

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE DOUTORADO**

**O MICROBIOMA DA FERMENTAÇÃO DO TABACO  
(*Nicotiana tabacum*) E O POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO  
DAS LEVEDURAS**

**DJALMA MOREIRA SANTANA FILHO**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
FEVEREIRO – 2018**

**O MICROBIOMA DA FERMENTAÇÃO DO TABACO  
(*Nicotiana tabacum*) E O POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO  
DAS LEVEDURAS**

**DJALMA MOREIRA SANTANA FILHO**

Engenheiro agrônomo

Universidade Federal da Bahia, 2006

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

**Orientador:** Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

**Coorientador:** Dr. Miroslav Svercel

**Coorientador:** Prof. Dr. Carlos Augusto Dorea Bragança

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**FEVEREIRO – 2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S232m

Santana Filho, Djalma Moreira.

O microbioma da fermentação do tabaco (*Nicotiana tabacum*) e o potencial biotecnológico das leveduras / Djalma Moreira Santana Filho.\_ Cruz das Almas, BA, 2018.

113f.; il.

Orientador: Jorge Teodoro de Souza.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Microbiologia – Tabaco. 2.Ecologia – Fumo.  
I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 579

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE DOUTORADO**

**O MICROBIOMA DA FERMENTAÇÃO DO TABACO  
(*Nicotiana tabacum*) E O POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO  
DAS LEVEDURAS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE  
DJALMA MOREIRA SANTANA FILHO**

Realizada em 23 de Fevereiro de 2018

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza  
Universidade Federal de Lavras - UFLA  
Examinador Interno (Orientador)

Prof. Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB  
Examinador Interno

Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio  
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC  
Examinador Externo

Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
Examinador Externo

Dr. Harllen Sandro Alves Silva  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
Examinador Externo

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Djalma Moreira Santana e Auristela da Silva Santana, por toda dedicação ao longo da minha vida.*

*A minha esposa, Thayane, pelo amor e companheirismo dedicados a mim todo esse tempo, a minha filha Lara, por ser ela o motivo da continuidade da minha formação.*

*Aos meus irmãos, Adriana, Aurenívia, e Diego, pelo apoio e carinho incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS pelo dom da vida, pela força, e por estar sempre presente comigo, iluminando meus passos e minha mente, dando-me sabedoria para que eu possa concluir mais esta etapa da minha vida.

A todos os meus familiares pelo carinho e paciência, e por entender as ausências em momentos importantes da nossa família.

A todos os meus amigos, pela força, carinho, e pelos incentivos na ampliação dos meus conhecimentos. Sou eternamente grato a vocês.

Ao Dr. Jorge Teodoro de Souza, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação, pela confiança, amizade e conselhos, compartilhando seus conhecimentos, contribuindo para minha formação profissional.

Ao Dr. Carlos Augusto Dórea, Dr. Phellippe Marbach, Dr. Carlos Alfredo Lopes, Dra. Márcia Luciana Cazetta pela amizade, paciência, incentivo e por estarem sempre dispostos a ajudar, por todos os ensinamentos e contribuições indispensáveis.

Ao Dr. Miroslav Svercel, pela participação e dicas essenciais à realização do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da UFRB, pela oportunidade de realização do curso.

À técnica de laboratório da Clínica Fitossanitária da UFRB, Carolina Yamamoto, à colega Patrícia e às estagiárias Darlene, Soraya, Carol e Kellen, pelas contribuições na execução dos experimentos.

À empresa Danco Indústria e Comercio de Fumo LTDA, na figura do seu diretor geral, senhor Félix Boher, do gerente de fermentação, senhor Ângelo e do encarregado João Carlos, pelo financiamento da pesquisa e ajuda na fase amostral do projeto.

A FAPESB, pela concessão da bolsa durante o período do curso.

Aos colegas do curso, pelo convívio e amizade.

A todos aqueles que de alguma forma ajudaram na realização desse trabalho.

# O MICROBIOMA DA FERMENTAÇÃO DO TABACO (*Nicotiana tabacum*) E O POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS LEVEDURAS

Autor: Djalma Moreira Santana Filho

Orientador: Dr. Jorge Teodoro de Souza

**RESUMO:** As fermentações são mundialmente utilizadas para melhorar características como a qualidade, sabor e vida de prateleira de produtos industrializados, alimentos e bebidas. Estudos de ecologia, diversidade e dinâmica de populações são importantes para a obtenção de informações sobre a estrutura das comunidades microbianas presentes nesses biosistemas e seu potencial para aplicações biotecnológicas. O objetivo desse trabalho foi caracterizar a comunidade microbiana da fermentação do fumo variedade Mata Fina no Recôncavo da Bahia. No primeiro capítulo desse trabalho foi realizado o estudo das populações de bactérias presentes no processamento do fumo por meio do pirosequenciamento de amostras retiradas de diferentes ciclos das pilhas de fermentação. Esse estudo demonstrou que os filos Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes foram os mais numerosos nas pilhas de fermentação. O gênero *Staphylococcus* foi mais abundante durante todo o processo de fermentação da variedade Mata Fina. No segundo capítulo foram feitos estudos por meio de técnicas de cultivo, revelando que as bactérias são mais numerosas que os fungos e que as densidades populacionais de microrganismos decrescem com o progresso dos ciclos fermentativos. Foram encontradas poucas correlações significativas entre as densidades populacionais e as variáveis físico-químicas, demonstrando como o processo fermentativo varia entre as pilhas de fermentação. No terceiro capítulo foi realizada uma investigação preliminar do potencial de leveduras isoladas do processo fermentativo do fumo para a aplicações biotecnológicas. Alguns isolados apresentaram potencial para a produção de enzimas de interesse industrial e para o controle biológico do patógeno causador da antracnose do mamão. Esse foi o primeiro estudo científico para a caracterização físico-química e microbiológica da fermentação do fumo Mata Fina.

**Palavras-chave:** Tabaco, sequenciamento de próxima geração, 16S, biotecnologia.

## **MICROBIOME OF TOBACCO (*Nicotiana tabacum*) FERMENTATION AND THE BIOTECHNOLOGICAL POTENCIAL OF SELECTED YEAST**

Author: Djalma Moreira Santana Filho

Advisor: Dr. Jorge Teodoro de Souza

**ABSTRACT:** Fermentations are widely used to improve the quality, flavor and shelf life of industrialized products, foods and beverages. Studies on the ecology, diversity and population dynamics are important to obtain information about the structure of the microbial populations present in these biosystems and their potential biotechnological applications. The objective of this study was to characterize the microbial communities of the tobacco variety Mata Fina in the Recôncavo region of Bahia. In the first chapter of this work a study of the bacterial populations present in the tobacco fermentation was performed by pyrosequencing samples from different cycles of the fermentation piles. This study revealed that the phyla Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes were the most numerous in all fermentation piles. The genus *Staphylococcus* was the most abundant during the whole fermentation of the Mata Fina variety. In the second chapter studies with cultivation techniques were done and revealed that bacteria are more numerous than fungal populations and these microbial populations decrease with the progress of the fermentation cycles. There were few significant correlations between population densities and the physico-chemical variables measured, demonstrating how variable the fermentative process is among the different piles. In the third chapter a preliminary investigation of the potential biotechnological applications of yeasts isolated from the fermentation was performed. Some isolates showed potential to be used in the production of enzymes of industrial interest and some for the biocontrol of the pathogen of papaya anthracnosis. This is the first scientific study on the physico-chemical and microbiological characterization of the fermentation process employed in the Mata Fina tobacco.

**Keywords:** Tobacco, next generation sequencing, 16S, biotechnology.

## SUMÁRIO

	Página
REFERENCIAL TEÓRICO .....	9
ARTIGO 1	
DYNAMICS OF THE BACTERIAL MICROBIOME OF TOBACCO LEAVES UNDER NATURAL FERMENTATION .....	30
ARTIGO 2	
DENSIDADES POPULACIONAIS DE MICRORGANISMOS CULTIVADOS DA FERMENTAÇÃO DO TABACO ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) .....	72
ARTIGO 3	
POTENCIAIS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE FUNGOS ISOLADOS DA FERMENTAÇÃO DO TABACO ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) .....	96
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	113

## REFERENCIAL TEÓRICO

O processamento de produtos agrícolas por fermentação é muito comum no mundo. O Brasil se destaca com vários tipos de processos fermentativos, tanto em pequena quanto em larga escala. Um desses processos é a fermentação em pilhas das folhas do fumo da variedade Mata Fina (Tobacco Brazil Bahia), utilizada para adequar a níveis desejáveis o teor de nitrosaminas das folhas, e melhorar o flavor dos charutos produzidos. O fermentado é utilizado para o enchimento dos charutos, também conhecido como “filler”.

A fermentação do tabaco a ser avaliada é um processo realizado de forma natural na empresa Danco Indústria e Comércio de Fumo Ltda. Nesse processo, amontoam-se folhas de fumo compradas de pequenos produtores das regiões circunvizinhas à cidade, após a secagem na propriedade. As pilhas de fumo são formadas inicialmente com 6.000 kg, e durante o processo são unificadas em pilhas de 18.000 kg de folhas. Todo o conhecimento aplicado ao processo é empírico, não havendo informações científicas sobre as diversas variáveis físico-químicas envolvidas ou sobre a população microbiana atuante. Do ponto de vista científico é uma excelente oportunidade para entender a estrutura e a dinâmica das populações microbianas envolvidas na fermentação, pois trata-se de um sistema ainda não investigado anteriormente com essa variedade.

Estudos de diversidade, dinâmica populacional e de potencialidades dos microrganismos para diferentes aplicações biotecnológicas são importantes para responder questões tais como: quais grupos de microrganismos estão presentes na fermentação do fumo? O que acontece com as populações de fungos e bactérias ao longo dos ciclos fermentativos? Quais fatores interferem na dinâmica das populações? Os microrganismos presentes nesse processo podem ser aplicados em estudos de produção de pigmentos, enzimas, biocontrole, dentre outras áreas da biotecnologia?

O presente trabalho trata-se de um estudo de dinâmica populacional, uma área da ecologia que quantifica as alterações que ocorrem em populações de seres vivos em função do espaço e do tempo (ODUM, 1988).

Em microbiologia, estão sendo realizadas pesquisas sobre contaminantes do solo e de rios em áreas de exploração dos recursos naturais e em ambientes agrícolas através de métodos com e sem cultivo dos microrganismos. Esses resultados podem

ser utilizados para comparar a estrutura microbiana de ambientes equilibrados com outros que apresentem algum distúrbio.

Esse trabalho teve como objetivo principal obter informações para entender a estrutura da comunidade microbiana da fermentação de folhas do tabaco da variedade Mata Fina, realizado pela empresa Danco Indústria e Comércio de Fumo Ltda na cidade de Cruz das Almas-BA.

No primeiro capítulo buscou-se responder as questões inerentes à dinâmica populacional e diversidade microbiana por meio do pirosequenciamento. Esse é um tipo de sequenciamento de próxima geração, aplicado na identificação e quantificação de microrganismos sem a necessidade de cultivo. Esses dados foram correlacionados com dados mensurados de pH, umidade das folhas, umidade relativa e temperatura do ar ao redor das pilhas, temperatura no interior e temperatura global, teor de oxigênio, gás carbônico, metano e amônia no interior das pilhas para verificar a existência de relações de dependência entre o número de “reads” e essas variáveis. O objetivo foi verificar a hipótese de que há grande diversidade na população bacteriana presente na fermentação em pilhas do fumo, da variedade Mata Fina, e que essa população pode variar em função do pH, da umidade, dos componentes da atmosfera gasosa e da temperatura.

O segundo capítulo refere-se a estudos de dinâmica populacional (densidade populacional) de microrganismos obtidos por meio de técnicas de cultivo. Nesse caso, foi verificada a existência de correlação entre a variável resposta utilizada, a saber: unidades formadoras de colônias, obtida por contagens ao longo dos ciclos e as variáveis mensuradas citadas na descrição do primeiro capítulo. O objetivo foi verificar a hipótese de que a população de bactérias e de fungos presente na fermentação sofre a influência de vários fatores e quais variações podem ser detectadas com técnicas de cultivo.

Por fim, no terceiro capítulo, foram realizados testes de produção de enzimas e controle biológico do agente causador da antracnose do mamoeiro, objetivando encontrar aplicações biotecnológicas para os microrganismos atuantes nesse processo. A hipótese é de que esses microrganismos podem apresentar aplicações de interesse biotecnológico.

## **Fermentações: importância, tipos e diversidade dos microbiomas**

Entende-se por fermentação um processo complexo que envolve espécies de microrganismos que estabelecem ambientes determinantes para a sua sobrevivência e para a sucessão microbiana. A exploração do seu potencial biotecnológico é importante para a indústria, o que explica o volume de trabalhos para a obtenção de modelos mais eficazes na fabricação de uma série de produtos (SINGHANIA et al., 2009). As produções de enzimas por microrganismos benéficos, por exemplo, tornam os alimentos mais ricos, fáceis de preservar e com menor risco de contaminação (STEINKRAUS, 2002).

Os principais microrganismos atuantes nos diversos tipos de fermentação são classificados como bactérias ácido-láticas, bactérias ácido-acéticas e fungos leveduriformes. Em alguns casos, essas denominações são oriundas do tipo de fermentação a qual cada microrganismo está associado, bem como, alguns tipos de fermentações, recebem nomes em função dos principais componentes da mistura de substâncias resultantes do processo. Algumas espécies presentes nas fermentações ácido-láticas resistem ao ambiente inóspito devido à alta produção desse ácido, se sobressaindo e apresentando-se em maior quantidade. A exemplo da fermentação do chucrute, cuja principal espécie presente no fermentado difere daquela presente na fermentação da maioria dos vegetais (Tabela 1) (ESTEBAN-TORRES et al., 2015; TAMANG et al., 2016).

Na fermentação de azeitonas *Zygorulasporea mrakii* apresentou-se com frequência de 59,6%, segundo Alves et al. (2012). A fermentação ácido-lática do apresenta microbioma caracterizado pela presença de outras espécies, com predomínio de fungos leveduriformes, diferente dos vegetais cujas bactérias perfazem a maioria dos indivíduos encontrados (ALONSO et al., 2014). Há presença marcante de bactérias do gênero *Bacillus* nas fermentações ácido-láticas de vegetais, entretanto, na grande maioria desses processos, ocorre grande diversidade de microrganismos.

O cacau, por exemplo, apresenta microbiota complexa e variável, com grande diversidade de leveduras, mas de acordo com estudos de dinâmica populacional e diversidade microbiana em fermentações realizadas em regiões da Ásia, África e Brasil, o predomínio é exercido pelas mesmas espécies nos diferentes continentes, demonstrando sucessão microbiana semelhante em todos os casos (MEERSMAN et al., 2013; CAMU et al., 2007).

Ho et al. (2015) observaram bactérias ácido-láticas na fermentação do cacau, mesmo com a utilização de antibióticos inibidores, obtendo-se um produto final semelhante à fermentação sem inibidor. A presença de *Archaea* também já foi registrada na fermentação em batelada, como é conhecido o processo realizado para obtenção do biogás de vegetais (HANREICHA et al., 2013).

A produção de vinagre é uma fermentação acética, onde as bactérias são os principais microrganismos envolvidos, entretanto as leveduras desempenham papel importante na sucessão microbiana. Bactérias dependem das leveduras para produzir substâncias de fácil oxidação. Sem a presença dos fungos e das bactérias não seria possível obter esse produto (TAMANG et al., 2016).

A fermentação alcoólica é uma das mais conhecidas do mundo, por meio da qual se obtém bebidas alcoólicas e pão. Mesmo com a grande diversidade de microrganismos, as leveduras são os mais importantes desse processo. Além dos fungos leveduriformes, bactérias ácido-láticas também desempenham papel importante na fermentação (STEINKRAUS, 2002).

Os fungos filamentosos aparecem com maior frequência em fermentações de folhas e sementes, como o café. Mesmo com a predominância de fungos, bactérias, principalmente do gênero *Bacillus*, aparecem discretamente nesse tipo de fermentação (CHEN et al., 2010; JAYABALAN et al., 2014; STEINKRAUS, 2002; TAMANG et al., 2016; XU et al., 2015). A presença de espécies do gênero *Bacillus* associadas a fungos, principalmente das espécies *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *B. pumilus*, caracterizam essas fermentações como alcalinas. Elas são responsáveis pela hidrólise de proteínas em aminoácidos e peptídeos, com consequente liberação de amônia, o que aumenta a alcalinidade e torna o substrato inadequado para o crescimento de organismos deterioradores. A fermentação alcalina é muito comum na África para produzir uma variedade de condimentos, e alimentos proteicos a partir da fermentação de sementes (STEINKRAUS, 2002; PEREIRA et al., 2012).

Os estudos dos diversos tipos de fermentação levaram a utilização dos principais microrganismos encontrados como iniciadores em processos controlados (Tabela 2). Os fungos leveduriformes são os mais utilizados para compor as misturas aplicadas na fermentação como tentativa de torná-la mais eficaz, devido à capacidade dos fungos de decompor a matéria prima e tornar o ambiente propício à chegada e atuação das bactérias em alguns casos (TAMANG et al., 2016). Essa técnica é muito comum na fermentação alcoólica para produção de etanol, normalmente utilizando

*Saccharomyces cerevisiae* (LANGE et al., 2014; STEINKRAUS, 2002; JUTAKANOKKE et al., 2012). A fermentação do café, apesar de pouco estudada, também foi alvo de estudos com culturas iniciadoras da fermentação, obtendo-se como resultado o aumento da atividade de quebra da pectina (PEREIRA et al., 2016). Maldonado-Robledo et al. (2003) obtiveram melhor sabor e aroma de charutos fabricados de folhas do fumo sujeitas a atuação de microrganismos pré-selecionados e inoculados durante a fermentação.

Conhecer a diversidade e os fatores que alteram a composição da comunidade microbiana ao longo do tempo em sistemas biológicos, como as fermentações, é importante para nortear trabalhos de melhorias dos diferentes processos.

Tabela 1: Principais tipos de fermentação, matéria-prima, gêneros e espécies presentes nos diversos processos.

Fermentação	Matéria prima	Gêneros	Principais espécies	Referência
Ácido-lática	Vegetais	<i>Lactobacillus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Pediococcus</i> <i>Streptococcus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> (Vegetais); <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (chucrute); <i>Zygorulaspora mrakii</i> (azeitonas)	Esteban-Torres et al., 2015 Tamang et al., 2016 Alves et al. 2012
	Cacau	<i>Saccharomyces</i> <i>Hanseniaspora</i> <i>Pichia</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Acetobacter pasteurianus</i>	Meersman et al., 2013 Camu et al., 2007
	Leite	<i>Lactococcus</i> , <i>Brevibacterium</i> <i>Propionibacter</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Geotrichum</i> <i>Penicillium</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alonso et al., 2014
Ácido-acética	Vinagre	<i>Acetobacter</i> <i>Saccharomyces</i>	<i>Acetobacter acetic</i> , <i>Acetobacter xylinum</i> , <i>Acetobacter ascendens</i> , <i>Saccharomyces ellipsoideus</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tamang et al., 2016
Alcalina	Folhas e sementes	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Rhizopus</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Bacillus</i>	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>Saccharomyces spp</i> , <i>Bacillus spp</i>	Chen et al., 2010 Jayabalan et al., 2014 Steinkraus, 2002 Tamang et al., 2016 Xu et al., 2015
	Café	<i>Pichia</i>	<i>Pichia guilliermondii</i> , <i>Pichia fermentans</i>	Pereira et al., 2012

### **Dinâmica populacional microbiana de fermentações**

O mundo microbiano é um sistema naturalmente complexo e difícil de ser estudado. Os fatores ambientais e o crescimento da própria população interferem na sua diversidade e dinâmica, em diferentes comunidades de microrganismos. Essa dificuldade leva a estudos dessa ordem de forma compartimentalizada, tratando o ecossistema de forma mais simples, e portanto, não integrando fatores para verificar o seu efeito conjunto na população. Por outro lado, investigações envolvendo todas as variáveis de uma comunidade microbiana são de difícil execução e interpretação dos dados. Observar o efeito de variáveis em conjunto sobre um sistema microbiológico dinâmico, e encontrar explicações biológicas, pode ser uma tarefa muito difícil se realizada pelos modelos convencionais de pesquisa (HOSODA et al., 2016). Em alguns trabalhos é possível, utilizando modelos matemáticos, encontrar alguma explicação biológica para o complexo ambiente microbiano (Tabela 3).

É válido ressaltar que estudos de dinâmica populacional de bactérias e fungos são de difícil execução, entretanto bem mais simples que aqueles onde os vírus são o objeto de estudo. A sua ocorrência restrita ao hospedeiro dificulta a obtenção de dados preditivos, sendo necessários estudos de características da relação vírus-hospedeiro para entender o sistema (WILMES et al. 2009).

Existem vários fatores bióticos e abióticos que interferem na dinâmica de uma população de microrganismos. O pH é considerado um fator importante na seleção de microrganismos do ambiente e geralmente é observado em trabalhos envolvendo microrganismos de solo. Na literatura existem estudos de correlação entre essa variável e a população de bactérias em húmus e argila (KADEN et al., 2012), e o decréscimo na população de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em solos antes e depois da aplicação de controle (HUANG et al., 2015).

Outras variáveis físico-químicas também estão sendo utilizadas para estudos de correlação com resultados quantitativos da comunidade microbiana, tais como temperatura e limites de água livre em células (AGUIRRE E KOUTSOUMANIS, 2016), efeito do dióxido de carbono na resiliência de solos (McFARLAND et al., 2013), dentre outros. Dados de estudos de densidade populacional *in vitro* podem perfeitamente ser utilizados para observação de correlações entre as populações de microrganismos e o fator desejado (ZHANG et al., 2015).

Tabela 2: Espécies de iniciadores utilizados em fermentações.

<b>Matéria prima</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Referências</b>
Cacau	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Acetobacter aceti</i>	Sandhya et al., 2016
Cacau	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Acetobacter tropicalis</i>	Pereira et al., 2012
Cacau	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> e <i>Candida</i> <i>ethanolica</i>	Visintin et al., 2016
Cana-de-açúcar	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Steinkraus, 2002 Lange et al., 2014 Jutakanoke et al., 2012
Café	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Pichia</i> <i>guilliermondii</i> e <i>Pichia fermentans</i>	Pereira et al., 2016
Fumo	<i>Bacillus sp.</i> e <i>Geotricum sp.</i>	Maldonado-Robledo et al. 2003

Tabela 3: Trabalhos envolvendo modelos matemáticos de estudo de populações microbianas em ambientes complexos.

<b>Objeto de estudo</b>	<b>Referência</b>
Populações de nematoides entomopatogênicos utilizados no controle biológico de pragas	Wang e Chen, 2009
Ação microbiana na transformação de nitrogênio no solo	Poluektov, 2011
Sobre o comportamento dinâmico de cadeias alimentares microbianas autônomas	Kooi et al. 1997

## Métodos utilizados no estudo das fermentações de fumo

A utilização de ferramentas moleculares em estudos de dinâmica populacional microbiana vem se tornando mais frequente a cada dia, e seus avanços tem acelerado a obtenção de resultados, a custos cada vez menores, nas diversas áreas de estudo de microrganismos (MARGULIES et al., 2005; ROESCH et al., 2007; MALIK et al., 2008; KÖCHLING et al., 2011; LEMOS et al., 2011). Essas técnicas vêm possibilitando resultados interessantes, tornando-as viáveis em testes de qualidade de produtos (BOKULICH et al., 2012), produção de enzimas em ambientes peculiares (DI MAIUTA et al., 2013), ou em avaliações do potencial de impacto ambiental em áreas contaminadas (YERGEAU et al., 2012). Os avanços recentes em tecnologias de sequenciamento de bases de alto rendimento permitirão estudar de forma mais profunda essas populações em um curto período de tempo (DOUD et al., 2009; RAVIN, 2010). A aplicação dessas técnicas, bem como técnicas mais antigas, em estudos de dinâmica populacional da comunidade bacteriana presente em fermentações de fumo são resumidas na tabela abaixo (Tabela 4).

Os estudos de diversidade e dinâmica populacional de processos fermentativos geralmente culminam em novidades taxonômicas à comunidade científica. Isso ocorreu no trabalho de Collins et al. (1999) cujos estudos filogenéticos propiciaram a descoberta da espécie *Facklamia tabacinasalis* sp. nov. no tabaco triturado, conhecido vulgarmente como rapé.

Segundo alguns trabalhos com fumo, o processamento ou simples armazenamento do mesmo reduz o quantitativo de microrganismos e, conseqüentemente a diversidade, tanto para bactérias como para fungos. Em pesquisas sobre densidade populacional conduzidos por Di Giacomo et al. (2007) verificou-se que a população de bactérias diminuiu ao longo da fermentação do tabaco Toscano. Vigliota et al. (2007) constataram que o mesmo ocorre quando se utiliza a levedura *Debariomyces hansenii* como iniciadora da fermentação dessa variedade de tabaco. Informações obtidas por meio da densidade populacional obtida pela contagem de unidades formadoras de colônias, por Qiu et al. (2003), verificou-se que há uma redução no número de microrganismos do fumo fermentado artificialmente, em relação ao controle composto pelo fumo não fermentado (Figura 1).

Tabela 4: Principais trabalhos, métodos utilizados e principais descobertas na área de diversidade e dinâmica populacional de microrganismos na fermentação do fumo.

Objeto de estudo	Métodos utilizados	Principais descobertas	Referência
Fumo Toscano	Densidade populacional DGGE SSCP	Redução da população de bactérias aeróbicas dos estágios iniciais da fermentação para os finais. Presença de <i>Aerococcus viridans</i> , <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> , <i>Weissella</i> spp.	Di Giacomo et al. (2007)
Fumo	RT-PCR	Predominância de <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>B. licheniformis</i> e <i>Aerococcus viridans</i>	VIGLIOTTA et al., 2007
Fumo	Atividade enzimática e análise dos componentes químicos principais	92% dos microrganismos presentes nas folhas de fumo fermentado artificialmente são bactérias	QIU et al., 2003
Fumo	Genômica	Principais gêneros são <i>Sphingomonas</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Pantoea</i> e <i>Pseudomonas</i>	Su et al., 2011
Fumo (rapé)	Filogenia	<i>Facklamia tabacinasalis</i> sp. nov.	Collins et al., 1999
Fumo Zhongyan 100 NC89 Zhongyan 101	PCR-DGGE	Baixa similaridade entre as espécies das diferentes variedades	Zhao et al., 2007
Fumo K326	RFLP	<i>Bacillus</i> spp. e <i>Pseudomonas</i> spp. foram os gêneros dominantes	Huang et al. 2010
Fumo Zimbabwe	Filogenia; Sequenciamento sem cultivo	Alta diversidade bacteriana	Su et al. (2012)

As pesquisas de Huang et al. (2010), utilizando a técnica de RFLP, mostraram que o quantitativo de bactérias é maior no fumo não curado em relação ao fumo curado.

Zhao et al. (2007) observaram baixa similaridade na estrutura da comunidade bacteriana ao analisarem folhas de fumo envelhecido e curado, através da tecnologia

de PCR-DGGE, empregando o método para identificar organismos não cultivados diretamente de folhas de fumo das variedades Zhongyan 100, NC89 e Zhongyan 101. A diversidade bacteriana do fumo da variedade K326 curado em galpões aquecidos foi estudada por Huang et al. (2010) e mostrou, pela técnica de RFLP, que o processo reduz o número de unidades taxonômicas operacionais em relação às folhas que não passaram por esse processamento, e revelou baixa diversidade quando são levados em consideração apenas os principais filos (Figura 2).

No estudo de filogenia da comunidade bacteriana com o tabaco Zimbabwe, Su et al. (2012) identificaram um grande número de unidades taxonômicas operacionais, incluindo não-cultiváveis, mostrando assim a diversidade bacteriana desse biossistema.

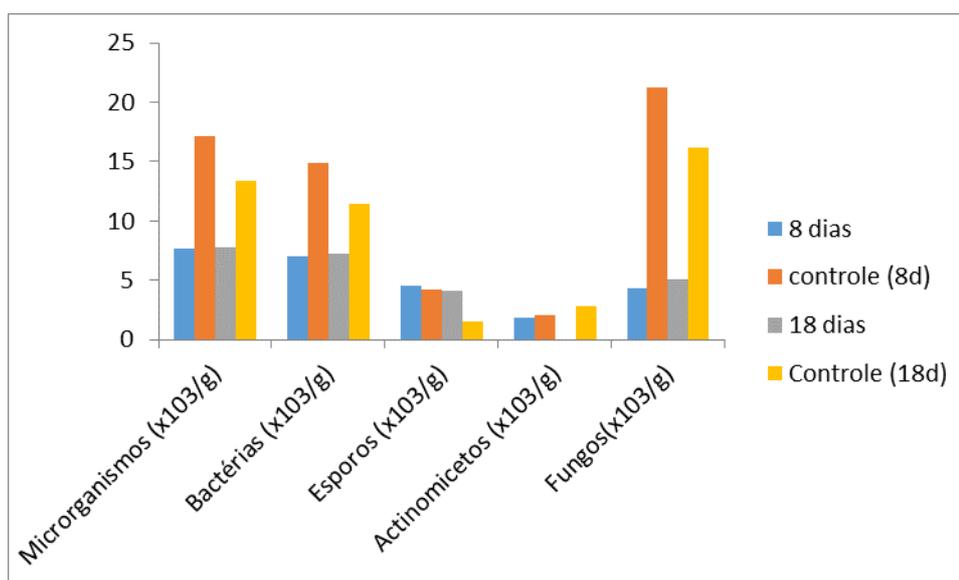


Figura 1: Unidades formadoras de colônias de microrganismos totais, bactérias, esporos, actinomicetos e fungos em fumo fermentado (8 e 18 dias) e não fermentado (controles). Adaptado de Qui et al. (2004).

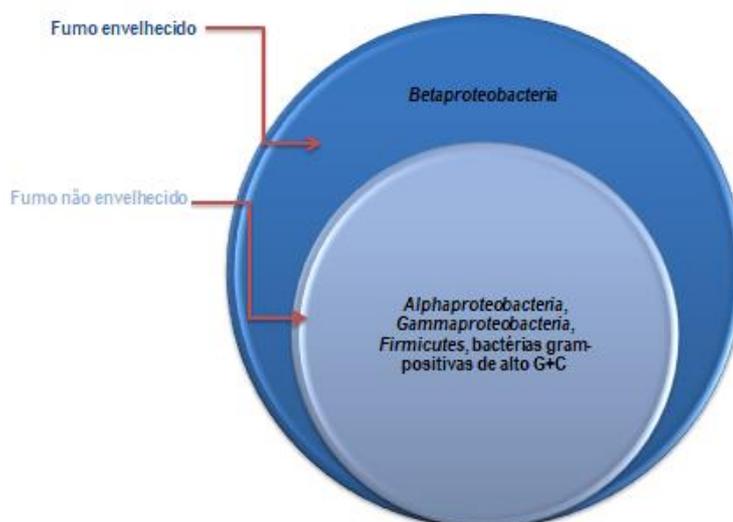


Figura 2: Principais filamentos presentes no fumo curado e não curado. Adaptado de Su et al. (2012).

Os métodos de sequenciamento de próxima geração (NGS) ainda não foram aplicados na fermentação do fumo. Por outro lado, o pirosequenciamento já foi utilizado para estudos de diversidade em solos (ROESCH et al., 2007), em biorreatores anaeróbicos (MA et al., 2013), e ainda em estudos de dinâmica populacional de microrganismos produtores de enzimas celulolíticas em fezes de peixes bagre (DI MAIUTA et al., 2013).

As vantagens dessa técnica em relação a outras abordagens de NGS é a obtenção de sequências de maior comprimento de leitura (LIU et al., 2012). Por outro lado, é difícil encontrar ferramentas adequadas para a montagem da grande quantidade de fragmentos de sequências de DNA gerados. As duas principais tecnologias de montagem são os grafos de De Bruijn e a estratégia de Overlap-Layout-Consensus (OLC).

Por isso, buscou-se como principal objetivo estudar a diversidade e dinâmica populacional com a técnica de pirosequenciamento, a primeira técnica de sequenciamento massivo utilizada, o primeiro NGS de sucesso segundo Loman et al., (2012). Espera-se que sua aplicação proporcione mais detalhes sobre a composição e dinâmica da comunidade microbiana do fumo do que as técnicas de DGGE, T-RFLP,

e clonagem de bibliotecas de genes 16S rRNA. Mesmo com as taxas de erro, esses métodos de sequenciamento podem levar a identificação de filotipos raros.

Outro ponto importante desse estudo é verificar a possibilidade de aplicação desses microrganismos para outros fins biotecnológicos, tais como a produção de enzimas, a decomposição de materiais indesejados e o controle biológico de patógenos que atacam frutos pós-colheita.

### **Considerações finais**

O uso de técnicas de identificação molecular tem incrementado o conhecimento sobre diversidade de microrganismos em diversos trabalhos. Os avanços nas tecnologias de estudo do DNA, com as ferramentas de sequenciamento de próxima geração tem ajudado a acessar a estrutura da comunidade microbiana em diferentes ambientes.

A variedade de processos fermentativos existentes, aliada à diversidade microbiana associada à alteração da matéria prima para obtenção dos produtos desejados, tornam esses sistemas excelentes oportunidades para estudos científicos sobre estruturas das comunidades microbianas, diversidade de espécies, dinâmica populacional microbiana e obtenção de microrganismos aplicáveis à biotecnologia. O conhecimento da estrutura dessa comunidade é de extrema importância, pois os microrganismos são os principais responsáveis pelos mais diversos processos biogeoquímicos do planeta, atuando na decomposição e produção de uma série de substâncias químicas, e participando ativa ou passivamente de uma série de reações. Assim, é perceptível que há a necessidade do desenvolvimento de ferramentas moleculares adequadas ao estudo dos microrganismos.

Não existem relatos da utilização de sequenciamento de próxima geração em estudos populacionais de microrganismos fermentadores do fumo. Além disso, a fermentação do tabaco da variedade Mata Fina (filler) em pilhas nunca teve sua comunidade explorada por estudos científicos. Aliar métodos tradicionais de pesquisas microbiológicas com as novas tecnologias parece ser o melhor caminho para alcançar uma fermentação de alto nível.

Por isso, buscou-se, com esse trabalho, definir o perfil dos microrganismos atuantes na fermentação do fumo da variedade Mata Fina, investigando a estrutura e

dinâmica dos microrganismos por meio de técnicas de estudo de microrganismos cultivados e não cultivados.

## Referências Bibliográficas

AGUIRRE, J.S.; KOUTSOUMANIS, K.P. Towards lag phase of microbial populations at growth-limiting conditions: The role of the variability in the growth limits of individual cells. **International Journal of Food Microbiology** v.224, p.1–6, 2016.

ALONSO, S.; HERRERO, M.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Physiological heterogeneity in *Lactobacillus casei* fermentations on residual yoghurt whey. **Process Biochemistry**, v.49, p.732–739, 2014. Doi: 10.1016/j.procbio.2014.01.033.

ALVES, M.; GONÇALVES, T.; QUINTAS, C. Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives' fermentations. **Food Control**, v.23, p.363–368, 2012. Doi: 10.1016/j.foodcont.2011.07.033

BOKULICH, N.A. et al. Next-generation sequencing reveals significant bacterial diversity of botrytized wine. **Plos one**, v.7, p.1-10, 2012. Doi: 10.1371/journal.pone.0036357.

CAMU, N. et al. Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana. **Applied And Environmental Microbiology**, v.73, n.6, p.1809–1824, 2007.

CHEN, Y.; LIU, B.; CHANG, Y. Bioactivities and sensory evaluation of Pu-erh teas made from three tea leaves in an improved pile fermentation process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.109, p.557–563, 2010. Doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.11.004

COLLINS, M.D; HUTSON, R.A.; FAKEN, E.; SJODEN, B. *Facklamia tabacinasalis* sp. nov., from powdered tobacco. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.1247-1250, 1999.

DI GIACOMO , M. et al. Microbial Community Structure and Dynamics of Dark Fire-Cured Tobacco Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.3, p. 825–837, 2007. Doi: 10.1128/AEM.02378-06.

DI MAIUTA, N. et al Microbial population dynamics in the faeces of wood-eating loricariid catfishes. **Letters in applied microbiology**, v.56, p.401-407, 2013. Doi: 10.1111/lam.12061.

DOUD, M. et al. Approaches to analyse dynamic microbial communities such as those seen in cystic fibrosis lung. **Human Genomics**, v.3, p.246–256, 2009.

ESTEBAN-TORRES, M.; MANCHENO, J.M.; LAS RIVAS,B.; MUNOZ, R. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. **LWT - Food Science and Technology**, v.60, p.246-252, 2015. Doi: 10.1016/j.lwt.2014.05.063.

HANREICHA, A. et al. Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation. **Systematic and Applied Microbiology**, v.36, p.330–338, 2013. Doi: 10.1016/j.syapm.2013.03.006.

HO, V.T.T.; ZHAO, J.; FLEET, G. The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.205, p.54-67, 2015. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.031.

HOSODA, S. et al. Population–reaction model and microbial experimental ecosystems for understanding hierarchical dynamics of ecosystem. **BioSystems**, v.140, p.28–34, 2016. Doi: 10.1016/j.biosystems.2015.12.005.

HUANG, J. et al. Bacterial diversities on unaged and aging flue-cured tobacco leaves estimated by 16S rRNA sequence analysis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 88, p.553–562, 2010. Doi: 10.1007/s00253-010-2763-4.

HUANG, X. et al. Illumina MiSeq investigations on the changes of microbial community in the *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* infected soil during and after reductive soil disinfestation. **Microbiological Research**, v.181, p.33–42, 2015. Doi: 10.1016/j.micres.2015.08.004.

JAYABALAN, R. et al. A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.13, p.538-550, 2014.

JUTAKANOKI, R. et al. Sugarcane leaves: Pre-treatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and bioenergy**, v.39, p.283-289, 2012.

KADEN, R. et al. The dynamic cultivation system: a new method for the detection of temporal shifts in microbial community structure in clay. **Applied Clay Science**, v.65–66, p.53–56, 2012. Doi: 10.1016/j.clay.2012.06.009.

KÖCHLING T. et al. Microbial community composition of anoxic marine sediments in the Bay of Cádiz (Spain). **International Microbiology**, v.14, p.143-154, 2011.

KOOI, B.W.; BOER, M.P.; KOOIJMAN, S.A.L.M. Complex dynamic behaviour of autonomous microbial food chains. **Journal of Mathematical Biology**, v.36, p.24-40, 1997.

LANGE, J.N. et al. Implantation and persistence of yeast inoculum in Pinot noir fermentations at three Canadian wineries. **International Journal of Food Microbiology**, v.180, p.56–61, 2014. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.003.

LEMOS, L. N.; FULTHORPE, R. R.; TRIPLETT, E. W.; ROESCH, L. F.. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. **Journal of microbiological methods**, v.86, p.42–51, 2011. Doi: 10.1016/j.mimet.2011.03.014.

LIU, L. et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. **Journal of biomedicine and biotechnology**, p.1-12, 2012. Doi: 10.1155/2012/251364.

LOMAN, N.J. et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. **Nature biotechnology**, v.30, p.434-562, 2012. Doi: 10.1038/nbt.2198.

MA, J. et al. Microbial communities in an anaerobic dynamic membrane bioreactor (AnDMBR) for municipal wastewater treatment: Comparison of bulk sludge and cake layer. **Process biochemistry**, v.48, p.510–516, 2013. Doi: 10.1016/j.procbio.2013.02.003.

MALDONADO-ROBLEDO, G.; RODRIGUEZ-BUSTAMANTE, E.; SANCHEZ-CONTRERAS, A.; RODRIGUEZ-SANOJA, R.; SANCHEZ, S. Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.62, p484–488, 2003. Doi: 10.1007/s00253-003-1315-6.

MALIK, S., BEER, M., MEGHARAJ, M., NAIDU, R. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. **Environment International**, v. 34, p.265–276, 2008.

MARGULIES, M. et al. Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. **Nature**, v.437, p. 376–380, 2005. Doi: 10.1038/nature03959.

MCFARLAND J. W., WALDROP M.P. HOW M. Extreme CO<sub>2</sub> disturbance and the resilience of soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**, v.65, p.274-286p, 2013. Doi: 10.1016/j.soilbio.2013.04.019.

MEERSMAN, E. et al. Detailed analysis of the microbial population in malaysian spontaneous cocoa pulp fermentations reveals a core and variable microbiota. **PLOS ONE**, v.8, n.12, p.1-10, 2013. Doi: 10.1371/journal.pone.0081559.

ODUM, E.P. *Ecologia*. Rio de Janeiro: Gaunabara, 1988. 434p.

PEREIRA, G.V.M.; MIGUEL, M.G.C.P.; RAMOS, C.L.; SCHWAN, R.F. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p. 5395–5405, 2012.

PEREIRA, G.V.M.; SOCCOL, V.T.; SOCCOL, C.R. Current state of research on cocoa and coffee fermentations. **Current Opinion Food Science**, v.7, p.50-57, 2016. Doi: 10.1016/j.cofs.2015.11.001.

POLUEKTOV, R.A. Dynamics of microbial population in the framework of a model of nitrogen transformation in soil. **Russian Agricultural Sciences**, v.37, p.501–503, 2011. Doi: 10.3103/S1068367411060139.

QIU, L. et al. Changes in biological activity during artificial fermentation of flue-cured tobacco. **Tobacco Science**, v.40, p. 24-27, 2003. Doi: 10.3381/0082-4623-46.1.24.

RAVIN, N. V. Modern methods of genome sequencing and their application for deciphering genomes of microorganisms. **Applied biochemistry and microbiology**, v.46, p.663–670, 2010. Doi: 10.1134/S000368381007001X.

ROESCH, L.F.W. et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, v.1, p.283–290, 2007. Doi: 10.1038/ismej.2007.53.

SANDHYA, M.V.S. et al. Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, v.65, p.731-738, 2016. Doi: 10.1016/j.lwt.2015.09.002.

SINGHANIA, R.R; PATEL, A. K.; SOCCOLC, C. R.; PANDEYA, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, p.13–18, 2009. Doi:10.1016/j.bej.2008.10.019.

SU, C. et al. Diversity and phylogeny of bacteria on Zimbabwe tobacco leaves estimated by 16S rRNA sequence analysis. **Applied microbial and biotechnology**, v.92, p.1033–1044, 2011. Doi: 10.1007/s00253-011-3367-3.

TAMANG, J. P.; WATANABE, K.; HOLZAPFEL, W. H. Review: Diversity of Microorganisms in global fermented foods and beverages. **Frontiers in microbiology**, v.7, p.1-28, 2016. Doi: 10.3389/fmicb.2016.00377.

VIGLIOTTA, G. et al. Nitrite metabolism in *Debaryomyces hansenii* TOB-Y7, a yeast strain involved in tobacco fermentation. **Applied of microbiology biotechnology**, v.75, p.633–645, 2007.

VISINTIN, S. et al. Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in West Africa. **International Journal of Food Microbiology**, v.216, p.69–78, 2016. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.004.

WANG, T.; CHEN, L. Dynamic complexity of microbial pesticide model. **Nonlinear Dynamics**, v.58, p.539–552, 2009. Doi: 10.1007/s11071-009-9499-7.

WILMES, P.; SIMMONS, S.L.; DENEFF, V.J.; BANFIELD, J.F. The dynamic genetic repertoire of microbial communities. **FEMS Microbiology Reviews.**, v.33, p.109–132, 2009. Doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00144.x.

XU, J. et al. Investigation on biochemical compositional changes during the microbial fermentation process of Fu brick tea by LC–MS based metabolomics. **Food Chemistry**, v.186, p.176–184, 2015. Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.045.

YERGEAU, E. et al. Next-Generation Sequencing of microbial communities in the athabasca river and its tributaries in relation to oil sands mining activities. **Applied and environmental microbiology**, v.78, p.7626–7637, 2012. Doi: 10.1128/AEM.02036-12.

ZHANG, B. et al. Dynamic changes of the microbial communities during the preparation of traditional Tibetan Qula cheese. **Dairy Science and Technology**, v.95, p.167–180, 2015. Doi: 10.1007/s13594-014-0194-1

ZHAO, M.; WANG, B.; LI, F.; QIU, L.; LI, F.; WANG, S.; CUI, J. Analysis of bacterial communities on aging flue-cured tobacco leaves by 16S rDNA PCR–DGGE technology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.73, p.1435–1440, 2007. Doi: 10.1007/s00253-006-0625-x.

**ARTIGO 1****Dynamics of the bacterial microbiome of tobacco leaves under natural  
fermentation**

---

<sup>1</sup>Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Pesquisa Agropecuária Tropical, em versão na língua portuguesa.

**Dynamics of the bacterial microbiome of tobacco leaves under natural  
fermentation**

**Santana-Filho, D.M.<sup>1,4\*</sup>, Svercal, M.<sup>3</sup>, Souza, J.T.<sup>2</sup>**

**<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano**

**<sup>2</sup>Universidade Federal de Lavras**

**<sup>3</sup>Protabaco Agency**

**<sup>4</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia**

**\*Corresponding author**

**E-mail: [Djalma.filho@ifbaiano.edu.br](mailto:Djalma.filho@ifbaiano.edu.br) (DMSF)**

## Abstract

The fermentation of tobacco Mata Fina in piles is an ecologically, biotechnologically and phylogenetically unexplored process. In this study, the bacteria involved in this process were studied during the fermentation cycles of three piles of tobacco, which lasted approximately six months. For this purpose, samples were taken at each cycle of fermentation and a region of approximately 400-bp of the 16S rRNA rRNA, encompassing the hypervariable regions V1, V2 and V3 were sequenced by pyrosequencing. The fermentation piles differed greatly in the abundance and composition of bacteria, with a great influence of the bacterial groups present in the beginning of the fermentation. The temperature, relative humidity, pH, water content of the leaves, concentrations of oxygen, carbon dioxide, methane and ammonia were monitored in each fermentation cycle of the different piles. The phyla Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes were the most numerous during the fermentation cycles in all piles. Thirty-nine bacterial species represented 95.6% of all the reads obtained during the fermentation and *Staphylococcus cohnii* was the most frequent, followed by *Brevibacterium linens*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas cichorii*. There was a positive correlation between the number of reads assigned to the genus *Staphylococcus* and high concentrations of methane, high pH of the leaves and high relative humidity of the air. Most correlations with physico-chemical characteristics were significant for one pile only, showing how different and variable the fermentation was in the different piles. This study showed an extended diversity of bacteria in the fermentation of tobacco than the previous studies reported in the literature. These data may be used to select starting bacterial species to standardize the fermentation process and uniformize the quality of the fermented product.

**Keywords:** Tobacco, pyrosequencing, taxonomy, bacteria.

## Introduction

Diverse fermentation processes are well known and used to improve characteristics of foods, beverages and other products in the whole world (SINGHANIA et al., 2009; STEINKRAUS, 2002). Some examples of fermentations are sugarcane to produce ethanol, cocoa and coffee fermentations to improve flavor, sauerkraut to increase shelf life, tea to improve flavor, bread and beer (LANGE et al., 2014; TAMANG et al., 2016; PEREIRA et al., 2016; CHEN et al., 2010; JAYABALAN et al., 2014; STEINKRAUS, 2002; XU et al., 2015; STEINKRAUS, 2002).

The tobacco fermentation is a process by which tobacco leaves change the flavor and become good to smoke (LARSSON et al., 2008). During the fermentation, there is a release of high amounts of carbon dioxide, ammonium and methane (DI GIACOMO et al., 2007). In general, the processing of tobacco leaves starts with drying or cure, followed by fermentation and aging. In general, all these three processes are known as curing (WU et al., 2017; VIGLIOTTA et al., 2007; HUANG et al., 2010). The main methods of tobacco processing are air-curing used in the Burley tobacco in the Americas (USA, Brazil and Argentina) and Malawi; flue-curing used in Virginia tobacco common in the Americas and in British tobacco; fire-curing used to process Toscano tobacco in Italy; sun-curing used in Oriental tobacco in the Americas and the Mediterranean region; and Perique tobacco that includes high pressure anaerobic fermentation in oak barrels in the USA. Air-curing is done in barns with good ventilation and the process is completed in four to eight weeks yielding tobacco leaves with soft and sweet taste (LEFFINGWELL and ALFORD, 2005). Fire- and flue-curing are process done using fire, but smoke only enters in contact with the leaves in the first method. Fire-curing is done in three days to one week, resulting in tobacco leaves with low sugar and high nicotine levels (DI GIACOMO et al., 2007). On the other hand, flue-cured tobacco suffer slow increases in temperature for one week and produce tobacco leaves rich in sugar and middle to high nicotine levels (HUANG et al., 2010; WU et al., 2017). Sun-curing is done under the sun and produces tobacco leaves rich in sugar and poor in nicotine (GILCHRIST, 1999; PEEDIN, 1999; ADAM et al., 2005).

Previous studies on the microbial diversity of tobacco fermentation have focused on cultivation, DDGE, 16S cloning and sequencing, AFLP, but not on deep sequencing (DI GIACOMO et al., 2007; HUANG et al., 2010; SU et al., 2011; VIGLIOTTA et al., 2007). These studies shown that bacteria are more numerous than fungi in tobacco leaves and that their densities and diversity decrease as the

fermentation process progresses (QIU et al., 2004; SU et al., 2011; DI GIACOMO et al., 2007).

The fermentation of air-cured tobacco variety Mata Fina is a natural process done annually, from September to December in the municipality of Cruz das Almas, Bahia State, Brazil. The fermentation takes 5 to 6 months to complete and the tobacco does not receive any additives. An aeration system with pvc is installed inside the fermentation piles. The process produces a strong and characteristic smell in the warehouses, with high concentrations of ammonium, methane and carbon dioxide (unpublished data). There is no scientific information on this fermentation process and in this study we take the opportunity to investigate the dynamics of bacterial populations during the fermentation cycles by next generation sequencing (NGS). Furthermore, the fermentation piles were physico-chemically characterized and these data correlated with the number of reads obtained by NGS.

## **Material and Methods**

**Fermentation piles and sampling procedure.** Each fermentation pile was assembled with tobacco leaves acquired from certified producers in the Recôncavo region of Bahia State, Brazil, where the variety Mata Fina is grown. These leaves were harvested, dried for 45 days in curing barns and transferred to a warehouse that belongs to the company Protabaco AG in the municipality of Cruz das Almas, Bahia, where they were classified, weighted and piled up for fermentation. The classification is done by leaf size and quality, which is an attempt to give more uniformity to the fermentation process. Each initial or small pile was composed of 6.000 kg of Mata Fina tobacco leaves that remained piled up for approximately 30 days and were revolved 3 to 4 times to mix the pile and decrease the temperature every time it raises to more than 50 °C. After this period the pile was joined with two others with the same classification and age to form a large pile with 18.000 kg, where the fermentation proceeded until the temperature stopped raising above 50 °C. These large piles were revolved at approximately every 30 days. Each revolvment of the pile was considered as a fermentation cycle. Fermentation cycles were short (3-4 days) in the initial piles and longer (30 days) in large piles. Smaller piles were 2m x 2m x 2.5 m (width, length and height) and large piles measured 2.7 x 2.7 x 3. For this study, three small and three large piles of tobacco were sampled from fermentation cycle 0 (zero) to the end

cycle (Table 1). Piles 43, 75, and 88 were composed of 6.000 kg each and were later incorporated into large piles 14, 25, and 29 with 18.000 kg each. The fermentation piles studied were initiated in September 2013 and lasted until May 2014. These piles showed different numbers of fermentation cycles and samples were taken at every cycle in triplicate by collecting 100g of leaves from three different points in the pile and separately stored in bags at -20 °C until use for DNA extraction.

**DNA extraction and sequencing.** Three samples were collected per pile in each fermentation cycle, totaling 87 single samples. These were combined to form one sample per fermentation cycle per pile, totaling 29 composed samples. Bacterial genomic DNA was extracted from the leaves with the kit QIAamp DNA Stool Mini according to the manufacture's instructions (Qiagen). Amplicon libraries were prepared according to the 454 Life Science Genome Sequencer System manual (Roche). Two partial regions of the 16S rRNA encompassing the hypervariable regions V1, V2 and V3 were amplified by fusion primers generated with the bacterial universal primers EUB8m\_f (WEISBURG et al. 1991) and EUB515\_r (BAKER et al. 2003) to amplify the hypervariable regions V1, V2 and V3. PCR amplifications were carried out with the Illustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare Life Sciences). Reactions with the beads were supplemented with 1 µl of each primer (10 µM), 20-30 ng of DNA and adjusted to a final volume of 25 µl. Amplifications were carried out with the following program: initial denaturation at 95 °C for 5 min, 35 cycles of 94 °C for 45 s, annealing at 52 °C for 45 s and elongation at 72 °C for 1 min and a final extension of 72 °C for 10 min. Two reactions were prepared for each DNA sample and pooled before purification with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen). The purified samples were pooled in equimolar amounts, immobilized on DNA capture beads, amplified by emulsion PCR and analyzed in a 454 GS Junior sequencing system (Roche) at Microstec (Burg, Switzerland). Signal processing was done with the GS Run Processor software and the SFF tool. The sequencing kit GS Junior Titanium allowed reads of approximately 400 bp. Sequences with bad quality as revealed by their length, quality score and tag recognition were removed from the analyses.

**Data analysis.** The sequences selected in the previous step were analysed by the pipeline at the Ribosomal Database Project (RDP II) website (COLE et al., 2009). Sequences shorter than 250 bp and containing undefined bases were excluded. The

naïve Bayesian rRNA classifier with an 80% bootstrap threshold was run to perform the taxonomy-based analysis (WANG et al., 2007). After that, sequence batches from a given sample sharing the same tag were aligned using the 'infernai' aligner. Clustering of the sequences was done with the complete-linkage clustering method (NAWROCKI and EDDY 2007). Taxonomy-dependent analysis by clustering reads in OTUs was done with the cluster files generated in the last step. Ecological metrics such as coverage of the libraries were calculated with the OTUs. Representative sequences from the sequenced libraries were selected by combining all reads into a single alignment followed by data de-replication based on clustering at 3% sequence divergence.

**Physico-chemical characteristics.** The following physico-chemical characteristics were measured during the fermentation process: water content of the leaves, pH, temperature and humidity of the air, global temperature, which is the mean value of the temperature in the interior and in the extremities of each pile, and concentration of gases, including ammonia, carbon dioxide, oxygen and methane. The water content of the leaves in percentage was given by the difference between the fresh and dry weight of the leaves after exposure to 100°C for 24 h. The pH was measured with a pH meter in an extract prepared with 2% of tobacco leaves. The humidity and temperature of the air in the fermentation barn were measured daily with a termohigrometer. The temperature in the interior of the piles was monitored daily with a common thermometer installed in the interior of each fermentation pile, while a thermometer with probes inserted in base, middle and the top of each pile was used to determine the temperature in the extremities and the global temperature was the average between the temperature in the interior and in the extremities. The concentration of gases was measured with a X-am 7000 meter (Dräger) with sensors to measure ammonia (NH<sub>3</sub>), carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), oxygen (O<sub>2</sub>) and methane (CH<sub>4</sub>). The water content of the leaves was measured at the end of each cycle, whereas all the other variables were measured daily. The program BIOESTAT 5.0 was used to correlate by employing Pearson's correlation coefficient the physico-chemical characteristics and the number of reads of each OTU.

## Results

**Number of reads.** A total 743,555 useful reads were obtained with an average length of 421 bp. These reads were higher in fermentation pile 14, followed by pile 25 and 29 for large piles and for small piles were 43, 75 and 88 (Figure 1). The number of reads tended to increase from beginning to the end of the fermentations (Table 1).

**Taxonomical categories.** A total of 855 phylotypes were detected during the traditional fermentation of tobacco Mata Fina with 3% sequence divergence. These phylotypes were classified into 17 bacterial Phyla. Four of these, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes represented 99.9% of all the reads obtained (Tables 2 and 3). Proteobacteria showed the highest number of reads in piles 25, 29, 75 and 88. Firmicutes was predominated with high numbers of reads in piles 14 and 43. Considering the total reads number in all piles evaluated, Firmicutes was the Phylum with highest numbers, followed by Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes (Table 2).

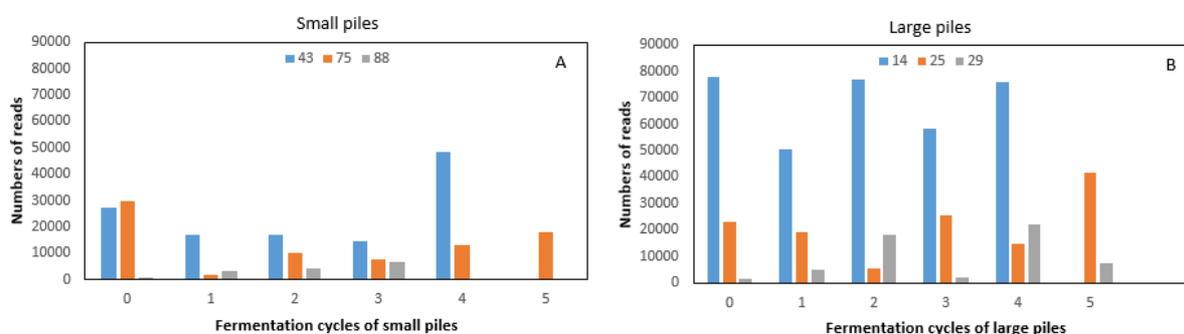


Figure 1. Number of reads obtained in each cycle of six fermentation piles of tobacco Mata Fina. The fermentation piles were 43, 75 and 88 are small piles with 6.000 kg of tobacco leaves and 14, 25, 29 are large piles with 18.000 kg of tobacco fermented leaves. The numbers of fermentations cycles were variable (3 to 5) among the piles. Data are from samples collected in triplicate and pooled to compose 1 sample per pile per cycle with piles treated separately. Sequencing of the regions V1, V2 and V3 of the 16S rRNA was done by pyrosequencing.

Table 1. Number of fermentation cycles in the six tobacco piles used in this study. Small piles were characterized by fermentation in piles of 6000 kg and the large ones were done in piles of 18000 kg of leaves. Fermentations always began with non-fermented leaves and the large one with fermented leaves from three small piles, of which one was evaluated before and two others not. .

<b>Fermentation piles</b>	<b>Numbers of cycles</b>	<b>Kind of piles</b>	<b>Weight of leaves</b>
<b>43</b>	4	Small	6000
<b>75</b>	5	Small	6000
<b>88</b>	3	Small	6000
<b>28</b>	5	Large	18000
<b>25</b>	6	Large	18000
<b>29</b>	6	Large	18000

There were 35 bacterial classes, 58 orders, 152 families and 473 bacterial genera in the six fermentation piles combined, but from these, 6 classes, 17 orders, 20 families and 36 genera represented more than 99% of the total number of reads within each of these taxonomical categories (Table 3). Pile 14 had the highest number of phyla, classes and orders of bacteria, while pile 75 had the highest number of families and pile 25 the highest number of genera. Pile 29 had the lowest number of reads in the taxonomical categories Phylum, Class and Order and pile 88 in taxonomical categories Family and Genera (Table 3). Firmicutes had the highest numbers of reads followed by Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes (Table 4).

There were 855 bacterial species in all the fermentation piles and 39 species represented 95.6% of all the reads (Table 5).

Table 2. Number of taxonomical categories identified in different fermentation cycles of tobacco Mata Fina arranged in six piles.

Fermentation cycles	Phyla				Classes				Orders				Families				Genera																							
	43	75	88	14	25	29	43	75	88	14	25	29	43	75	88	14	25	29	43	75	88	14	25	29																
<b>0</b>	7	9	7	5	9	4	12	17	10	11	17	7	20	33	17	22	34	12	52	84	35	60	85	31	85	170	45	87	135	38										
<b>1</b>	8	4	4	6	6	6	15	9	10	11	11	14	28	14	18	23	19	22	62	32	43	60	54	58	120	47	56	101	75	77										
<b>2</b>	6	5	7	4	5	4	11	8	15	10	11	7	15	16	26	16	19	15	40	40	61	38	50	51	60	47	97	55	62	87										
<b>3</b>	6	6	9	11	6	5	9	13	19	20	13	9	18	24	32	33	20	16	43	77	71	84	61	41	60	132	110	166	96	53										
<b>4</b>	5	6		8	5	6	10	15		16	12	12	17	25		31	20	17	53	64		68	59	42	79	112		107	85	64										
<b>5</b>		7			6	16		14				12	13		28			12	13						80			21	21		80		48	62		157			67	87

**Table 3.** Number of different taxonomical categories in six fermentation piles of tobacco Mata Fina. The names of the taxonomical categories that represent the majority of the reads are listed and should be contrasted with the total number of names of taxonomical categories. The percentage represented by the names listed is shown between parentheses at the end of each category.

Categories	Fermentation piles						Total	Majority of the reads (>99%)
	43	75	88	14	25	29		
Phyla	11	10	10	13	12	8	17	Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes (99.9%)
Classes	19	22	22	23	21	17	35	Bacilli, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Actinobacteria, Betaproteobacteria, Clostridia (99.9%)
Orders	34	37	37	44	39	29	58	Bacillales, Pseudomonadales, Actinomycetales, Sphingomonadales, Enterobacteriales, Rhizobiales, Burkholderiales, Lactobacillales, Rhodobacteriales, Clostridiales, Xanthomonadales, Caulobacterales, Rhodospirillales, Bacteroidales, Flavobacteriales, Sphingobacteriales, Oceanospirillales (99.9%)
Families	106	113	95	107	102	95	152	Staphylococcaceae, Pseudomonadaceae, Sphingomonadaceae, Brevibacteriaceae, Enterobacteriaceae, Corynebacteriaceae, Methylobacteriaceae, Moraxellaceae, Burkholderiaceae, Erythrobacteraceae, Micrococcaceae, Pseudonocardiaceae, Bacillaceae 1 and 2, Alcaligenaceae, Dermabacteriaceae, Rhodobacteraceae, Aerococcaceae, Lachnospiraceae, Xanthomonadaceae (99.1%)
Genera	199	287	182	248	322	194	473	Staphylococcus, Pseudomonas, Brevibacterium, Pantoea, Sphingomonas, Corynebacterium, Methylobacterium, Acinetobacter, Ralstonia, Azomonas, Erwinia, Brachybacterium, Bacillus, Sphingobium, Oceanobacillus, Aerococcus, Enterobacter, Prauserella, Alterythrobacter, Achromobacter, Salmonella, Erythrobacter, Shimwellia, Aurantimonas, Arthrobacter, Bordetella, Sphingosinicella, Devosia, Sphingopyxis, Stenotrophomonas, Yaniella, Blautia, Propionibacterium, Paracoccus, Saccharopolyspora, Klebsiella (99.1%)

Table 4. Number of reads assigned to different phyla of bacteria in three small fermentation piles (43, 75 and 88) and three large piles (14, 25 and 29). Data are from samples collected in triplicate and pooled to compose 1 sample per pile per cycle with piles treated separately. Sequencing of the regions V1, V2 and V3 of the 16S rRNA was done by pyrosequencing. The classification in different phyla was done by comparison with sequences deposited in the RDP II website.

Phylum	Fermentation piles						Total
	43	75	88	14	25	29	
Firmicutes	78234	12804	746	249338	47108	5948	394178
Proteobacteria	33406	63973	13400	38516	80037	37165	266497
Actinobacteria	12253	3360	490	51427	2279	12417	82226
Bacteroidetes	43	105	54	111	117	67	497
Fusobacteria	13	16	8	1	37	4	79
Candidatus Saccharibacteria	3	6	3	5	2	3	22
Acidobacteria	1	5	5	5	1	2	19
Chloroflexi	2	4	4	1	3	0	14
Gemmatimonadetes	2	0	2	3	1	0	8
Deinococcus-Thermus	2	1	0	0	2	1	6
Armatimonadetes	0	1	1	0	0	0	2
Nitrospira	0	0	0	1	1	0	2
Spirochaetes	1	0	0	0	0	0	1
Elusimicrobia	0	0	0	1	0	0	1
Synergistetes	0	0	0	1	0	0	1
Deferribacteres	0	0	0	1	0	0	1
Crenarchaeota	0	0	0	0	1	0	1
	123960	80275	14713	339411	129589	55607	743555

Table 5. Bacterial species identified in piles of tobacco Mata Fina under natural fermentation. Thirty nine from a total of 855 species are shown and these represent 95.6% of the total number of reads that could be assigned to species. The identity of the isolates was calculated with matches to sequences from the RDPII website and the relative amount is the percentage of reads assigned to each species.

<b>Species</b>	<b>Numer of reads</b>	<b>Identity (%)</b>	<b>Relative amount (%)</b>
<i>Staphylococcus cohnii</i>	181382	100.0	36.12
<i>Brevibacterium linens</i>	55057	100.0	10.96
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	39163	100.0	7.80
<i>Staphylococcus aureus</i>	29149	100.0	5.80
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	27869	99.1	5.55
<i>Pseudomonas cichorii</i>	24040	100.0	4.79
<i>Brevibacterium iodinum</i>	23652	99.3	4.71
<i>Staphylococcus xylosus</i>	18245	96.7	3.63
<i>Staphylococcus microti</i>	9586	100.0	1.91
<i>Paenibacillus pabuli</i>	7856	100.0	1.56
<i>Pantoea dispersa</i>	7588	100.0	1.51
<i>Pantoea agglomerans</i>	7461	100.0	1.49
<i>Corynebacterium casei</i>	6299	100.0	1.25
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5835	100.0	1.16
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4260	100.0	0.85
<i>Staphylococcus devriesei</i>	4147	96.2	0.83
<i>Staphylococcus carnosus</i>	3141	100.0	0.63
<i>Staphylococcus hominis</i>	2466	94.1	0.49
<i>Sphingomonas melonis</i>	2372	99.2	0.47
<i>Escherichia hermannii</i>	2168	99.4	0.43
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	1886	99.0	0.38
<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	1429	99.2	0.28
<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	1425	100.0	0.28
<i>Corynebacterium macginleyi</i>	1232	99.4	0.25
<i>Micrococcus luteus</i>	1138	100.0	0.23
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1096	95.9	0.22
<i>Sphingomonas sp.</i>	1013	98.0	0.20
<i>Staphylococcus equorum</i>	941	95.8	0.19
<i>Pantoea sp. Sc1</i>	870	100.0	0.17
<i>Staphylococcus capitis</i>	853	100.0	0.17
<i>Sphingobium sp. P21</i>	816	100.0	0.16
<i>Mycobacterium chelonae</i>	815	100.0	0.16
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	808	95.1	0.16
<i>Pseudomonas putida</i>	737	98.6	0.15
<i>Staphylococcus auricularis</i>	715	96.8	0.14
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	703	100.0	0.14
<i>Laceyella sacchari</i>	695	100.0	0.14
<i>Bacillus pumilus</i>	622	99.9	0.12
<i>Pantoea ananatis</i>	605	100.0	0.12

**Dynamics of the fermentation.** The six fermentation piles behaved differently in terms of microbial dynamics. The initial bacterial population in the leaves in cycle 0 greatly influenced the microbial composition in the other cycles. Pile 14 and 43 had high numbers of bacteria in the Phylum Firmicutes and consequently members of this phylum were the most numerous in all the other fermentation cycles (Figure S1). Members of the class Bacilli, order Bacillales, family Staphylococcaceae and genus *Staphylococcus* were the most numerous in most cycles of pile 14 and 43 (Figures S2 and S3).

Piles 25, 29, 75 and 88 initiated the fermentative process with high numbers of members of the Proteobacteria phylum and showed higher numbers of members of this phylum in the other cycles (Figure S1). Classes Gammaproteobacteria and Alphaproteobacteria, orders Pseudomonadales and Sphingomonadales, families Pseudomonadaceae and Sphingomonadaceae and genera *Pseudomonas* and *Sphingomonas* were more numerous in most cycles of piles 25 and 75 (Figures S2 and S3). Pile 29 and 88 was more similar to pile 25 and 75 in terms of composition down to the category of class. However, the orders were more diversified and did not follow a clear trend in the different cycles of fermentation, but the dominant ones were Enterobacteriales, Sphingomonadales, Actinomycetales and Rhizobiales. The dominant families and genera were Enterobacteriaceae, Sphingomonadaceae and *Corynebacterium*; and *Pantoea*, *Corynebacterium* and *Sphingomonas*. Sphingomonadaceae, represented by *Sphingomonas* showed a better distribution among the fermentation cycles, whereas Enterobacteriaceae, represented by the genus *Pantoea* and Corynebacteriaceae, represented by the genus *Corynebacterium* were concentrated on fermentation cycles 0 and 2 of large pile.

The number of phyla, classes, orders, families and genera fluctuated among the cycles of fermentation, with a tendency to increase in the fermentation cycles of the middle and small decreases toward the end of the fermentation process. The final number of all taxonomic categories was generally higher than the numbers in cycle 0 (Table 2).

**Characterization of the fermentation.** The pH of the leaves varied from 5.8 to 7.3 during the process, with small fluctuations along the cycles. The water content of the leaves varied from 15.4 to 27.3% and decreased with the progress of the cycles (Figure 2 A and B). The global temperature varied from 26 to 44 °C in the three piles, with a

decrease towards the end of the fermentation, while the relative humidity of the air increased toward the end of the process, with variations from 50 to 95% (Figura 2 E and F). The levels of carbon dioxide decreased along the fermentation cycles, varying from 0 to 60% and the concentration of oxygen decreased in all piles toward the end of the fermentation (Figure 2 D and G). The levels of ammonia were on average 21.37 ppm in all fermentations piles. The levels of methane increased and subsequently reduced in all piles along the fermentation cycles, varying from 0 to 4500 ppm (Figura 2 C and H).

### **Relationships between taxonomical categories and physico-chemical data.**

Some of the many correlations found between variables were not repeated in all fermentation piles. However the phylum Bacteroidetes was correlated with the relative humidity in five from six piles. The correlations were negative in the three small piles and positive in large piles 14 and 25. The classes Bacilli, Betaproteobacteria and Gammaproteobacteria were positively correlated with leaf humidity (L Hum) in the three large piles. Bacilli showed positive correlation with carbon dioxide and methane in the three large fermentation piles. Leaf humidity correlated positively with Enterobacteriales and Bulkoderiales in three large piles. The numbers of reads of Bacillales, Enterobacteriales and Rhizobiales correlated positively with carbon dioxide, but in the large piles it was observed in the first and second cycles and in small piles it occurred in the third cycles. Bacillales was correlated positively with methane, Enterobacteriales with O<sub>2</sub> in the large piles and Rhizobiales with ammonium and oxygen in the small piles. The Flavobacteriales order showed positive correlations with relative humidity (RH) in four piles, three were a large. Sphingobacteriales was positively correlated in 5 from 6 piles evaluated, among wich three were large (Table S2).

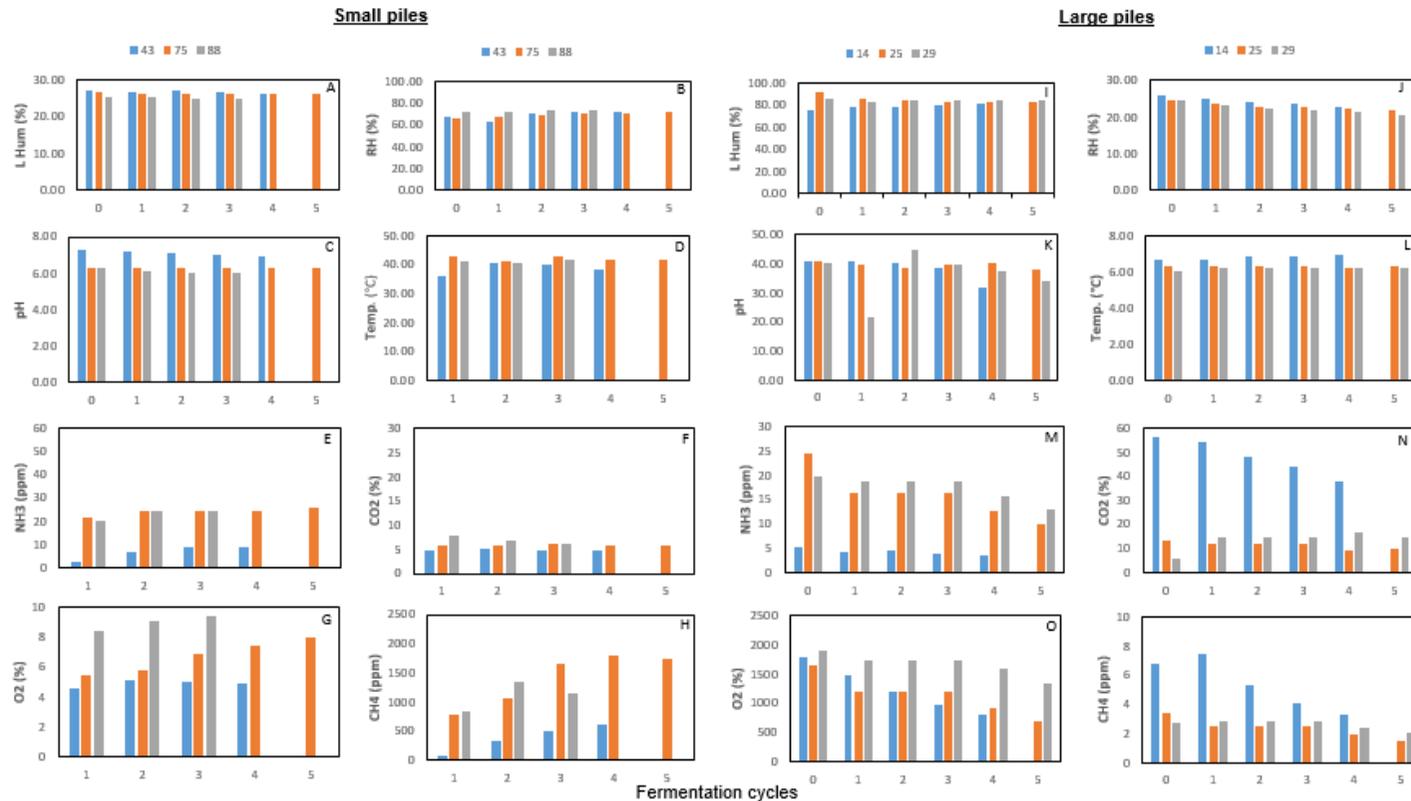


Figure 2: Physico-chemical characteristics of six piles of tobacco Mata Fina under natural fermentation. A – H - small piles with 6000 kg and I – P - large piles with 18000 kg. The figures show water content of the leaves (L Hum) in percentage to small (A) and large (I) piles; relative humidity (RH) in percentage to small (B) and large (J) piles; pH to small (C) and large (K) piles; temperature in degree Celsius (Temp.) to small (D) and large (L) piles; ammonium in parts per million (NH<sub>3</sub>) to small (E) and large (M) piles; carbon dioxide in percentage (CO<sub>2</sub>) to small (F) and large (N) piles; oxygen in percentage (O<sub>2</sub>) to small (G) and large (O) piles; methane in parts per million (CH<sub>4</sub>) to small (H) and large (P) piles. Water content of the leaves was measured at the end of each cycle, whereas all the other variables were measured daily.

## Discussion

This study represents the first investigation of the bacterial microbiome of tobacco under fermentation using deep sequencing. In this study we showed that piles of fermentation greatly vary in their composition and the initial diversity in the leaves determine the taxonomical profile of each fermented tobacco batch.

The sequencing approach adopted in this study allowed us to show an extended diversity of bacteria in the fermentation of tobacco. The other studies done on tobacco fermentation did not use any high-throughput culture-independent method and for this reason were limited in revealing a low number of bacterial groups. Some of these studies showed 55 bacterial species (DI GIACOMO et al., 2007). In this study, we were able to show 15 times more species of bacteria in the tobacco fermentation process because the non-culturable bacteria were included.

Previous studies showed that there is a decrease in the populations and in their diversity as the fermentation progresses (DI GIACOMO et al. 2007, HUANG et al. 2010, SU et al. 2011, VIGLIOTTA et al. 2007, QIU et al. 2004). However, in our study such decreases were not observed for both number of taxonomical categories and population densities as shown by the number of reads obtained. The independency of cultivation and the capacity of NGS to show relatively rare taxonomical groups are responsible for these extended results in numbers of taxonomical categories and number of individuals.

There are different types of tobacco fermentation in the world (DI GIACOMO et al., 2007; ZHAO et al., 2007; HUANG et al. 2010; SU et al., 2012) and therefore any comparison among them must be done with care. Probably the population densities and diversity of the bacteria involved in these processes are different. Nevertheless, if anyone strives to repeat the process and keep the uniformity and quality of the end product, the fermentation should be standardized. Our data on Mata Fina tobacco fermented in piles showed a lack of uniformity and microbial composition both in numbers and diversity, what probably would result in batches with different quality. Although no attempt to correlate the quality of the batches resulting from each fermentation pile and the bacterial microbiome was done, this would be a logical next step to take. Studies to select bacterial isolates able to improve the quality of tobacco are being conducted by the company Protabaco. The idea is to add such bacterial isolate to the fermentation piles to standardize the process and improve the quality of the end product.

All bacterial groups identified in previous studies of tobacco fermentation were found in our investigation. The phyla Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes were the dominant ones in our study and in studies reported by other authors (SU et al. 2011). This is not surprising because these four phyla are also the dominant bacterial groups in environments as diverse as the human gut and the plant rhizosphere (MENDES, GARBEVA and RAAIJMAKERS 2013).

*Streptococcus cohnii* was the dominant species in the fermentation of tobacco Mata Fina in piles. This genus was never reported as dominant in any tobacco fermentation reported previously. Instead, the genera *Jeotgaliococcus*, *Staphylococcus*, *Aerococcus*, *Lactobacillus* and *Weissella* were dominant in the fermentation of Toscano tobacco (DI GIACOMO et al., 2007).

The fermentation of Mata Fina tobacco is an alkaline process as the concentrations of ammonia and the pH values indicate (STEINKRAUS, 2002). For this reason, *Staphylococcus* and *Bacillus* are among the dominant genera in this process.

Many bacterial species found in the tobacco piles in this study are pathogenic to humans and other animals (Supplementary table S1) as observed by other authors studying other kind of tobacco products. Different studies suggest that pathogenic microorganisms and the toxins they produce may cause health problems in smokers (PAULY and PASZKIEWICZ, 2011; CHOPKY et al., 2017). This study does not advocate the use of tobacco as its harmful health effects are well established. Instead, we used the previously unknown Mata Fina fermentation to study its bacterial microbiome.

## **Acknowledgements**

The authors thank DANCO and FAPESB for financial assistance.

## References

- Adam T.; Ferge T.; Mitschke, S.; Streibel, T.; Baker, R. R.; Zimmermann, R. Discrimination of three tobacco types (Burley, Virginia and Oriental) by pyrolysis single-photon ionisation–time-of-flight mass spectrometry and advanced statistical methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2005; 381: 487–499. Doi 10.1007/s00216-004-2935-0.
- Chen Y, Liu B, Chang Y. Bioactivities and sensory evaluation of Pu-erh teas made from three tea leaves in an improved pile fermentation process. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2010; 109: 557–563. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.11.004.
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 141–145.
- D & R Tobacco. History of Perique Tobacco. Acesso em 02.02.18, Disponível em: <http://www.cigarettetobacco.com/perique2.htm>, accessed Dec.21, 2004.
- Di Giacomo M, Paolino M, Silvestro D, Vigliotta G, Imperi F, Visca P, et al. Microbial Community Structure and Dynamics of Dark Fire-Cured Tobacco Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73: 825–837.
- Gilchrist, S. N. (1999) In: DAVIS DEL, NIELSEN MR (eds) Tobacco: production, chemistry, and technology. Blackwell, Oxford, p.154.
- Huang J, Yang J, Duan Y, Gu W, Gong X, Zhe W, et al. Bacterial diversities on unaged and aging flue-cured tobacco leaves estimated by 16S rRNA sequence analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 88: 553–562.
- Jayabalan R, et al. A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2014; 13: 538-550.

Lange, J.N. et al. Implantation and persistence of yeast inoculum in Pinot noir fermentations at three Canadian wineries. *International Journal of Food Microbiology* 2014, 180: 56–61. Doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.003.

Larsson, L.; Szponar, B.; Ridha, B.; Pehrson, C.; Dutkiewicz, J.; Krysińska-Traczyk, E.; Sitkowska, J. Identification of bacterial and fungal components in tobacco and tobacco smoke. *Tobacco Induced Diseases* 2008, 4:4. Doi: 10.1186/1617-9625-4-4.

Leffingwell, J. C.; Alford, E. D. Volatile constituents of perique tobacco. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 4; 899-915, 2005.

Mendes, R.; Garbeva, P.; Raaijmakers, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* 2013; 37: 634–663. Doi: 10.1111/1574-6976.12028.

Nawrocki, E.P.; Eddy, S.R. Query-dependent banding (QDB) for faster RNA similarity searches. *PLOS Computational Biology* 2007; 3: 540-554. Doi: 10.1371/journal.pcbi.0030056.

Palmer Gk, Pearce RC (1999) In: DAVIS DEL, NIELSEN MR (eds) *Tobacco: production, chemistry, and technology*. Blackwell, Oxford, 143.

Peedin GF (1999) In: DAVIS DEL, NIELSEN MR (eds) *Tobacco: production, chemistry, and technology*. Blackwell, Oxford, 104.

Pereira, G.V.M., Miguel, M.G.C.P., Ramos, C. L., and Schwan, R. F. Microbiological and Physicochemical Characterization of Small-Scale Cocoa Fermentations and Screening of Yeast and Bacterial Strains To Develop a Defined Starter Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; 78: 5395–5405.

Pereira, G.V.M.; Soccol, V.T.; Soccol, C.R. Current state of research on cocoa and coffee fermentations. *Current Opinion Food Science* 2016; 7: 50-57. Doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.001.

Qiu, L.; Zhao, M.; Li, F.; Qi, W.; Zhang, W.; Yue, X.; Cui, J. Changes In Biological Activity During Artificial Fermentation Of Flue-Cured Tobacco. *Tobacco Science* 2004; 46: 24-27.

Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandeya, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 2009; 44: 13–18.

Steinkraus, K.H. Fermentations in World Food Processing. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety* 2002; 1: 23-32.

Su, C., Gu, W., Zhe, W., Hang, K., Duan, Y., Yang, J. Diversity and phylogeny of bacteria on Zimbabwe tobacco leaves estimated by 16S rRNA sequence analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011; 92: 1033–1044.

Tamang, J. P.; Watanabe, K.; Holzapfel, W. H. Review: Diversity of Microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in microbiology* 2016; .7: 1-28. Doi: 10.3389/fmicb.2016.00377.

Vigliotta, G.; Di Giacomo, M.; Carata, E.; Massardo, D.R.; Tredici, S.M.; Silvestro, D.; Paolino, M.; Pontieri, P.; Del Giudice, L.; Parente, D.; Alifano, P. Nitrite metabolism in *Debaryomyces hansenii* TOB-Y7, a yeast strain involved in tobacco fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007; 75: 633–645.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 1991; 173: 697–703.

Wu, J.; Yang, S. X.; Tian, F. C. An Adaptive Neuro-Fuzzy Approach to Bulk Tobacco Flue-Curing Control Process, *Drying Technology* 2017; 35. Doi: 10.1080/07373937.2016.1183211.

Xu, J. et al. Investigation on biochemical compositional changes during the microbial fermentation process of Fu brick tea by LC–MS based metabolomics. *Food Chemistry* 2015; 186: 176–184. [Doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.045](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.045).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Bacterial species identified during different fermentation cycles of tobacco Mata Fina in piles.

Species	abundance	% ident	Species	abundance	% ident
<i>Staphylococcus cohnii</i>	181382.000	100	<i>Mycobacterium abscessus</i>	242.000	100
<i>Brevibacterium linens</i>	55057.000	100	<i>Pseudomonas migulae</i>	238.000	100
<i>Staph. saprophyticus</i>	39163.000	100	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	238.000	99.98
<i>Staphylococcus aureus</i>	29149.000	100	<i>Bacillus litoralis</i>	236.000	100
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	27869.000	99.07	<i>Erwinia amylovora</i>	219.000	99.97
<i>Pseudomonas cichorii</i>	24040.000	100	<i>Pantoea deleyi</i>	208.000	100
<i>Brevibacterium iodinum</i>	23652.000	99.32	<i>Pseudomonas sp. SCD-14b</i>	206.000	99.22
<i>Staphylococcus xylosum</i>	18245.000	96.72	<i>Methylobacterium extorquens</i>	203.000	100
<i>Staphylococcus microti</i>	9586.000	100	<i>Ochrobactrum sp. R-24448</i>	203.000	100
<i>Paenibacillus pabuli</i>	7856.000	100	<i>Burkholderia cepacia</i>	198.000	100
<i>Pantoea dispersa</i>	7588.000	100	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	190.000	100
<i>Pantoea agglomerans</i>	7461.000	100	<i>Bacillus firmus</i>	187.000	100
<i>Corynebacterium casei</i>	6299.000	100	<i>Staphylococcus caprae</i>	183.000	97.88
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5835.000	100	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	173.000	92.5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4260.000	100	<i>Sinorhizobium sp. R-25067</i>	163.000	100
<i>Staphylococcus devriesei</i>	4147.000	96.2	<i>Staphylococcus intermedius</i>	155.000	100
<i>Staphylococcus carnosus</i>	3141.000	100	<i>Listonella anguillarum</i>	153.000	98.89
<i>Staphylococcus hominis</i>	2466.000	94.12	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	149.000	100
<i>Sphingomonas melonis</i>	2372.000	99.19	<i>Virgibacillus halophilus</i>	146.000	100
<i>Escherichia hermannii</i>	2168.000	99.38	<i>Sphingomonas agrestis</i>	138.000	100
<i>Staph. saccharolyticus</i>	1886.000	99.04	<i>Corynebacterium variabile</i>	133.000	100
<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	1429.000	99.18	<i>Acinetobacter junii</i>	131.000	100
<i>Brachybact. paraconglomeratum</i>	1425.000	100	<i>Nocardioides albus</i>	128.000	100
<i>Corynebacterium macginleyi</i>	1232.000	99.39	<i>Sphingomonas sp. CHY-1</i>	128.000	100
<i>Micrococcus luteus</i>	1138.000	100	<i>Bacillus subtilis</i>	127.000	99.77
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1096.000	95.94	<i>Clavibacter michiganensis</i>	126.000	99.35
<i>Sphingomonas sp.</i>	1013.000	98	<i>Citrobacter rodentium</i>	124.000	100
<i>Staphylococcus equorum</i>	941.000	95.83	<i>Kytococcus sedentarius</i>	120.000	100
<i>Pantoea sp. Sc1</i>	870.000	100	<i>Nocardioopsis kunsanensis</i>	114.000	100
<i>Staphylococcus capitis</i>	853.000	100	<i>Klebsiella oxytoca</i>	111.000	97.23
<i>Sphingobium sp. P21</i>	816.000	100	<i>Pantoea endophytica</i>	108.000	99.24
<i>Mycobacterium chelonae</i>	815.000	100	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	98.000	100
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	808.000	95.05	<i>Staph. pseudolugdunensis</i>	98.000	95.52
<i>Pseudomonas putida</i>	737.000	98.59	<i>Pseudomonas parafulva</i>	97.000	99.26
<i>Staphylococcus auricularis</i>	715.000	96.78	<i>Bacillus badius</i>	96.000	100
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	703.000	100	<i>Tetrasphaera australiensis</i>	95.000	100
<i>Laceyella sacchari</i>	695.000	100	<i>Saccharopolyspora hirsuta</i>	92.000	100
<i>Bacillus pumilus</i>	622.000	99.91	<i>Saccharopolyspora pogona</i>	91.000	100
<i>Pantoea ananatis</i>	605.000	100	<i>Bacillus flexus</i>	86.000	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	597.000	100	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	86.000	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	574.000	100	<i>Ochrobactrum gallinifaecis</i>	85.000	100
<i>Bacillus clausii</i>	568.000	98.91	<i>Pantoea cypripedii</i>	85.000	97.44
<i>Staphylococcus kloosii</i>	565.000	100	<i>Lactobacillus sp.</i>	83.000	100
<i>Sphingobium chlorophenolicum</i>	563.000	100	<i>Nocardioides sp.</i>	80.000	100
<i>Prauserella rugosa</i>	558.000	100	<i>Arthrobacter agilis</i>	79.000	100
<i>Erwinia persicina</i>	516.000	100	<i>Propionibacterium acnes</i>	76.000	100
<i>Staphylococcus sciuri</i>	502.000	100	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	76.000	100
<i>Staphylococcus warneri</i>	482.000	98.4	<i>Dialister invisus</i>	72.000	100
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	430.000	100	<i>Erythrobacter sp. JL-475</i>	72.000	100
<i>Cronobacter sakazakii</i>	412.000	97.86	<i>Coryneb. ammoniagenes</i>	71.000	100
<i>Brevibacterium casei</i>	387.000	100	<i>Bacillus megaterium</i>	70.000	100
<i>Pasteuria penetrans</i>	359.000	100	<i>Microbact. dextranolyticum</i>	70.000	100
<i>Enterobacter hormaechei</i>	358.000	100	<i>Methylobacterium jeotgali</i>	66.000	99.18
<i>Blautia sp. Ser8</i>	340.000	99.24	<i>Selenomonas ruminantium</i>	66.000	100
<i>Bordetella avium</i>	338.000	99.99	<i>Corynebacterium auriscanis</i>	63.000	100
<i>Staphylococcus lentus</i>	283.000	100	<i>Staphylococcus arlettae</i>	63.000	100
<i>Arthrobacter keyseri</i>	276.000	100	<i>Bacillus ginsengi</i>	61.000	100
<i>Escherichia coli</i>	276.000	100	<i>Pseudom. plecoglossicida</i>	61.000	99.43
<i>Paracoccus sp. R-24652</i>	273.000	100	<i>Serratia proteamaculans</i>	61.000	100
<i>Aerococcus viridans</i>	270.000	99.49	<i>Erwinia piflorinigrans</i>	60.000	99.4
<i>Mycobacterium abscessus</i>	242.000	100	<i>Pseudomonas luteola</i>	58.000	100
<i>Pseudomonas migulae</i>	238.000	100	<i>Leifsonia xyli</i>	56.000	100
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	238.000	99.98	<i>Pantoea sp. LMG 5341</i>	56.000	98.74
<i>Bacillus litoralis</i>	236.000	100	<i>Staphylococcus succinus</i>	56.000	100
<i>Erwinia amylovora</i>	219.000	99.97	<i>Erwinia rhapontici</i>	55.000	100
<i>Pantoea deleyi</i>	208.000	100	<i>Hespellia porcina</i>	55.000	100
<i>Pseudomonas sp. SCD-14b</i>	206.000	99.22	<i>Bacillus sp. KSM-K38</i>	54.000	100
<i>Methylobacterium extorquens</i>	203.000	100	<i>Corynebacterium sp.</i>	54.000	99.08
<i>Ochrobactrum sp. R-24448</i>	203.000	100	<i>Pantoea sp. A0310</i>	54.000	100
<i>Burkholderia cepacia</i>	198.000	100	<i>Proteus mirabilis</i>	53.000	95.59
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	52.000	99.12	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	19.000	100

<i>Moorella thermoacetica</i>	52.000	100	<i>Streptococcus mutans</i>	19.000	100
<i>Arthrobacter ilicis</i>	51.000	100	<i>Amycolatopsis minnesotensis</i>	18.000	100
<i>Zymomonas mobilis</i>	51.000	100	<i>Fusobacterium perfoetens</i>	18.000	98.48
<i>Pseudom. pseudoalcaligenes</i>	50.000	100	<i>Nocardioides sp. SPI2</i>	18.000	100
<i>Sphingomonas sp. Gamma12-7</i>	49.000	100	<i>Tetragenococcus muritaticus</i>	18.000	98.93
<i>Leifsonia aquatica</i>	47.000	100	<i>Amycolatopsis thermoflava</i>	17.000	100
<i>Salmonella enterica</i>	47.000	100	<i>Arthrobacter ramosus</i>	17.000	99.62
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	46.000	99.83	<i>Bacillus methanolicus</i>	17.000	100
<i>Xenorhabdus poinarii</i>	45.000	99.09	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	17.000	100
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	43.000	100	<i>Dietzia sp. W5004</i>	17.000	100
<i>Methylobacterium suomiense</i>	42.000	100	<i>Gordonia bronchialis</i>	17.000	100
<i>Kluyvera ascorbata</i>	41.000	98.31	<i>Methylosinus sp. LW4</i>	17.000	100
<i>Bacillus sp. S210</i>	40.000	100	<i>Mycobact. salmoniphilum</i>	17.000	98.86
<i>Enterobacter ludwigii</i>	40.000	99.04	<i>Riemerella anatipestifer</i>	17.000	99.41
<i>Stenotrophomonas terrae</i>	40.000	99.19	<i>Salinispora pacifica</i>	17.000	100
<i>Corynebacterium auris</i>	39.000	100	<i>Bartonella bacilliformis</i>	16.000	100
<i>Sphingomonas azotifigens</i>	37.000	100	<i>Dietzia kunjamensis</i>	16.000	100
<i>Enterobacter cloacae</i>	36.000	99.94	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	16.000	100
<i>Agrococcus jenensis</i>	35.000	99.3	<i>Fusobacterium varium</i>	16.000	98.28
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	34.000	100	<i>Paracoccus halophilus</i>	16.000	100
<i>Salmonella bongori</i>	34.000	100	<i>Phyllobacterium trifolii</i>	16.000	100
<i>Stenotroph. maltophilia</i>	34.000	100	<i>Rhodococcus fascians</i>	16.000	100
<i>Cellulomonas flavigena</i>	33.000	100	<i>Rubrobacter radiotolerans</i>	16.000	100
<i>Corynebacterium durum</i>	33.000	100	<i>Staph. piscifermentans</i>	16.000	99.49
<i>Erwinia pyrifoliae</i>	33.000	100	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	15.000	100
<i>Frankia sp.</i>	33.000	100	<i>Enterobacter pyrinus</i>	15.000	99.85
<i>Methylob. thiocyanatum</i>	33.000	100	<i>Pseudomonas argentinensis</i>	15.000	100
<i>Rhizobium sp. TJ173</i>	33.000	100	<i>Staph. pseudintermedius</i>	15.000	100
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	32.000	100	<i>Streptomyces verticillus</i>	15.000	99.35
<i>Corynebacterium phocae</i>	32.000	100	<i>Tsukamurella pulmonis</i>	15.000	99.15
<i>Mycobacterium immunogenum</i>	32.000	100	<i>Lactobacillus crustorum</i>	14.000	100
<i>Arthrob. polychromogenes</i>	31.000	100	<i>Paenibacillus antarcticus</i>	14.000	100
<i>Geodermatophilus obscurus</i>	31.000	99.43	<i>Paenibacillus ginsengisoli</i>	14.000	100
<i>Sphingomonas elodea</i>	31.000	100	<i>Prevotella pallens</i>	14.000	99.52
<i>Bacillus plakortidis</i>	30.000	100	<i>Saccharopolyspora sp. S582</i>	14.000	100
<i>Nocardioides sp. MTD22</i>	30.000	100	<i>Tistrella mobilis</i>	14.000	100
<i>Paenibacillus sabiniae</i>	30.000	99.66	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	13.000	98.96
<i>Pseudonocardia ammonioxydans</i>	30.000	100	<i>Actinomadura hibisca</i>	13.000	100
<i>Rhodoc. corynebacterioides</i>	30.000	100	<i>Aeromicrobium erythreum</i>	13.000	98.72
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	30.000	99.2	<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	13.000	100
<i>Coryneb. pseudogenitalium</i>	29.000	100	<i>Bacillus sp. GB02-2A</i>	13.000	99.62
<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i>	29.000	100	<i>Bacteroides fragilis</i>	13.000	100
<i>Erythrobacter litoralis</i>	28.000	100	<i>Clostridium indolis</i>	13.000	99.25
<i>Pseudomonas cedrina</i>	28.000	100	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	13.000	100
<i>Raoultella terrigena</i>	28.000	100	<i>Corynebacterium sp. 89349</i>	13.000	100
<i>Amycolatopsis jejuensis</i>	27.000	100	<i>Corynebacterium urealyticum</i>	13.000	100
<i>Brachybacterium sp. MSA21</i>	27.000	99.35	<i>Gordonia aichiensis</i>	13.000	100
<i>Curtobacterium citreum</i>	27.000	100	<i>Micrococcus sp. TS17</i>	13.000	100
<i>Massilia timonae</i>	27.000	99.5	<i>Nesterenkonia sp. 10004</i>	13.000	100
<i>Bartonella tamiae</i>	26.000	100	<i>Nocardioides aromaticivorans</i>	13.000	100
<i>Candidatus Aquiluna rubra</i>	25.000	98.02	<i>Pectobacterium wasabiae</i>	13.000	100
<i>Escherichia vulneris</i>	25.000	100	<i>Pseudomonas sp. HF-1</i>	13.000	100
<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	24.000	100	<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	13.000	99.65
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	24.000	100	<i>Sphingobium sp. JZ-1</i>	13.000	100
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	24.000	100	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	12.000	100
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	24.000	100	<i>Nesterenkonia halobia</i>	12.000	100
<i>Amycolatopsis palatopharyngis</i>	23.000	100	<i>Nocardioides sp. DN36</i>	12.000	100
<i>Bacillus licheniformis</i>	23.000	100	<i>Alcaligenes sp.</i>	11.000	100
<i>Brevibacterium sp. TAF-2.4a</i>	23.000	98.75	<i>Bacillus sp. A12</i>	11.000	100
<i>Kluyvera intermedia</i>	23.000	100	<i>Bacillus sp. G1</i>	11.000	100
<i>Microbacterium foliorum</i>	23.000	100	<i>Bacillus sp. w5</i>	11.000	100
<i>Staphylococcus felis</i>	23.000	100	<i>Cellulomonas bogoriensis</i>	11.000	100
<i>Flavobacterium denitrificans</i>	22.000	100	<i>Kineococcus radiotolerans</i>	11.000	100
<i>Methylobacterium nodulans</i>	22.000	97.83	<i>Lactobacillus plantarum</i>	11.000	100
<i>Xenorhabdus beddingii</i>	22.000	100	<i>Micromonospora chokoriensis</i>	11.000	99.31
<i>Bacillus schlegelii</i>	21.000	100	<i>Polynucleobacter necessarius</i>	11.000	99.59
<i>Brevundimonas diminuta</i>	21.000	100	<i>Slackia heliotrinireducens</i>	11.000	100
<i>Kineococcus aurantiacus</i>	21.000	100	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	10.000	100
<i>Microbact. esteraromaticum</i>	21.000	100	<i>Cupriavidus basilensis</i>	10.000	100
<i>Pantoea anthophila</i>	21.000	98.33	<i>Enterococcus canintestini</i>	10.000	100
<i>Raoultella planticola</i>	21.000	100	<i>Marinospirillum megaterium</i>	10.000	100
<i>Staphylococcus sp. Lgg15.7</i>	21.000	100	<i>Methylob. rhodesianum</i>	10.000	100
<i>Bacillus circulans</i>	20.000	100	<i>Nocardioopsis halotolerans</i>	10.000	100
<i>Pseudomonas monteilii</i>	20.000	100	<i>Pseudonocardia saturnea</i>	10.000	98.7
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	20.000	100	<i>Rhodobacter azotoformans</i>	10.000	100
<i>Xenorhabdus japonica</i>	20.000	100	<i>Rhodococcus koreensis</i>	10.000	100
<i>Bosea sp. CRIB-13</i>	19.000	100	<i>Rhodococcus opacus</i>	10.000	100
<i>Gordonia amarae</i>	19.000	100	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	10.000	100
<i>Ralstonia pickettii</i>	19.000	100	<i>Actinomadura vinacea</i>	9.000	100
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	19.000	100	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	9.000	100
<i>Dietzia maris</i>	9.000	100	<i>Atopobium vaginae</i>	5.000	100

<i>Enterobacter cowanii</i>	9,000	98.72	<i>Bacillus niacini</i>	5,000	100
<i>Mycobacterium</i> sp. HE5	9,000	100	<i>Bacillus</i> sp.	5,000	99.8
<i>Nocardioides</i> sp. C190	9,000	100	<i>Brevibacillus thermoruber</i>	5,000	100
<i>Planomicrobium okeanokoites</i>	9,000	100	<i>Burkholderia</i> sp. WBF3	5,000	98.09
<i>Sphingobium</i> sp. YBL1	9,000	100	<i>Burkholderia</i> sp. WBF4	5,000	98.09
<i>Sphingomonas</i> sp. BR12253	9,000	100	<i>Clostridium drakei</i>	5,000	100
<i>Staphylococcus simulans</i>	9,000	96.17	<i>Corynebacterium accolens</i>	5,000	100
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	9,000	100	<i>Dermatophilus congolensis</i>	5,000	99.39
<i>Williamsia deligens</i>	9,000	99.22	<i>Enterobacter</i> sp. ATCC 27993	5,000	99.38
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	8,000	99.15	<i>Erwinia tasmaniensis</i>	5,000	100
<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	8,000	100	<i>Finegoldia magna</i>	5,000	100
<i>Beutenbergia cavernae</i>	8,000	100	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	5,000	99.37
<i>Chryseobact. soldanellicola</i>	8,000	100	<i>Lactococcus lactis</i>	5,000	100
<i>Corynebacterium mastitidis</i>	8,000	100	<i>Methylobact. fujisawaense</i>	5,000	100
<i>Edwardsiella tarda</i>	8,000	100	<i>Micromonospora viridifaciens</i>	5,000	100
<i>Enterobacter nickellidurans</i>	8,000	100	<i>Mycobacterium gilvum</i>	5,000	100
<i>Enterococcus mundtii</i>	8,000	99.47	<i>Mycobacterium gordonae</i>	5,000	100
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	8,000	100	<i>Myroides odoratus</i>	5,000	98.7
<i>Kribbella jejuensis</i>	8,000	100	<i>Nocardioides</i> sp. 4P1-A	5,000	100
<i>Leucobacter komagatae</i>	8,000	99.17	<i>Nocardioides</i> sp. CF8	5,000	100
<i>Marinococcus halophilus</i>	8,000	98.98	<i>Nocardiosis exhalans</i>	5,000	100
<i>Mycobacterium phlei</i>	8,000	100	<i>Nocardiosis xinjiangensis</i>	5,000	99.09
<i>Novosphingobium</i> sp. K16	8,000	100	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	5,000	100
<i>Oceanobacillus picturae</i>	8,000	100	<i>Paenibacillus</i> sp. KSM-M126	5,000	100
<i>Photorhabdus temperata</i>	8,000	100	<i>Pantoea stewartii</i>	5,000	100
<i>Saccharopolyspora flava</i>	8,000	98.13	<i>Pedobacter heparinus</i>	5,000	96.97
<i>Streptomyces tricolor</i>	8,000	100	<i>Porphyromonas uenonis</i>	5,000	100
<i>Thermobispora bispora</i>	8,000	100	<i>Prevotella melaninogenica</i>	5,000	98.04
<i>Tsukamurella inchenonensis</i>	8,000	100	<i>Propionibact. granulosum</i>	5,000	100
<i>Acinetobacter baylyi</i>	7,000	99.49	<i>Pseudom. brassicacearum</i>	5,000	100
<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>	7,000	100	<i>Pseudomonas fulva</i>	5,000	100
<i>Bacillus humi</i>	7,000	100	<i>Pseudomonas mendocina</i>	5,000	100
<i>Bacillus indicus</i>	7,000	93.9	<i>Rathayibacter tritici</i>	5,000	100
<i>Bacillus thuringiensis</i>	7,000	100	<i>Rhizobium gallicum</i>	5,000	100
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	7,000	100	<i>Roseococcus thiosulfatophilus</i>	5,000	100
<i>Clostridium disporicum</i>	7,000	100	<i>Sphingobium faniae</i>	5,000	100
<i>Clostridium proteolyticum</i>	7,000	100	<i>Sphingomonas</i> sp. NM05	5,000	100
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	7,000	99.43	<i>Wautersiella falsenii</i>	5,000	100
<i>Cytophaga</i> sp. I-482	7,000	100	<i>Amycolatopsis rubida</i>	4,000	100
<i>Cytophaga</i> sp. I-976	7,000	100	<i>Anaerococcus prevotii</i>	4,000	100
<i>Flectobacillus major</i>	7,000	100	<i>Angiococcus disciformis</i>	4,000	98.04
<i>Herminiimonas glaciei</i>	7,000	100	<i>Bacillus pseudofirmus</i>	4,000	100
<i>Kocuria rhizophila</i>	7,000	100	<i>Bacillus sonorensis</i>	4,000	100
<i>Marinobacter alkaliphilus</i>	7,000	100	<i>Bacillus</i> sp. S209	4,000	99.38
<i>Marinobacter</i> sp. ELB17	7,000	100	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	4,000	99.48
<i>Microbacterium</i> sp. YK18	7,000	100	<i>Clostridium paraputrificum</i>	4,000	100
<i>Paracoccus marcusii</i>	7,000	100	<i>Clostridium scindens</i>	4,000	100
<i>Pseudomonas</i> sp. PNP5	7,000	97.53	<i>Collinsella aerofaciens</i>	4,000	100
<i>Pseudonocardia chloroethenivorans</i>	7,000	100	<i>Corynebacterium genitalium</i>	4,000	100
<i>Sphingomonas</i> sp. Alpha4-2	7,000	100	<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>	4,000	100
<i>Stenotroph. acidaminiphila</i>	7,000	96.95	<i>Corynebacterium matruchotii</i>	4,000	99.22
<i>Thermomonospora curvata</i>	7,000	100	<i>Eubacterium hallii</i>	4,000	99.17
<i>Tsukamurella tyrosinosolvans</i>	7,000	100	<i>Halomonas</i> sp. Sa4-21	4,000	100
<i>Vagococcus carniphilus</i>	7,000	100	<i>Hymenobacter soli</i>	4,000	100
<i>Alcaligenes faecalis</i>	6,000	100	<i>Hymenobacter</i> sp. VUG-A141a	4,000	100
<i>Arthrobacter dextranolyticus</i>	6,000	100	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	4,000	100
<i>Aurantimonas</i> sp. E.plume	6,000	99.34	<i>Microbacterium oxydans</i>	4,000	100
<i>Bacillus smithii</i>	6,000	100	<i>Microbacterium resistens</i>	4,000	100
<i>Blautia producta</i>	6,000	100	<i>Micrococcus phosphovorans</i>	4,000	100
<i>Catenuloplanes nepalensis</i>	6,000	100	<i>Mycobacterium monacense</i>	4,000	99.14
<i>Corynebacterium massiliense</i>	6,000	100	<i>Mycobacterium sherrisii</i>	4,000	100
<i>Corynebacterium resistens</i>	6,000	100	<i>Myroides odoratimimus</i>	4,000	100
<i>Ensifer adhaerens</i>	6,000	100	<i>Nocardia abscessus</i>	4,000	100
<i>Enterococcus dispar</i>	6,000	98.48	<i>Nocardiosis dassonvillei</i>	4,000	100
<i>Gardnerella vaginalis</i>	6,000	100	<i>Nocardiosis listeri</i>	4,000	100
<i>Gordonia oitidis</i>	6,000	100	<i>Paenibacillus</i> sp. HanTHS1	4,000	99.34
<i>Granulicatella adiacens</i>	6,000	100	<i>Pantoea</i> sp. EM13cb	4,000	99.28
<i>Megamonas hypermegale</i>	6,000	100	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	4,000	99.15
<i>Mycobacterium avium</i>	6,000	98.11	<i>Pseudomonas syringae</i>	4,000	100
<i>Mycobacterium neoaurum</i>	6,000	100	<i>Pseudonocardia alni</i>	4,000	100
<i>Nocardia asteroides</i>	6,000	100	<i>Pseudonocardia</i> sp. S053	4,000	99.03
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	6,000	100	<i>Ruminococcus gauvreauii</i>	4,000	100
<i>Pseudomonas</i> sp. LBUM223	6,000	96.97	<i>Salmonella</i> sp.	4,000	100
<i>Pseudonocardia</i> sp. SP020602-02	6,000	98.88	<i>Sanguibacter antarcticus</i>	4,000	100
<i>Pseudorhodobacter</i> sp. HDW-19	6,000	100	<i>Segniliparus rotundus</i>	4,000	100
<i>Rothia dentocariosa</i>	6,000	100	<i>Streptococcus mitis</i>	4,000	100
<i>Sphingobium</i> sp. P1	6,000	97.06	<i>Streptomyces filipinensis</i>	4,000	100
<i>Staphylococcus muscae</i>	6,000	96.91	<i>Vagococcus fluvialis</i>	4,000	99.49
<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	6,000	100	<i>Acinetobacter baumannii</i>	3,000	99.73
<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>	5,000	100	<i>Acinetobacter soli</i>	3,000	100
<i>Actinomyces naeshlundii</i>	3,000	100	<i>Corynebacterium</i> sp. NML94-0380	2,000	100

<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	3.000	100	<i>Corynebacterium xerosis</i>	2.000	100
<i>Atopobium minutum</i>	3.000	100	<i>Curtobacterium luteum</i>	2.000	98.15
<i>Azorhizobium doebereineriae</i>	3.000	99.42	<i>Cystobacter fuscus</i>	2.000	100
<i>Bacillus cereus</i>	3.000	97.55	<i>Cytophaga sp. MBIC04663</i>	2.000	100
<i>Bacillus sp. GB02-14C</i>	3.000	100	<i>Dietszia psychrocaliphila</i>	2.000	100
<i>Bacillus sp. SH3</i>	3.000	99.33	<i>Dyadobacter fermentans</i>	2.000	100
<i>Bacteroides nordii</i>	3.000	100	<i>Enterobacter asburiae</i>	2.000	100
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	3.000	100	<i>Enterococcus silesiacus</i>	2.000	100
<i>Bifidobacterium sp. JEMLUCVII-1</i>	3.000	100	<i>Enterococcus termitis</i>	2.000	99.46
<i>Brevibacterium sp. II</i>	3.000	100	<i>Erwinia sp. MB31</i>	2.000	100
<i>Clostridium xylanolyticum</i>	3.000	100	<i>Eubacterium cellulosolvens</i>	2.000	100
<i>Comamonas aquatica</i>	3.000	100	<i>Flavobacterium aquatile</i>	2.000	100
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	3.000	100	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	2.000	100
<i>Eubacterium fissicatena</i>	3.000	100	<i>Globicatella sulfidifaciens</i>	2.000	100
<i>Flavobacterium sp.</i>	3.000	100	<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	2.000	100
<i>Lachnospira multipara</i>	3.000	96.88	<i>Gordonia amicalis</i>	2.000	100
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3.000	100	<i>Granulicatella elegans</i>	2.000	99.38
<i>Leptotrichia shahii</i>	3.000	100	<i>Haemophilus parasuis</i>	2.000	100
<i>Listeria grayi</i>	3.000	100	<i>Halobacillus trueperi</i>	2.000	100
<i>Microbacterium aurum</i>	3.000	100	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	2.000	100
<i>Moraxella ovis</i>	3.000	100	<i>Klebsiella sp. AF-4C</i>	2.000	100
<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	3.000	100	<i>Kurthia gibsonii</i>	2.000	100
<i>Mycobacterium brumae</i>	3.000	100	<i>Lactobacillus iners</i>	2.000	100
<i>Nesterenkonia aethiopica</i>	3.000	100	<i>Lactobacillus sakei</i>	2.000	100
<i>Paenibacillus borealis</i>	3.000	100	<i>Leptotrichia hofstadii</i>	2.000	99.31
<i>Paenibacillus sp. GJ46</i>	3.000	100	<i>Leptotrichia wadei</i>	2.000	100
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	3.000	100	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2.000	100
<i>Pantoea calida</i>	3.000	99.43	<i>Methylobacterium aquaticum</i>	2.000	100
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	3.000	100	<i>Methylosinus sp. LW3</i>	2.000	100
<i>Porphyromonas catoniae</i>	3.000	100	<i>Methylosinus trichosporium</i>	2.000	100
<i>Prevotella copri</i>	3.000	97.54	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	2.000	100
<i>Prevotella falsenii</i>	3.000	100	<i>Microbacterium terregens</i>	2.000	100
<i>Prevotella nigrescens</i>	3.000	100	<i>Morganella morgani</i>	2.000	99.73
<i>Pseudonocardia sp. S073</i>	3.000	100	<i>Mycobacterium fallax</i>	2.000	100
<i>Pseudonocardia sp. W101</i>	3.000	100	<i>Mycobacterium hassiacum</i>	2.000	100
<i>Rhodococcus equi</i>	3.000	100	<i>Mycobacterium madagascariense</i>	2.000	100
<i>Rhodococcus sp.</i>	3.000	100	<i>Nocardia africana</i>	2.000	100
<i>Rubritepida flocculans</i>	3.000	100	<i>Nocardioides sp. JS614</i>	2.000	100
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	3.000	100	<i>Oerskovia turbata</i>	2.000	99.18
<i>Salinibacterium amurskyense</i>	3.000	100	<i>Okibacterium frutillarum</i>	2.000	100
<i>Sphaerobacter thermophilus</i>	3.000	100	<i>Paenibacillus daejeonensis</i>	2.000	100
<i>Sphingopyxis sp. 113P3</i>	3.000	100	<i>Paenibacillus wynnii</i>	2.000	100
<i>Streptomyces luteosporus</i>	3.000	100	<i>Paracoccus versutus</i>	2.000	99.38
<i>Tatumella ptyseos</i>	3.000	100	<i>Paraprevotella clara</i>	2.000	99.16
<i>Actinocorallia aurantiaca</i>	2.000	100	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	2.000	99.46
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	2.000	100	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	2.000	100
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	2.000	100	<i>Peptoniphilus indolicus</i>	2.000	100
<i>Actinomyces oris</i>	2.000	100	<i>Photorhabdus luminescens</i>	2.000	100
<i>Advenella kashmirensis</i>	2.000	100	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	2.000	100
<i>Amycolatopsis tucumanensis</i>	2.000	100	<i>Pseudomonas sp. P48</i>	2.000	98.8
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	2.000	100	<i>Pseudomonas sp. SY4</i>	2.000	99.03
<i>Arthrobacter globiformis</i>	2.000	100	<i>Pseudonocardia autotrophica</i>	2.000	97.2
<i>Arthrobacter oxydans</i>	2.000	100	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i>	2.000	98.95
<i>Azovibrio sp. R-25062</i>	2.000	100	<i>Pseudonocardia halophobica</i>	2.000	100
<i>Bacillus coaluiliensis</i>	2.000	100	<i>Rhodanobacter ginsenosidimitans</i>	2.000	100
<i>Bacillus lentus</i>	2.000	99.27	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	2.000	100
<i>Bacillus sp. GB02-25</i>	2.000	100	<i>Rhodococcus ruber</i>	2.000	100
<i>Bacillus sp. N2a</i>	2.000	100	<i>Rhodococcus sp. SW09</i>	2.000	100
<i>Barnesiella intestinihominis</i>	2.000	100	<i>Rhodopseudomonas oryzae</i>	2.000	100
<i>Blastomonas natatoria</i>	2.000	100	<i>Roseiflexus castenholzii</i>	2.000	100
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	2.000	100	<i>Rothia mucilaginosa</i>	2.000	100
<i>Bradyrhizobium sp. TSA26</i>	2.000	100	<i>Saccharopolyspora hordei</i>	2.000	100
<i>Bradyrhizobium sp. TSA27s</i>	2.000	100	<i>Saccharopolyspora taberi</i>	2.000	100
<i>Bradyrhizobium sp. TSA43</i>	2.000	100	<i>Salegentibacter salegens</i>	2.000	100
<i>Bradyrhizobium sp. TSA44</i>	2.000	100	<i>Sorangium cellulosum</i>	2.000	100
<i>Brevibacterium sp.</i>	2.000	100	<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	2.000	100
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	2.000	99.38	<i>Sphingomonas sp. KA1</i>	2.000	100
<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>	2.000	100	<i>Sporosarcina pasteurii</i>	2.000	96.25
<i>Chromohalobacter marismortui</i>	2.000	100	<i>Staphylococcus croceolyticus</i>	2.000	100
<i>Chryseobacterium gleum</i>	2.000	100	<i>Staphylococcus fleuretii</i>	2.000	94.03
<i>Clostridium baratii</i>	2.000	100	<i>Streptococcus sanguinis</i>	2.000	100
<i>Clostridium butyricum</i>	2.000	100	<i>Streptomyces africanus</i>	2.000	100
<i>Clostridium haemolyticum</i>	2.000	100	<i>Streptomyces fimicarius</i>	2.000	100
<i>Clostridium perfringens</i>	2.000	100	<i>Streptomyces globisporus</i>	2.000	100
<i>Clostridium sp. Kas104-4</i>	2.000	100	<i>Tannerella forsythia</i>	2.000	100
<i>Comamonas terrigena</i>	2.000	98.55	<i>Thermincola potens</i>	2.000	100
<i>Coralloccoccus macrosporus</i>	2.000	98.9	<i>Thermoflavimicrobium dichotomicum</i>	2.000	99.13
<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	2.000	100	<i>Thermoleophilum album</i>	2.000	100
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	2.000	100	<i>Variovorax paradoxus</i>	2.000	100
<i>Corynebacterium sp. NML09-0341</i>	2.000	100	<i>Veillonella dispar</i>	2.000	100
<i>Veillonella parvula</i>	2.000	100	<i>Corynebacterium riegliei</i>	1.000	100

<i>Vibrio ordalii</i>	2.000	100	<i>Corynebacterium singulare</i>	1.000	100
<i>Xanthomonas oryzae</i>	2.000	99.15	<i>Corynebacterium sundsvallense</i>	1.000	99
<i>Acidiphilium angustum</i>	1.000	100	<i>Cytophaga sp. I-762</i>	1.000	100
<i>Acidiphilium rubrum</i>	1.000	100	<i>Cytophaga sp. MBIC01539</i>	1.000	100
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	1.000	100	<i>Deinococcus deserti</i>	1.000	100
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	1.000	100	<i>Deinococcus grandis</i>	1.000	100
<i>Acinetobacter schindleri</i>	1.000	98.55	<i>Dermacoccus sp. Ellin185</i>	1.000	100
<i>Actinobaculum schaalii</i>	1.000	100	<i>Desulfatibacillum aliphaticivorans</i>	1.000	100
<i>Actinomadura cremea</i>	1.000	99.24	<i>Desulfobacterium anilini</i>	1.000	100
<i>Actinomadura rubrobrunea</i>	1.000	100	<i>Desulfofallobium retbaense</i>	1.000	100
<i>Actinomadura viridis</i>	1.000	100	<i>Desulfonatronum lacustre</i>	1.000	100
<i>Actinosynnema pretiosum</i>	1.000	100	<i>Desulfonauticus autotrophicus</i>	1.000	100
<i>Aeromicrobium marinum</i>	1.000	100	<i>Desulfonauticus submarinus</i>	1.000	100
<i>Aeromonas sobria</i>	1.000	100	<i>Desulfotomaculum kuznetsovii</i>	1.000	100
<i>Afifella marina</i>	1.000	100	<i>Desulfotomaculum ruminis</i>	1.000	100
<i>Afipia felis</i>	1.000	100	<i>Enterobacter gergoviae</i>	1.000	99.48
<i>Alcaligenes sp. OS2</i>	1.000	100	<i>Enterobacter sp.</i>	1.000	100
<i>Alicyclobacillus contaminans</i>	1.000	100	<i>Enterococcus aquimarinus</i>	1.000	100
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	1.000	100	<i>Enterococcus asini</i>	1.000	100
<i>Alicyclobacillus vulcanalis</i>	1.000	100	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1.000	99.18
<i>Alistipes putredinis</i>	1.000	100	<i>Enterococcus cecorum</i>	1.000	100
<i>Amycolatopsis coloradensis</i>	1.000	100	<i>Enterococcus malodoratus</i>	1.000	98.93
<i>Amycolatopsis lactamdurans</i>	1.000	100	<i>Enterorhabdus caecimuris</i>	1.000	100
<i>Amycolatopsis sp. GY034</i>	1.000	100	<i>Ethanoligenens harbinense</i>	1.000	100
<i>Amycolatopsis sulphurea</i>	1.000	100	<i>Flavobacterium columnare</i>	1.000	100
<i>Anaeroplasm abactoclasticum</i>	1.000	100	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	1.000	100
<i>Anaerostipes caccae</i>	1.000	100	<i>Flavobacterium sp. SOC A4(12)</i>	1.000	100
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	1.000	100	<i>Flexibacter elegans</i>	1.000	100
<i>Atopostipes suicloacalis</i>	1.000	100	<i>Flexibacter flexilis</i>	1.000	100
<i>Azospirillum sp. TSH7</i>	1.000	100	<i>Frankia sp. BMG5.11</i>	1.000	100
<i>Bacillus azotoformans</i>	1.000	100	<i>Fusobacterium equinum</i>	1.000	100
<i>Bacillus cohnii</i>	1.000	100	<i>Gramella forsetii</i>	1.000	100
<i>Bacillus massiliensis</i>	1.000	100	<i>Halomonas aquamarina</i>	1.000	99.46
<i>Bacillus mycoides</i>	1.000	95.9	<i>Halomonas nitroreducens</i>	1.000	100
<i>Bacillus oshimensis</i>	1.000	100	<i>Halomonas salina</i>	1.000	100
<i>Bacillus simplex</i>	1.000	100	<i>Halomonas sp. TNB 159</i>	1.000	100
<i>Bacillus sp. Am 13</i>	1.000	100	<i>Herbaspirillum sp. B501</i>	1.000	100
<i>Bacillus sp. MB-11</i>	1.000	100	<i>Hermiimonas aquatilis</i>	1.000	98.97
<i>Bacillus sp. PL-12</i>	1.000	100	<i>Hespellia stercorisuis</i>	1.000	100
<i>Bacillus sp. S207</i>	1.000	99.46	<i>Hymenobacter ocellatus</i>	1.000	100
<i>Bacillus sp. US149</i>	1.000	100	<i>Hyphomonas neptunium</i>	1.000	100
<i>Bacillus vallismortis</i>	1.000	98.61	<i>Jannaschia rubra</i>	1.000	100
<i>Bacteroides acidifaciens</i>	1.000	100	<i>Kibdelosporangium aridum</i>	1.000	100
<i>Bacteroides caccae</i>	1.000	100	<i>Klebsiella sp. CPK</i>	1.000	99.17
<i>Bacteroides helcogenes</i>	1.000	100	<i>Klebsiella variicola</i>	1.000	100
<i>Bacteroides plebeius</i>	1.000	100	<i>Kribbella flavida</i>	1.000	100
<i>Bacteroides sp.</i>	1.000	99.32	<i>Lactobacillus reuteri</i>	1.000	100
<i>Bacteroides vulgatus</i>	1.000	100	<i>Lactobacillus salivarius</i>	1.000	100
<i>Bifidobacterium bombi</i>	1.000	100	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1.000	100
<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	1.000	100	<i>Lawsonia intracellularis</i>	1.000	100
<i>Bordetella sp. I-3</i>	1.000	100	<i>Leptotrichia buccalis</i>	1.000	100
<i>Brachymonas denitrificans</i>	1.000	100	<i>Macrocococcus brunensis</i>	1.000	100
<i>Bradyrhizobium lablabi</i>	1.000	100	<i>Macrocococcus sp. 1123N2A</i>	1.000	100
<i>Brevundimonas aurantiaca</i>	1.000	97.89	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	1.000	100
<i>Candidatus Erwinia daciicola</i>	1.000	100	<i>Methylobacterium hispanicum</i>	1.000	100
<i>Candidatus Solibacter usitatus</i>	1.000	100	<i>Microbacterium aerolatum</i>	1.000	98.25
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	1.000	94.16	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	1.000	100
<i>Catenuloplanes japonicus</i>	1.000	100	<i>Microbacterium saperdae</i>	1.000	99.18
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	1.000	100	<i>Microbacterium sp. MA1</i>	1.000	100
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1.000	98.28	<i>Micromonospora chalcea</i>	1.000	100
<i>Chryseobacterium sp. CTM</i>	1.000	100	<i>Micromonospora echinofusca</i>	1.000	99.33
<i>Chryseobacterium sp. KM</i>	1.000	100	<i>Micromonospora sp. 211018</i>	1.000	99.42
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	1.000	100	<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	1.000	100
<i>Clostridium aminovalericum</i>	1.000	100	<i>Mycobacterium aichiense</i>	1.000	100
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1.000	100	<i>Mycobacterium arupense</i>	1.000	100
<i>Clostridium cellobioparum</i>	1.000	100	<i>Mycobacterium duvalii</i>	1.000	99.22
<i>Clostridium cylindrosporium</i>	1.000	100	<i>Mycobacterium kansasii</i>	1.000	100
<i>Clostridium magnum</i>	1.000	99.38	<i>Mycobacterium marinum</i>	1.000	100
<i>Clostridium purinilyticum</i>	1.000	100	<i>Mycobacterium rhodesiae</i>	1.000	100
<i>Clostridium sartagoforme</i>	1.000	100	<i>Mycobacterium sp. JS623</i>	1.000	100
<i>Clostridium sp. MLG661</i>	1.000	100	<i>Mycobacterium sp. JS624</i>	1.000	100
<i>Clostridium sp. MLG856-1</i>	1.000	100	<i>Mycobacterium sp. STR-17</i>	1.000	100
<i>Clostridium tertium</i>	1.000	100	<i>Mycobacterium sp. STR-21</i>	1.000	100
<i>Coenonia anatina</i>	1.000	100	<i>Mycobacterium sp. STR-6</i>	1.000	100
<i>Comamonas denitrificans</i>	1.000	100	<i>Mycobacterium sp. STR-7</i>	1.000	100
<i>Corynebacterium coyleae</i>	1.000	100	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	1.000	100
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1.000	100	<i>Mycobacterium yunnanensis</i>	1.000	100
<i>Corynebacterium felinum</i>	1.000	99.43	<i>Natranaerobius thermophilus</i>	1.000	100
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>	1.000	97.48	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	1.000	100
<i>Corynebacterium mucifaciens</i>	1.000	100	<i>Nocardia crassostreae</i>	1.000	100
<i>Nocardia rhamnosiphila</i>	1.000	100	<i>Rhodococcus sp. 11/8p</i>	1.000	100

<i>Nocardioides sp. 116-VN10-1W</i>	1.000	100	<i>Rhodoferax fermentans</i>	1.000	98.97
<i>Nocardioides sp. SG-4G</i>	1.000	100	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	1.000	100
<i>Nocardiopsis composta</i>	1.000	100	<i>Rikenella microfusus</i>	1.000	100
<i>Nonomuraea spiralis</i>	1.000	98.26	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	1.000	100
<i>Novosphingobium capsulatum</i>	1.000	98.78	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	1.000	100
<i>Novosphingobium nitrogenifigens</i>	1.000	100	<i>Salinisphaera shabanensis</i>	1.000	100
<i>Paenibacillus alginolyticus</i>	1.000	100	<i>Salinisphaera sp. S4-8</i>	1.000	100
<i>Paenibacillus alvei</i>	1.000	100	<i>Salinispora arenicola</i>	1.000	100
<i>Paenibacillus chondroitinus</i>	1.000	100	<i>Sphingobacterium sp. TN19</i>	1.000	100
<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	1.000	100	<i>Sphingomonas molluscorum</i>	1.000	99.24
<i>Paenibacillus sp. Ao3</i>	1.000	98.79	<i>Sphingomonas sp. 99-VN2-1W</i>	1.000	98.98
<i>Paenibacillus sp. GJ10</i>	1.000	100	<i>Sphingomonas sp. JS1</i>	1.000	100
<i>Paenibacillus stellifer</i>	1.000	100	<i>Sphingopyxis macrogoltabida</i>	1.000	100
<i>Paenibacillus taichungensis</i>	1.000	99.49	<i>Spirillospora albida</i>	1.000	100
<i>Pantoea sp. P8SAA</i>	1.000	100	<i>Sporosarcina saromensis</i>	1.000	100
<i>Pedobacter sp. KP-2</i>	1.000	100	<i>Stackebrandtia nassauensis</i>	1.000	100
<i>Phyllobacterium bourgognense</i>	1.000	100	<i>Staphylococcus condimenti</i>	1.000	99.16
<i>Planomicrobium chinense</i>	1.000	98.72	<i>Staphylococcus delphini</i>	1.000	100
<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	1.000	99.21	<i>Stenotrophomonas sp. PAMU-2.32</i>	1.000	97.76
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	1.000	100	<i>Streptomyces almqvistii</i>	1.000	100
<i>Prevotella oris</i>	1.000	99.22	<i>Streptomyces avidinii</i>	1.000	100
<i>Prevotella salivae</i>	1.000	99.45	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	1.000	100
<i>Prevotella veroralis</i>	1.000	100	<i>Streptomyces flaveus</i>	1.000	100
<i>Propionibacterium acidifaciens</i>	1.000	100	<i>Streptomyces griseocarneus</i>	1.000	100
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	1.000	100	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	1.000	100
<i>Proteus penneri</i>	1.000	100	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	1.000	100
<i>Proteus vulgaris</i>	1.000	100	<i>Thermus filiformis</i>	1.000	100
<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	1.000	100	<i>Thermus scotoductus</i>	1.000	99.42
<i>Pseudomonas reactans</i>	1.000	100	<i>Treponema azotonutricium</i>	1.000	100
<i>Pseudomonas sp. Ki-1w</i>	1.000	100	<i>Tsukamurella paurometabola</i>	1.000	100
<i>Pseudomonas sp. LCY16</i>	1.000	100	<i>Tsukamurella pseudospumae</i>	1.000	99.14
<i>Pseudomonas sp. SOD-3</i>	1.000	100	<i>Veillonella atypica</i>	1.000	100
<i>Pseud. syringae group genomsp. 7</i>	1.000	98.98	<i>Weeksella virosa</i>	1.000	100
<i>Pseudonocardia asaccharolytica</i>	1.000	100	<i>Weissella cibaria</i>	1.000	100
<i>Pseudonocardia petroleophila</i>	1.000	100	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	1.000	100
<i>Ralstonia solanacearum</i>	1.000	100	<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	1.000	100
<i>Rhizobium galegae</i>	1.000	100	<i>Zunongwangia profunda</i>	1.000	100
<i>Rhizobium sp.</i>	1.000	100			









Correlations	NH3		CO2		CH4		O2		L Hum		pH		RH		Temp	
	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile
Order	0.8706 /0.0548	14	-0.904 /0.0351	43	0.9685 /0.0067	14	-0.8807 /0.0485	43	0.9522 /0.0124	14			-0.9521 /0.0125	14	-0.7981 /0.0570	25
Bacillales			0.9324 /0.0209	14	-0.8802 /0.0206	25	-0.8903 /0.0174	25	-	0.8307 /0.0405	25		-0.8676 /0.0251	25		
			-0.9187 /0.0096	25	-0.8943 /0.0161	29	-0.8184 /0.0464	29								
			-0.8515 /0.0314	29												
Order	-0.9738 /0.0010	75	0.9511 /0.0129	43	-0.9572 /0.0027	75	0.9266 /0.0236	43	0.7313 /0.0985	25			-0.9395 /0.0054	75	-0.9997 /< 0.0001	75
Pseudomonadales	-0.8690 /0.0557	14	-0.9422 /0.0049	75			-0.9927 /< 0.0001	75	-	0.8940 /0.0162	29		0.9185 /0.0097	25	-0.9023 /0.0361	14
															0.7991 /0.0564	25

Correlations	NH3		CO2		CH4		O2		L Hum		pH		RH		Temp		
	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	
Order	-0.9449 /0.0154	14			-0.9192 /0.0272	14	-0.9536 /0.0119	14	-	0.9104 /0.0317	14	0.9681 /0.0068	14				
Actinomycetales																	
Order	-0.9862 /0.0019	43	-0.9466 /0.0147	14	-0.9308 /0.0216	43	-0.8955 /0.0399	43				0.9491 /0.0137	43	-0.9753 /0.0009	29	-0.9928 /0.0007	43
	0.8124 /0.0494	29										0.8708 /0.0239	29			-0.9385 /0.0055	29
Sphingomonadales																	
Order	-0.8953 /0.0400	14	-0.8947 /0.0160	29	-0.8993 /0.0378	14	-0.9429 /0.0162	14	-	0.8758 /0.0515	14			0.9902 /0.0001	25	0.9658 /0.0017	25
Enterobacteriales					0.8765 /0.0219	25	0.8924 /0.0167	25	0.9601 /0.0024	25							
					-0.8330 /0.0395	29	-0.8296 /0.0410	29	-	0.7951 /0.0586	29						



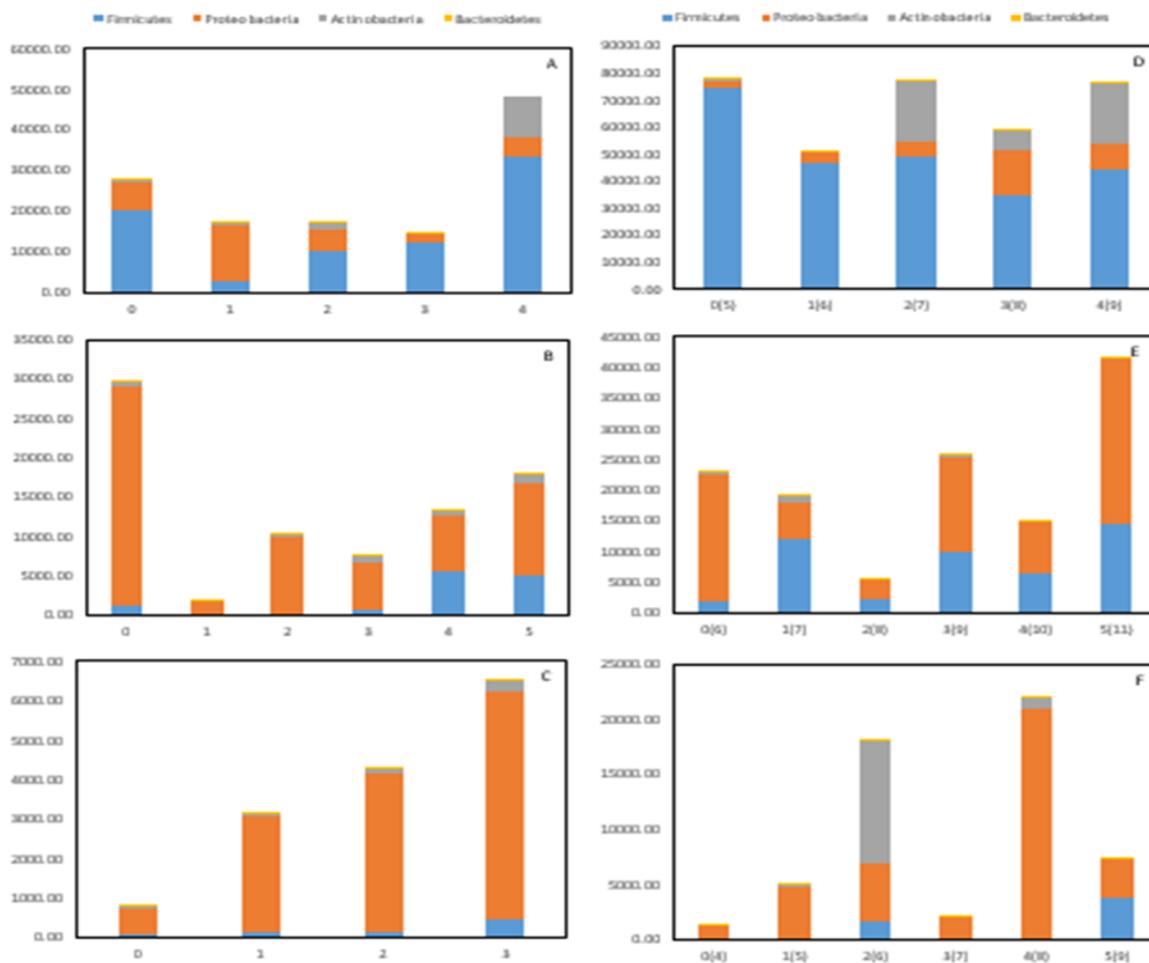


Correlations	NH3		CO2		CH4		O2		L Hum		pH		RH		Temp		
	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	
Order	-0.9903 /0.0011	43	-0.9701 /0.0013	75	-0.9426 /0.0164	43	-0.8804 /0.0487	43	-	0.7935 /0.0595	25	0.9584 /0.0101	43	-0.8849 /0.0191	75	-0.9887 /0.0014	43
Caulobacterales	-0.9909 /0.0001	75	-0.9202 /0.0267	14	-0.9131 /0.0110	75	-0.9792 /0.0006	75						-0.8840 /0.0194	25	-0.9856 /0.0003	75
														-0.9213 /0.0090	29	-0.9677 /0.0015	29
Order	-0.9744 /0.0049	43	-0.9346 /0.0063	75	-0.9963 /<0.0001	43	-0.8551 /0.0299	75	-	0.8093 /0.0510	14	0.9756 /0.0045	43	-0.8419 /0.0355	25	-0.8893 /0.0434	43
Rhodospirillales	-0.9427 /0.0048	75	-0.8658 /0.0578	25								0.9188 /0.0096	29	-0.9351 /0.0062	29	-0.8703 /0.0241	75
	0.8574 /0.0290	29														-0.9216 /0.0090	29

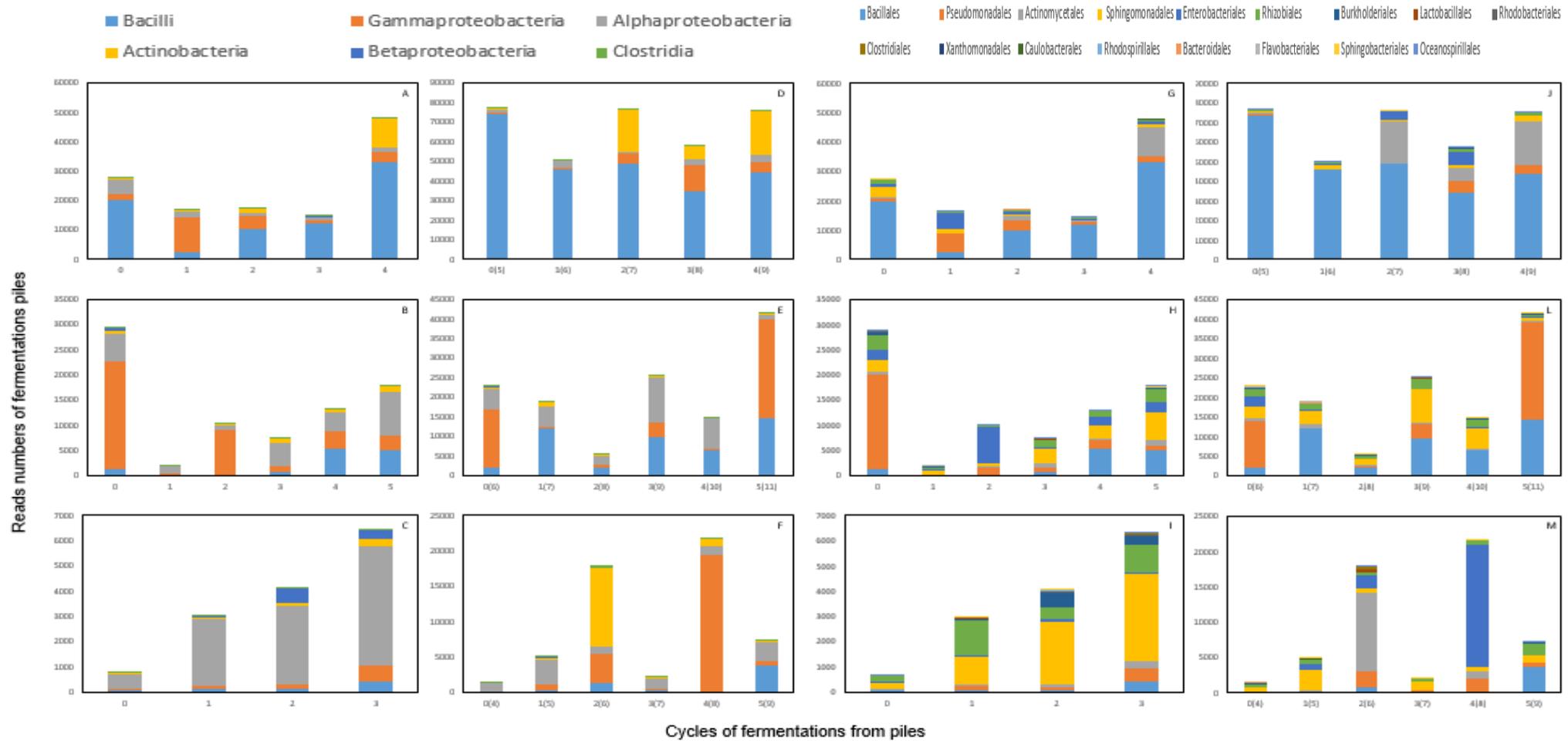
Correlations	NH3		CO2		CH4		O2		L Hum		pH		RH		Temp	
	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile
Order	-0.9784 /0.0007	75	-0.9734 /0.0011	75	-0.9346 /0.0063	75	-0.9888 /0.0002	75	- /0.0399	88	0.9384 /0.0182	14	0.9853 /0.0147	88	-0.9810 /0.0005	75
Bacteroidales	-0.9890 /0.0014	14			-0.9684 /0.0067	14	-0.9763 /0.0043	14	- /0.0059	14			0.9381 /0.0183	14		
Order	-0.9843 /0.0004	75	-0.9487 /0.0039	75	-0.9182 /0.0097	75	-0.9788 /0.0007	75	- /0.0224	14	0.8062 /0.0527	29	-0.9134 /0.0109	75	-0.9904 /0.0001	75
Flavobacteriales	0.9805 /0.0195	88	-0.9465 /0.0147	14	-0.9320 /0.0210	14	0.9887 /0.0113	88	0.9543 /0.0031	25			0.9427 /0.0163	14	0.9801 /0.0199	88
			0.9009 /0.0142	25	0.8604 /0.0278	25	0.8765 /0.0219	25					0.9849 /0.0003	25	0.9767 /0.0008	25
													-0.9489 /0.0038	29	-0.9792 /0.0006	29

Correlations	NH3		CO2		CH4		O2		L Hum		pH		RH		Temp		
	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	r/P	Pile	
Order	-0.9683 /0.0015	75	-0.9475 /0.0041	75	-0.8656 /0.0579	43	-0.9035 /0.0135	75	-	0.9629 /0.0371	88	0.8331/ 0.0394	29	-0.9504 /0.0132	43	-0.9127 /0.0111	75
Sphingobacteriales	-0.9110 /0.0314	14	-0.9011 /0.0367	14	-0.9445 /0.0155	14	0.8322 /0.0398	25	-	0.9463 /0.0148	14		0.9978 /< 0.0001	88	0.9434 /0.0047	25	
			0.8702 /0.0242	25	0.8124 /0.0495	25			0.8968 /0.0154	25			0.9467 /0.0147	14	-0.9638 /0.0019	29	
													0.9899/0 .0002	25			
													-	0.9495/0 .0038	29		
Order	-0.9924 /< 0.0001	75	-0.9649 /0.0018	75	-0.9131 /0.0110	75	-0.9845 /0.0004	75						-0.8983 /0.0150	75	0.8776 /0.0504	43
Oceanospirillales			-0.8549 /0.0300	29	-0.8712 /0.0238	29	-0.8759 /0.0221	29								-0.9892 /0.0002	75

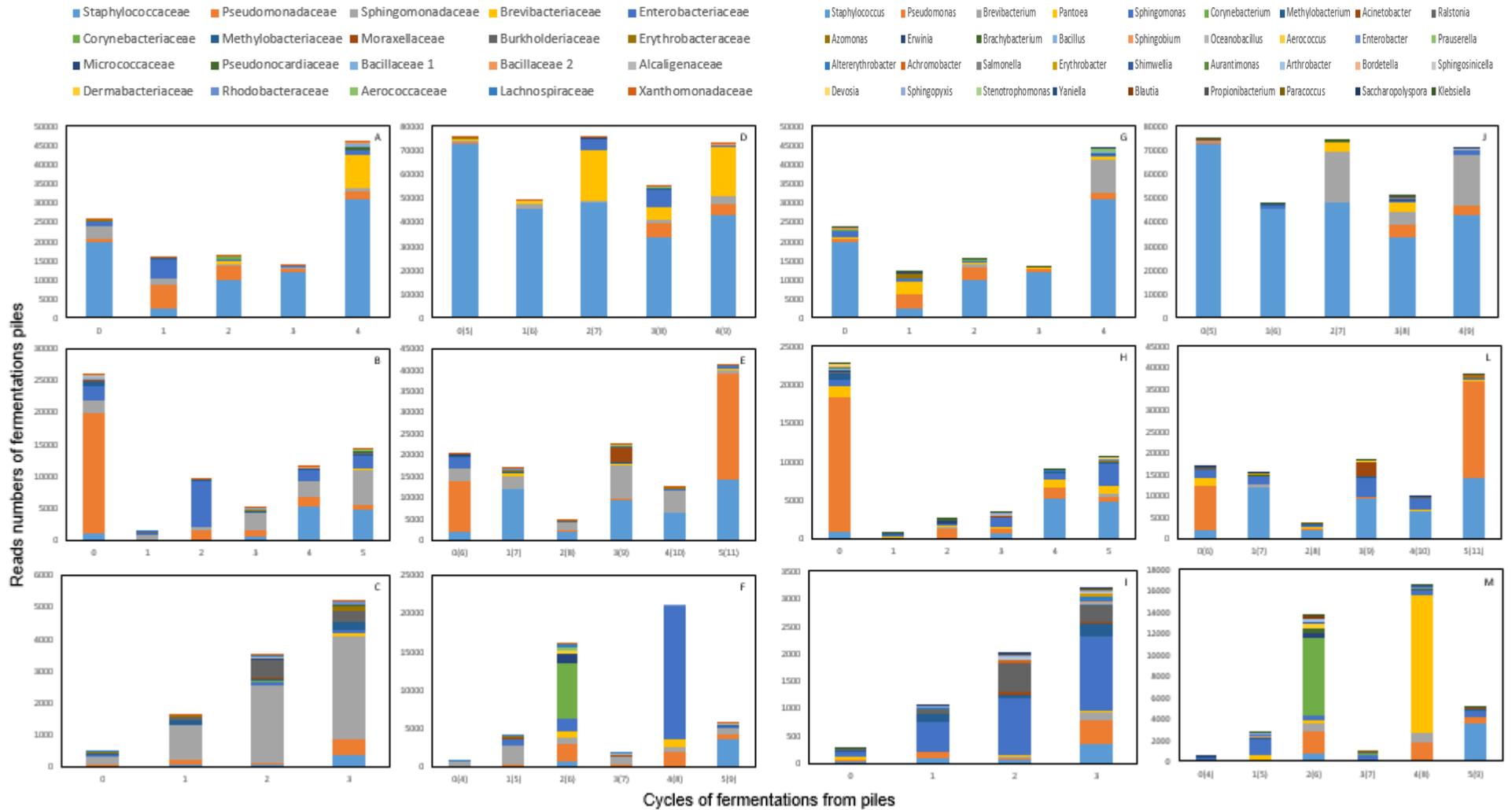
**Figure S1.** Number of reads during cycles of fermentation assigned to different phyla of bacteria in three different fermentation small piles (A – small pile 43, B - small pile 75 and C - small pile 88) and three large piles (D – large pile 14, E – large pile 25 and F large pile 29).



**Figure S2.** Number of reads obtained during the cycles of fermentation assigned to different classes (A, B, C, D, E and F) and orders (G, H, I, J, L and M) of bacteria in three different fermentation piles (A, G – small pile 43; B, H - small pile 75; C, I - small pile 88; D, J – large pile 14; E, L – large pile 25 and F, M – large pile 29).



**Figure S3.** Number of reads obtained during the cycles of fermentation assigned to different families (A, B, C, D, E and F) and genera (G, H, I, J, L and M) of bacteria in three different fermentation piles (A, G – pile 43; B, H - pile 75; C, I - pile 88; D, J – large pile 14; E, L – large pile 25 and F, M – large pile 29).



**ARTIGO 2****DENSIDADES POPULACIONAIS DE MICRORGANISMOS DA FERMENTAÇÃO  
DO TABACO (*Nicotiana tabacum*)**

**DENSIDADES POPULACIONAIS DE MICRORGANISMOS DA FERMENTAÇÃO  
DO TABACO (*Nicotiana tabacum*)**

**Santana-Filho, D.M.<sup>1\*</sup>, Svercal, M.<sup>2</sup>, Dorea, C.A.B.<sup>3</sup>, Souza, J.T.<sup>4</sup>**

**<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano**

**<sup>2</sup>Protabaco Agency**

**<sup>3</sup>Universidade Federal do recôncavo da Bahia**

**<sup>4</sup>Universidade Federal de Lavras**

## **Resumo**

A fermentação natural do fumo em pilhas é um processo empírico realizado pelas empresas produtoras. A atuação de microrganismos nesse processo ainda não foi explorada cientificamente. O objetivo desse trabalho foi determinar as densidades populacionais de microrganismos cultivados, realizar uma caracterização físico-química do processo fermentativo e verificar a existência de correlação entre as densidades populacionais de microrganismos fermentadores cultiváveis das folhas de fumo e as variáveis físico-químicas. Para tal, foram coletadas amostras de folhas ao longo dos ciclos fermentativos de quatro pilhas de fumo. As densidades populacionais dos microrganismos e ao mesmo tempo, foram realizadas mensurações de diversos parâmetros físico-químicos. Os dados mostraram que houve um decréscimo nas populações de bactérias com o progresso do processo de fermentação. As populações de fungos são mais altas antes do início da fermentação, desaparecem nos ciclos intermediários e reaparecem nos ciclos finais. A caracterização físico-química do processo fermentativo mostrou variações de acordo com as pilhas, com algumas tendências em comum, como o decréscimo da umidade das folhas, da temperatura interna das pilhas, das concentrações de oxigênio e metano e o aumento da umidade relativa do ar. Observou-se a existência de correlações positivas entre as densidades populacionais de fungos e bactérias e as concentrações de oxigênio e dióxido de carbono e correlações negativas com a temperatura global. No entanto, essas correlações não foram observadas para todas as pilhas estudadas, demonstrando o quanto o processo varia entre as pilhas. Os resultados desse estudo servirão para adicionar dados científicos ao processo de fermentação do fumo da variedade Mata Fina e também para que as empresas produtoras avancem no sentido de padronizar a qualidade do produto final.

**Palavras-chave:** Dinâmica populacional, bactérias, fungos, tabaco, fermentação.

**Abstract**

The natural fermentation of tobacco in piles is an empirical process done by the producing companies. The microbiota that acts in this process has not yet been explored scientifically. The aim of this study was to determine the population densities of the culturable microorganisms, perform a physico-chemical characterization of the fermentation and verify the existence of correlations between the population densities and the physico-chemical variables. To accomplish these objectives, leaf samples were collected in each fermentation cycle of four piles and at the same time several physico-chemical parameters were registered. The data showed a decrease in the densities of bacteria with the progress of the fermentative process. Fungal population densities were higher before the beginning of the fermentation, but these populations disappeared in some of the intermediate cycles and reappeared at the end of the process. The physico-chemical characterization showed variations according to the fermentation pile, with some common tendencies. For example, there was a decrease in the water content of the leaves, the internal temperature of the fermentation piles, the concentrations of oxygen and methane and an increase in the relative humidity of the air. There were positive correlations between the population densities of fungi and bacteria and the concentrations of carbon dioxide and oxygen and negative correlations with the global temperature. However, these correlations were not observed for all piles, demonstrating how variable the fermentation process is among piles. The results of this study add the first scientific data to the fermentation of tobacco Mata Fina and will serve to assist the producing companies to standardize the process in order to produce tobacco batches with an uniform quality.

**Keywords:** Population density, bacteria, fungi, tobacco, fermentation.

## Introdução

A fermentação é muito utilizada para alterar as características de vários produtos, em muitos casos com a intenção de agregar valor a eles. Entretanto, a complexidade desses sistemas justifica a realização de trabalhos que expliquem seu mecanismo de funcionamento (HOSODA et al., 2016). Os microrganismos estão intimamente relacionados com esse processo, atuando tanto na produção de substâncias desejadas como não desejadas que interferem diretamente no sabor, aroma e tempo de prateleira dos produtos.

A quantificação dos microrganismos envolvidos nesse sistema pode ser realizada por meio de estudos de dinâmica populacional, gerando informações sobre a estrutura dessas comunidades no espaço e no tempo (ODUM, 1988). Para isso, é necessário a utilização de métodos capazes de obter informações sobre o efeito de variáveis ambientais nos fatores que alteram o quantitativo de microrganismos nos sistemas naturais, tais como as taxas de emigração, imigração, crescimento e morte (KINKEL, 1997).

Um dos desafios dos pesquisadores que realizam estudos de dinâmica populacional é encontrar ferramentas adequadas para o levantamento e avaliação das informações de trabalhos *in vitro*. No entanto, a densidade populacional parece ser a melhor variável para a quantificação, em laboratório, dos microrganismos cultiváveis. Zhang et al. (2016) obteve êxito na utilização desse parâmetro para determinar o número de bactérias ácido lácticas, coliformes, bactérias aeróbicas, fungos filamentosos e leveduriformes da fermentação para produção de queijo.

No processamento do fumo, a densidade populacional foi o parâmetro utilizado por Qiu et al. (2004) para determinar a população de fungos e bactérias. Assim como ele, Di Giacomo et al. (2007), utilizaram a mesma variável e perceberam que a população de bactérias é maior que a de fungos, e que alguns microrganismos podem reduzir sua população ao ponto de não serem detectados ao longo do tempo. Entretanto, a semelhança dos resultados não pode ser considerada um padrão para todas as fermentações do fumo, porque existem uma variedades delas, aplicadas a diferentes cultivares e em diferentes condições ambientais. Além disso, pode ocorrer prevalência de diferentes espécies, como *Corynebacterium ammoniagenes* segundo Vigliotta et al. (2007), *Bacillus pumilus* e *B. licheniformis* entre as bactérias formadoras de endosporos e *Aerococcus viridans* entre as bactérias ácido-láticas (SU et al., 2011). Su et al. (2011) relatam ainda que a quantidade de táxons dos gêneros

*Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* estiveram entre 65 e 84. Outra dificuldade encontrada nos estudos de comunidades microbianas é correlacionar o crescimento microbiano e variáveis ambientais como pH, temperatura e concentração dos gases envolvidos. Esses fatores físico-químicos podem estar diretamente relacionados com o crescimento microbiano, seja criando condições favoráveis ou inibindo-o, podendo também levar a sucessões que resultam em comunidades microbianas mais complexas (DUARTE et al., 2010; COUVERT et al., 2017; McFARLAND et al., 2013; HE et al., 2016; HANSEN et al., 1998; RUIZ-SÁNCHEZ et al., 2017).

Os sistemas fermentativos são os mais utilizados no mundo para obtenção de subprodutos da agricultura e podem ser fonte de novidades taxonômicas e biotecnológicas (SINGHANIA et al., 2009). Alguns processos fermentativos acabam sendo mais estudadas que outras, em função do mercado consumidor do produto final. Uma delas é a fermentação do cacau, matéria prima do chocolate, para a qual já existem informações sobre a atuação da população microbiana no seu processamento em diversos países do mundo, como Malásia, Equador e Brasil (MEERSMAN et al., 2013; PAPALEXANDRATOU et al., 2011; PEREIRA et al., 2012). O queijo Tibetano também teve seu microbioma acessado para obtenção de dados de dinâmica populacional (ZHANG et al., 2016). Entretanto, A fermentação do fumo da variedade Mata Fina, realizada pela empresa Danco na cidade de Cruz das Almas-BA, ainda não foi cientificamente explorada. Por ser uma fermentação natural, é um bom sistema a ser estudado.

O objetivo desse trabalho foi coletar dados para realizar um estudo de dinâmica por meio da densidade populacional da fermentação do tabaco da variedade Mata Fina e assim responder as seguintes questões: (i) Qual o melhor meio de cultura para realizar estudos de dinâmica populacional a partir da densidade microbiana da fermentação do fumo? (ii) A população de fungos e bactérias diminui ao longo dos ciclos de fermentação em pilhas do fumo Mata Fina? (iii) Existe correlação entre essas populações e as variáveis físico-químicas envolvidas na fermentação do fumo da variedade Mata Fina.

## Material e métodos

**Pilhas de fermentação e amostragem.** Quatro pilhas pequenas (43, 75, 88 e 38) e quatro pilhas grandes (14, 25, 29 e 28) de fermentação de folhas de fumo da variedade Mata Fina foram amostradas na empresa Danco Industria e Comércio de Fumos LTDA., sediada na cidade de Cruz das Almas-BA. As pilhas pequenas de fermentação apresentavam 6.000 kg de folhas e mais tarde foram unidas a duas outras pilhas para compor as pilhas grandes, as quais apresentavam 18.000 kg. As amostragens das folhas foram realizadas em três pontos na diagonal das pilhas de fermentação. Consistiram de duas amostras de cada ponto (um grupo de amostras para determinação da umidade das folhas e um grupo de amostras para ser estocada em geladeira para “backup”) e uma amostra mista composta por folhas dos três pontos para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e isolamento dos microrganismos em laboratório. As amostras foram retiradas durante a fermentação, iniciando-se do ciclo zero (montagem das pilhas) e a cada viragem (ciclos subsequentes), as quais ocorriam quando a temperatura das pilhas encontrava-se ao redor de 50°C. As amostragens seguiram até o final da fermentação, caracterizada pela estabilidade da temperatura em valores mais baixos. As amostras foram retiradas de três pontos diferentes na diagonal, no interior de cada pilha, misturadas para formar uma única amostra, embaladas adequadamente e levadas ao laboratório.

**Densidades populacionais.** A determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) e o isolamento foram realizados utilizando os meios Minimal Agar (MA) e Tobacco Base Agar (TBA) para bactérias e Minimal Agar com antibiótico (MA\*), Tobacco Base Agar com antibiótico (TBA\*) e Yeast Extract Peptone Dextrose com antibiótico (YEPD) (\*suplementados com cloranfenicol) para fungos. Para o preparo do TBA, 40g de pequenos pedaços das folhas amostradas das pilhas em estudo foram adicionadas à 400 mL de H<sub>2</sub>O destilada e mantida sob agitação a 150 rpm por 20 min. O extrato obtido foi filtrado com filtros Whatman nº 1 (filtros de nitrocelulose de 0,22 µm). Desse extrato foram retirados 50 mL e adicionados a 450 mL de água destilada para uma diluição de 10 vezes. Em seguida, foram adicionados 15 g / L de Bactoagar (Difco). O meio ágar mínimo (MA – Minimal Agar) foi preparado de acordo com Francy et al. (1991), onde se propôs utilizar 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1 g NaCl; 0,01g FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O; 0,2 g MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O; 0,002 g MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 0,01 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,03 g extrato de levedura; 0,03 g glucose, 15 g de ágar para cada 1 L

de meio produzido. Para os meios suplementados com antibiótico foram adicionados 100 µg/mL de cloranfenicol. O meio yeast extract peptone dextrose (YEPD) foi utilizado para o cultivo de fungos leveduriformes. A composição utilizada foi de 1 % de extrato de levedura, 1 % de peptona, 2 % de dextrose e 2 % de ágar.

Um montante de 40 g das folhas de cada amostra foi cortado em pequenos pedaços, adicionados a 400 mL de água destilada, agitados por 20 min a 150 rpm para produção do extrato. Uma alíquota de 1 mL foi retirada para ser submetido à diluição seriada. As diluições de 0-3 foram semeadas em meios TBA e MA com antibiótico cloranfenicol, e as diluições 1-5 nos mesmos meios, sem antibiótico. Após o semeio, as placas foram colocadas sob duas condições, temperatura ambiente (25 °C), denominada de condição mesofílica, e em condições termofílicas (50 °C), para todas as pilhas. A contagem das unidades formadoras de colônias bacterianas foi realizada após 24-48 h de incubação, e ao longo de uma semana para as colônias de fungos. Os dados foram convertidos para a escala logarítmica antes de ser submetidos à análise estatística. Na determinação da densidade populacional de fungos, os dados obtidos das pilhas 43, 75, 88, 14, 25 e 29 (ano 2013) foram descartados por apresentarem muita variação e/ou por serem nulos. Nesse estudo foram utilizados apenas dados da pilha 38 e 28 (ano 2014).

**Parâmetros físico-químicos.** Os fatores físico-químicos mensurados da fermentação do fumo foram: umidade das folhas (% SH), pH, umidade e temperatura do ar (% AR; Ta °C), temperatura interior (Ti °C), temperatura nas extremidades (Te °C), temperatura global (Tg °C), teor de gases (ppm NH<sub>3</sub>; % CO<sub>2</sub>; % O<sub>2</sub>; ppm CH<sub>4</sub>).

A umidade das folhas foi obtida pela diferença entre massa fresca obtida por pesagem no momento da amostragem e massa seca das folhas obtidas com a pesagem após 24 horas sob a temperatura de 100 °C. O potencial hidrogeniônico (pH) foi medido com um peagâmetro, no extrato utilizado para produção do meio de cultura a 2 %. A umidade e temperatura da atmosfera ao redor das pilhas ou do ar foram mensuradas diariamente com um termohigrômetro. As temperaturas foram medidas por meio de termômetros específicos para cada caso. A temperatura interior foi monitorada diariamente com termômetro comum instalado no centro das pilhas de fermentação, a temperatura nas extremidades medida utilizando termômetro com sonda, inserido na parte frontal e lateral, sempre em três pontos equidistantes na base, no meio e no alto das pilhas, e a temperatura global foi constituída pela média

dos valores de temperatura interna e temperatura das extremidades das pilhas. Os teores dos gases que compõem a atmosfera gasosa das pilhas em fermentação foram obtidos por meio do medidor de gases X-am 7000 (Drager), com sensores para medir níveis de amônia ( $\text{NH}_3$ ), gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ), oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) e metano ( $\text{CH}_4$ ). As variáveis unidades formadoras de colônias e umidade das folhas foram obtidas ao final de cada ciclo, enquanto que as demais foram mensuradas diariamente.

**Análise dos dados.** Os dados foram analisados por testes de média de todas as variáveis mensuradas e testes de correlação de Person e entre as variáveis físico-químicas e a densidade populacional de bactérias e fungos utilizando-se o programa BIOESTAT 5.0.

## Resultados

**Densidades populacionais de bactérias.** De acordo com a análise de variância não existem diferenças significativas com relação às densidades bacterianas obtidas nos meios de cultura TBA ou MA, entre as pilhas de fermentação estudadas, sejam elas pequenas ou grandes, tanto nas condições mesofílicas ( $25\text{ }^\circ\text{C}$ ) como nas termofílicas ( $50\text{ }^\circ\text{C}$ ) (Figura 1). Considerando todas as pilhas, a 43 apresentou maior número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias. Entre as pilhas grandes, a 14 apresentou maior número de UFC. Comparando-se os ciclos, a análise de variância mostrou existir diferenças significativas entre eles. O teste de Tukey mostrou que a diferença é evidenciada quando comparados ciclos iniciais de fermentação com os finais. A densidade populacional de bactérias foi maior nos ciclos iniciais, com exceção das pilhas 29 e 28, onde o número de UFC foi maior. Considerando-se as pilhas pequenas, em todos os casos o número de unidades formadoras de colônias diminuiu ao longo dos ciclos. Nas pilhas grandes apenas a pilha 25 apresentou maior número de UFC no ciclo final (Tabela 1). A pilha 88 entre as pequenas e 28 entre as grandes foram as que apresentaram os menores números de UFC. Na figura 2 pode ser visto que não há diferença entre as médias dos diferentes meios de cultura testados para uma mesma pilha, independente da condição.

O comportamento polinomial dos dados de UFC das bactérias pode ser visto em todos os meios testados, entretanto ao longo dos ciclos há um decréscimo na densidade populacional na maioria das pilhas (Figura 3).

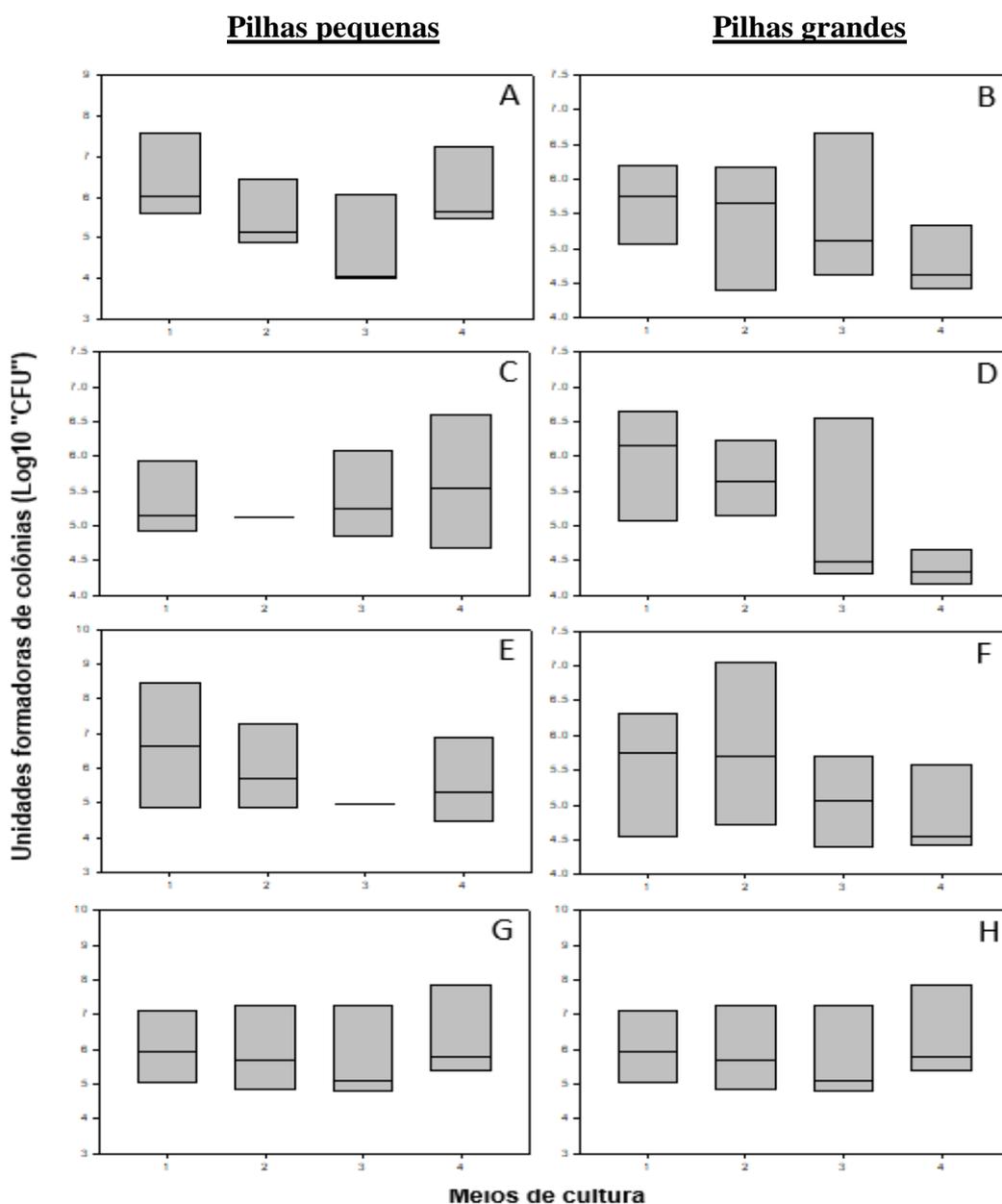


Figura 1. Box-Plot das médias de densidades populacionais bacterianas das pilhas. Nas figuras A, C, E e G os boxes 1, 2, 3 e 4 representando as pilhas pequenas 43, 75, 88, 38 e nas figuras B, D, F e H os boxes de números 1, 2, 3 e 4 representam as pilhas grandes 14, 25, 29 e 28. Os dados foram transformados para a escala logarítmica. A – B - contagens obtidas nos meios de cultura MA em condições mesofílicas; C – D - Contagens no meio de cultura MA em condições termofílicas; E – F - contagens no meio de cultura TBA em condições mesofílicas; G – H - contagens no meio de cultura TBA em condições termofílicas; Nos gráficos as médias estão representadas na linha no interior do box, os desvios são as linhas limítrofes dos boxes. Os valores de mínima e máxima dos dados coincidem com os desvios em todas as pilhas apresentadas no gráfico, não valores extremos fora dos desvios.

Tabela 1: Médias de densidade populacional de bactérias para cada ciclo de fermentação, médias por pilha, desvio padrão (DesvPad), erro padrão (ErroPad) e significância do teste de F para os dados.

Ciclos Pilhas	0	1	2	3	4	5	Média/Pilha	DesvPad	ErroPad	P-valor
43	7.76	5.87	5.11	5.93	5.61	-	6.06	1.01	0.45	0.0025
75	7.65	4.90	6.18	5.14	4.95	6.09	5.82	1.06	0.43	0.0416
88	7.93	4.52	5.79	4.82	-	-	5.76	1.54	0.77	0.0416
38	7.61	5.56	5.39	5.06	-	-	5.91	1.15	0.58	0.0002
14	6.06	5.93	5.98	6.78	4.85	-	5.92	0.69	0.31	0.0009
25	6.67	5.60	4.40	4.74	5.41	6.11	5.49	0.84	0.34	0.0104
29	5.09	5.08	5.52	4.39	4.57	6.65	5.22	0.81	0.33	0.0051
28	4.56	5.28	4.56	4.37	4.39	5.40	4.76	0.46	0.19	0.0002

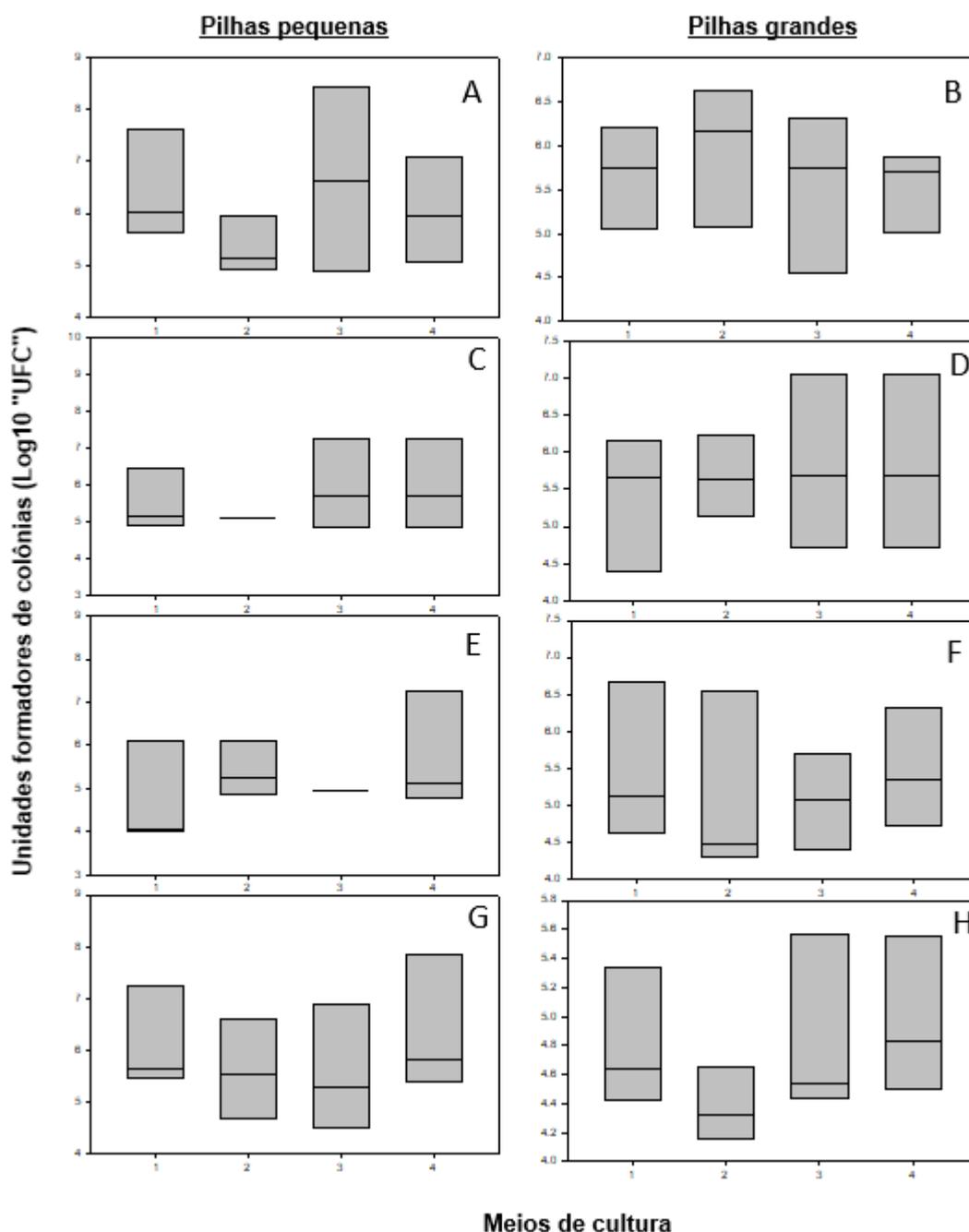


Figura 2: Box – Plot dos diferentes meios de cultura em diferentes pilhas de fermentação de folhas de fumo. 1 – meio MA na condição mesofílica; 2 – meio MA condições termofílicas; 3 - meio TBA sob condições termofílicas e 4 – meio TBA sob condições mesofílicas. As pilhas pequenas são formadas por 6000 kg de folhas e as pilhas grades por 18000 kg. A – pilha 43, C – pilha 75, D – pilha 88 e E – pilha 38. B – pilha 14, D – pilha 25, F – pilha 29 e H – pilha 28.

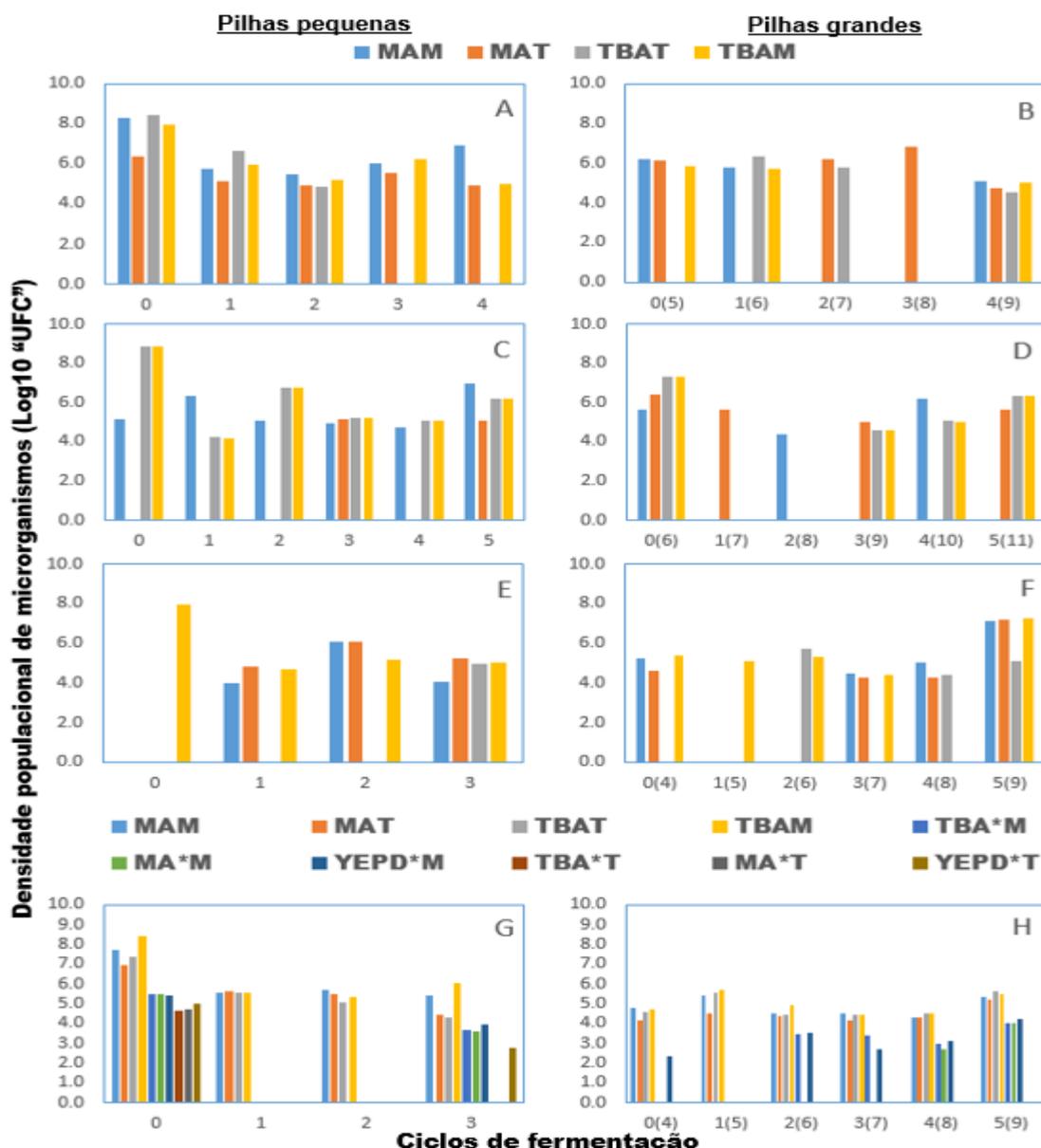


Figura 3: Unidades formadoras de colônias (densidades populacionais de microrganismos) ao longo dos ciclos da fermentação do fumo em pilhas pequenas de 6000 kg e grandes de 18000 kg. A, C, E e G correspondem as pilhas pequenas 43, 75, 88 e 38; em B, D, F e H correspondem as pilhas grandes 14, 25, 29 e 28. O número de unidades formadoras de colônias de bactérias está sendo apresentado no Meio Mínimo nas condições Mesofílicas (MAM), Meio Mínimo nas condições Termofílicas (MAT), Tabaco Base Ágar nas condições Mesofílicas (TBAM), Tabaco Base Ágar nas condições Mesofílicas (TBAT), e para fungos no Meio Mínimo com antibiótico Clorafenicol nas condições Mesofílicas (MA\*M), Meio Mínimo com antibiótico Clorafenicol nas condições Termofílicas (MA\*T), Yeast Extract Peptone Dextrose nas condições Mesofílicas (YEPD\*M) e Yeast Extract Peptone Dextrose nas condições Termofílicas (YEPD\*T).

**Densidades populacionais de fungos.** Foram utilizados dados apenas da pilha 38 e 28. As maiores média das densidades populacionais de fungos foram obtidas, tanto para as condições mesofílicas como para as termofílicas, no meio YEPD. Houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre o número de unidades formadoras de colônias obtidos nas condições mesofílicas em relação às condições termofílicas (Tabela 2) nos diferentes meios utilizados, sendo que nesta última condição, em todos os meios de cultura, os valores foram inferiores às condições mesofílicas. A utilização de gráficos box-plot nessa sessão foi impossibilitada pela escassez de dados em alguns ciclos fermentativos, principalmente na condição termofílica, como pode ser visto na figura 3, itens G e H.

As maiores densidades de fungos foram observadas no ciclo inicial para a pilha 38 (pequena) e no ciclo final na pilha 28 (grande) nas condições de avaliação para todos os meios de cultura utilizados. Houve diferenças significativas nos testes de comparação de médias entre os ciclos ( $p < 0,01$ ) para a pilha 38, principalmente entre o ciclo inicial e os ciclos finais, mas não houve diferença significativa para a pilha 28.

No caso dos fungos, a população desaparece em alguns ciclos fermentativos. Na pilha pequena há uma redução significativa do ciclo inicial para o final. Entretanto, na pilha grande, não existe diferença significativa entre os dados dos ciclos iniciais e finais (Tabela 3).

Tabela 2: Médias e erros padrões da densidade populacional de fungos para a pilha 38 obtida em diferentes meios de cultura sob diferentes condições de incubação.

Condição	Meio	Média	Erro padrão médio
Mesofílica (25°C)	TBA*	2.291	0.075
Mesofílica (25°C)	MA*	1.586	0.041
Mesofílica (25°C)	YEPD*	2.533	0.107
Termofílica (50°C)	TBA*	0.466	0.015
Termofílica (50°C)	MA*	0.472	0.006
Termofílica (50°C)	YEPD*	0.777	0.009

Tabela 3: Médias de densidade populacional de fungos ao longo dos ciclos nas pilhas de fermentações.

Ciclos	0	1	2	3	4	5	p-valor
Pilhas							
38	5.1	0.0	0.0	2.3			< 0.0001
28	0.4	0.0	1.2	1.0	1.5	2.0	0.2661

**Caracterização físico-química das pilhas.** A análise de variância dos dados de cada ciclo, dentro de cada pilha, não foram significativas para o pH. Entretanto houve diferença significativa quando os testes estatísticos foram realizados com as médias de pH das pilhas estudadas ( $p < 0,001$ ). O pH das folhas de fumo variou durante o processo entre 5,8 e 7,3, mostrando uma variação do meio de ácido a ligeiramente básico (Figura 4).

A umidade das folhas foi maior nas pilhas pequenas (25,6) em relação as grandes (21,3). Os testes estatísticos mostraram haver diferenças significativas entre a humidade das pilhas avaliadas ( $p < 0,0001$ ), mas o teste de Tukey mostrou que essas diferenças ocorrem entre pilhas pequenas e grandes.

As médias da temperatura interna nas pilhas avaliadas ficaram entre 31 e 42 °C. Não houve diferenças significativas entre as temperaturas das pilhas avaliadas, apesar de existirem diferenças entre as temperaturas dos ciclos dentro de cada pilha ( $p = 0,0154$ ).

Os níveis de amônia não apresentaram diferenças significativas entre os ciclos de fermentação, mas houve diferença significativa entre as pilhas estudadas ( $p = 0,0037$ ). Os valores médios variaram entre 9,5 e 37 ppm. Também houve diferenças significativas entre os níveis de O<sub>2</sub> consumidos nas pilhas ( $p = 0,0172$ ). O teor variou entre 1,5 e 9,4 %, e as pilhas pequenas apresentam maiores valores que as grandes. Os níveis de dióxido de carbono diminuíram ao longo dos ciclos em todas as pilhas, entretanto os testes estatísticos não apresentaram diferenças significativas entre os ciclos de fermentação, mas apresentaram diferenças entre as pilhas ( $p = 0,05$ ). A média de metano apresentado pelas pilhas pequenas foi de 1440,5 ppm, enquanto que as pilhas grandes tiveram médias de 995,4 ppm. Os testes estatísticos não mostraram diferenças significativas entre os ciclos das pilhas, nem entre pilhas. A

umidade relativa do ar foi diferente entre as pilhas monitoradas ( $p < 0,0001$ ), e os valores estiveram entre 42,8 e 84,9 %.

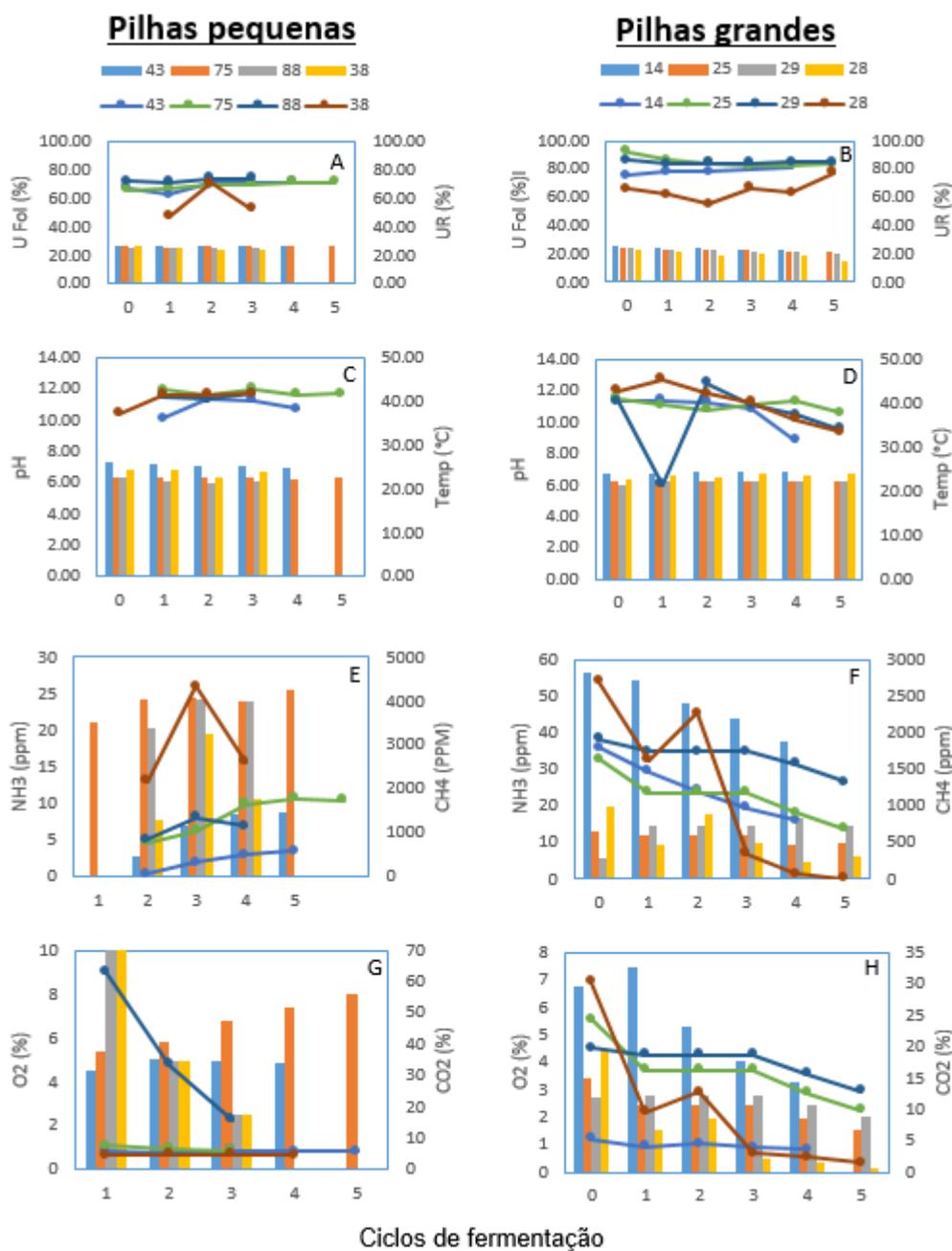


Figura 4: Dados físico-químico ao longo dos ciclos da fermentação do fumo mata fina em pilhas pequenas e em pilhas grandes: A e B - umidade das Folhas e umidade relativa do ar, C e D - pH e temperatura, E e F - amônio (NH<sub>3</sub>) e metano (CH<sub>4</sub>) e G e H - oxigênio e gás carbônico (CO<sub>2</sub>) em pilhas pequenas e grandes, respectivamente.

**Relação entre densidades populacionais e condições ambientais.** Foram encontradas muitas correlações entre as variáveis físico-químicas e a densidade populacional de fungos e bactérias, mas na maioria dos casos, as correlações não ocorrem em todas as pilhas. Exceto pelos resultados apresentados quando correlacionados a densidade populacional bacteriana em condições mesofílicas e as variáveis nível de amônia (NH<sub>3</sub>), metano e temperatura. Nesse caso, as correlações negativas se repetiram nas quatro pilhas pequenas avaliadas, com probabilidades inferiores a 5%. Todos os meios de cultura apresentaram alguma correlação com alguma variável físico-química, inclusive os meios seletivos para fungos. Nesse caso tanto a temperatura como o nível de metano correlacionaram negativamente com a densidade populacional tanto na pilha pequena quanto na pilha grande nas condições mesofílicas no meio mínimo. As pilhas menores apresentaram mais variáveis físico-químicas correlacionando com a densidade populacional que as grandes tanto para fungos como para bactérias (Tabela 4).

## **Discussão**

Nesse estudo abordou-se pela primeira vez a dinâmica de microrganismos cultiváveis em pilhas de fermentação tradicional de fumo da variedade Mata Fina. Nesse trabalho foi possível verificar que a população de bactérias decresce ao longo dos ciclos de fermentação nas pilhas menores. Por outro lado, apesar de existirem diferenças significativas entre os ciclos das pilhas grandes, não há indícios de que a população diminua nessas pilhas. No caso das pilhas menores, onde as variações físico-químicas são mais intensas, a população diminui, enquanto que nas pilhas grandes, nos ciclos finais, a população de microrganismos se reestabelece e em algumas pilhas apresentam densidade populacional maior nos ciclos finais do que nos iniciais. É válido ressaltar que as pilhas grandes são formadas pela junção de pilhas pequenas que já foram submetidas a no mínimo três ciclos de fermentação.

A densidade populacional de fungos é menor que a bacteriana, e sofre mais os efeitos negativos das variações ambientais. Em vários ciclos de fermentação não foi possível contar unidades formadoras de colônias de fungos, isso porque eles simplesmente desaparecem ao longo do processo, reaparecendo nos ciclos finais, onde os efeitos da temperatura, dos gases, umidade, entre outras, são mais amenos.

Os resultados de densidade bacteriana obtidos nas pilhas menores corroboram com os achados de vários autores, os quais defendem que a população microbiana diminui ao longo do tempo e que a população de bactérias é maior que a de fungos (QIU et al., 2004; DI GIACOMO et al., 2007; VIGLIOTTA et al., 2007). No entanto, em nosso trabalho, os resultados de algumas pilhas grandes foram contrários.

As populações baixas de fungos em relação as de bactérias podem ser explicadas pela menor resistência desses a altas temperaturas da fermentação do fumo (50 °C), principalmente os fungos filamentosos. Esses reaparecem nos ciclos finais de fermentação, devido a temperatura não subir tanto como nos iniciais, o que cria um ambiente propício ao reaparecimento desses microrganismos. De acordo com alguns trabalhos, a quantidade de esporos de fungos decresce à medida que a temperatura aumenta e fungos termofílicos sobrevivem entre intervalos de 8 a 45 °C (PITT and HOCKING, 2009).

Apesar de não conseguirmos correlações que se repetissem em todas as pilhas, é importante ressaltar que as variáveis físico-químicas tem papel importante na seleção de microrganismos durante os processos fermentativos. Também é válido lembrar que nosso trabalho trata-se de avaliação de um sistema ambiental, natural, sem nenhum controle externo. O que torna as correlações encontradas importantes do ponto de vista ecológico. Todas as variáveis apresentaram em alguma pilha ou condição, correlação com a densidade populacional de fungos e bactérias. Entre as correlações podemos citar aquelas que ocorreram com a umidade das folhas, pH e UR%, importantes para manutenção das células e germinação de esporos, condicionamento ambiental e incremento de indivíduos durante as viragens das pilhas, respectivamente.

As variáveis concentração de O<sub>2</sub> e nível de CO<sub>2</sub> apresentaram resultados que se assemelham aos da literatura, apresentando resultados em que a concentração de CO<sub>2</sub> interfere negativamente no crescimento populacional de determinados microrganismos (COUVERT et al., 2017), que podem alterar a composição e a sucessão na estrutura de populações microbianas (McFARLAND et al., 2013), e ainda que não há efeito sobre atividades microbianas (HE et al., 2016).

Nesse estudo o pH das folhas variou de 5,8 a 7,3, o que difere de valores apresentados em trabalhos da fermentação de cacau, que variam de 3,5 a 4,3 (CAMU et al., 2007). O pH pode estar intimamente ligado ao alto nível de CO<sub>2</sub> encontrado na

fração gasosa da fermentação do fumo, um gás que aumenta acidez em sistemas onde é liberado como subproduto (ESTEBAN-TORRES et al., 2015).

A temperatura também é um importante fator relacionado ao incremento populacional microbiano. A temperatura interna interferiu na densidade populacional correlacionando-se negativamente, mas apenas para as pilhas menores. Os intervalos de temperaturas da fermentação do fumo se assemelham aqueles apresentados pela fermentação do cacau, as quais variaram entre 26,3 e 43,5 °C (CAMU et al., 2007).

A amônia também interferiu na densidade populacional de bactérias ou fungos, mas na maioria dos casos em pilhas pequenas. A literatura destaca ação inibitória sobre a população microbiana dessa variável nos trabalhos de Hansen et al. (1998) e Ruiz-Sánchez et al. (2017). Apesar de não utilizarmos nenhum método específico para isolamento de metanogênicas, houve correlações significativas entre a densidade populacional e os níveis de metano nas pilhas pequenas. A fermentação do fumo apresentou elevadas quantidades de metano em alguns ciclos, assim como na fermentação em batelada para produção de biogás com ou sem as metanogênicas representando um número menor na comunidade microbiana (HANREICHA et al., 2013), entretanto essa variável não apresentou correlação com a densidade populacional de bactérias e fungos.

Nesse estudo apresentamos pela primeira vez uma caracterização físico-química e microbiológica do processo de fermentação do fumo da variedade Mata Fina em pilhas.

Tabela 4: Correlações (r de Person) entre as densidades populacionais em diferentes meios de cultura (TBA, MA, YEPD) em diferentes condições (mesofílicas e termofílicas) e as características físico-químicas das pilhas de fermentação de fumo. As pilhas pequenas são representadas com os números 43, 75, 88 e 38, enquanto que as pilhas grandes pelos números 14, 25, 29 e 28. A tabela se estende até a página 92.

Correlações	NH3		CO2		CH4		O2		L Hum		pH		RH		Temp	
	r/P	Pilha	r/P	Pilha	r/P	Pilha	r/P	Pilha								
Mesofílicos	-0.9567 /0.0107	43	-0.9131 /0.0303	43	-0.8745 /0.0523	43	-0.9437 /0.0159	43	0.8747 /0.0522	43	0.9111 /0.0313	43	-0.8625 /0.0270	75	-0.9978 / <0.0001	43
TBA (bacteria)	-0.9823 /0.0005	75	-0.9758 /0.0009	75	-0.9074 /0.0125	75	-0.9892 /0.0002	75	0.955 /0.0449	38	-0.8669 /0.0571	14	-0.9938 /0.0062	38	-0.9674 /0.0016	75
	-0.9926 /0.0074	88			-0.9718 /0.0282	88	-0.9870 /0.0130	88					-0.8654 /0.0580	14	-0.9984 /<0.0001	88
	-0.9628 /0.0372	38			-0.9789 /0.0211	38									-0.9978 /< 0.0001	38
Termofílicos	-0.9705 /0.0061	43	-0.8762 /0.0513	43	-0.8782 /0.0501	43	-0.915 /0.0293	43	0.978 /0.022	38	0.8839 /0.0466	43	-0.8625 /0.0270	75	-0.9787 /0.0037	43
TBA (bacteria)	-0.9823 /0.0005	75	-0.9758 /0.0009	75	-0.9074 /0.0125	75	-0.9892 /0.0002	75					-0.9886 /0.0114	38	-0.9674 /0.0016	75
	-0.9624 /0.0375	38			-0.9753 /0.0247	38									-0.9923 /0.0077	38
Mesofílicos	-0.9222 /0.0257	43	-0.9562 /0.0109	43			-0.9777 /0.004	43	-0.8407 /0.0360	75	-0.9988 /< 0.0001	38	-0.9861 /0.0139	38	-0.9805 /0.0033	43
MA (bacteria)	-0.9642 /0.0358	38	0.8675 /0.0567	14					0.9469 /0.0531	38	-0.8686 /0.0560	14	-0.9268 /0.0235	14	-0.9443 /0.0557	38
	0.8655 /0.0580	14							0.8946 /0.0404	14						

Correlações	NH3		CO2		CH4		O2		L Hum		pH		RH		Temp	
	r/P	Pilha	r/P	Pilha	r/P	Pilha	r/P	Pilha								
Termofílicos	-0.948 /0.0141	43	-0.9238 /0.0249	43	-0.9645 /0.0354	38	-0.9531 /0.0121	43	0.8626 /0.0598	43	0.8899 /0.0431	43	-0.9722 /0.0278	38	-0.9929 /0.0007	43
MA (bacteria)	-0.9568 /0.0432	38	0.8927 /0.0166	25	0.8651 /0.0260	25	0.8782 /0.0213	25	0.9842 /0.0158	38	0.8402 /0.0362	28	0.9579 0.0026	25	-0.9704 /0.0296	38
	-0.9005 /0.0143	28	-0.8706 /0.024	28	-0.8534 /0.0306	28	-0.8748 /0.0225	28	0.9542 /0.0031	25						
									-0.8628 /0.0269	28						
Mesofílicos			-0.9713 /0.0287	38			-0.9579 /0.0421	38	-0.9687 /0.0015	28	0.9069 /0.0126	28			-0.9696 /0.0304	38
TBA*(fungos)			-0.8966 /0.0155	28			-0.9007 /0.0143	28							-0.8015 /0.0551	28
Mesofílicos	-0.8036 /0.0540	28	-0.9732 /0.0268	38	-0.9090 /0.0120	28	-0.9602 /0.0398	38					-0.9509 /0.0491	38	-0.9642 /0.0358	38
YEPD (fungos)															-0.8379 /0.0372	28
Mesofílicos			-0.971 /0.029	38	-0.9355 /0.0645	38	-0.9574 /0.0426	38	-0.8299 /0.0409	28			-0.9576 /0.0424	38	-0.9705 /0.0295	38
MA* (fungos)					-0.8174 /0.0469	28									-0.9351 /0.0062	28
Termofílicos TBA* (Fungos)	-0.9532 /0.0468	38			-0.972 /0.0279	38			0.9536 /0.0464	38			-0.9906 /0.0094	38	-0.9999 /< 0.0001	38
Termofílicos MA* (fungos)	-0.9532 /0.0468	38			-0.972 /0.0279	38			0.9536 /0.0464	38			-0.9906 /0.0094	38	-0.9999 /< 0.0001	38
Termofílicos YEPD (fungos)			-0.9659 /0.0341	38	-0.9459 /0.0541	38	-0.9514 /0.0486	38					-0.9674 /0.0326	38	-0.9797 /0.0203	38

### Referências bibliográficas

Camu, N. et al. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied And Environmental Microbiology* 73: 1809–1824, 2007.

Couvert, O.; Guégan, Sté.; Hézard, B.; Huchet, Vé.; Lintz, A.; Thuault, D.; Stahl, Valé. Modeling carbon dioxide effect in a controlled atmosphere and its interactions with temperature and pH on the growth of *L. monocytogenes* and *P. fluorescens*. *Food Microbiology*, 2017. Doi: 10.1016/j.fm.2017.07.003.

Di Giacomo, M. et al. 2007. Microbial community structure and dynamics of dark fire-cured tobacco fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 73:825–837. Doi: 10.1128/AEM.02378-06.

Duarte, S.; Pascoal, C.; Alves, A.; Correia, A.; Cássio, F.; Assessing the dynamic of microbial communities during leaf decomposition in a low-order stream by microscopic and molecular techniques. *Microbiological Research* 165:351—362, 2010. Doi: 10.1016/j.micres.2009.06.002.

Esteban-Torres, M.; Mancheno, J.M.; Las Rivas,B.; Munoz, R. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. *LWT - Food Science and Technology* 60:246-252, 2015. Doi: 10.1016/j.lwt.2014.05.063.

Francy, D. S.; Thomas, J. M.; Raymond R. L.; Ward, C. H. Emulsification of hydrocarbon by surface bacteria. *J Industrial Microbiol* 8: 237-246, 1991.

Hanreicha, A. et al. Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation. *Systematic and Applied Microbiology* 36:330–338, 2013. Doi: 10.1016/j.syapm.2013.03.006.

Hansen, K. H.; Angelidaki, I.; Ahring, B. K. Anaerobic digestion of swine manure: Inhibition by ammonia. *War. Res.*, 32:5-12, 1998.

He, W.; Moonis, M.; Chung, H.; Yoo, G. Effects of high soil CO<sub>2</sub> concentrations on seed germination and soil microbial activities. *International Journal of Greenhouse Gas Control* 53:117–126, 2016. Doi: 10.1016/j.ijggc.2016.07.023.

Hosoda, S. et al. Population–reaction model and microbial experimental ecosystems for understanding hierarchical dynamics of ecosystem. *BioSystems*, 140:28–34, 2016. Doi: 10.1016/j.biosystems.2015.12.005.

Kinkel, L. L. Microbial population dynamics on leaves. *Annual Review Phytopathology* 35:327–47, 1997.

McFarland, J. W.; Waldrop, M. P.; Haw, M. Extreme CO<sub>2</sub> disturbance and the resilience of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* 65:274-286, 2013. Doi: 10.1016/j.soilbio.2013.04.019.

Meersman, E., et al. Detailed analysis of the microbial population in Malaysian spontaneous cocoa pulp fermentations reveals a core and variable microbiota. *PLoS ONE* 8:1-10, 2013.

Odum, E.P. Rio de Janeiro: Gaunabara, 1988. 434p.

Papalexandratou, Z. et al. Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional Ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Applied And Environmental Microbiology* 77:7698–7714, 2011.

Pereira, G.V.M.; Miguel, M.G.C.P.; Ramos, C.L.; Schwan, R.F. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 5395–5405, 2012.

Pitt, J.I.; Hocking, A.D. The ecology of fungal food spoilage. In: *Fungi and Food Spoilage*. Springer, Boston, MA. Doi: 10.1007/978-0-387-92207-2\_2, 2009.

Qiu, L. et al. changes in biological activity during artificial fermentation of flue-cured tobacco. *Tobacco Science* 46: 24-27, 2004.

Ruiz-Sánchez, J., Campanaro, S., Guivernau, M., Hernández, B., Prenafeta-Boldú, F.X. Effect of ammonia on the active microbiome and metagenome and from stable full-scale digesters. *Bioresource Technology*, 2017. Doi: 10.1016/j.biortech.2017.11.068

Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccolc, C.R., Pandeya, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 44: 13–18, 2009.

Su, C. et al. Diversity and phylogeny of bacteria on Zimbabwe tobacco leaves estimated by 16S rRNA sequence analysis. *Applied in Microbiology and Biotechnology* 92: 1033-1044, 2011. Doi: 10.1007/s00253-011-3367-3.

Vigliotta, G., et al. Nitrite metabolism in *Debaryomyces hansenii* TOB-Y7, a yeast strain involved in tobacco fermentation. *Applied in Microbiology and Biotechnology* 75:633–645, 2007.

Zhang, H. et al. Dynamic changes of microbial communities in *Litopenaeus vannamei* cultures and the effects of environmental factors. *Aquaculture* 455: 97-108, 2016. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.01.011.

**ARTIGO 3**

**Aplicação de leveduras isoladas da fermentação do fumo (*Nicotiana tabacum*)  
na produção de enzimas e no biocontrol da antracnose do mamoeiro  
(*Colletotrichum* sp.)<sup>1</sup>**

**Aplicação de leveduras isoladas da fermentação do fumo (*Nicotiana tabacum*)  
na produção de enzimas e no biocontrol da antracnose do mamoeiro  
(*Colletotrichum sp.*)**

**Santana-Filho, D.M.<sup>1\*</sup>, Svercal, M.<sup>2</sup>, Dorea, C.A.B.<sup>3</sup>, Souza, J.T.<sup>4</sup>**

**<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano**

**<sup>2</sup>Protabaco Agency**

**<sup>3</sup>Universidade Federal do recôncavo da Bahia**

**<sup>4</sup>Universidade Federal de Lavras**

**Resumo:** A fermentação é uma das técnicas microbianas mais antigas de processamento de produtos. O objetivo desse trabalho foi encontrar aplicações biotecnológicas para os microrganismos isolados da fermentação do fumo. Para isso, foram realizados experimentos de produção de enzimas e controle biológico do patógeno causador da antracnose do mamão utilizando leveduras isoladas desse processo fermentativo. Um total de 72 isolados de leveduras foram testadas para a produção de enzimas e um total de 8 foram capazes de produzidas enzimas de interesse industrial. Os testes de controle bilógico realizados com 33 isolados mostraram que 2 possuem potencial para o controle do patógeno causador da antracnose do mamão, *Colletotrichum gloeosporioides*. Mais estudos deverão ser conduzidos para a identificação e desenvolvimento desses isolados para essas aplicações biotecnológicas.

**Palavras-chave:** Biotecnologia, enzimas, biocontrole, *Colletotrichum gloeosporioides*, fermentação.

**Abstract:** Fermentation is one of the oldest microbial technologies used to process products. The goal of this work was to test fungal isolates from the tobacco fermentation in biotechnological applications. To do this, experiments to screen the isolates for enzyme production and biocontrol activity were done. A total of 72 yeast isolates were tested for enzyme production and 8 were able to produce enzymes of industrial interest. The biocontrol screenings with 33 isolates showed 2 with potential to control the antracnosis of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. More studies need to be conducted to identify and develop these isolates for these biotechnological applications.

**Keywords:** Biotechnology, enzymes, biocontrol, *Colletotrichum gloeosporioides*, fermentation.

## Introdução

A aplicação de enzimas produzidas por microrganismos é importante em alguns setores da indústria. Já a utilização de microrganismos como agentes de biocontrole enfrenta alguns problemas, principalmente quando testados em ambientes naturais. Entretanto, uma aplicação não difere da outra em importância para os setores industrial e agrícola. Produzir enzimas capazes de degradar substratos é tão importante quanto controlar agentes causadores de doenças de plantas.

As principais áreas de aplicação de enzimas produzidas são a produção de alimentos, detergentes e fármacos (SINGHANIA et al., 2009). Os produtos mais comuns da utilização dos microrganismos em pesquisa são proteínas farmacêuticas, antibióticos, enzimas e micotoxinas (ADRIO and DEMAIN, 2003). As enzimas podem ter papel importante nos processos de biotransformação como as fermentações, de biorremediação em ambientes naturais contaminados e de biocontrole na agricultura, principalmente de doenças pós-colheita. A produção de enzimas a partir de fungos filamentosos e leveduriformes é comum na indústria (DEMAIN, 2000). As leveduras são muito utilizadas para obtenção de amilase, lipase, pectinase, protease, uréase e quitinase. E a seleção desses microrganismos tornou-se mais fácil pela detecção dessas enzimas em meios de cultura sólidos (HANKIN and ANAGNOSTAKIS, 1975). Outra aplicação microbiana importante é o emprego como agente de biocontrole de doenças de plantas, com grande aceitação para o uso em frutos pós-colheita, por tratar-se de uma alternativa para evitar o uso de produtos químicos mais agressivos à saúde humana (WILSON et al. 1991). O antagonismo microbiano e as substâncias antimicrobianas naturais são consideradas atualmente como importantes tecnologias emergentes não convencionais (MARI et al., 2003).

As leveduras antagonistas podem ser isoladas de ambientes diversos, entre eles da superfície do próprio fruto infectado (LIMA et al., 1998). A efetividade da técnica vem sendo testada em vários patossistemas, entretanto a maior dificuldade é obter resultados satisfatórios *in situ*. Espécies dos gêneros *Pichia* e *Candida* já foram citados controlando *Colletotrichum capsici* em pimentão, com controle variando de aproximados 66 a 93% *in vivo* (CHANCHAICHAOVIVAT et al. 2007). Leveduras isoladas da superfície de frutos infectados do gênero *Candida* e outras não descritas anteriormente foram eficazes em controlar *Colletotrichum sp.*, causador da antracnose em frutos de manga. Experimentos *in vivo* com as espécies de leveduras *Wickerhamomyces anomalus* (strain 422) e *Meyerozyma guilliermondii* (strain 443)

também apresentaram eficácia, com 24,68 e 20,68% de controle do crescimento do fungo, respectivamente. Essas leveduras controlaram o fungo *Colletotrichum gloesporioides*, causador da antracnose do mamão, por micoparasitismo, confirmado por microscopia eletrônica (LIMA et al., 2013). Quando veiculadas com 2 % dos agentes adesivos gelatina e cera de carnaúba o percentual de controle da doença em frutos de mamão foi de 50 % (LIMA et al., 2014).

Os sistemas fermentativos são fonte de diferentes microrganismos de alto potencial biotecnológico, que podem ser utilizados em diversas áreas de produção (SINGHANIA et al., 2009). Muitos estudos estão direcionados à seleção e identificação de indivíduos capazes de atuar como iniciadores desses processos (TAMANG et al., 2016) com o objetivo de padronizá-los para obter produtos finais com uma maior qualidade e uniformidade. No entanto, não existem relatos da aplicação de microrganismos isolados da fermentação do fumo em processos biotecnológicos de produção. Logo, nosso objetivo foi utilizar leveduras isoladas das folhas em fermentação do tabaco da variedade Mata Fina, para produzir enzimas de interesse para a indústria e como agente de biocontrole do fitopatógeno causador da antracnose do mamão, *Colletotrichum* sp.

## **Material e métodos**

**Isolamento do patógeno.** *Colletotrichum* sp. foi isolado do mamão com sintomas de antracnose em placas de Petri contendo meio de cultura de ágar-ágar. Em seguida o gênero foi confirmado por morfologia da colônia utilizando-se microscopia ótica. O isolado foi conservado em meio líquido Batata Dextrose (BD) com concentração de 20% de glicerol à temperatura de -18 °C.

**Meios de cultura.** O meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) foi preparado adicionando-se 20% do ingrediente de batata + 2% dextrose + 3% ágar. No meio de cultura um quinto Batata Dextrose Agar (1/5 BDA) essas quantidades foram divididas por cinco. Para a produção do Papaya Dextrose Agar (PDA) foram utilizados os mesmos procedimentos do preparo do BDA, com a diferença de que utilizaram-se quantidades diferentes de mamão, 1 e 10% ao invés de batata, utilizada no BDA. Em todos os casos a massa do ingrediente principal foi levado ao micro-ondas para retirada do extrato que posteriormente foi misturado à dextrose e ao ágar.

**Isolamento das leveduras.** As leveduras foram isolados de pilhas de fermentação de fumo da variedade Mata Fina na empresa Danco Comércio e Indústria de Fumo Ltda. O isolamento dos microrganismos foi feito a cada ciclo de fermentação, em quatro pilhas diferentes nos meios de cultura Tabaco Base Ágar (TBA), Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD) e Ágar Mínimo (MA), suplementados com antibiótico. Uma solução preparada com 40 g tabaco/400 mL de água destilada foi agitada por 15 min. A solução foi usada para o preparo de diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ , as quais foram plaqueadas nos meios Minimal Agar (MA), Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD) e Tobacco Base Agar (TBA) e submetidos a duas condições de temperatura, temperatura ambiente (25°C) e alta temperatura (45°C) em BOD. Os microrganismos isolados à temperatura ambiente foram classificados como mesofílicos e os isolados a 45 °C foram denominados termofílicos. Colônias com diferentes aspectos, tais como cor, forma e tipo de crescimento foram selecionadas e isoladas. As leveduras foram conservadas em meio líquido Tabaco Base (TB), acrescido de solução de glicerol na concentração 40 % de forma que a solução final apresentasse concentração de 20 % glicerol para armazenagem a -18 °C.

**Preparo da suspensão de levedura.** As leveduras foram reativadas em meio líquido Batata Dextrose (BD), utilizando-se uma alíquota de 20 µL do isolado conservado em 20 % glicerol para 700 µL do meio BD, em seguida foram colocados para crescer no agitador à 100 rpm à temperatura do ambiente por 7-8 dias.

**Seleção de leveduras.** As leveduras isoladas do tabaco foram primeiramente testadas em placas de Petri para verificar a ocorrência de antagonismo entre elas e o isolado de *Colletotrichum* sp. De forma equidistante, o patógeno e os isolados de levedura foram alocados em placas contendo BDA (pH ajustado para 6,0) e mantidas a 25 °C. Depois, os isolados identificados como antagonistas no primeiro “screening” passaram por uma segunda avaliação em triplicata. O antagonismo foi determinado por avaliação visual e mensuração das colônias do fungo nas placas. Os isolados que demonstraram controlar o crescimento das colônias do fungo foram selecionados para testes *in vivo*. Em todos os testes as placas foram incubadas por 8 dias à temperatura ambiente (25 °C).

**Esporulação do fungo.** Foram utilizados meios cultura Papaya Dextrose Agar (PDA) preparados com extrato de mamão 1 % e 10 % + 2 % dextrose + 3% ágar. Os meios foram mantidos em duas condições de fotoperíodo, 12 e 48 h de luz para tentar induzir a esporulação. Ao final dos testes, foram adicionadas 20 mL de água destilada nas placas contendo as colônias do fungo. Foram preparadas suspensões as quais o número de esporos foi determinado por contagem em microscópio estereoscópio. Foram avaliados a produção de esporos nos meios BDA, 1/5 BDA, PDA á 1% e 10%.

**Ensaio de biocontrole *in vivo*.** Após a seleção dos isolados *in vitro*, foram realizados testes de biocontrole da doença *in vivo*. Frutos de mamão foram esterilizados superficialmente com álcool 70 %. Após a secagem, os frutos foram perfurados com estilete esterilizado na profundidade de 1 mm e diâmetro de 6 mm, com três ferimentos por fruto, cada furo se caracterizando como uma repetição. Uma alíquota de 20 µL da suspensão de cada isolado de levedura foi aplicada nos furos. Depois de 30 min, um disco de micélio do patógeno foi colocado sobre cada furo. Os frutos de mamão foram acondicionados em bandejas de plástico contendo algodão umedecido, com a umidade sendo repostada sempre que necessário, e colocados sob bancada nas condições locais (28 °C). Após oito dias, o diâmetro das lesões características do fungo foram mensuradas e comparadas com o tratamento controle, que consistiu da alocação, sobre os furos, de discos de micélios do fungo, inoculados previamente com o meio líquido esterilizado. O “screening” *in vitro* foi realizado em duas etapas: na primeira todos os 33 isolados de leveduras testados foram plaqueados com alíquotas de 20 µl para infestação da superfície das placas de Petri, as quais também receberam a adição de um pequeno disco de micélio. Após 12 dias de avaliações foram selecionados 12 isolados que apresentaram alguma diferença de crescimento em relação ao controle.

**Produção de enzimas líticas.** As leveduras foram crescidas no meio glucose yeast extract peptone agar (GYP) composta por 1 g de glucose, 0,1 g de extrato de levedura, 0,5 g de peptona, 16 g de ágar para 1 L de água destilada com 0,2 % de amido solúvel e pH igual a 6. Para confirmar a produção da enzima amilase observou-se o aparecimento de um halo claro ao redor das colônias. A solução de revelação utilizada foi preparada com 1 % de iodato em 2 % de iodato de potássio. O meio GYP, para verificar áreas amarelas ao redor das colônias das leveduras, que indicavam a

produção de celulase, recebeu a adição de 0,5 % de carboximetilcelulose. Para detecção de pectinase, as leveduras foram semeadas no meio pectina ágar, preparado com 5 g de pectina, 1 g de extrato de levedura, 15 g de ágar para o preparo de 1 L de meio, com ajuste do pH para 5,0. A solução de revelação do halo claro ao redor da colônia foi preparada com 1 % de brometo de hexadecil trimetilamonio (SUNITHA et al., 2013). No caso de detecção de ligninase, pela ocorrência de clareamento do meio ao redor das colônias, foi preparado um meio poly R ágar, com 0,2 % de Poly R, 0,2 % de glucose, 0,1 % de extrato de levedura e 1,6 % de ágar (POINTING, 1999).

**Análise estatística.** Os dados foram analisados por testes de variância e o teste de média de Tukey, com o programa BIOESTAT 5.0.

## **Resultados**

**Seleção de leveduras produtoras de Enzimas.** Um total de 72 isolados foram utilizados nos testes para a detecção da produção de enzimas. Com esses testes foi possível obter oito isolados de levedura com potencial para aplicação na produção enzimática. As enzimas produzidas foram celulase, amilase, pectinase, e a enzima ligninase.

Verificou-se que os isolados SF982 e SF983 são capazes de produzir a enzima celulase; os isolados SF1109 e SF1113 produziram a enzima amilase; os isolados SF962, SF966 e SF981 produziram a enzima pectinase; e os isolados SF973 e SF1113 produziram a enzima ligninase. Apenas o isolado SF1113 foi capaz de produzir duas das enzimas testadas *in vitro* (Tabela 1).

**Testes de esporulação e crescimento mycelial *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*.** A esporulação e o crescimento micelial do fungo foram testados em meios alternativos, pensados para simular o substrato que serviria de suporte para o experimento *in situ*. Para isso, foram preparados meios de cultura com extratos de frutos de mamão, os quais foram comparados com BDA e 1/5BDA nos testes de esporulação e crescimento do micélio.

Os testes serviram para verificar se o fungo esporulava bem e se crescia bem no meio produzido por meio da comparação desse meio chamado de PDA (Papaya Dextrose

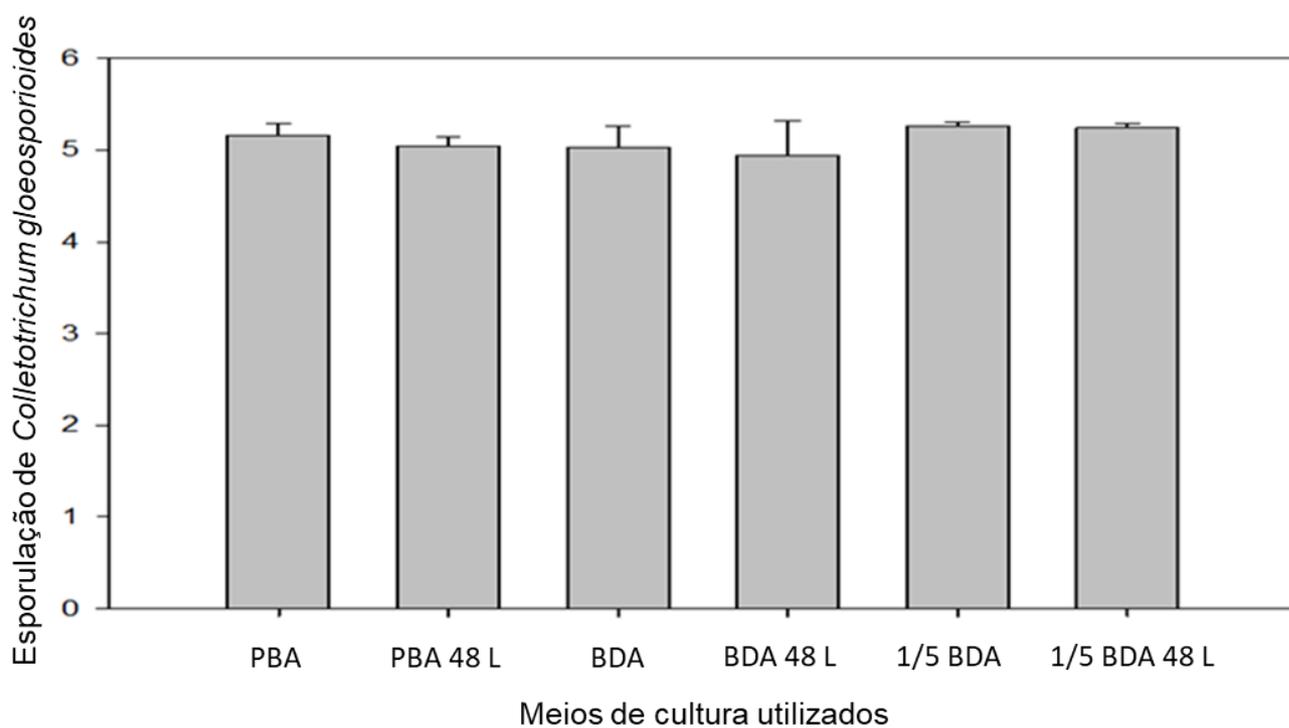
Agar) com um meio rico (BDA) e um meio diluído (1/5BDA). Após os testes estatísticos verificou-se que não houve diferença significativa entre os meios PDA, BDA e 1/5BDA ( $P=0,823$ ) tanto nas condições de 12 h como na condição de 48 h de luz (Figura 1). Entretanto, houve diferenças significativas entre os diâmetros das colônias dos fungos nos meios PBA, BDA e 1/5BDA ( $P<0,0001$ ). O diâmetro das colônias foi maior no PBA do que 1/5BDA ( $P<0.01$ ), maior no BDA do que no 1/5BDA ( $P<0.01$ ), e não houve diferença significativa entre os dados obtidos nos meios PBA e BDA ( $P>0.05$ ) (Figura 2). A repetição do experimento corroborou com os resultados do primeiro.

**Controle biológico de *Colletotrichum* sp. com leveduras isoladas da fermentação do fumo *in vitro* e *in situ*.** Testes *in vitro* antecederam os experimentos *in situ* de controle biológico da antracnose do mamoeiro para que os isolados de leveduras com maior potencial fossem selecionados. Após a seleção dos isolados com melhor potencial o experimento *in vitro* foi repetido mais duas vezes em triplicata (Tabela S1). De acordo com as análises, houve diferenças significativas entre o tratamento controle e as placas contendo os isolados SF962 e SF973 (Tabela S2), os quais apresentaram algum controle sobre o crescimento do fungo.

Os dois isolados que apresentaram melhores resultados, SF962 e SF973, foram selecionados e submetidos a um novo experimento com os meios PDA 1 e 10 %. Esse meio de cultura foi pensado para tentar fornecer aos microrganismos um ambiente quimicamente similar aquele sob qual os mesmos estariam submetidos na superfície do fruto. Os testes estatísticos indicaram a existência de diferenças significativas ( $P=0,01$ ) entre o tratamento controle e os dois isolados testados no meio de cultura PDA 1 %, por outro lado, no meio de cultura PDA 10 % apenas o isolado SF962 apresentou diferença significativa em relação controle (Tabela S3). Apesar disso, o tratamento controle apresentou maior média de diâmetro das colônias que os outros dois tratamentos.

Tabela 1. Isolados produtores de celulase, amilase, pectinase e ligninase.

Enzimas e isolados		T(°C) de isolamento
Celulase	SF982 e SF983	45
Amilase	SF1109 e SF1113	28
Pectinase	SF962, SF966, SF981	45
Ligninase	SF973 e SF1113	45

Figura 1. Esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides* nos meios PBA, BDA e 1/5BDA nas condições de 12 e 48h de luz.

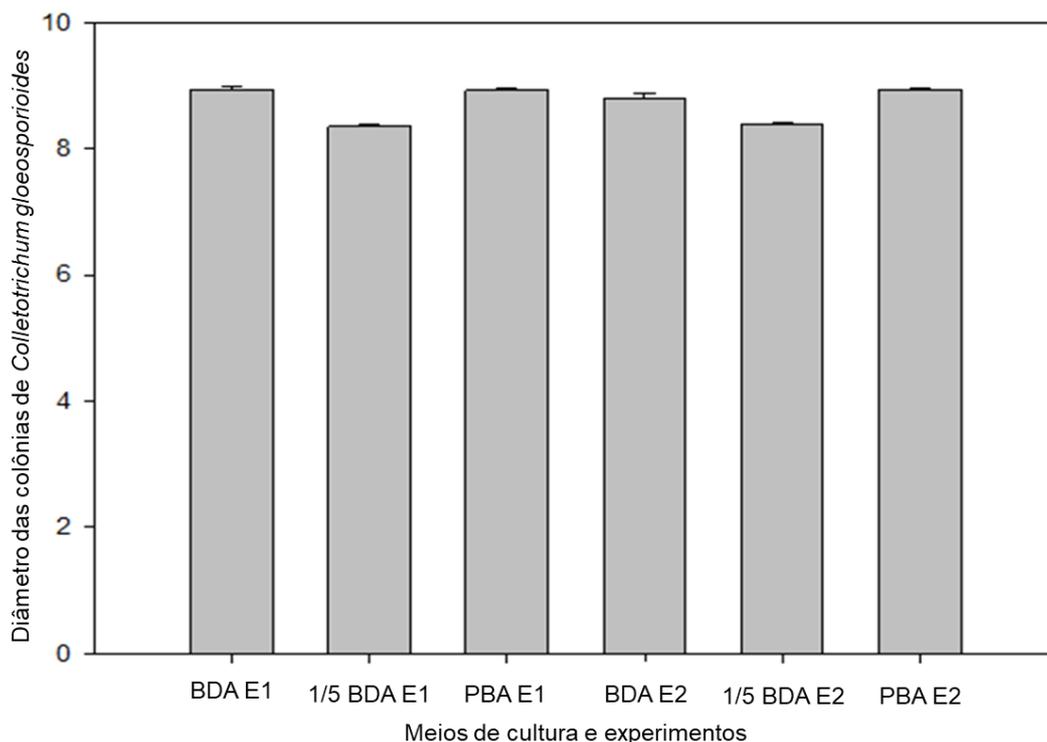


Figura 2. Crescimento de *Colletotrichum* sp. em placas de Petri com meio PDA, BDA e 1/5BDA nos experimentos 1 e 2. Ao lado dos meios de cultura, E1 significa experimento um, enquanto que E2 significa experimento dois.

Nos testes *in situ* ou nos frutos, as lesões ocasionadas pelo fungo foram maiores no tratamento controle, sem a adição de leveduras, do que nos tratamentos em que as leveduras foram inoculadas (Figura 3). Existe variabilidade entre os dados segundo os testes de variância ( $P=0,002$ ) e diferenças significativas entre o tratamento controle e o tratamento com a presença da levedura SF962 ( $P<0,05$ ), bem como entre o controle e o tratamento com a presença da levedura SF973 ( $P<0,01$ ) segundo o teste de Tukey.

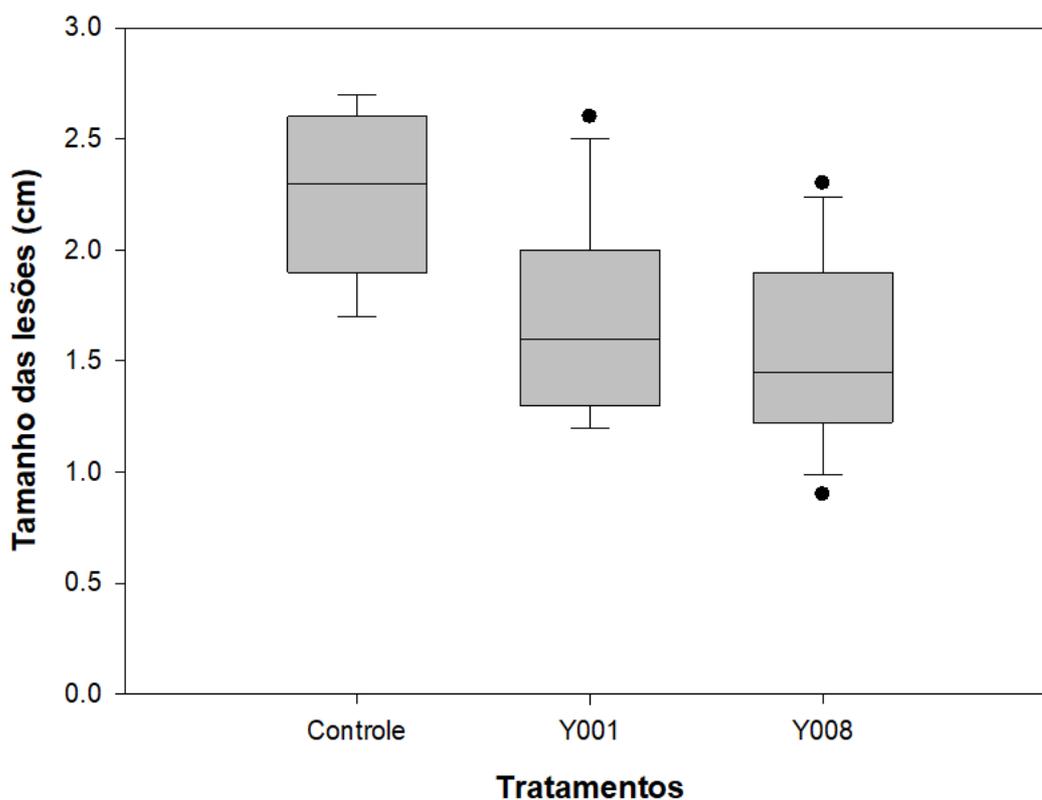


Figura 3. Tamanho das lesões (cm) ocasionadas por *Colletotrichum* sp. em frutos de mamão. Os códigos Y001 e Y008 correspondem aos isolados SF962 e SF973 respectivamente.

## Discussão

Os fungos são excelentes produtores de enzimas de interesse industrial (NILADEVI, 2009), de importância para a indústria têxtil, de produção de detergentes, alimentos, couros (SUNITHA et al., 2013) e ainda em processos de biorremediação (BABIČ et al., 2012). As fermentações podem ser excelentes fontes de microrganismos produtores dessas enzimas. A fermentação do fumo, foco do presente estudo, pode fornecer tais microrganismos. Oito isolados de leveduras utilizados em testes iniciais foram capazes de produzir enzimas de interesse industrial. Mais estudos devem ser conduzidos para compará-los com isolados usados comercialmente.

Dos isolados de leveduras testados no controle biológico *in vitro* da antracnose do fruto do mamão, apenas dois apresentaram resultados satisfatórios para a realização de testes *in situ*, 6 % do total testado. Os isolados SF962 e SF973 foram capazes de restringir o crescimento da colônia do fungo *Colletotrichum* sp. em todos os testes realizados, no quarto, oitavo e décimo segundo dia de avaliação. Entretanto, Chanchaichaovivat et al. (2007), realizaram testes *in vitro* com meio BDA, com 211 isolados, selecionando 54 deles com controle positivo de *Colletotrichum capsici*, causador da antracnose do pimentão, o que corresponde a 25% do total testado. Essa pode ser uma alternativa menos agressiva para o controle da antracnose em diversos frutos e verduras, tornando-se mais saudáveis ao consumo humano pela não utilização ou redução na utilização de produtos químicos indesejáveis.

Com os resultados obtidos percebe-se que a fermentação do fumo pode fornecer microrganismos promissores para a produção de enzimas e controle biológico da antracnose em frutos de mamão, causada pelo fungo *Colletotrichum* sp. No entanto, mais estudos, incluindo sua identificação, devem ser conduzidos para o desenvolvimento desses microrganismos em processos biotecnológicos.

**Referências bibliográficas**

Adrio J.L., Demain A.L. (2003) Fungal biotechnology. *Int Microbiol* 6: 191–199. Doi: 10.1007/s10123-003-0133-0.

Alves M., Gonçalves T., Quintas C. (2012) Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives' fermentations. *Food Control* 23: 363-368. Doi:10.1016/j.foodcont.2011.07.033

Babič J., Likozar B., Pavko A. (2012) Optimization of ligninolytic enzyme activity and production rate with *Ceriporiopsis subvermispora* for application in bioremediation by varying submerged media composition and growth immobilization support. *International Journal of Molecular Sciences* 13:11365-11384. Doi: 10.3390/ijms130911365.

Chanchaichaovivat A., Ruenwongsa P., Panijpan B. (2007) Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biological Control* 42:326–335. Doi:10.1016/j.biocontrol.2007.05.016.

Demain A.L. (2000) Microbial biotechnology. *Trends in Biotechnology* 18: 26-31. Doi: 10.1016/S0167-7799(99)01400-6.

Hankin L., Anagnostakis S.L. (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67:597-607.

Lakshmi B.K.M., Reddy, P.N. and Prasad R.D. (2011) Cross-infection Potential of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Isolates Causing Anthracnose in Subtropical Fruit Crops. *Tropical Agricultural Research* 22:183 - 193.

Lima G., Curtis F., Castoria R., Cicco V. (1998) Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post-harvest rots on different fruits. *Biocontrol Science and Technology* 8:257-267. Doi: 10.1080/09583159830324.

Lima J.R., Gondim D.M.F., Oliveira J.T.A., Oliveira F.S.A., Gonçalves, L.R.B., Viana F.M.P. (2013) Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biology and Technology* 83:58–64. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2013.03.014.

Lima J.R., Viana F.M.P., Lima F.A., Pieniz V., Gonçalves L.R.B. (2014) Efficiency of a yeast-based formulation for the biocontrol of postharvest anthracnose of papayas. *Summa Phytopathologica*, v.40, n.3, p.203-211.

Mari M., Bertolini P., Pratella G.C. (2003) Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *Journal of Applied Microbiology* 94:761–766.

Niladevi K.N. (2009) Ligninolytic Enzymes. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Doi 10.1007/978-1-4020-9942-7 22.

Paull R.E., Nishijima W., Reyes M., Cavaletto C. (1997) Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya* L.). *Postharvest Biology and Technology* 11:165–179. Doi: 10.1016/S0925-5214(97)00028-8.

Pointing S.B. (1999) Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Divers* 2:17-33.

Rosa M.M., Tauk-Tornisielo S.M., Rampazzo P.E., Ceccato-Antonini S.R. (2010) Evaluation of the biological control by the yeast *Torulasporea globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *World J Microbiol Biotechnol* 26: 1491–1502. Doi 10.1007/s11274-010-0324-8.

Singhania R.R., Patel A.K., Soccolc C.R., Pandeya A. (2009) Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 44:13–18. Doi:10.1016/j.bej.2008.10.019.

Steinkraus K.H. (2002) Fermentations in World food processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1: 23-32.

Sunitha V.H., Devi D.N., Srinivas C. (2013). Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. *World Journal of Agricultural Sciences* 9:01-09. Doi: 10.5829/idosi.wjas.2013.9.1.72148.

Tamang J.P., Watanabe K. And Holzapfel W.H. (2016) Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Front. Microbiol.*7:377. Doi: 10.3389/fmicb.2016.00377.

Wilson C.L., Wisniewski M.E., Biles C.L., Mclaughlin R., Chalutz E., Droby S. (1991) Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. *Crop Protection* 10:172-177. Doi: 10.1016/0261-2194(91)90039-T.

Spoladore, D.S.; Junior, R.B.; Teixeira, J.P.F.; Zullo, Marco A.T.; Azzini, A. Composição química das folhas e dimensões das fibras lenhosas em rami. *Bragantia* 43:237, 1984. Doi: 10.1590/S0006-87051984000100019.

## Dados suplementares

Tabela S1. Resultado do teste de média entre o tratamento controle e tratamentos com leveduras aos quatro, oito e doze dias de incubação das placas.

Dias	P
4	< 0.0001
8	< 0.0001
12	0.0109

Tabela S2. Variáveis significativas no primeiro screening em relação ao controle nos três tempos de avaliação, quatro, oito e doze dias para os isolados SF962 e SF973.

Isolado	4 dias	8 dias	12 dias
	P		
SF962	0.0344	< 0.001	0.03
SF973	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Tabela S3: Probabilidade dos testes de média mostrando as diferenças entre os tratamentos e o controle no meio de cultura Papaya Base Agar à 1 e 10%.

	P-values	
	1%PBA	10%PBA
Control x <b>SF962</b>	< 0.01	< 0.01
Controle x <b>SF973</b>	< 0.01	ns

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo explorou-se cientificamente pela primeira vez o processo de fermentação do fumo Mata Fina no Recôncavo da Bahia. O objetivo foi entender a dinâmica da população microbiana no processo e obter informações sobre possíveis aplicações biotecnológica dos isolados. Não houve intenção de estimular o uso do fumo pela população, uma vez que seus efeitos prejudiciais a saúde já são conhecidos.

Os estudos foram realizados utilizando métodos de isolamento sem cultivo, por meio do pirossequenciamento, e métodos de isolamento com cultivo em placas de Petri, utilizando-se a técnica de contagem de unidades formadoras de colônias. Os potenciais de aplicação resumiram-se em experimentos *in vitro* de produção de enzimas e controle biológico do agente causal da antracnose em frutos de mamão.

Observou-se que as folhas de fumo em fermentação apresentam alta diversidade microbiana. Além disso, existe variação entre a densidade populacional dos microrganismos ao longo dos ciclos de fermentação. Alguns isolados de leveduras foram eficientes na produção de enzimas e no controle biológico do fitopatógenos, entretanto é preciso identificar esses isolados por meio de métodos moleculares.