracelular. Contudo, os isolados que não tiveram contato com o glúten anteriormente (cultivo em meio M), provavelmente, produziram moléculas degradadoras do glúten em menor quantidade ou só as produziram a partir do momento que entraram em contato com esse composto quando incubado em meio sólido, daí o halo de degradação ser menor.

Isso pode ser comprovado pelos testes com os extratos brutos dessas bactérias em meio sólido, em que aqueles obtidos do meio M após 8 dias de cultivo não foram positivos para a quebra do glúten, já os extratos brutos das seis estirpes que foram cultivadas em meio MG apresentaram atividade de quebra dessa proteína. Enquanto que somente os extratos obtidos das estirpes INPA\_Ps076 e Ps178 cultivadas em meio G apresentaram essa propriedade, todos após 24h de incubação (Tabela 6; Figura 16).

As estirpes Ps\_225 e Ps\_178 cultivadas em meio MG mesmo a uma concentração de  $10^1$  mostraram uma capacidade de degradação semelhante àquelas de concentrações maiores ( $10^3$ ,  $10^5$  e  $10^7$ ) quando incubadas a 36,5° C. Talvez essas bactérias apresentem metabólitos mais potentes na quebra do glúten quando comparadas às demais estirpes (Tabela 5; Figura 15).

Tabela 5. Índice de degradação do glúten obtido pela atividade das estirpes de *Paenibacillus* sp. em diferentes concentrações celulares ( $\text{mL}^{-1}$ ) incubadas em meio sólido contendo 1,0% de glúten.

Estirpes INPA	Cultivo	Temperatura a 26,5° C				Temperatura a 36,5° C			
		10 <sup>1</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>
		----- mm -----							
<b>Ps020</b>	M	2,0	2,5	3,0	4,0	2,0	2,5	3,0	4,0
	MG	2,2	3,0	3,2	> 4,0	2,8	> 4,0	> 4,0	> 4,0
<b>Ps021</b>	M	1,7	2,1	3,2	3,2	1,8	2,9	> 4,0	> 4,0
	MG	3,0	>4,0	>4,0	> 4,0	3,0	> 4,0	> 4,0	> 4,0
<b>Ps028</b>	M	2,0	*	*	*	2,0	*	*	*
	MG	2,4	2,5	3,0	> 4,0	3,0	> 4,0	> 4,0	> 4,0
<b>Ps076</b>	M	1,8	2,0	2,3	2,8	2,0	3,3	> 4,0	> 4,0
	MG	2,0	2,9	3,1	3,4	3,3	3,5	> 4,0	> 4,0
<b>Ps178</b>	M	1,5	2,1	2,6	> 4,0	3,4	4,0	> 4,0	> 4,0
	MG	2,7	4,0	>4,0	>4,0	3,8	> 4,0	> 4,0	> 4,0
<b>Ps225</b>	M	1,8	3,0	3,2	3,8	2,2	3,0	4,0	> 4,0
	MG	3,0	3,1	3,4	> 4,0	4,0	> 4,0	> 4,0	> 4,0

Obs.: M: cultivo das bactérias em meio líquido contendo 1,0% de glúten; MG: cultivo da bactéria em meio líquido contendo 1,0% de manitol + 0,2% glúten. (\*) Sem crescimento e sem halo de degradação.

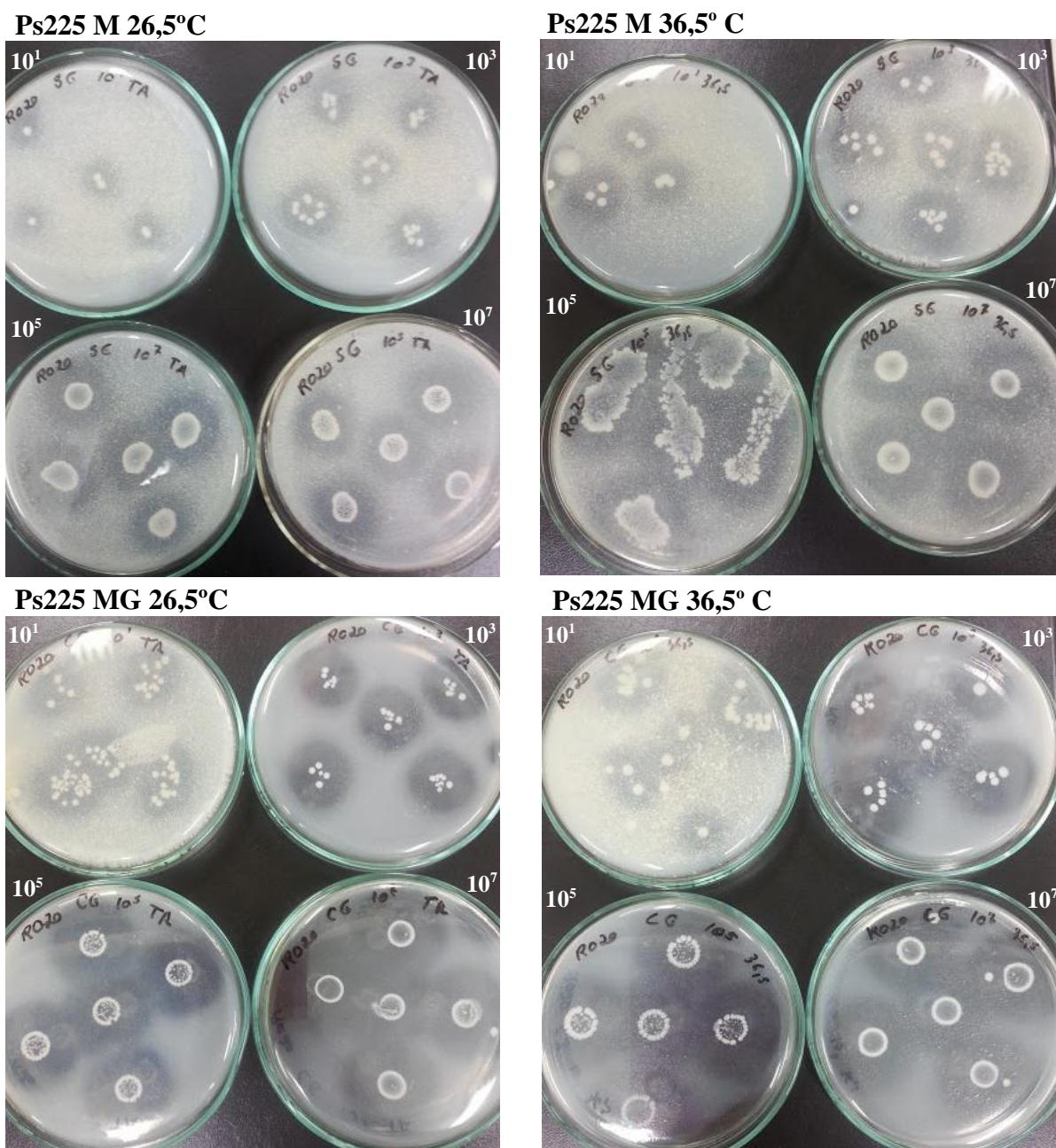


Figura 15 - Halos de degradação do glúten da estirpe INPA\_Ps225 a diferentes concentrações celulares ( $10^1$ ,  $10^3$ ,  $10^5$  e  $10^7$  /  $\text{mL}^{-1}$ ) em meio sólido contendo 1,0% de glúten e incubadas a  $26,5^\circ\text{C}$  e  $36,5^\circ\text{C}$ . M: cultivo da bactéria em meio líquido contendo 1,0% de manitol; MG: cultivo da bactéria em meio líquido contendo 0,2% de glúten + 1,0% de manitol.



Tabela 6. Degradação do glúten em meio sólido pelos extratos brutos das estirpes de *Paenibacillus* sp., incubação à temperatura de 36,5° C.

Extratos Bacterianos	Presença de Halo de Transparência					
	18h			3° dia		
	M	MG	G	M	MG	G
INPA_Ps020	-	+	-	-	+	-
INPA_Ps021	-	+	-	-	+	-
INPA_Ps028	-	+	-	-	+	-
INPA_Ps076	-	+	+	-	+	+
INPA_Ps178	-	+	+	-	+	+
INPA_Ps225	-	+	-	-	+	-

Obs.: M: cultivo das bactérias em meio líquido contendo 1,0% de manitol; MG: cultivo da bactéria em meio líquido contendo 1,0% de manitol + 0,2% de glúten.

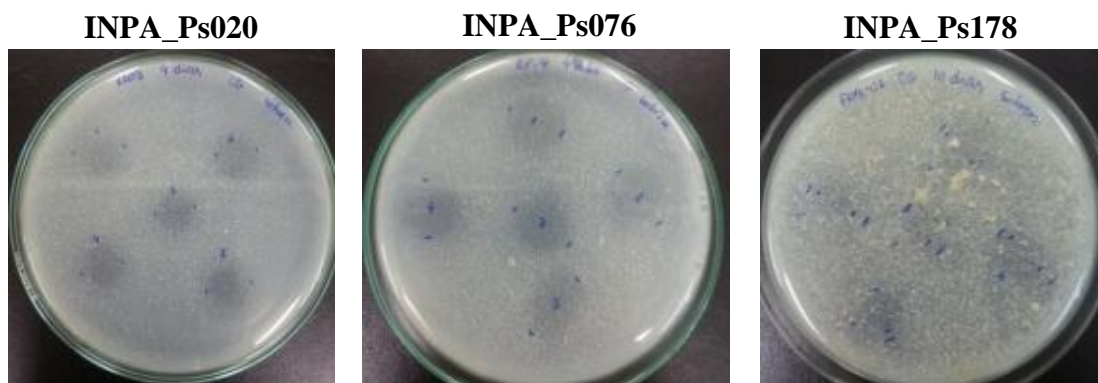


Figura 16 - Halos de degradação do glúten pelos extratos brutos das estirpes de *Paenibacillus* sp. após 8 dias de cultivo em meio líquido MG (1,0% manitol + 0,2% glúten); incubação a 36,5° C em meio sólido contendo 1,0% de glúten.

Esses mesmos extratos foram diluídos de 2x até 128x para verificar o potencial de diluição dos metabólitos degradadores do glúten. Os extratos brutos, das estirpes INPA\_Ps020, Ps021, Ps028 e Ps076 cultivadas em meio líquido MG apresentaram atividade biológica na quebra do glúten, mesmo diluídos 8x. Enquanto que o extrato de Ps225 mostrou-se mais potente entre os demais, apresentando halos mesmo quando diluído 16x (Tabela 7, Figura 17).

Os extratos brutos, das seis estirpes de *Paenibacillus* sp. cultivadas em meio MG e das INPA\_Ps076 e Ps178 cultivadas em meio G, que apresentaram atividade metabólica de quebra do glúten foram submetidos à velocidade de 14000 rpm de centrifugação para uma tentativa de separação de metabólitos leves e pesados. Separou-se o sobrenadante do que estava no fundo dos microtubos (precipitado), testando-os separadamente quanto à capacidade de degradar o glúten. De acordo com a Tabela 8, os extratos brutos de todas as estirpes cultivadas em meio MG apresentaram metabólitos leves e pesados com capacidade de quebra do glúten. Já os extratos brutos obtidos de INPA\_Ps178 apresentaram somente metabólitos pesados com capacidade de quebra dessa proteína.

Em estudos semelhantes, a atividade antimicrobiana do extrato bruto de *Paenibacillus polymyxa* exibiu um grupo de antibióticos encontradas no sobrenadante (DENG et al., 2011a). Já o resultado de ensaio antifúngico com o extrato do sedimento de células e do sobrenadante no trabalho de Song et al. (2012) mostrou que o extrato de células tinha uma elevada atividade antifúngica, mas a fração sobrenadante teve uma fraca atividade, implicando que o composto antifúngico poderia estar firmemente associado às células bacterianas.

Isso mostra que esses micro-organismos tem uma diversidade de moléculas (simples ou leves, complexas ou pesadas) com inúmeras funções, que ainda precisam ser identificadas e caracterizadas.

Tabela 7 - Diâmetros dos halos de degradação do glúten a partir de diferentes diluições dos extratos brutos das estirpes de *Paenibacillus* sp. cultivadas em meio líquido MG e obtidos a partir de diferentes tempos de incubação.

Extratos INPA	Diâmetros dos Halos de Transparência									
	24h			4 dias			8 dias			
	2x	4x	8x	2x	4x	8x	2x	4x	8x	16x
	----- mm -----									
Ps020	13,0	-	-	12,1	11,3	-	16,3	14,7	12,7	-
Ps021	-	-	-	14,0	12,2	11,9	16,9	14,3	11,4	-
Ps028	-	-	-	16,2	11,9	-	18,6	14,7	12,0	-
Ps076	-	-	-	14,5	13,8	12,5	15,5	13,6	11,8	-
Ps178	-	-	-	-	-	-	18,3	17,0	-	-
Ps225	-	-	-	-	-	-	17,5	15,2	11,6	9,9

Obs.: (-) Sem halo de degradação visível.

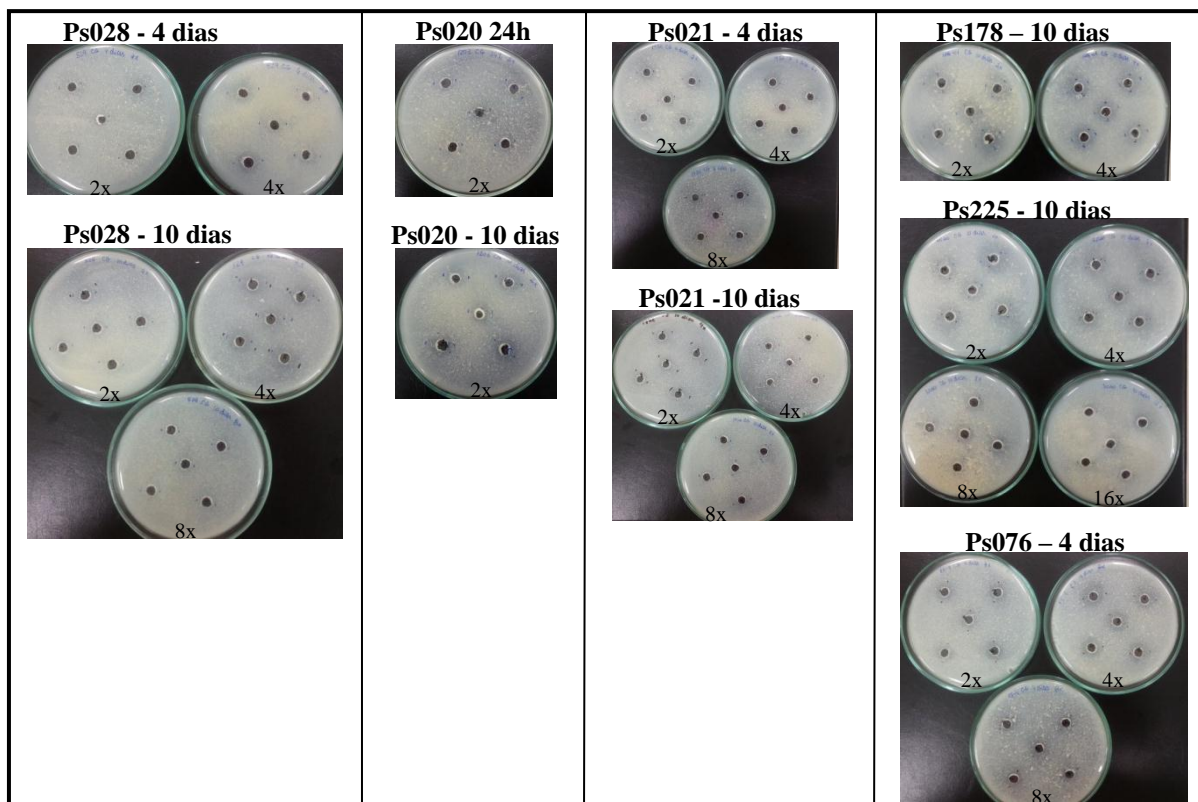


Figura 17 - Halos de degradação do glúten em meio sólido a partir de diferentes diluições (2x, 4x, 8x e 16x) dos extratos brutos das estirpes de *Paenibacillus* sp.

Tabela 8 - Degradação do glúten pelos extratos brutos das estirpes de *Paenibacillus* sp. cultivadas em dois meios líquidos e em condições de centrifugação diferente (precipitado e sobrenadante).

Extratos INPA	Diâmetros dos Halos de Transparência			
	Meio MG (Manitol + Glúten)		Meio G (Glúten)	
	Prec.	Sobren.	Prec.	Sobren.
	----- mm -----			
Ps020	11,5	11,5	-	-
Ps021	10,3	10,6	-	-
Ps028	14,2	13,5	-	-
Ps076	11,5	14,0	10,7	10,9
Ps178	11,9	15,8	12,3	-
Ps225	9,0	9,9	-	-

Obs.: Cultivo das bactérias até o oitavo dia de crescimento. MG: meio líquido contendo 1,0% manitol + 0,2% glúten; G: meio líquido contendo 0,2% glúten. (-) Sem halo de degradação visível.

Os extratos brutos das seis estirpes cultivadas em meio líquido MG foram testados em diferentes temperaturas (36° a 96° C). Todos os seis apresentaram atividade na quebra do glúten em meio ágar-glúten nas temperaturas 36°, 46° e 56° C dentro de 24h. O extrato do isolado Ps225 foi o que apresentou o maior halo de transparência a temperatura de 36°C, enquanto que o extrato de Ps076 foi o que apresentou o maior halo de transparência a uma temperatura de 56° C (Tabela 9, Figura 18).

No entanto, quando os extratos foram exposto às temperaturas de 66° a 96°C, perderam suas propriedades degradadoras do glúten, sugerindo que nessas temperaturas seus sítios de atividades foram desativados.

Os extratos brutos das mesmas estirpes cultivadas em meio líquido MG foram também submetidos a diferentes pHs (2 - 9). Todos os seis apresentaram atividade na quebra do glúten em meio ágar-glúten no pH 7. O extrato bruto de Ps021 apresentou atividade tanto em pH ácido como básico (pHs 5, 6 e 9), enquanto que a maioria dos extratos apresentou melhor atividade em pH ácido. Somente o extrato de Ps178 mostrou atividade apenas nos pHs neutro e básico (8,0) (Tabela 10, Figura 19).

As moléculas presentes no extrato bruto dessas estirpes mostram uma ótima função em temperatura de 36° C e pH 7, sendo essas as ideias no corpo humano. Basta, no entanto, aprofundar os estudos na identificação dessas moléculas e caracterizá-las a fim de poderem ser utilizadas como alternativas para os portadores da doença celíaca.

Tabela 9 - Diâmetros dos halos de degradação do glúten a partir dos extratos brutos das estirpes de *Paenibacillus* sp. submetidos a diferentes temperaturas.

Extratos INPA	Diâmetros dos Halos de Transparência							
	24h				3 dias			
	36° C	46° C	56° C	66-96°C	36° C	46° C	56° C	66-96°C
	----- mm -----							
Ps020	18,8	14,6	13,8	-	19,6	22,3	22,9	-
Ps021	12,1	12,4	15,2	-	17,8	13,5	21,2	-
Ps028	12,7	12,0	10,8	-	20,1	19,2	14,9	-
Ps076	14,3	13,1	16,7	-	18,4	19,0	24,1	-
Ps178	15,9	20,2	15,3	-	19,5	22,8	21,2	-
Ps225	22,2	13,4	13,5	-	30,2	18,1	20,5	-

Obs.: (-) Sem halo de degradação visível.

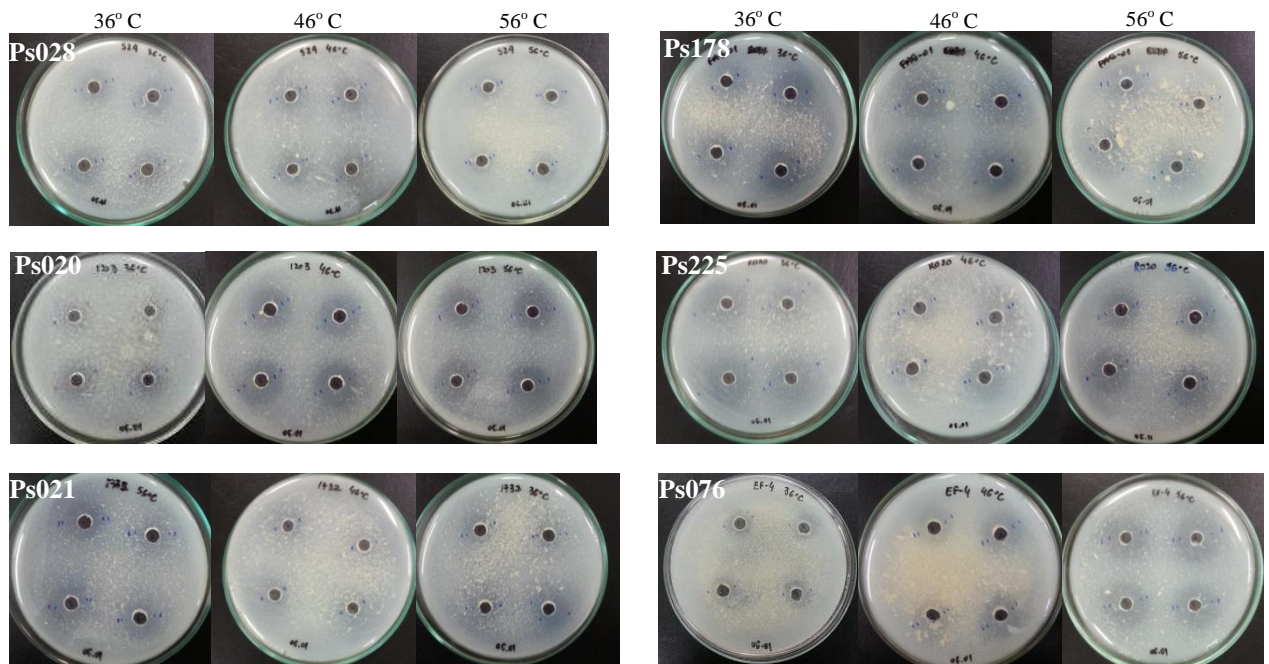


Figura 18 - Halos de degradação do glúten pelos extratos brutos das estirpes de *Paenibacillus* sp. após choques térmicos em diferentes temperaturas.

Tabela 10 - Diâmetros dos halos de degradação do glúten a partir dos extratos brutos das estirpes de *Paenibacillus* sp. submetidos a diferentes pHs.

Extratos	Diâmetros dos Halos de Transparência							
	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
	----- mm -----							
Ps020	-	-	13,2	13,2	-	14,0	-	-
Ps021	-	-	-	13,9	11,8	12,1	-	12,3
Ps028	-	-	-	10,5	-	11,0	-	-
Ps076	-	-	-	-	12,2	14,1	-	-
Ps178	-	-	-	-	-	13,5	11,5	-
Ps225	-	-	-	13,9	-	12,8	-	-

Obs.: (-) Sem halo de degradação visível.

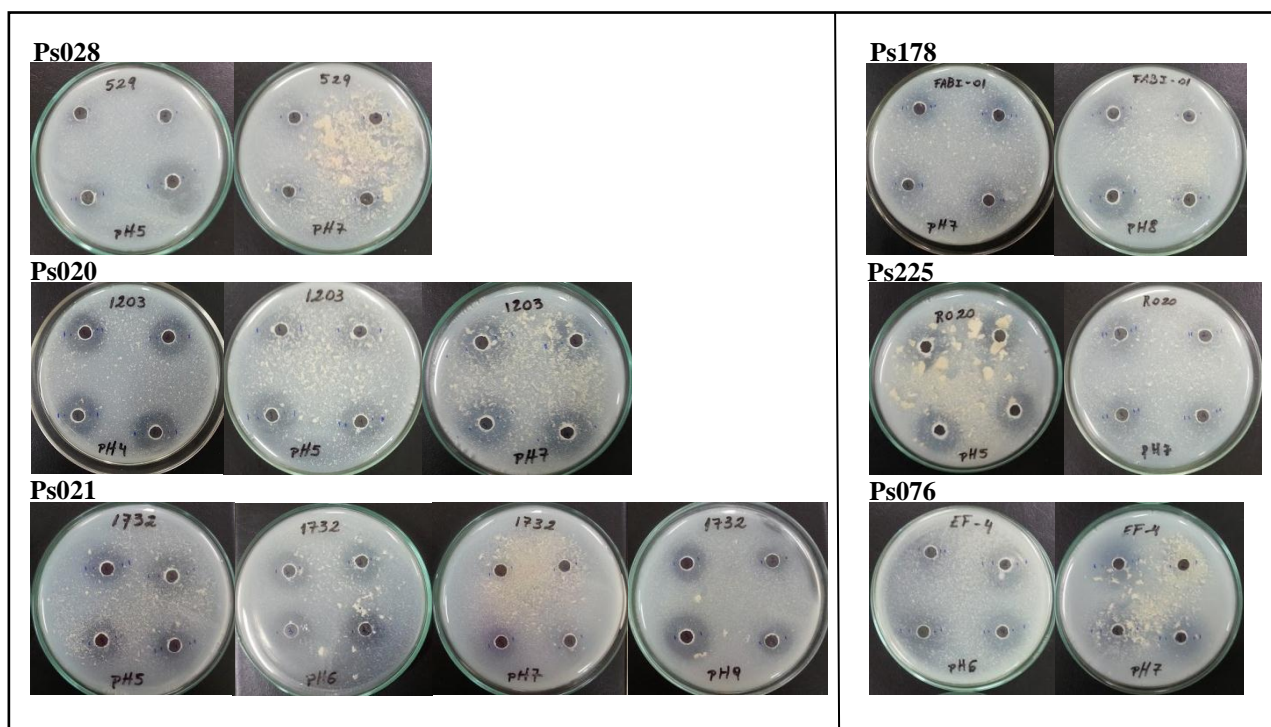


Figura 19 - Halos de degradação do glúten a partir dos extratos brutos das estirpes de *Paenibacillus* sp. submetidos a diferentes pHs.

#### 4.4. Caracterização fenotípica das estirpes de *Paenibacillus* sp.

A maioria das estirpes de *Paenibacillus* apresentou características semelhantes quanto à morfologia das colônias. As estirpes INPA\_Ps020, Ps021 e Ps028, apresentaram colônias com a forma circular e borda irregular; as colônias das INPA\_Ps020, Ps076 e Ps178 evidenciaram uma borda regular na superfície. As colônias da INPA\_Ps076 foram as únicas que apresentaram uma forma irregular, uma densidade óptica translúcida e bastante viscosa no meio YMA. As colônias das demais estirpes nesse mesmo meio apresentaram uma densidade óptica opaca e uma consistência aquosa e no meio YMA com glúten todas apresentaram uma característica pastosa.

As que cresceram em meio YMA apresentaram colônias maiores (diâmetro variando de 1 até 12 mm) em relação aos que cresceram em meio YMA com glúten, predominando nesse último, a ocorrência de colônias pequenas (0,2 a 4 mm de diâmetro, poucas colônias atingiram um diâmetro de até 8 mm) (Tabela 11; Figura 20).

Tabela 11 - Caracterização morfológica das estirpes de *Paenibacillus* sp. após 7 dias de incubação à temperatura de 36,5° C.

Isolados	Cultivos	Forma/Borda da colônia	Diâmetro (mm)	Densidade óptica	Produção de goma
INPA_Ps020	M	Circular/Irregular	0,8-8,0	Opaco	Aquosa
INPA_Ps020	G	Circular/Irregular	0,7-7,0	Opaco	Pastosa
INPA_Ps021	M	Circular/Irregular	0,7-10,0	Opaco	Aquosa
INPA_Ps021	G	Circular/Irregular	0,2-4,0	Opaco	Pastosa
INPA_Ps028	M	Circular/Irregular	1,0-7,0	Opaco	Aquosa
INPA_Ps028	G	Circular/Irregular	0,2-7,0	Opaco	Pastosa
INPA_Ps076	M	Irregular/Regular	2,0-10,0	Translúcido	Gomosa
INPA_Ps076	G	Irregular/Regular	1,0-6,0	Opaco	Pastosa
INPA_Ps178	M	Circular/Regular	1,0-8,0	Opaco	Aquosa
INPA_Ps178	G	Circular/Regular	0,2-5,0	Opaco	Pastosa
INPA_Ps225	M	Circular/Regular	1,0-12,0	Opaco	Aquosa
INPA_Ps225	G	Circular/Regular	0,8-8,0	Opaco	Pastosa

Obs.: M: meio YMA; G: meio YMA com glúten.

Todas as estirpes de *Paenibacillus* mostraram reação ácida (coloração amarela na presença do indicador azul de bromotimol) no meio YMA (VINCENT, 1970) (Figura 20). De acordo com a coloração de Gram todas apresentaram uma coloração roxa, portanto, Gram-positivas e forma de bastonete (Figura 21); também tiveram reação positiva para a enzima catalase. Características essas típicas para o gênero.

Outra característica morfológica distinta para o gênero é a disposição das colônias em meio ágar, que podem ser caracterizadas como morfotipos diferentes entre as estirpes. Padrões morfotipo T em meio ágar são caracterizados por ramificação crescente na ponta, com ramos finos e contorcidos. Novos ramos são formados como ramos laterais dos ramos existentes (Figura 22). Padrões morfotipo V quando cultivados em ágar apresentam morfologia em vórtice, onde uma gota de células leva cada ramo, cada gota consiste em até milhões de células que giram em torno de um centro comum (COHEN et al., 2000).

Algumas espécies formam colônias complexas em que há considerável movimento por meio dos flagelos e interação celular, formando uma característica típica. O comprimento celular pode também aumentar consideravelmente em meio-ágar a 42° C (INGHAM e JACOB, 2008).



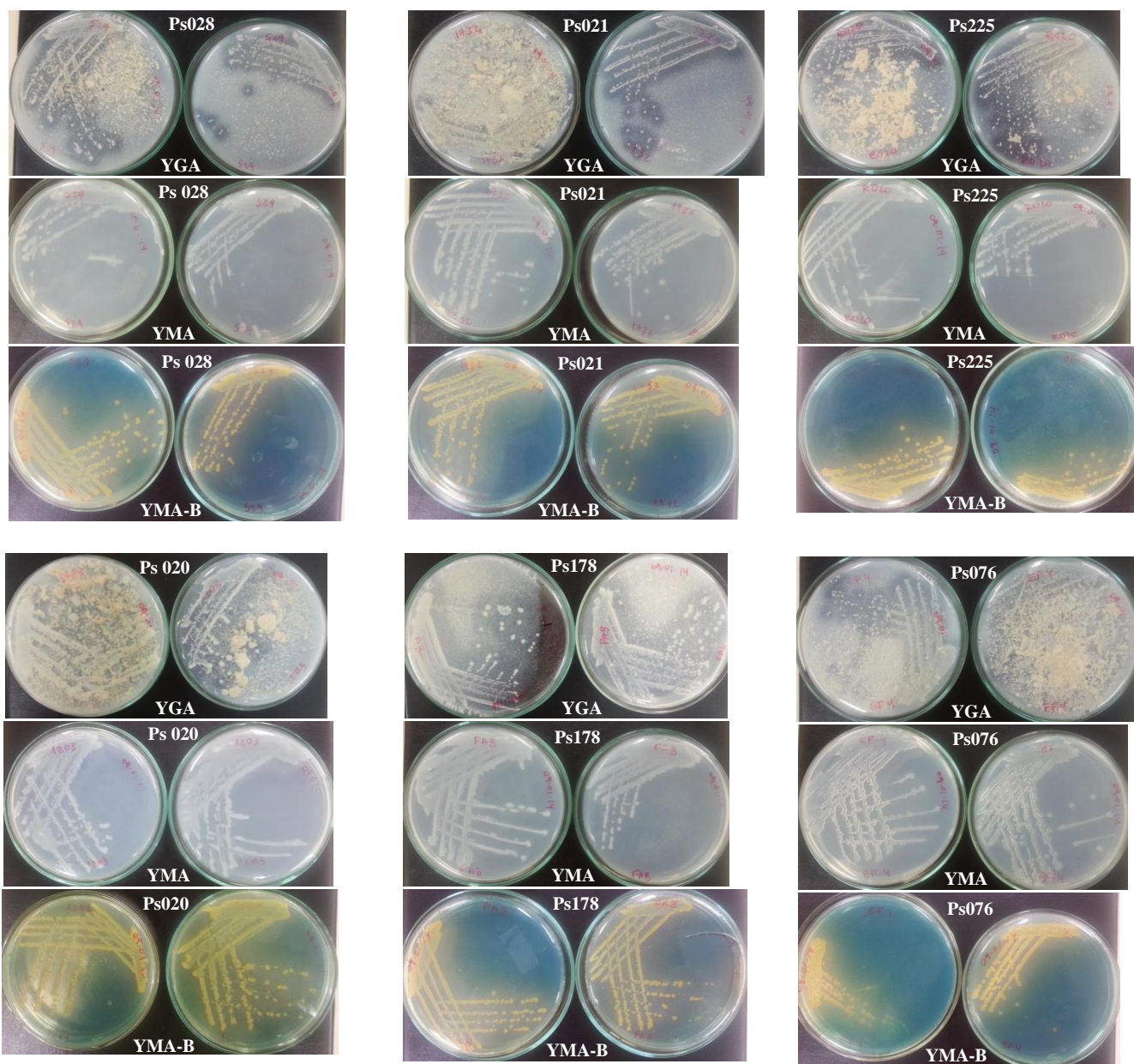


Figura 20 - Estirpes de *Paenibacillus* sp. estriadas em diferentes meios: ágar-Glúten (YGA), ágar-Manitol (YMA) e ágar-Manitol + azul de bromotimol (YMA-B) a uma temperatura de 36,5° C e pH 7.

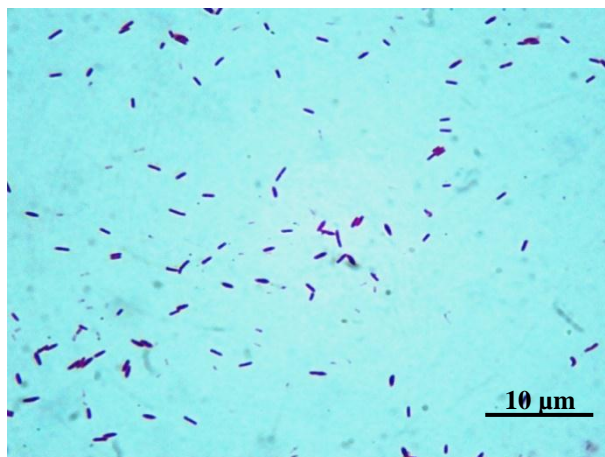


Figura 21 - Fotomicrografia de células Gram positivas em forma de bastonete de *Paenibacillus* sp. (aumento total de 1000x em microscópio óptico).

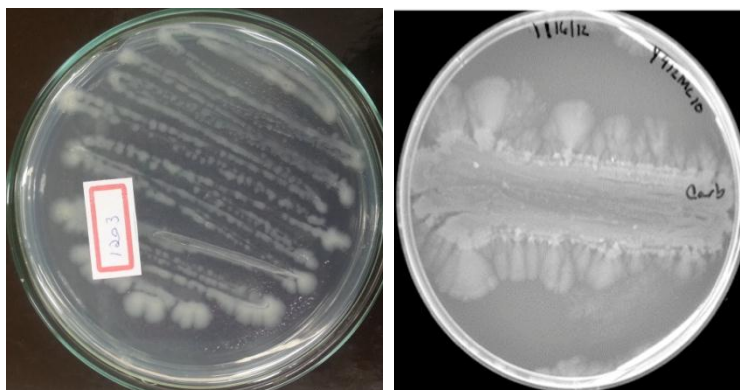


Figura 22 - Característica morfológica das colônias: A) *Paenibacillus* sp. (estirpe Ps\_020, presente trabalho) em ágar manitol; incubação a 36,5° C por 7 dias; B) *Paenibacillus* sp. Y412MC10 em ágar triptona; incubação a 37° C por 7 dias (MEAD et al., 2012).

A estirpe Ps\_076 mostrou uma consistência bastante viscosa e translúcida, associada a produção de exopolissacarídeos (Figura 23).

Espécies de *Paenibacillus* são capazes de produzir exopolissacarídeos (muco) que podem apresentar inúmeras funções biológicas. *P. jamilae* é capaz de produzir esse muco em diferentes condições de crescimento (pH 5-8 a uma temperatura variando de 25° a 40° C). Porém, em condições ótimas, pH 7 e temperatura de 30° C, atingem uma quantidade máxima durante a fase estacionária de crescimento (após 72h de cultivo) (MORILLO et al., 2007). O muco, quando modificado quimicamente (acetilado, fosforilado ou benzilado), pode apresentar atividades anti-oxidantes e anti-tumorais *in vitro*, exibindo redução de radicais livres e atividade antiproliferativa de células cancerígenas (LIU et al., 2012).

Diversos compostos com diferentes fontes orgânicas (C e N) influenciam na produção de exopolissacarídeos. Os meios utilizando açúcares como fonte de carbono faz com que os micro-organismos produzam mais muco, enquanto que os que crescem em com proteínas como fonte de N produzem um menor teor de muco. Há uma variedade de exopolissacarídeos produzidos por *P. polymyxa*, dependendo do tipo de estirpes, condições de cultura e composição do meio. Testes *in vivo* do muco mostraram baixa toxicidade em ratos, além dos efeitos antioxidantes e antitumoral (RAZA et al., 2011; LIU et al., 2010; RUIZ-BRAVO et al., 2001).

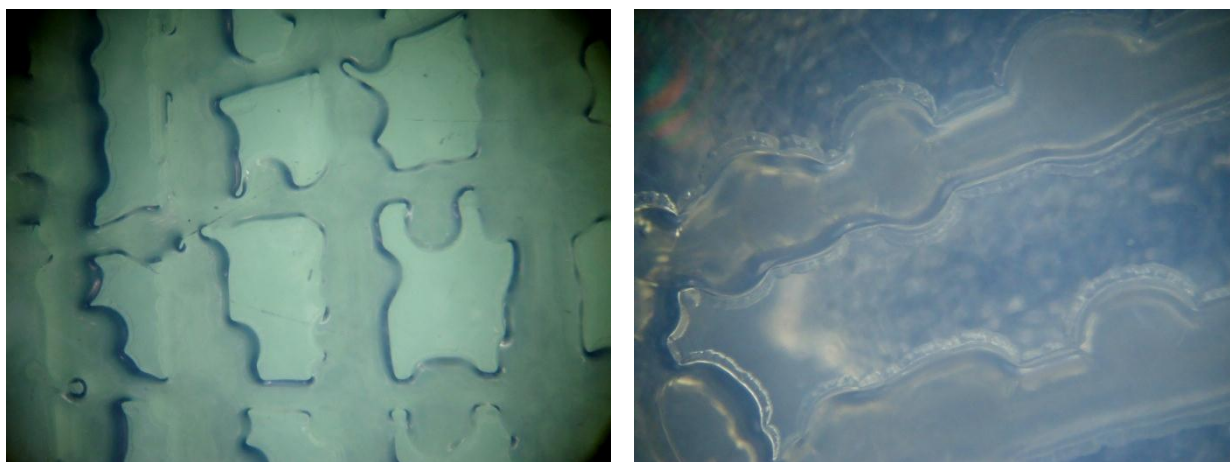


Figura 23 - Colônias de *Paenibacillus* sp. (estirpe INPA\_Ps076) evidenciando a presença de exopolissacarídeos, muco, em placa com meio YMA (aumento total de 5x).

As espécies de *Paenibacillus*, de acordo com o presente trabalho e vários outros associados a suas atividades biológicas, mostram um elevado potencial biotecnológico. São rizobactérias que podem ser encontradas em diferentes nichos - solos, rizosfera e raízes de diversos vegetais. Foi observado que na rizosfera está envolvida na fixação do nitrogênio, na solubilização de minerais, na regulação do crescimento da planta e na produção de antibióticos. É capaz também de produzir uma variedade de enzimas, metabólitos secundários e exopolissacarídeos com inúmeras funções. Juntamente com essas propriedades, está a sua capacidade de formar esporos o qual lhe permite resistir a uma grande variedade de estresses ambientais, tornando essa espécie um promissor agente biotecnológico em vários processos industriais (LAL e TABACCHIONI, 2009).

Pretende-se com esses resultados aprofundar os estudos com as proteases dessas bactérias visando utilizá-las como supridoras de metabólitos ou enzimas, em benefício das pessoas com doença celíaca.

## **5. CONCLUSÕES**



Cerca de 10% das rizobactérias testadas apresentaram habilidade de degradar o glúten, sendo elas: INPA\_Ps007, Ps020, Ps021, Ps024, Ps028, Ps076, Ps178, Ps183, Ps225 e Ps572.

As seis melhores rizobactérias (INPA\_Ps020, Ps021, Ps028, Ps076, Ps178, Ps225) foram identificadas taxonomicamente como *Paenibacillus* spp.

Essas *Paenibacillus* sp. apresentaram melhores crescimentos em meio contendo manitol e glúten, quando comparados nos meios somente com glúten ou somente manitol.

A presença do glúten no meio de cultura contendo manitol foi essencial para que as estirpes de *Paenibacillus* sp. INPA\_Ps020, Ps021, Ps028, Ps076, Ps178 e Ps225 produzissem extratos com atividade degradadora dessa proteína.

A maioria dos extratos brutos dessas *Paenibacillus* sp. apresentaram ação degradadora do glúten até na diluição de oito vezes aos 8 dias de crescimento em meio de cultura MG.

O extrato bruto da estirpe INPA\_Ps178 mostrou atividade degradadora do glúten até na diluição de quatro vezes e o da INPA\_Ps225 até na diluição de 16 vezes aos 8 dias de crescimento em meio de cultura MG.

Apenas os extratos produzidos pelas estirpes INPA\_Ps076 e Ps178 em meio contendo somente glúten apresentaram a capacidade de degradar essa proteína.

Os extratos brutos das seis estirpes estudadas apresentaram ação degradadora do glúten entre as temperaturas de 36° a 56° C, mas perderam essa habilidade entre as temperaturas de 66° a 96° C.

Houve uma influência do pH na capacidade desses extratos brutos em degradarem o glúten, com o pH neutro (7,0) sendo o mais adequado para todos eles.

## **6. PERSPECTIVAS**



Este trabalho pode ser complementado com os seguintes estudos:

- Identificação taxonômica a nível de espécie das seis estirpes de *Paenibacillus* sp. por meio de ferramentas moleculares e/ou bioquímicas;
- Isolar e caracterizar os metabólitos degradadores do glúten por cromatografia líquida de alta performance ou por espectrometria de massas;
- Quantificar o glúten nos meios onde houve o cultivo das estirpes de *Paenibacillus* sp. ou por meio dos extratos isolados dessas bactérias pela técnica de Elisa, para confirmar a quebra dessa proteína e o potencial de degradação pelas rizobactérias a fim de poder utilizá-las como alternativas para o tratamento da doença celíaca.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**





ANDREOLI, C. S.; CORTEZ, A. P. B.; SDEPANIAN, V. L.; MORAIS, M. B. Avaliação nutricional e consumo alimentar de pacientes com doença celíaca com e sem transgressão alimentar. **Revista Nutricional**, v. 26, n. 3, p. 301-311, 2013.

ANTOUN, H.; PRÉVOST, D. Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Z. A. Siddiqui (ed.), **PGPR: Biocontrol and Biofertilization**, Chapter 1, p 1–38, 2006.

ARAÚJO, H. M. C.; ARAÚJO, W. M. C.; BOTELHO, R. B. A.; ZANDONADI, R. P. Doença celíaca, hábitos e práticas alimentares e qualidade de vida. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 3, p. 467-474, 2010.

ASH, C., PRIEST, F. G. & COLLINS, M. D. *Paenibacillus* gen. nov. and *Paenibacillus polymyxa* comb. nov. In. **Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB**, List no. 51. *Int J Syst Bacteriol*, v. 44, p. 852, 1994.

BAINY, E. M.; CORREDIG, M.; POYSA, V.; WOODROW, L.; TOSH, S. Assessment of the effects of soy protein isolates with different protein compositions on gluten thermosetting gelation. **Food Research International**, v. 43, p. 1684–1691, 2010.

BAIS, H. P.; TIFFANY L. WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 57, p. 233-266, 2006.

BERGE, O.; GUINEBRETIERE, M. H.; ACHOUAK, W.; NORMAND, P.; HEULIN, T. *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 607–616, 2002.

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v. 17, n. 4, p 399-406, 1976.

BRIANI, C.; SAMAROO, D.; ALAEDINI, A. Celiac disease: From gluten to autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, n. 8, p. 644-650, 2008.

CABRERA-CHÁVEZ, F.; BARCA, A. M. C. Trends in wheat technology and modification of gluten proteins for dietary treatment of coeliac disease patients. **Journal of Cereal Science**, v. 52, p. 337-341, 2010.

CAMINERO, A.; NISTAL, E.; ARIAS, L.; VIVAS, S.; COMINO, I.; REAL, A.; SOUSA, C.; MORALES, J. M. R.; FERRERO, M.A.; RODRIGUEZ-APARICIO, L. B. CASQUEIRO, J. A gluten metabolism study in healthy individuals shows the presence of faecal glutenase activity. **Eur J Nutr**, v. 51, p. 293–299, 2012.

CHAUDHRY, V.; CHAUHAN, P. S.; MISHRA, A.; GOEL, R.; ASIF, M. H.; MANTRI, S. S.; BAG, S. K.; SINGH, S. K.; SAWANT, S. V.; NAUTIYAL, S. C.; Insights from the draft genome of *Paenibacillus lentimorbus* NRRL B-30488, a promising plant growth promoting bacterium. **Journal of Biotechnology**, v.168, n.4 p. 737– 738, 2013.

COHEN, I.; RON, I. G.; BEN-JACOB, E. From branching to nebula patterning during colonial development of the *Paenibacillus alvei* bacteria. **Physica A**, v. 286, n. 1-2, p. 321-336, 2000.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951–4959, 2005.

COPELTON, D. A.; VALLE, G. “You don’t need a prescription to go gluten-free”: The scientific self-diagnosis of celiac disease. **Social Science & Medicine**, v. 69, p. 623–631, 2009.

DENG, Y.; LU, Z.; LU, F.; ZHANG, C.; WANG, Y.; ZHAO, H.; BIE, X. Identification of LI-F type antibiotics and di-n-butyl phthalate produced by *Paenibacillus polymyxa*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, n. 3, p. 175–182, 2011a.

DENG, Y.; LU, Z.; BI, H.; LU, F.; ZHANG, C.; BIE, X. Isolation and characterization of peptide antibiotics LI-F04 and polymyxin B6 produced by *Paenibacillus polymyxa* strain JSa-9. **Peptides**, v. 32, n. 9, p. 1917–1923, 2011b.

DEWETTINCK, K.; BOCKSTAELE, F.V.; KUHNE, B.; WALLE, D.V.; COURTENS, T.M.; GELLYNCK, X. Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. **Journal of Cereal Science**, v. 48, p. 243-257, 2008.

DONDERO N. C, HOLBERT P. E. The endospore of *Bacillus polymyxa*. **J Bacteriol.**, v. 74, n. 1, p. 43–47, 1957.

ELLI, L.; RONCORONI, L.; HILS, M.; PASTERNAK, R.; BARISANI, D.; TERRANI, C.; VAIRA, V.; FERRERO, S.; BARDELLA, M.T. Immunological effects of transglutaminase-treated gluten in coeliac disease. **Human Immunology**, v. 73, p. 992–997, 2012.

EMBRAPA (Comunicado Técnico). **Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por BOX-PCR**. HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P.; BANGEL, E. V. Londrina, PR. ISSN 1516-1752, 2008.

EPA - **Environmental Protection Agency**. United States (Estados Unidos da América) Disponível em: <<http://www.epa.gov/>>. Acesso em: 10 de fev. 2014.

FARRELL, R.J.; KELLY, C.P. Clinical Reviews: Diagnosis of Celiac Sprue. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 96, n. 12, 2001.

FIGUEIREDO, M. V. B.; SELDIN, L.; ARAUJO, F. F.; MARIANO, R. L. R. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. Plant Growth and Health Promoting Bacteria: **Microbiology Monographs**, v. 18, p. 21-43, 2011.

FIGUEIREDO, M. V. B.; SELDIN, L.; ARAUJO, F. F.; MARIANO, R. L. R. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. D.K. Maheshwari (ed.). Plant Growth and Health Promoting Bacteria, **Microbiology Monographs**, v. 18, 2010.

FIGUEIREDO, M. V. B. ; MARTINEZ, C. R.; BURITY, H. A.; CHANWAY, C. P. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World J Microbiol Biotechnol**, v. 24, n. 7, p. 1187-1193, 2007.

FRIC, P.; GABROVSKA, D.; NEVORAL, J. Celiac disease, gluten-free diet, and oats. **Nutrition Reviews**, v. 69, n. 2, p. 107-115, 2011.

GIANFRANI, C.; SICILIANO, R.A.; FACCHIANO, A.M.; CAMARCA, A.; MAZZEO, M. F.; COSTANTINI, S.; SALVATI, V.M.; MAURANO, F.; MAZZARELLA, G.; IAQUINTO, G.; BERGAMO, P.; ROSSI, M. Transamidation of Wheat Flour Inhibits the Response to Gliadin of Intestinal T Cells in Celiac Disease. **Gastroenterology**, v. 133, p. 780–789, 2007.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30– 39, 2014.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

GORDON, G. W.; BERRY, G.; LIANG, X. H.; LEVINE, B.; HERMAN, B. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. **Biophys. J.**, v. 74, p. 2702–2713, 1998.

GOVINDASAMY, V.; SENTHILKUMAR, M.; MAGHESHWARAN, V.; KUMAR, U.; BOSE, P.; SHARMA, V.; ANNAPURNA, K.; Editora Springer. *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: Potential PGPR for Sustainable Agriculture. **Plant Growth and Health Promoting Bacteria**; Microbiology Monographs, v.18, pp 333-364; 2011.

GRECO, L.; GOBBETTI, M.; AURICCHIO, R.; MASE, R.; LANDOLFO, F.; PAPARO, F.; CAGNO, R.; ANGELIS, M.; RIZZELLO, C.G.; CASSONE, A.; TERRONE, G.; TIMPONE, L.; D'ANIELLO, M.; MAGLIO, M.; TRONCONE, R.; AURICCHIO, S. Safety for Patients With Celiac Disease of Baked Goods Made of Wheat Flour Hydrolyzed During Food Processing. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, p. 24–29, 2011.

GU, L.; BAI, Z.; BO JIN, B.; ZHANG, J.; LI W.; ZHUANG, G.; ZHANG, H. Production of a newly isolated *Paenibacillus polymyxa* biocontrol agent using monosodium glutamate wastewater and potato wastewater. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 9, p.1407–1412, 2010.

GÜNES, A.; TURAN, M.; GÜLLÜCE, M.; SAHIN, F. Nutritional content analysis of plant growth-promoting rhizobacteria species. **European Journal of Soil Biology**, v.60, p. 88 e 97, 2014.

HADITHI, M.; PEÑA, A.S. Current methods to diagnose the unresponsive and complicated forms of coeliac disease. **European Journal of Internal Medicine**, v. 21, p. 247–253, 2010.

HARTMANN, G.; KOEHLER, P.; WIESER, H. Rapid degradation of gliadin peptides toxic for coeliac disease patients by proteases from germinating cereals. **Journal of Cereal Science**, v. 44, p. 368–371, 2006.

HE, Z.; KISLA, D.; ZHANG, L.; YUAN, C.; GREEN-CHURCH, K. B.; YOUSEF, A.E. Isolation and Identification of a *Paenibacillus polymyxa* Strain That Coproduces a Novel Lantibiotic and Polymyxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n 1, p. 168–178, 2007.

HERNANDEZ-LAHOZ, C.; RODRIGO, L. Trastornos relacionados con el gluten y enfermedades desmielinizantes. **Med Clin**, v. 140, n. 7, p. 314–319, 2013.

HONG, Y.; MA, Y.; WU, L.; MAKI, M.; QIN, W.; CHEN, S. Characterization and analysis of *nifH* genes from *Paenibacillus sabiniae* T27. **Microbiological Research**, v.167, n. 10, p. 596– 601, 2012.

HOON, C.; PARK, S-Y.; RYU, C-M.; KIM, J. F.; PARK, S-H.; PARK, C. S. Diversity of Root-Associated *Paenibacillus* spp. in Winter Crops from the Southern Part of Korea. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 15, n. 6, p. 1286–1298, 2005.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. CNPS<sup>o</sup>, CNPAF. EMBRAPA/ SPI. (EMBRAPA-CNPAF, Documento, 46), Brasília. 542p, 1994.

HWANG, I. T.; LIM, H. K.; SONG, H. Y.; CHO, S. J.; CHANG, J-S.; PARK, N-J. Cloning and characterization of a xylanase, KRICT PX1 from the strain *Paenibacillus* sp. HPL-001. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, p. 594–601, 2010.

INGHAM, C. J.; JACOB, AND E. B. Swarming and complex pattern formation in *Paenibacillus vortex* studied by imaging and tracking cells. **BMC Microbiol**, v. 8, n. 36, p. 1-16, 2008.

JEONG, H.; PARK, S-Y.; CHUNG, W-H.; KIM, S. H.; KIM, N.; PARK, S-H.; KIM, J. F. Draft Genome Sequence of the *Paenibacillus polymyxa* Type Strain (ATCC 842T), a Plant Growth-Promoting Bacterium. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 18, p. 5026–5027, 2011.

KAMBLE, P. N.; ROUSK, J.; FREY, S. D.; BÅÅTH, E. Bacterial growth and growth-limiting nutrients following chronic nitrogen additions to a hardwood forest soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 59, p. 32-37, 2013.

KIM, J. F.; JEONG, H.; PARK, S-Y.; KIM, S-B.; PARK, Y. K.; CHOI, S-K.; RYU, C-M.; HUR, C-G.; GHIM, S-Y.; OH, T. K.; KIM, J. J.; PARK, C. S.; PARK, S-H Genome Sequence of the Polymyxin-Producing Plant-Probiotic Rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E68. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 22, p. 6103–6104, 2010.

KO, C-H.; TSAI, C-H.; LIN, P-H.; CHANG, K-C.; TU, J.; WANG, Y-N.; YANG, C-Y. Characterization and pulp refining activity of a *Paenibacillus campinasensis* cellulase expressed in *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7882–7888, 2010.

KONTOGIORGOS, V. Microstructure of hydrated gluten network. **Food Research International**, v. 44, p. 2582–2586, 2011.

LAL, S.; TABACCHIONI, S. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. **Indian J Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 2–10, 2009.

LEBWOHL, B.; SPECHLER, S. J.; WANG, T. C.; GREEN, P.H.; LUDVIGSSON, J. F. Use of proton pump inhibitors and subsequent risk of celiac disease. **Digestive and Liver Disease**, v. 46, n. 1, p. 36-40, 2014.

LERNER, A.A. New therapeutic strategies for celiac disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, p. 144–147, 2010.

LIAO, L.; WANG, Q.; ZHAO, M.M. Functional, conformational and topographical changes of succinic acid deamidated wheat gluten upon freeze- and spray-drying: a comparative study. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 177-184, 2013.

LITWINEK, D.; ZIOBRO, R.; GAMBUŚ, H.; SIKORA, M. Gluten Free Bread in a Diet of Celiacs. **International Journal of Celiac Disease**, v. 2, n. 1, p. 11-16, 2014.

LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; ZENG X. Preparation, antioxidant and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3-4, p. 767–772, 2012

LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; SUN, Y.; LU, Z.; ZENG, X. In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 4, p. 1278–1283, 2010.

LPSN bacterio.net. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/paenibacillus.html>> (webpage or website). Acesso em: 10 de fev. 2014.

LU, F.; LU, Z.; BIE, X.; YAO, Z.; WANG, Y.; LU, Y.; GUO, Y. Purification and characterization of a novel anticoagulant and fibrinolytic enzyme produced by endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Thrombosis Research**, v.126, n. 5, p.349 e 355, 2010.

MA, M.; WANG, C.; DING, Y.; LI, L.; SHEN, D.; JIANG, X.; GUAN, D.; CAO, F.; CHEN, H.; FENG, R.; WANG, X.; GE, Y.; YAO, L.; BING, X.; YANG, X.; LI, J.; DU, B.; Complete Genome Sequence of *Paenibacillus polymyxa* SC2, a Strain of Plant Growth-Promoting Rhizobacterium with Broad-Spectrum Antimicrobial Activity. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 1, p. 311–312, 2011.

MALAMUT, G.; CERF-BENSUSSAN, N.; CELLIER, C. Deciphering the Different Types of Refractory Celiac Disease. **International Journal of Celiac Disease**, v. 2, n. 1, p. 4-5, 2014.

MANDIC-MULEC, I.; PROSSER, J. I. Diversity of Endospore-forming Bacteria in Soil: Characterization and Driving Mechanisms. Editora Springer. **Endospore-forming Soil Bacteria**, Soil Biology, v. 27, pp 31-59, 2011.

MEAD, A. J.; RUGLESS, M. J.; JACOBSEN, S. E. W.; SCHUH, A. Germline JAK2 mutation in a family with hereditary thrombocytosis. (Letter) **New Eng. J. Med.**, v. 366, p. 967-969, 2012.

MOSBY'S NURSING CONSULT (Internet). 2014® Elsevier / MC Strategie. Disponível em: <<http://www.nursingconsult.com/nursing/drugs/>>. Acesso em: 10 de fev. 2014.

MOONEY, P. D.; LEEDS, J. S.; LIBZO, N.; SIDHU, R.; EVANS, K. E.; HALL, E. J.; JANDU, V. S.; HOPPER, A. D.; BASUMANI, P.; DEAR, K. L.; MCALINDON, M. E.; SANDERS, D. S. Case-finding for coeliac disease in secondary care: A prospectivemulticentre UK study. **Digestive and Liver Disease**, v. 46, n. 1, p. 32-35, 2014.

MORILLO, J. A.; ÁGUILA, V. G. DEL.; AGUILERA, M.; RAMOS-CORMENZANA, A.; MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M. Production and characterization of the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae* grown on olive mill-waste waters. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 23, n. 12, p. 1705–1710, 2007.

NASCIMENTO, K. O.; TAKEITI, C. Y.; BARBOSA, M. I. M. J. Doença Celíaca: Sintomas, Diagnóstico e Tratamento Nutricional. **Saúde em Revista**, v. 12, n. 30, p. 53-63, 2012

NARULA, N KOTHE, E; BEHL, R. K. Role of root exudates in plant-microbe interactions. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 82, n. 2, p. 122 – 130, 2009.

NEVORAL, J. Celiac Disease in Children: What Has Changed? **International Journal of Celiac Disease**, v. 2, n. 1, p. 18-23, 2014.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Citado em 2014, Fev. Disponível: <[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)>

NCBI - National Center for Biotechnology Information (Global Cross-database Search). U.S. National Library of Medicine, USA. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=Paenibacillus>>. Acesso em: 10 de fev. 2014.

NIEWINSKI, M.M. Advances in Celiac Disease and Gluten-Free Diet. **J Am Diet Assoc.**, v. 8, n. 4, p. 661-672, 2008.

NIU, B.; RUECKERT, C.; BLOM, J.; WANG, Q.; BORRIS, R. The Genome of the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* M-1 Contains Nine Sites Dedicated to Nonribosomal Synthesis of Lipopeptides and Polyketides. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 20, p. 5862–5863, 2011.

NOBRE, S.R.; SILVA, T.; J.E.; CABRAL, P. Doença celíaca revisitada. **Ge - J Port Gastrenterol**, v. 14, p. 184-193, 2007.

NONG, G.; RICE, J. D.; CHOW, V.; PRESTON, J. F. Aldouronate Utilization in *Paenibacillus* sp. Strain JDR-2: Physiological and Enzymatic Evidence for Coupling of Extracellular Depolymerization and Intracellular Metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 13, p. 4410–4418, 2009.

OLIVEIRA, L.A.; MAGALHÃES, H.P. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. **Revista de Microbiologia**, v.30, p. 203-208, 1999.

PÉREZ, L.C.; VILLASANTE, G.C.; RUIZ, A.C.; LEÓN, F. Non-dietary therapeutic clinical trials in coeliac disease. **European Journal of Internal Medicine**, v. 23, p. 9–14, 2012.

PÉREZ, J. A. M.; GARCÍA-RIBERA, R.; QUESADA, T.; AGUILERA, M.; RAMOS-CORMENZANA, A.; MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M. Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 24, n. 11, p. 2699–2704, 2008.

PHARMACEUTICAL DRUG MANUFACTURERS. (Internet), Disponível em: <<http://www.pharmaceutical-drug-manufacturers.com/>>. Acesso em: 10 de fev. 2014.

POLACCO, J. C.; TODD, C. D.; (Editores). **Ecological Aspects of Nitrogen Metabolism in Plants**. Print ISBN: 978-08138-1649-4. Book: 448 p., 2011.



RAZA, W.; MAKEEN, K.; WANG, Y.; XU, Y.; QIRONG, S. Optimization, purification, characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6095–6103, 2011.

RE, V.D.; CAGGIARI, L.; TABUSO, M.; CANNIZZARO, R. The versatile role of gliadin peptides in celiac disease, **Clinical Biochemistry**, v. 46, p. 552–560, 2013.

RIBEIRO, M.; POETA, P.; IGREJAS, G. The Genetic Variability of Wheat Can Ensure Safe Products for Celiac Disease Patients? **International Journal of Celiac Disease**, v. 2, n. 1, p. 24-26, 2014.

RIBOSOMAL DATABASE PROJECT. Biomedical and Physical Sciences Building, Michigan State University. Disponível em: <<http://rdp.cme.msu.edu/>>. Acesso em: 10 de fev. 2014.

ROSSI, M; SCHWARTZ, B. Editorial: Celiac disease and intestinal bacteria: not only gluten? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, p. 749-751, 2010.

RUIZ-BRAVO, A.; JIMENEZ-VALERA, M.; MORENO, E.; GUERRA, V.; RAMOS-CORMENZANA, A.; Biological Response Modifier Activity of an Exopolysaccharide from *Paenibacillus jamilae* CP-7. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 4, p. 706–710. 2001.

RUBIO-TAPIA, A.; BARTON, S.H.; MURRAY, J.A. Celiac Disease And Persistent Symptoms. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, p. 13–17, 2011.

RUBIO-TAPIA, A.; RAHIM, M. W.; SEE, J. A.; LAHR, B. D.; WU, T. T.; MURRAY, J. A. Mucosal recovery and mortality in adults with celiac disease after treatment with a gluten-free diet. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 105, n. 6, p. 1412-1420, 2010.

SÁEZ, R.L.; FUENTES-ÁLVAREZ, D.; PÉREZ-MARTÍNEZ, I.; ALVAREZ-MIERES, N.; NIÑO-GARCÍA, P.; DE-FRANCISCO-GARCÍA, R.; Riestra-Menéndez, S.; BOUSOÑO-GARCÍA, C.; ALONSO-ARIAS, R.; LÓPEZ-VÁZQUEZ, A. Differences between pediatric and adult celiac disease. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 103, n. 5, p. 238-244, 2011.

SAINSBURY, K.; MULLAN, B.; SHARPE, L. Gluten free diet adherence in coeliac disease. The role of psychological symptoms in bridging the intention–behaviour gap. **Appetite**, v. 61, p. 52–58, 2013.

SCHUPPAN, D.; JUNKER, Y.; BARISANI, D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. **Gastroenterology**, v. 137, n. 6, p. 1912-1933, 2009.

SCHUPPAN, D. Current Concepts of Celiac Disease Pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 119, p. 234–242, 2000.

SILVA, P. C.; ALMEIDA, P. D. V.; AZEVEDO, L. R.; GRÉGIO, A. M. T.; MACHADO, M. A. N.; LIMA, A. A. S. Doença Celíaca: Revisão. **Clínica e Pesquisa em Odontologia**, v. 2, n. 5/6, p. 401-406, 2006.

SILVA, T. S. G.; FURLANETTO, T. W. Diagnóstico de doença celíaca em adultos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 122-126, 2010.

SOLLID, L.M.; LIE, A. Celiac Disease Genetics: Current Concepts and Practical Applications. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, p. 843–851, 2005.

SON, S.H.; KHAN, Z.; KIM, S.G.; KIM, Y.H. Plant growth-promoting rhizobacteria, *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus lentimorbus* suppress disease complex caused by root-knot nematode and fusarium wilt fungus. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 2, P. 524-32. 2009.

SONG, Y-S.; SEO, D-J.; KIM, K-Y.; PARK, R-D.; JUNG, W-J. Expression patterns of chitinase produced from *Paenibacillus chitinolyticus* with different two culture media. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p. 1187– 1192, 2012.

STEPNIAK, D.; KONING, F. Celiac Disease-Sandwiched between Innate and Adaptive Immunity. **Human Immunology**, v. 67, p. 460–468, 2006.

STOVEN, S.; MURRAY, J. A.; MARIETTA, E. Celiac Disease: Advances in Treatment via Gluten Modification. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 8, p. 859-862, 2012.

SUSANNA, S.; PRABHASANKAR, P. A comparative study of different bio-processing methods for reduction in wheat flour allergens. **Eur Food Res Technol**, v. 233, p. 999–1006, 2011.

SZIKSZ, E.; VÖRÖS, P.; VERES, G.; FEKETE, A.; VANNAY, A. Coeliac Disease: From Triggering Factors to Treatment. **International Journal of Celiac Disease**, v. 1, n. 1, p. 9-13, 2013.

TACK, G. J.; VERBEEK, W. H. M.; SCHREURS, M. W. J.; MULDER; C. J. J. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. **Nature Reviews Gastroenterol Hepatol**, v. 7, n. 4, p. 204-13, 2010.

THOM, S.; LONGO, B.M.; RUNNING, A.; ASHLEY, J. A Guide to Successful Diagnosis and Treatment. **The Journal for Nurse Practitioners – JNP**, p. 244-253, 2009.

TIMMUSK, S.; WEST, P. VAN.; GOW, N. A. R.; WAGNER, E. G. H. Antagonistic effects of *Paenibacillus polymyxa* towards the oomycete plant pathogens *Phytophthora palmivora* and *Pythium aphanidermatum*. In: **Mechanism of action of the plant growth promoting bacterium *Paenibacillus polymyxa***. Uppsala University, Uppsala, Sweden, p. 1–28, 2003.

TONUCCI, E.; BIZZARO, N. Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensitivity. **Autoimmunity Reviews**, 2014.

TYE-DIN, J.A.; ANDERSONA, R.P.; FFRENCH, R.A.; BROWNE, G.J.; HODSMANF, P.; SIEGEL, M.; BOTWICK, W.; SHREENIWAS, R. The effects of ALV003 pre-digestion of gluten on immune response and symptoms in celiac disease in vivo. **Clinical Immunology**, v. 134, p. 289–295, 2010.

VALE JÚNIOR, J. F.; SOUZA, M. I. L.; NASCIMENTO, P. P. R. R.; CRUZ, D. L. S. Solos da Amazônia: etnopedologia e desenvolvimento sustentável. **Revista Agro@mbiente Online**, v. 5, n. 2, p.158-165, 2011.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571–586, 2003.

VINCENT, J. M. **A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications (International Biology Program Handbook, 15. London), 164 p., 1970.

VINCENTINI, O.; QUARANTA, M.G.; VIORA, M.; AGOSTONI, C.; SILANO, M. Docosahexaenoic acid modulates in vitro the inflammation of celiac disease in intestinal epithelial cells via the inhibition of cPLA2. **Clinical Nutrition**, v. 30, p. 541-546, 2011.

VITA, P.; FICCO, D.B.M.; LUCIANI, A.; VINCENTINI, O.; PETTOELLO-MANTOVANI, M.; SILANO, M.; MAIURI, L.; CATTIVELLI, L. A u-secalin contained decamer shows a celiac disease prevention activity. **Journal of Cereal Science**, v. 55, p. 234-242, 2012.

XU, H.; FEELY, S.L.; WANG, X.; LIU, D.X.; BORDA, J.T.; DUFOUR, J.; LI, W.; AYE, P.P.; DOXIADIS, G.G.; KHOSLA, C.; VEAZEY, R.S.; SESTAK, K. Gluten-sensitive enteropathy coincides with decreased capability of intestinal T cells to secrete IL-17 and IL-22 in a macaque model for celiac disease. **Clinical Immunology**, v. 147, p. 40-49, 2013.

XU, J.; BIETZ, J.A.; CARRIERE, C.J. Viscoelastic properties of wheat gliadin and glutenin suspensions. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1025-1030, 2007.

WALKER, M.M.; WOODWARD, J. A clinicopathological approach to the diagnosis of coeliac disease. **Diagnostic Histopathology**, v. 18, n. 10, p. 402-410, 2012.

WEID, I. V. D.; PAIVA, E.; NÓBREGA, A.; ELSAS, J. D. V.; SELDIN, L. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of maize planted in Cerrado soil. **Res. Microbiol.**, v. 151, n. 5, p. 369-381, 2000.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, (Roots Special Issue), p. 487-511, 2001.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 115-119, 2007.

WOODWARD, J. Coeliac disease. **Medicine**, v. 39, n. 3, p. 173-177, 2010.

ZHANG, X.; HAN, X. Nitrogen deposition alters soil chemical properties and bacterial communities in the Inner Mongolia grassland. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, n. 8, p.1483-149, 2012.

ZHAO , D.; MULVANEY, S.; CHINNASWAMY, R.; RAYAS-DUARTE, P.; ALLVIN, B.; WANG, M. Elastic properties of gluten representing different wheat classes. **Journal of Cereal Science**, v. 52, p. 432-437, 2010.

ZEIGLER, D. R. The Family Paenibacillaceae: *Bacillus* Genetic Stock Center Catalog of Strains. Columbus **Biological Sciences** (Strain Catalog and Reference – BGSC). Part 5, 32 p., 2013.

# ANEXO

## Contigs – primers: 542F e 1492R

> Contig1\_INPA\_Ps028

```
ATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGGCTCTTTTAGTCTGGTGTTAATCCCCAGGCTCAACTCCGGTTCGCACTGGAAACTGG
GGAGCTTGAGTGCAGAAAAAGAGAGTGGAAATCCCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCG
AAGGCGACTCTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAATACCTGGTAGTCCACG
CCGTAACCGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCCTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGT
ACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGC
GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTCTGACCGGTCTAGAGATAGGCCTTTCCTTCGGGACAGAGGAGACAGGTGGTGC
ATGGTTGTCGTAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATGCTTAGTTGCCAGCAGGTC
AAGCTGGGCACTTAAGCAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGGGGGAGGACGTCAAATCATATGCCCTTATGCC
TGGGCTACACAGTACTACAATGGCCGGTACAACGGGAAGGGAAGCCGGGAGGGGGAGCCAATCCTAGAAAAAGCCGGTCTC
AGTTGGGATTGCAAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTGGGAATTGTTAGTAATCGGGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGT
TCCCGGGTTTTGTACACACCGCCCGTACCCACGAGAGTTTACAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCGCAAGGGCCCA
```

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Paenibacillus jamilae strain NBI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1537	1537	99%	0.0	98%	<a href="#">JX498909.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa strain JK-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">JQ283973.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 26 &gt;qb</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">HE981791.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 25</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">HE981790.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 24</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">HE981789.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 20</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">HE981785.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 6</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">HE981771.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 1</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">HE981766.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa M1 main chromosome, complete genome</a>	1526	21239	100%	0.0	97%	<a href="#">HE577054.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa SC2, complete genome</a>	1526	21241	100%	0.0	97%	<a href="#">CP002213.1</a>
<a href="#">Paenibacillus sp. RA4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">GU979221.1</a>
<a href="#">Paenibacillus sp. S151 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">GU328690.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa strain 1203 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1526	1526	100%	0.0	97%	<a href="#">EU982510.1</a>

**SeqMatch :: Summary** [ new match | summary | help ]

Select All Match Hits to seqCART

Display depth: Auto

Lineage (click node to return it to hierarchy view):

Hierarchy View:

- rootrank Root (1) [query sequences] show printer friendly results download as text file [options]
- domain Bacteria (1)
- phylum Firmicutes (1)
- class Bacilli (1)
- order Bacillales (1)
- family Paenibacillaceae 1 (1)
- genus Paenibacillus (1)
- seqmatch\_seq [view selectable matches]

> **Contig2\_INPA\_Ps178**

GGCGTAAAGCGCGCCAGCGGGCTCTTTTAGTCTGGTGTAAATCCCCAGGCTCAACTTCCGGTGCCTGGAACCTGGGGAG  
 CTTGAGTGCAGAAAAAGAGAGTGAATTCCTCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG  
 CGACTCTTGGGGCTGAACTGACGCTGAGGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT  
 AAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACG  
 GTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAA  
 GAACCTTACCAGGTTGACATCCCTCTGACCGGTCTAGAGATAGGCCTTTCCTTCGGGACAGAGGAGACAGGTGGTGCATGG  
 TTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGTTTAGTTGCCAGCAGGTCAGC  
 TGGGCACTTAAGCAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGGGGGAGGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGG  
 CTACACACGTACTACAATGGCCGGTACAACGGGAAGGGAAGCCGGGAGGGGGAGCCAATCCTAGAAAAGCCGGTCTCAGTT  
 GGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTGGGAATTGTTAGTAATCGGGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC  
 GGGTTTTGTACACACCGCCCGTCACCCACGAGAGTTTACAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCGCAAGGGCCACGCCG  
 G

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Paenibacillus polymyxa strain 1203 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1537	1537	100%	0.0	97%	<a href="#">EU982510.1</a>
<a href="#">Paenibacillus jamilae strain NBI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1535	1535	98%	0.0	98%	<a href="#">JX498909.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 26 &gt;qb</a>	1535	1535	100%	0.0	97%	<a href="#">HE981791.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 25</a>	1535	1535	100%	0.0	97%	<a href="#">HE981790.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 24</a>	1535	1535	100%	0.0	97%	<a href="#">HE981789.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 20</a>	1535	1535	100%	0.0	97%	<a href="#">HE981785.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 6</a>	1535	1535	100%	0.0	97%	<a href="#">HE981771.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 1</a>	1535	1535	100%	0.0	97%	<a href="#">HE981766.1</a>
<a href="#">Paenibacillus sp. JCM 8037 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	1535	1535	100%	0.0	97%	<a href="#">AB689757.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa M1 main chromosome, complete genome</a>	1535	21377	100%	0.0	97%	<a href="#">HE577054.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa SC2, complete genome</a>	1535	21383	100%	0.0	97%	<a href="#">CP002213.1</a>
<a href="#">Bacillus subtilis strain 1JW11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1535	1535	100%	0.0	97%	<a href="#">GU991853.1</a>
<a href="#">Paenibacillus sp. RA4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1535	1535	100%	0.0	97%	<a href="#">GU979221.1</a>
<a href="#">Paenibacillus sp. SI51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1535	1535	100%	0.0	97%	<a href="#">GU328690.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa strain 1178 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1535	1535	100%	0.0	97%	<a href="#">EU982504.1</a>
<a href="#">Bacillus subtilis isolate B7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1535	1535	100%	0.0	97%	<a href="#">F1770738.1</a>

**Classifier :: Hierarchy View** [ start over | assignment detail | help ]

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.6, Sep 2013  
 Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 9  
 Query File: classifier\_seq\_upload5950517352649353344.FASTA  
 Query Submit Date: Fri Feb 14 13:43:43 EST 2014

Display depth:  Confidence threshold:

domain	%	Library
Bacteria	100.0	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: #e91e63;"></div>

Hierarchy View (click a node to make it the root -- only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

- rootrank Root (1 sequences) [show assignment detail for Root only]
- > > domain Bacteria (1)
- > > > phylum Firmicutes (1)
- > > > > class Bacilli (1)
- > > > > > order Bacillales (1)
- > > > > > > family Paenibacillaceae 1 (1)
- > > > > > > > unclassified\_Paenibacillaceae 1 (1)

>Contig3\_INPA\_Ps076

ATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGCTCTTTTAGTCTGGTGTTAATCCCGAGGCTCAACTTCGGTTCGCACTGGAACCTGG  
 GGAGCTTGAGTGCAGAAAAAGAGAGTGGAAATCCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCG  
 AAGGCGACTCTCTGGGCTGTAACCTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAATACCTGGTAGTCCACC  
 CCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGT  
 ACGGTGCGAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAAATGGAAGCAACGC  
 GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTCTGACCGGTCTAGAGATAGGCCTTTCCTTCGGGACAGAGGAGACAGGTGGTGC  
 ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGCTTAGTTGCCAGCAGGTC  
 AAGCTGGGCACTCTAAGCAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACC  
 TGGGCTACACAGTACTACAATGGCCGGTACAACGGGAAGGAAGCCGCGAGGGGGAGCCAATCCTAGAAAAGCCGGTCTC  
 AGTTGGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTGGGAATTGTTAGTAATCGGGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGT  
 TCCCGGTTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTACAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCCGAAGGGCCAGC

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Paenibacillus iamillae strain NBI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1559	1559	99%	0.0	98%	<a href="#">JX498909.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa strain 1203 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1552	1552	100%	0.0	98%	<a href="#">EU982510.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 26 -qib</a>	1550	1550	100%	0.0	98%	<a href="#">HE981791.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 25</a>	1550	1550	100%	0.0	98%	<a href="#">HE981790.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 24</a>	1550	1550	100%	0.0	98%	<a href="#">HE981789.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 20</a>	1550	1550	100%	0.0	98%	<a href="#">HE981785.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 6</a>	1550	1550	100%	0.0	98%	<a href="#">HE981771.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 1</a>	1550	1550	100%	0.0	98%	<a href="#">HE981766.1</a>
<a href="#">Paenibacillus sp. JCM 8037 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	1550	1550	100%	0.0	98%	<a href="#">AB689757.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa M1 main chromosome, complete genome</a>	1550	21579	100%	0.0	98%	<a href="#">HE577054.1</a>
<a href="#">Paenibacillus polymyxa SC2, complete genome</a>	1550	21584	100%	0.0	98%	<a href="#">CP002213.1</a>
<a href="#">Bacillus subtilis strain 1JW11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1550	1550	100%	0.0	98%	<a href="#">GU991853.1</a>
<a href="#">Paenibacillus sp. RA4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1550	1550	100%	0.0	98%	<a href="#">GU979221.1</a>
<a href="#">Paenibacillus sp. SI51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1550	1550	100%	0.0	98%	<a href="#">GU328690.1</a>

**SeqMatch :: Summary**

[ new match | summary | help ]

Select All Match Hits to seqCART

Display depth: Auto

Lineage (click node to return it to hierarchy view):

Hierarchy View:

- rootrank Root (1) (query sequences) [ show printer friendly results | download as text file ] [ options ]
- domain Bacteria (1)
- phylum Firmicutes (1)
- class Bacilli (1)
- order Bacillales (1)
- family Paenibacillaceae 1 (1)
- genus Paenibacillus (1)
- seqmatch\_seq [view selectable matches]

> Contig4\_INPA\_Ps021

TATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTCTTTTAGTCTGGTGTTTAATCCCAGGCTCAACTTCCGGTCCGACTGGAAACTG  
 GGGAGCTTGAGTGCAAAAAAGAGAGTGGAAATCCCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAAGATGTGGAGGAACACCAGTGGC  
 GAAGGCGACTCTCTGGGCTGTAAGTACTGACGCTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAATACCTGGTAGTCCAC  
 GCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCTGGGGAG  
 TACGGTCCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTAATTCGAAGCAACGC  
 GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTCTGACCGGTCTAGAGATAGGCCTTTCCTTCGGGACAGAGGAGACAGGTGGTGC  
 ATGTTTGTCTGCTAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATGCTTAGTTGCCAGCAGGTC  
 AAGCTGGGCACTCTAAGCAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACC  
 TGGGCTACACAGTACTACAATGGCCGGTACAACGGGAAGGGAAGCCGCGAGGGGGAGCCAATCCTAGAAAAGCCGGTCTC  
 AGTTGGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTGGGAATTGTTAGTAATCGGGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT  
 TCCCAGGTTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTACAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCGCAAGGGCCCAGC

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Paenibacillus jamilae strain NBI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1567	1567	99%	0.0	98%	<a href="#">JX498909.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa strain 1203 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1559	1559	100%	0.0	98%	<a href="#">EU982510.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 26 -qb	1557	1557	100%	0.0	98%	<a href="#">HE981791.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 25	1557	1557	100%	0.0	98%	<a href="#">HE981790.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 24	1557	1557	100%	0.0	98%	<a href="#">HE981789.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 20	1557	1557	100%	0.0	98%	<a href="#">HE981785.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 6	1557	1557	100%	0.0	98%	<a href="#">HE981771.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 1	1557	1557	100%	0.0	98%	<a href="#">HE981766.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus sp. JCM 8037 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1557	1557	100%	0.0	98%	<a href="#">AB689757.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa M1 main chromosome, complete genome	1557	21682	100%	0.0	98%	<a href="#">HE577054.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa SC2, complete genome	1557	21687	100%	0.0	98%	<a href="#">CP002213.1</a>
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain 1JW11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1557	1557	100%	0.0	98%	<a href="#">GU991853.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus sp. RA4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1557	1557	100%	0.0	98%	<a href="#">GU979221.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus sp. SI51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1557	1557	100%	0.0	98%	<a href="#">GU328690.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa strain 1453-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1557	1557	100%	0.0	98%	<a href="#">EU982534.1</a>

**SeqMatch :: Summary** [ new match | summary | help ]

Select All Match Hits to seqCART

Display depth: Auto

Lineage (click node to return it to hierarchy view):

**Hierarchy View:**

- rootrank Root (1) (query sequences) [ show printer friendly results | download as text file ] [ options ]
- domain Bacteria (1)
- phylum Firmicutes (1)
- class Bacilli (1)
- order Bacillales (1)
- family Paenibacillaceae 1 (1)
- genus Paenibacillus (1)
- seqmatch\_seq [view selectable matches]



>Contig5\_INPA\_Ps020

```
CGGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTTGTAAACTCTCGTGGGGTGACGGGGGGGGTGTACAAAACCCGGGAACGTATTACCCG
CGGCATGCTGATCCCCGATTACTAACAAATCCCACCTTCATGCAGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCCAACTGAGACCGGCTTTT
CTAGGATTGGCTCCCCCTCCCGCTTCCCTTCCCGTTGTACCCGGCCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCAAGTCATAAAGGGCAT
GATGATTTGACGTCTCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTGCTTAGAGTGCCAGCTTGACCTGCTGGCAACTAA
GCATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCTCCTC
TGTCCCGAAGGAAAGGCCTATCTCTAGACCGGTCAGAGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGGTCTTCGCGTTGCTTCCAATTTAA
CCACATACTCCACTGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTAACCTCCCAAGCGGAATGCTTA
ATGTGTTAACTTCGGCACCAAGGGTATCGAAACCCCTAACACCTAGCATTTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATTTA
ATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGCCAGAGAGTCCGCTTCGCCACTGGTGTCTCCTCCACATC
TTTACGCATTTACCGCTACACGGGAATTCACCTCTTTTTTTGCACTCAAGCTCCCAAGTTCCAGTGCAGCCGGAAGTGG
AGCCTCGGGATTAACACAGACTAAAAGAGCCGCTGCGCGCGCTTTACGCCAATAA
```

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Paenibacillus jamilae strain NBI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1520	1520	100%	0.0	97%	<a href="#">JX498909.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa strain JK-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1509	1509	100%	0.0	97%	<a href="#">JQ283973.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 26 -qb	1509	1509	100%	0.0	97%	<a href="#">HE981791.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 25	1509	1509	100%	0.0	97%	<a href="#">HE981790.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 24	1509	1509	100%	0.0	97%	<a href="#">HE981789.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 20	1509	1509	100%	0.0	97%	<a href="#">HE981785.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 6	1509	1509	100%	0.0	97%	<a href="#">HE981771.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 1	1509	1509	100%	0.0	97%	<a href="#">HE981766.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa M1 main chromosome, complete genome	1509	20989	100%	0.0	97%	<a href="#">HE577054.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa SC2, complete genome	1509	20982	100%	0.0	97%	<a href="#">CP002213.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus sp. RA4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1509	1509	100%	0.0	97%	<a href="#">GU979221.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus sp. S151 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1509	1509	100%	0.0	97%	<a href="#">GU328690.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa isolate TN102 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1509	1509	100%	0.0	97%	<a href="#">EU362612.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa isolate TN96 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1509	1509	100%	0.0	97%	<a href="#">EU362608.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus polymyxa strain 1203 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1506	1506	100%	0.0	97%	<a href="#">EU982510.1</a>
<input type="checkbox"/> Paenibacillus en. SSKSD13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1504	1504	100%	0.0	97%	<a href="#">KF751678.1</a>

SeqMatch :: Summary

[ new match | summary | help ]

Select All Match Hits to seqCART

Display depth:

Lineage (click node to return it to hierarchy view):

Hierarchy View:

- rootrank Root (1) (query sequences) [show printer friendly results](#) [download as text file](#) [options](#)
- domain Bacteria (1)
- phylum Firmicutes (1)
- class Bacilli (1)
- order Bacillales (1)
- family Paenibacillaceae 1 (1)
- genus Paenibacillus (1)
- seqmatch\_seq [view selectable matches]

>Contig6\_INPA\_Ps225

CTGGGCCCTTGGCGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTGTAAACTCTCGTGGGGTGACGGGCGGTGTGTACAAAACCCGGGAAC  
 GTATTACCGCGGCATGCTGATCCCCGATTACTAACAATCCCACCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCCACTGAG  
 ACCGGCTTTTCTAGGATTGGCTCCCCCTCCCGGCTTCCCTTCCCGTTGTACCGGCCATTGTAGTACGTGTGTAGCCAGGGCAT  
 AAGGGGCATGATGATTTGACGCTCTCCCCCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTGCTTAGAGTGCCAGCTTGACCTGCT  
 GGCAACTAAACATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC  
 CTGTCTCTCTGTCCCGAAGGAAAGGCCTATCTCTAGACCGGTCAGAGGGATGTCAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCT  
 TCCAATTAACACATACTCCACTGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAGTCTTTCGACCGTACTCCCCAGGC  
 GGAATGCTTAATGTGTTAACTTCGGCACCAAGGGTATCGAAACCCCTAACACCTAGCATTTCATCGTTTACGGCGTGGACTACC  
 AGGGTATTTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGCCCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGT  
 CCTCCACATCTTTACGCATTTACCGCTACACGGGGAATTCCACTCTCTTTTTCTGCACTCAAGCTCCCCAGTTTCCAGTGCGA  
 CCCGAAGTTGAGCCTGGGGATTAACACCAGACTAAAAGAGCCGCTGCGCGCCTTTACGCCAAT

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi NCBI Blast:Contig6\_R020

View Favorites Tools Help

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus jamilae strain NBI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1537	1537	99%	0.0	98%	<a href="#">JX498909.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus polymyxa strain 1203 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1528	1528	100%	0.0	97%	<a href="#">EU982510.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus polymyxa strain JK-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">JQ283973.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 26 -qb</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">HE981791.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 25</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">HE981790.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 24</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">HE981789.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 20</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">HE981785.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 6</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">HE981771.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus polymyxa partial 16S rRNA gene, strain KCTC 3627, clone 1</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">HE981766.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. JCM 8037 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	1526	1526	100%	0.0	97%	<a href="#">AB689757.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus polymyxa M1 main chromosome, complete genome</a>	1526	21248	100%	0.0	97%	<a href="#">HE577054.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus polymyxa SC2, complete genome</a>	1526	21254	100%	0.0	97%	<a href="#">CP002213.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis strain 1JW11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1526	1526	100%	0.0	97%	<a href="#">GU991853.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. RA4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">GU979221.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. SI51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1526	1526	99%	0.0	97%	<a href="#">GU328690.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus polymyxa strain 1453-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1526	1526	100%	0.0	97%	<a href="#">EU982534.1</a>