

Sistema de Raciocínio Baseado em Casos para Identificação de Bactérias Aeróbicas Formadoras de Endósporo

Anita Maria da Rocha Fernandes^{1,2}, Helton Machado Kraus², Alessio Delazari¹

¹Curso de Ciência da Computação – Universidade do Vale do Itajaí – Campus de São José (UNIVALI) – São José – SC – Brasil

²Mestrado em Computação Aplicada – Universidade do Vale do Itajaí – Campus de São José (UNIVALI) – São José – SC – Brasil

{anita,heltonkraus,alessio}@univali.br

Abstract. *Aerobic endospore-forming bacteria are major producers of enzymes related to the production of antibiotics and biopesticides. The identification of this group of bacteria is very complex, since there is a very large species of this genus and described in the literature, only a visual examination through the microscope is not sufficient to identify it. In this context the system is developed and search by similarity, comparing a series of taxonomic characteristics of a sample under study, with a database containing descriptors of species already analyzed, using the technique of Case Based Reasoning.*

Resumo. *Bactérias aeróbicas formadoras de endósporos são grandes produtoras de enzimas relacionadas à produção de antibióticos e bioinseticidas. A identificação de bactérias deste grupo é muito complexa, uma vez que há uma quantidade muito grande de espécies deste gênero descrita na literatura e somente a análise visual via microscópio não é suficiente para a identificação. Neste contexto esta o sistema desenvolvido, que busca através da similaridade comparar uma série de características taxonômicas de uma amostra em estudo com uma base de dados contendo descritores de espécies já analisadas, utilizando a técnica de Raciocínio Baseado em Casos.*

1. Introdução

O processo de formação de esporo dentro de uma célula vegetativa ou endósporo é chamado esporogênese. Endósporos são estruturas arredondadas ou ovais, intracelulares, que tem uma estrutura complexa formada por uma camada protetora, um córtex e uma membrana interna que envolve o protoplasto. Eles contêm dipicolinato de cálcio, são muito resistentes ao calor, dessecação, corantes, desinfetantes e radiação. As mudanças estruturais ocorridas no interior celular durante este evento podem ser estudadas pela microscopia eletrônica. Sob determinadas circunstâncias, em vez de dividir-se, a célula passa por uma série de mudanças que terminam em um esporo que será liberado no ambiente, permanecendo dormente e viável por longos períodos [Presscott, Harley e Klein 1990].

De acordo com a formação de endósporos (Figura 1), as bactérias podem então ser classificadas em diversos grupos. As acidófilas compreendem formadoras de endósporos heterotróficas, restritas a bacilos termotolerantes e mesofílicos. Essas bactérias não crescem em pH neutro e tem como exemplo *Bacillus acidocaldarius* e *Bacillus cycloheptanicus*. As alcalófilas, que crescem em alto pH, não crescendo em pH neutro. *Sporosarcina ureae* geralmente é isolada de ambientes com alto pH e ricos em uréia. Termófilos, como sendo aqueles que crescem em temperaturas acima de 55°C e incluem cerca de 15 espécies de *Bacillus*, 11 de *Clostridium* e 7 de *Desulfotomaculum*, ocorrendo em solos de regiões temperadas, sendo obviamente mais encontrados em locais termais. Psicrófilas, que crescem em baixa temperatura de 0 a 25°C como *C. arcticum*. As fixadoras de nitrogênio e denitrificantes são na maioria bacilos e clostrídios, comuns em solos. Como exemplo *Clostridium butylicum*, *Bacillus macerans*, *Bacillus polymyxa* [Priest e Grigorova 1990].

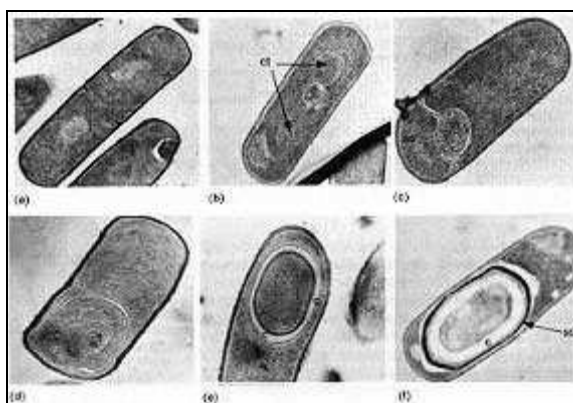


Figura 1. Formação do endósporo.

Com o avanço da genética um número considerável de bactérias circulares, formadoras de endósporos anteriormente associadas ao gênero *Bacillus* foram transferidas para um novo gênero chamado *Paenibacillus*, através de uma análise das seqüências 16S. Exemplos de espécies erroneamente classificadas são *Bacillus gordonae*, *Bacillus validus*, *Bacillus larvae*, *Bacillus macquarensis*, *Bacillus polymyxa*, todos estes reclassificados para o gênero *Paenibacillus* [Heyndrickx et al 1996].

Na identificação das bactérias, são utilizadas variáveis como: crescimento na ausência do oxigênio, utilização da glicose e de outros carboidratos, produção de enzimas diversas, características morfológicas, entre outras.

Este processo de classificação é extremamente complexo e em constante alteração à medida que ocorrem os avanços da genética. Neste contexto, este projeto propõe o desenvolvimento de um sistema inteligente utilizando Raciocínio Baseado em Casos à fim de auxiliar na classificação de bactérias aeróbicas formadoras de endósporos. A escolha por Raciocínio Baseado em Casos se deve ao fato de que o processo de classificação é totalmente voltado para a similaridade entre as espécies em análise e as espécies já identificadas na literatura.

Nas seções seguintes são apresentados os trabalhos relacionados a identificação de bactérias, seguindo por uma apresentação da técnica de Raciocínio Baseado em Casos (RBC) que foi utilizada na elaboração do projeto, conceitos sobre bactérias aeróbicas e em seguida apresenta-se o sistema desenvolvido e as conclusões.

2. Análise através do Gladius

Antes do início da elaboração do sistema foi realizada uma análise do processo de identificação realizado pelos pesquisadores do laboratório de microorganismos da instituição que se realizou o projeto.

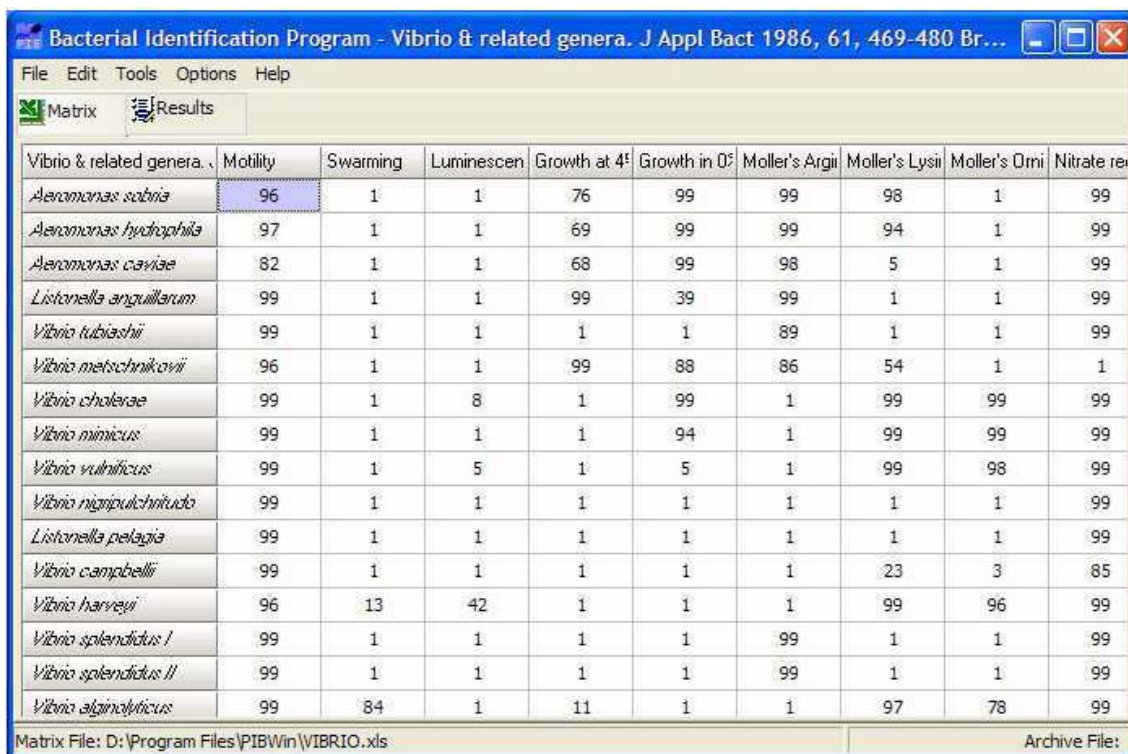
Após a realização de reuniões com os especialistas e acompanhamentos dos experimentos dos mesmos durante os primeiros seis meses de projeto, foi possível definir os processos de análise das bactérias levantando as variáveis a serem utilizadas.

Existem no mercado alguns softwares que auxiliam o pesquisador na classificação, porém a grande maioria não possui uma política de manutenção de sua base de dados. Além disto, não permitem que o usuário cadastre as espécies mais comuns verificadas em seus experimentos. Um exemplo disto é o PIBWin utilizado no laboratório onde foi realizado o projeto.

O programa PIBWin fornece uma identificação probabilística de bactérias em relação a uma matriz de características de bactérias já conhecidas [Bryant 2007]. O programa tem três funções principais:

- A identificação de uma bactéria isolada desconhecida;
- A seleção de testes adicionais para distinguir entre possíveis problemas caso a identificação não é alcançada;
- O armazenamento e recuperação dos resultados.

O programa faz uso dos arquivos do Excel para armazenar os dados e os resultados. Na Figura 2 é apresentada a interface do software Pibwin, onde é possível visualizar as características de uma família de bactérias.



The screenshot shows the 'Bacterial Identification Program - Vibrio & related genera. J Appl Bact 1986, 61, 469-480 Br...' window. The interface includes a menu bar (File, Edit, Tools, Options, Help) and two tabs: 'Matrix' and 'Results'. The 'Matrix' tab is active, displaying a table with the following data:

Vibrio & related genera.	Motility	Swarming	Luminescen	Growth at 4°	Growth in 0°	Moller's Argii	Moller's Lysii	Moller's Orni	Nitrate re
<i>Aeromonas sobria</i>	96	1	1	76	99	99	98	1	99
<i>Aeromonas hydrophila</i>	97	1	1	69	99	99	94	1	99
<i>Aeromonas caviae</i>	82	1	1	68	99	98	5	1	99
<i>Listonella anguillarum</i>	99	1	1	99	39	99	1	1	99
<i>Vibrio tubiashii</i>	99	1	1	1	1	89	1	1	99
<i>Vibrio metschnikovii</i>	96	1	1	99	88	86	54	1	1
<i>Vibrio cholerae</i>	99	1	8	1	99	1	99	99	99
<i>Vibrio mimicus</i>	99	1	1	1	94	1	99	99	99
<i>Vibrio vulnificus</i>	99	1	5	1	5	1	99	98	99
<i>Vibrio nimgulchnitudo</i>	99	1	1	1	1	1	1	1	99
<i>Listonella pelagia</i>	99	1	1	1	1	1	1	1	99
<i>Vibrio campbellii</i>	99	1	1	1	1	1	23	3	85
<i>Vibrio Harveyi</i>	96	13	42	1	1	1	99	96	99
<i>Vibrio splendidus I</i>	99	1	1	1	1	99	1	1	99
<i>Vibrio splendidus II</i>	99	1	1	1	1	99	1	1	99
<i>Vibrio alginolyticus</i>	99	84	1	11	1	1	97	78	99

At the bottom of the window, the status bar shows 'Matrix File: D:\Program Files\PIBWin\WIBRIO.xls' and 'Archive File:'.

Figura 2. Interface do Software Pibwin.

O Pibwin é uma alternativa para auxílio na identificação das bactérias, porém caso o usuário necessite incluir as características de uma nova bactéria recém descoberta, o programa não permite isto, ficando o usuário dependente de novas versões as quais não são fornecidas em um tempo razoável. Também não é possível emitir relatórios mais completos sobre as análises.

Com a pesquisa detalhada dos softwares que auxiliam na identificação das bactérias foi possível constatar que estes softwares não permitem a atualização facilitada das informações de novas bactérias, funcionalidade importante neste processo.

3. Raciocínio Baseado em Casos (RBC)

RBC é uma técnica de Inteligência Artificial que busca a solução para uma situação atual através da recuperação e adaptação de soluções passadas semelhantes, dentro de um mesmo domínio do problema [Fernandes, Miranda e Santos 2003]. A recuperação dos dados é realizada em memória, verificando se existem casos semelhantes com as características atuais do problema, podendo encontrar um ou mais casos e adaptá-los de alguma maneira, para que se ajuste ao problema atual, criando um novo caso para uso futuro.

von Wangenheim e von Wangenheim (2003) afirmam que: “RBC é um enfoque para a solução de problemas e para o aprendizado baseado em experiência passada. RBC resolve problemas ao recuperar e adaptar experiências passadas – chamadas casos – armazenadas em uma base de casos. Um novo problema é resolvido com base na adaptação de soluções de problemas similares já conhecidas”.

Para o desenvolvimento de sistemas RBC é necessário inicialmente utilizar soluções já aplicadas anteriormente com sucesso e determinar qual das experiências mais se assemelha ao problema atual. Para isso se torna necessário que estas experiências passadas sejam analisadas e armazenadas de maneira organizada. O sistema RBC é responsável por realizar a pesquisa nestas experiências armazenadas e verificar se existem casos semelhantes com as características do problema atual, podendo encontrar um ou mais casos, que serão utilizados para chegar a solução do problema. O sistema é capaz de localizar e encontrar partes de casos que não se adequem ao problema, criando um novo caso para uso posterior [Fernandes, Miranda e Santos 2003].

Desta forma, um sistema RBC pode ser dividido em quatro elementos básicos [von Wangenheim e von Wangenheim 2003] :

- **Representação do Conhecimento:** em um sistema de RBC, o conhecimento é representado principalmente em forma de casos, que descrevem experiências concretas.
- **Medida de Similaridade:** define como será calculada a similaridade entre a situação atual e um determinado caso na base de casos, sendo aplicada repetidamente, par a par, para todos os casos, chegando a um valor de similaridade. Estes valores e casos são ordenados e os mais similares são sugeridos como solução potencial para o problema presente.

- Adaptação: situações passadas representadas como casos dificilmente serão idênticas às do problema atual. Sistemas de RBC avançados têm mecanismos e conhecimento para adaptar os casos recuperados completamente, para verificar se satisfazem às características da situação presente.
- Aprendizado: para que um sistema se mantenha atualizado e evolua continuamente, sempre que ele resolver um problema com sucesso, deverá ser capaz de lembrar dessa situação no futuro como mais um novo caso.

Um caso é a forma de conhecimento contextualizado representando uma experiência que ensina uma lição útil. As lições úteis podem ser definidas como aquelas que têm o potencial para ajudar o raciocinador a alcançar uma meta ou um conjunto de metas ou advertem sobre a possibilidade de uma falha ou apontam para um problema futuro [Fernandes, Miranda e Santos 2003].

Um caso representa tipicamente a descrição de uma situação (problema) conjuntamente com as experiências adquiridas (solução) durante a sua resolução, sendo visto como essa associação dos dois conjuntos de informações: a descrição do problema e respectiva solução. Para que estes casos estejam a disposição para serem reutilizados, estes são organizados e armazenados em uma base de casos, formando um conjunto que geralmente contém experiências positivas descrevendo estratégias de solução que contribuíram com o sucesso para resolver o problema descrito, de forma que possam ser reutilizadas. Experiências negativas, expressando tentativas frustradas de solução também podem ser armazenadas, com o objetivo de indicar problemas potenciais e prevenir a repetição de erros passados [von Wangenheim e von Wangenheim 2003].

4. Bactérias Aeróbicas formadoras de endósporos

As bactérias são microrganismos procariontes amplamente difundidos em todos os ambientes terrestres e aquáticos. Esta ampla distribuição é um reflexo de sua grande adaptabilidade metabólica, o que permite observarmos estes organismos em ambientes extremos, como por exemplo, habitando ambientes com temperaturas abaixo do ponto de congelamento ou temperaturas acima do ponto de ebulição, ambientes extremamente ácidos ou alcalinos, e aeróbios ou anaeróbios [Weingartner 2005].

Esta adaptabilidade metabólica e ambiental resulta em um elevado potencial para a obtenção de produtos gerados por estes organismos, os quais podem ser aplicados nos mais variados setores industriais, incluindo a produção de alimentos e de substâncias para fins terapêuticos.

As bactérias formadoras de endósporos (BFE) compreendem bactérias capazes de formar um tipo de estrutura altamente resistente, os endósporos. Os endósporos são formados quando as células são impedidas de crescer, em função de condições ambientais desfavoráveis como exaustão de nutrientes, por exemplo. Estas estruturas especiais permitem a sobrevivência destes organismos em condições adversas, porém, nunca em células com crescimento ativo e, portanto, possuem uma série de alterações que tornam esta tarefa possível. Estas modificações incluem a presença de um revestimento complexo de multicamadas circundando a nova célula bacteriana, e diferenças na composição química em relação a uma célula em crescimento vegetativo, notadamente a presença de ácido dipicolínico e um alto conteúdo de cálcio, ambos

conferindo a extrema resistência ao calor e aos agentes químicos. Em função da sua resistência os endósporos podem permanecer viáveis em estado latente por muitos anos. Quando as condições ambientais se tornam favoráveis, o organismo recupera rapidamente a existência vegetativa. [Mins et al 1999].

Estes tipos de bactéria possuem afinidades taxonômicas que são consideradas incertas, e isso torna o processo de classificação extremamente complexo e em constante alteração à medida que ocorrem os avanços da genética. A literatura aponta testes que possibilitam a identificação de características destas bactérias, que foram utilizados na elaboração do sistema, sendo estes testes divididos em agrupamentos: a) Teste de morfologia; b) Teste de crescimento; c) Teste de Enzima; d) Teste de Hidrólise; e) Teste de Ácidos; f) Teste de utilização; e g) Testes Diversos.

Com a definição destes testes foi possível realizar a modelagem e arquitetura do sistema, conforme apresentado na próxima seção.

4. O sistema desenvolvido

Para o desenvolvimento do sistema inicialmente foi realizado um levantamento dos requisitos em conjunto com os especialistas. A seguir é apresentado este levantamento realizado, as ferramentas utilizadas e também a metodologia de desenvolvimento, detalhando as características e funcionalidade do sistema.

4.1. Características do sistema

O primeiro passo para criação do sistema foi a definição das características que poderiam identificar as diferentes espécies de bactérias. Para isso foram detalhados os grupamentos de testes, que são realizados pelos especialistas durante o processo de identificação. Os sete grupamentos de testes, apresentados na seção anterior, são formados por variáveis que definem quais as características de cada bactéria. Durante esta etapa foram levantadas um total de 71 variáveis. Na Tabela 1 são apresentadas as variáveis de cada grupo de teste.

Tabela 1. Variáveis consideradas nos testes

Teste	Variáveis
Morfologia	Distensão do esporângio; Esporos circulares; Esporos centrais; Esporos subterminais; Motilidade; Diâmetro celular; Inclusões de armazenamento; Vacúolos; Parede celular Gran negativa; Cristal paraesporal
Crescimento	Anaerobiose; Autotrófico; NaCl 0%; NaCl 2%; NaCl 5%; NaCl 7%; NaCl 10%; 5° C; 10° C; 20° C; 30° C; 37° C; 40° C; 50° C; 55° C; 65° C
Enzima	Catalase; Citocromo oxidase; Fenilamina desaminiase; Lectiniase; B Galactosidade
Hidrólise	Amido; Caseína; Esculina; Gelatina; Tirosina; Tween 20; Tween 80; Uréia
Ácidos	Adonitol; Amido; Cellobiose; D-Frutose; D-Glicose; D-Manitol; D-Manose; D-Trealose; D-Xilose; Galactose; Glicerol; Glicogênio; Inositol; Lactose; L-Arabinose; Maltose; Melibiose; N-Acetil-D-glucosamina; Rafinose; Ribose; Sacarose; Salicina; Sorbitol

Utilização	Acetato; Citrato; Formato; Lactato; Propionato; Succionato
Diversos	Redução do nitrato; Produção de indol; Teste de Voges_Proskauer

De acordo com as especificações dos especialistas, verificou-se que cada uma das variáveis relativas aos testes possuem valores booleanos (Sim ou Não), indicando se a bactéria obteve êxito ou não no teste. Com estas variáveis foram definidos os atributos, onde o conjunto destas variáveis, que para o RBC definem os atributos, formam os casos do sistema.

Para o cálculo da similaridade entre os casos do sistema foi definida a métrica do vizinho mais próximo, por ser uma técnica simples e não necessitar de um processamento com número elevado de cálculos, sendo sua fórmula apresentada na Equação 1.

$$\text{Similaridade}(N,F) = \frac{\sum_{i=1}^n f(N_i, F_i) * w_i}{\sum_{i=1}^n w_i} \quad \text{Equação 1}$$

A função de similaridade é calculada para cada atributo do caso, e a equação de similaridade é realizada para toda a base de casos, obtendo o ranking de cada caso. Este ranking estabelece uma medida de similaridade no intervalo entre 0 e 1, onde 0 representa o caso menos similar e 1 representa o caso igual.

Desta forma o sistema RBC pode apresentar ao usuário do sistema, após informar as características de uma nova bactéria, uma listagem das bactérias mais similares que já tenham sido cadastradas no sistema.

4.2. Funcionalidades do sistema

O sistema desenvolvido é composto por uma interface onde o usuário, após realizar a autenticação no sistema, pode realizar o cadastros dos grupamentos dos testes, as variáveis de cada teste, os pesos de cada variáveis (utilizados no cálculo da similaridade do sistema RBC), os valores dos testes realizados e seus respectivos resultados que correspondem a bactéria identificada.

Outra funcionalidade que foi solicitada pelos especialistas foi a possibilidade de emissão de relatórios com as características (valores das variáveis dos testes) que identificam cada bactéria.

Também torna-se possível navegar através dos casos cadastrados, que correspondem aos testes realizados no sistema.

4.3. Metodologia de desenvolvimento

O desenvolvimento iniciou-se com a análise e modelagem da aplicação, tendo como artefato desta etapa a modelagem UML. A modelagem do protótipo foi desenvolvimento baseada no padrão de projeto MVC (model view controller), que é um padrão de arquitetura de aplicações que separa a lógica da aplicação (Model), da interface do usuário (View) e do fluxo da aplicação (Controller). Também foi elaborada a modelagem Entidade-Relacionamento do banco de dados, onde são armazenados os casos do sistema RBC.

Em seguida foi realizada a implementação desta modelagem e o desenvolvimento da interface do sistema. Na Figura 3 é apresentada a interface principal do sistema, onde são visualizadas as principais funcionalidades.



Figura 3. Tela principal do sistema.

Previamente ao uso do sistema tornou-se necessário o cadastro de bactérias já identificadas através de testes anteriores realizados no laboratório pelos especialistas e também através de informações de bactérias identificadas na literatura.

Com o cadastro foi possível iniciar o uso do sistema, onde para cada novo teste o sistema busca na base de casos os testes já realizados com outras bactérias. Na Figura 4 é apresentada a tela onde o usuário pode definir as variáveis da bactéria que está sendo realizado o teste.

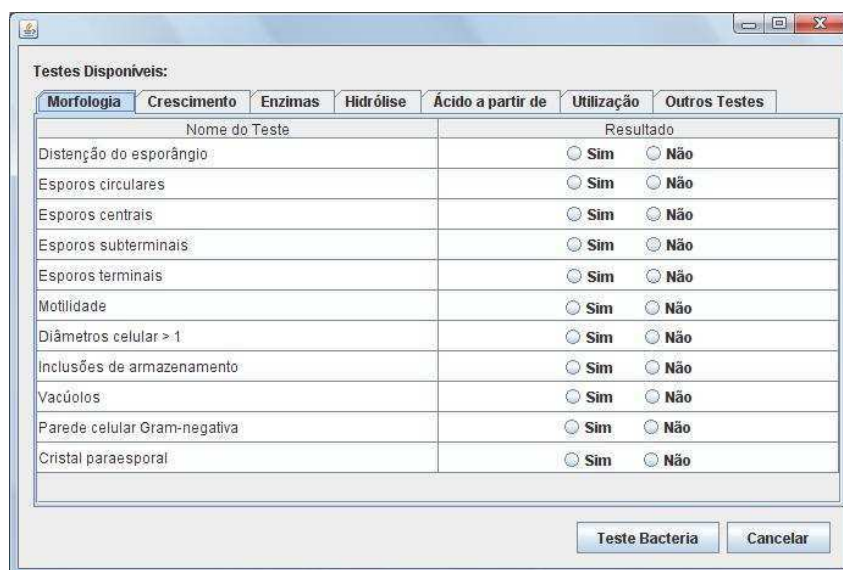
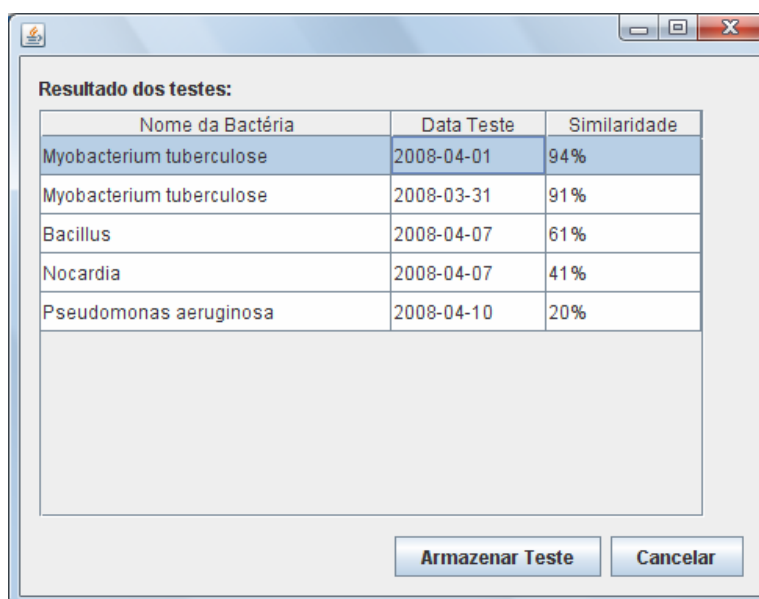


Figura 4. Tela de realização dos testes.

A comparação dos testes é realizada em todos os casos, comparando cada atributo (variáveis) e, através da contagem de características, aplica a função de similaridade do vizinho mais próximo, conforme apresentado na seção anterior.

Esta função determina um percentual de similaridade do caso atual com o caso armazenado na base. Ao final da comparação dos casos da base, os valores de similaridade são ordenados e os casos com maior valor de similaridade são apresentados ao usuário, o qual poderá avaliar os resultados obtidos nos testes (casos) anteriores.

Na Figura 5 é apresentada a tela de visualização dos casos mais similares.



Nome da Bactéria	Data Teste	Similaridade
Myobacterium tuberculose	2008-04-01	94%
Myobacterium tuberculose	2008-03-31	91%
Bacillus	2008-04-07	61%
Nocardia	2008-04-07	41%
Pseudomonas aeruginosa	2008-04-10	20%

Figura 5. Tela dos resultados do sistema.

Após a implementação, o sistema foi testado, considerando primeiramente os resultados no módulo de raciocínio baseado em casos e posteriormente foi analisada a sua junção com o sistema. Estes testes foram feitos levando em consideração a confiabilidade das respostas.

Em seguida, o sistema será utilizado por um grupo maior de usuários, os quais avaliarão o sistema em termos de sua ergonomia, confiabilidade e eficiência.

Todos os problemas detectados nesta etapa foram analisados e a equipe de desenvolvimento realizou a manutenção corretiva.

5. Conclusões

A importância das bactérias aeróbicas formadoras de endósporos está em áreas que vão desde o tratamento de água até a fabricação de antibióticos. Sendo assim, a sua classificação correta é de suma importância para a garantia da qualidade das pesquisas na área.

A similaridade entre as inúmeras espécies de bactérias leva a vários problemas de classificação, além disso, com os avanços da genética a cada hora surge uma nova forma de classificação, sendo assim, sistemas computacionais são de grande valia, principalmente quando conseguem modelar de maneira correta o processo de análise da

similaridade. Dentro deste contexto encontram-se os sistemas de raciocínio baseado em casos.

Além disto, este projeto tem uma importância multidisciplinar, uma vez que reúne pesquisadores da área de inteligência artificial e da área de microbiologia.

Fazendo um comparativo entre o sistema desenvolvido e o PIBWIN constatou-se um melhor desempenho do sistema RBC, pois entre os testes realizados, o sistema RBC sempre foi capaz de apresentar uma lista de bactérias com seus respectivos valores de similaridade, o que auxiliou na identificação direta da bactéria, ou em outros casos onde a similaridade não alcançou valores desejáveis, identificou-se as famílias com características similares, e então foi possível identificar e classificar mais facilmente a bactéria.

A maior melhoria identificada no sistema atual foi o cadastro facilitado de novas bactérias após os testes realizados, o que não era possível através do sistema PIBWIN.

Referências

- Bryant, T. (2007) “Probabilistic Identification of Bacteria for Windows”. Disponível em: <http://www.som.soton.ac.uk/staff/tnb/pib.htm>. Acessado em 12 de junho de 2007.
- Fernandes, A. M. R.; Miranda, E. M.; Santos, F. G. “Raciocínio baseado em casos”. In: *Inteligência artificial: noções gerais*. Ed. Visual Books, Florianópolis, 2003.
- Heyndrickx, M.; et al. (1996) “Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a Later Subjective Synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a Subspecies of *P. larvae*, with Emended Descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *Pulvifaciens*”. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Glasgow, 1996. vol. 46, No. 1, p. 270-279.
- Mims, C.; Playfair, J.; Roitt, I.; Wakelin, D.; Williams, R. (1999). “*Microbiologia médica*”. São Paulo: Manole Ltda.
- Prescott, L.M; Harley, J.P; Klein, D.A. (1990) “*Microbiology*”. Dubuque: Times Mirror Higher Education Group Inc., 1996. PRIEST, F. G.; GRIGOROVA, R. Methods for studying the ecology of endospore-forming bacteria. *Methods in Microbiology*, v. 22, p.565-591.
- Priest, F. G.; Grigorova, R. (1990) “Methods for studying the ecology of endospore-forming bacteria”. *Methods in Microbiology*, v. 22, p.565-591.
- von Wangenheim, C. G.; von Wangenheim, A.(2003) “Raciocínio baseado em casos”. Ed. Manole, Barueri.
- Weingartner, V. (2005). “Identificação e Atividade Antimicrobiana de Bactérias Formadoras de Endósporos Isoladas de Ambientes Impactados pela Mineração do Carvão”. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Ciências Biológicas – Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, UNIVALI, Itajaí, 07 de Novembro.