

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
ACTINOMICETOS ISOLADOS DE PROCESSO  
DE COMPOSTAGEM

MARGARONI FIALHO DE OLIVEIRA  
BIÓLOGA – UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de  
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre – RS  
Março de 2003

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Sueli T. Van Der Sand pela orientação e oportunidade de desenvolver este projeto.

Ao Dr. José Carlos Germani pela co-orientação e incentivo.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e em especial aos professores Gertrudes Corção, Marisa da Costa e Amauri Braga Simoneti pela colaboração.

Ao laboratório de Pesquisa de Corrosão, em especial a professora Dra. Gelsa Edith Englert pelo auxílio na técnica de microscopia eletrônica.

Aos funcionários da CETRISA pela parceria estabelecida em prol deste projeto.

Aos colegas da turma 2002, em especial as colegas Anelise B. da Silveira, Neida Macedo e Patrícia Bender pela amizade e companheirismo.

À bolsista de iniciação científica Sabrina Salamoni pela amizade e colaboração.

À minha mãe, Nadyr da Rosa Fialho, pelo grande carinho dedicado.

Ao meu namorado, Gustavo Vaconcellos, pelo seu amor, dedicação e principalmente pela sua enorme compreensão e paciência.

Aos meus queridos amigos Dirceu e Juceli pelo grande incentivo e amizade.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro ao longo destes dois anos.

# IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ACTINOMICETOS ISOLADOS DE PROCESSO DE COMPOSTAGEM<sup>1</sup>

Autor: Margaroni Fialho de Oliveira  
Orientadora: Sueli T. Van Der Sand  
Co-orientador: José Carlos Germani

## RESUMO

Atualmente, o isolamento e a caracterização de actinomicetos tem recebido atenção especial, pois, juntamente com os fungos, eles são os principais responsáveis pela degradação de substâncias de difícil decomposição durante o processo de compostagem. Portanto este trabalho tem por objetivo identificar os actinomicetos isolados durante o processo de compostagem através de métodos de microbiologia clássica e pela amplificação do 16S DNAr. Para a realização deste trabalho foram realizadas seis coletas na Central de Triagem e Compostagem de Resíduos Sólidos de Sapiranga (CETRISA) e três numa composteira da UFRGS. Para o isolamento dos actinomicetos foi utilizada a diluição de  $10^{-3}$  da amostra e a mesma foi semeada nos meios Jaunsen, 72C e Agar Amido Caseína e incubada nas temperaturas de 37°C, 50°C e a temperatura ambiente por um período de 10 a 14 dias. A identificação foi realizada através de análise taxonômica dos microcultivos dos isolados e de provas bioquímicas. Foram isolados 153 actinomicetos, destes 73 foram isolados da CETRISA e 80 da composteira da UFRGS. Na primeira, houve o predomínio do gênero *Nocardia* e na segunda, do gênero *Streptomyces*. Após a identificação dos actinomicetos o trabalho teve prosseguimento com a amplificação da região 16S do DNAr e digestão dos produtos obtidos com endonucleases de restrição. Foram testadas oito endonucleases de restrição, porém somente a *Msp1* e a *HinfI* produziram resultados favoráveis que puderam separar os isolados em nível de gênero.

1 Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, Brasil.

# Identification and characterization of actinomycetes isolated from composting environment <sup>1</sup>

Author: Margaroni Fialho de Oliveira  
Adviser: Dr. Sueli T. Van Der Sand  
Co-adviser: Dr. José Carlos Germani

## ABSTRACT

Actinomycetes together with fungi are the main responsible for the degradation of complex molecules during the composting process. The aim of this work was to isolate and identify actinomycetes present in a composting process using classic microbiology and by the amplification of 16S rDNA fragment. Six samples were collected at Central de Triagem e compostagem de Sapiranga (CETRISA) and three at a composting environment at Faculdade de Agronomia (UFRGS). The samples were seeded in plates with Jaunsen agar, 72C agar and starch casein agar and incubated at 50°C, 37°C and room temperature for 14 days. The identification proceeded through taxonomic analysis and biochemical tests. As a result 153 actinomycetes have been identified, where 73 were from CETRISA compost with the prevalence of *Nocardia* genus and 80 from UFRGS where mostly were from *Streptomyces* genus. All samples were submitted to PCR assay and from them 31 were selected for the PCR-RFLP assay. The results showed that with the enzymes *MspI* and *HinI* it was possible to group most of the isolates by the genus.

<sup>1</sup> Master of Science's Degree Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Março, 2003.

## SUMÁRIO

### Página

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1. Compostagem.....	3
2.2. Actinomicetos - Características Gerais.....	11
2.3. Actinomicetos em processo de compostagem.....	19
2.4. Identificação e classificação dos actinomicetos.....	21
2.5. DNA/RNA ribossomal.....	27
2.6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	31
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
3.1. Coleta das amostras.....	35
3.2. Isolamento dos Actinomicetos.....	36
3.3. Coloração de Gram.....	37
3.4. Identificação morfológica.....	38
3.5. Identificação Bioquímica.....	39

3.5.1. Crescimento sobre única fonte de carbono.....	39
3.5.2. Crescimento sobre única fonte de nitrogênio.....	40
3.5.3. Redução do nitrato.....	41
3.5.4. Degradação da caseína.....	41
3.5.5. Degradação do amido.....	42
3.5.6. Degradação da gelatina.....	42
3.5.7. Degradação da xantina.....	42
3.5.8. Degradação da tirosina.....	43
3.5.9. Degradação da esculina.....	43
3.5.10. Crescimento em diferentes concentrações de NaCl.....	43
3.5.11. Pigmentação.....	44
3.5.11.1. Cor da massa de esporos.....	44
3.5.11.2. Cor do micélio sobre o substrato.....	44
3.5.12. Produção de melanina.....	44
3.6. Caracterização Molecular.....	45
3.6.1. Extração do DNA cromossomal dos actinomicetos.....	45
3.6.2. Extração do DNA cromossomal das bactérias controle.....	46
3.6.3. Quantificação do DNA por comparação da intensidade de banda.....	47
3.6.4. Quantificação do DNA através do espectrofotometria.....	47
3.6.5. Oligonucleotídeos iniciadores.....	48
3.6.6. Condições de amplificação.....	49
3.6.7. Eletroforese em gel de agarose.....	50
3.6.8. Digestão com endonucleases de restrição.....	51

3.6.9. Marcadores Moleculares.....	53
3.7. Análise estatística.....	53
3.8. Microscopia Eletrônica.....	53
3.9. Análise filogenética.....	54
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
4.1. Isolamento dos actinomicetos.....	55
4.2. Identificação dos actinomicetos.....	61
4.2.1. Identificação morfológica dos actinomicetos.....	61
4.2.2. Identificação bioquímica dos actinomicetos.....	67
4.3. Caracterização Molecular.....	74
4.3.1. Extração do DNA cromossomal dos actinomicetos.....	74
4.3.2. Condições de amplificação.....	74
4.3.3. Digestão com endonucleases de restrição.....	76
4.4. Análise filogenética.....	81
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>90</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>91</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>
<b>8. APÊNDICES.....</b>	<b>106</b>

## RELAÇÃO DAS TABELAS

### Página

1. Controle positivo e negativo.....	50
2. Sistemas testados para a reação de PCR.....	51
3. Temperaturas de anelamento testadas.....	52
4. Condições de anelamento testadas.....	56
5. Espécies de actinomicetos isoladas.....	71
6. Análise de variância ANOVA.....	73
7. Matriz de similaridade obtida com <i>Hinfl</i> .....	118
8. Matriz de similaridade obtida com <i>Mspl</i> .....	120
9. Matriz de similaridade obtida <i>Hinfl</i> e <i>Mspl</i> .....	122
10. Matriz de similaridade obtida através do perfil bioquímico.....	124



## RELAÇÃO DAS FIGURAS

### Página

1. Dendrograma mostrando os relacionamentos filogenéticos da classe <i>Actinobacteria</i> .....	23
2. Arranjos das cadeias simples de esporos.....	25
3. Arranjos das cadeias de esporos verticilados.....	26
4. Diferentes tipos de superfície dos esporos.....	27
5. <i>Streptomyces griseoviridis</i> sobre ágar amido caseína.....	60
6. Colônias filamentosas de <i>Streptomyces</i> sp sobre o ágar amido caseína.....	60
7. Coloração de Gram demonstrando células fragmentadas de <i>Nocardia</i> sp.....	63
8. Coloração de Gram demonstrando hifas filamentosas de um <i>Streptomyces</i> sp.....	63
9. Esporos de <i>Streptomyces</i> sp. em cadeias espirais.....	64
10. Esporos de <i>Streptomyces</i> sp em cadeias flexíveis.....	64
11. Hifas ramificadas de uma <i>Nocardia</i> sp.....	65
12. Microscopia eletrônica de varredura de hifas de <i>Streptomyces</i> sp.....	65

13. Microscopia eletrônica de varredura de esporos de <i>Streptomyces</i> sp.....	66
14. Gráfico representando os gêneros encontrados nas leiras de compostagem da CETRISA.....	72
15. Gráfico representando os gêneros predominantes da pilha de compostagem da Faculdade de Agronomia.....	72
16. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de espécies de actinomicetos.....	77
17. Gel de eletroforese 1,5% com os resultados obtidos com o teste de especificidade dos oligonucleotídeos F243/R513.....	77
18. Gel de eletroforese 2,5% para análise dos fragmentos obtidos com <i>Hinfl</i> .....	80
19. Gel de eletroforese 2,5% para análise dos fragmentos obtidos com <i>MspI</i> .....	80
20. Dendrograma obtido através da análise dos fragmentos resultantes da digestão com <i>Hinfl</i> .....	83
21. Eletroforese em gel de agarose 2,5% para análise dos fragmentos obtidos com <i>Hinfl</i> .....	85
22. Dendrograma obtido através da análise dos fragmentos da digestão com <i>MspI</i> .....	87
23. Dendrograma obtido através da análise dos fragmentos obtidos com <i>MspI</i> e <i>Hinfl</i> .....	98
24. Dendrograma obtido através da análise do perfil bioquímico dos isolados.....	89

## **1. INTRODUÇÃO**

Um dos maiores problemas das grandes cidades é o destino final dos resíduos sólidos urbanos. No Brasil, a maioria destes resíduos não é aproveitada e vai para grandes aterros a céu aberto, causando prejuízos ao meio ambiente e a sociedade.

A contaminação do solo, do ar, da água e a ocupação de grandes áreas são alguns pontos negativos do destino final dos resíduos sólidos urbanos. Desta maneira nem os lixões, nem os aterros podem ser considerados os métodos mais adequados para eliminar os resíduos sólidos urbanos, uma vez que não são eficazes nem ambiental, nem economicamente.

Os resíduos orgânicos depositados em aterro são responsáveis pela formação de lixiviados e biogás, ou seja, poluição e propagação de maus cheiros e também pela propagação de vetores de doenças como ratos e insetos.

Desta maneira estratégias mais adequadas para melhorar o manejo dos resíduos sólidos urbanos têm sido implantadas, e isto inclui a minimização da quantidade de resíduos sólidos gerados e a maximização da ciclagem e recuperação destes resíduos. Esta última estratégia inclui a compostagem, uma técnica que não é recente, para atenuar o problema dos resíduos sólidos, dando

um destino útil aos resíduos orgânicos. A compostagem é um processo natural de decomposição biológica, que além de evitar o acúmulo de resíduos sólidos urbanos em aterros, devolve à terra os nutrientes dos quais ela necessita. Este processo é realizado por bactérias, actinomicetos e fungos, e tem como resultado final um produto suficientemente estável, o composto, que pode ser aplicado no solo com várias vantagens sobre os fertilizantes minerais.

Os actinomicetos são bactérias Gram positivas, predominantemente filamentosas e com alto teor de citosina e guanina no seu DNA. No processo de compostagem, eles desempenham importantes funções, pois, conseguem degradar compostos de difícil decomposição como lignocelulose, lignina, celulose e outros materiais recalcitrantes. Além disto muitos actinomicetos também conseguem decompor compostos químicos ambientalmente prejudiciais.

Devido à importância da atividade dos actinomicetos durante o processo de compostagem este trabalho tem como objetivo geral identificar e caracterizar os actinomicetos isolados do processo de compostagem; e como objetivos específicos realizar a identificação destes microrganismos através da observação das suas características morfológicas e provas bioquímicas, caracterizá-los através do emprego da Reação em Cadeia da Polimerase e clivagem com endonucleases de restrição e analisar a similaridade entre os actinomicetos isolados da CETRISA e os da composteira da UFRGS.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Compostagem**

A compostagem trata-se de um processo biológico, aeróbio, controlado e desenvolvido por uma população diversificada de microrganismos, que promovem a transformação da matéria orgânica em um produto final estável (Bari and Koenig, 2001; Déportes et al., 1995; Liang et al., 2003; and Pereira Neto, 1996). Desta maneira, o componente ativo, mediando a biodegradação e o processo de conversão da matéria orgânica, é a comunidade microbiana residente no resíduo orgânico (Peters et al., 1999). Segundo Barrington et al. (2001) a compostagem é um dos poucos processos naturais capazes de estabilizar resíduos orgânicos. O processo de estabilização elimina a maioria dos parasitas, patógenos e vírus contidos no resíduo, reduz consideravelmente a emissão de odor, através da redução dos níveis de hidrocarbonetos biodegradáveis, e a secagem do resíduo o torna não atrativo para insetos.

Os microrganismos transformam a matéria orgânica em CO<sub>2</sub>, biomassa, calor e um produto final semelhante a húmus. Os principais componentes da matéria orgânica são carboidratos, proteínas, lipídeos e lignina. A capacidade dos microrganismos para assimilar matéria orgânica depende da sua habilidade para

produzir as enzimas necessárias para a degradação do substrato. Quanto mais complexo o substrato, mais amplo e complexo é o sistema enzimático requerido. Através da ação sinérgica de microrganismos, compostos orgânicos complexos são degradados a pequenas moléculas, as quais podem ser utilizadas pelas células microbianas (Tuomela et al.,2000).

O processo é desenvolvido em duas fases distintas: a fase de degradação ativa, necessariamente termofílica, e a fase de maturação (Pereira Neto, 1996). A primeira fase corresponde à fase de fermentação na qual a matéria orgânica alcança a bioestabilização, obtendo-se o chamado composto cru. A segunda fase é o estágio no qual a matéria atinge a humificação, neste estágio ocorre produção do composto curado, o qual é recomendado para ser utilizado na agricultura sem envolver quaisquer níveis de concorrência entre a atividade microbiológica e as plantas que receberam o composto (Lima, 1995)

A avaliação da maturidade do composto de resíduos sólidos urbanos tem sido reconhecida como um dos mais importantes problemas relacionados ao processo de compostagem e utilização agrícola do produto final. Sabe-se que a aplicação de composto imaturo ao solo, além de poder causar imobilização microbiológica de nitrogênio, pode ainda provocar decréscimo na concentração de oxigênio no solo, criando um ambiente redutor capaz de aumentar a solubilidade de metais pesados. Composto imaturo gera mau cheiro, inibe a germinação de sementes e interfere negativamente no desenvolvimento de plantas (Johnson and Crawford, 1993). Bernal et al. (1998) consideram a estabilidade e a maturidade os principais requisitos para o composto ser usado com segurança no solo. Segundo

os autores, a maturidade está associada com o potencial de crescimento da planta ou fitotoxicidade, enquanto que a estabilidade está relacionada com a atividade microbiana do composto. Estabilidade e maturidade andam lado a lado, visto que compostos fitotóxicos são produzidos por microrganismos em compostos instáveis.

Durante o processo de compostagem é possível encontrar uma grande variedade de microrganismos. Mantendo-se as condições aeróbias, a temperatura é o fator determinante da população microbiana durante a compostagem e pode apresentar quatro fases distintas: psicrófila, mesófila, termófila e de maturação.

Na fase psicrófila, que dura em média 1 ou 2 dias, os microrganismos digerem os compostos solúveis de fácil degradação e através do seu metabolismo exotérmico, proporcionam um aumento gradual da temperatura no interior das leiras (Kiel,1985; Pereira Neto, 1996). Na mesófila continua a atividade metabólica com transformação da matéria orgânica em ácidos o que acarreta uma redução do pH, a temperatura permanece subindo até atingir a fase termófila. Nesta etapa a temperatura excede o limite de tolerância dos microrganismos mesofílicos e promove o desenvolvimento de microrganismos termófilos (Hassen et al., 2001). Esta fase caracteriza-se pela presença de fungos e actinomicetos que degradam os resíduos mais complexos, neste período ocorre também à eliminação de microrganismos patogênicos não esporulados. Terminada a fase termófila, inicia-se a de maturação na qual ocorre um decréscimo da taxa de decomposição e da temperatura, sendo o material novamente colonizado por microrganismos mesofílicos (Lima,1995). O tamanho das fases da compostagem depende da

natureza da matéria orgânica a ser compostada e da eficiência do processo, que é determinada pelo grau de aeração. No início da compostagem a massa está à temperatura ambiente e normalmente, ligeiramente ácida. Fontes de carbono solúveis e facilmente degradáveis, como monossacarídeos, amido e lipídeos, são utilizados pelos microrganismos no estágio inicial da compostagem, com decorrente diminuição do pH devido aos ácidos orgânicos resultantes da degradação destes compostos. Com o decorrer do processo os microrganismos começam a degradar proteínas, resultando na liberação de amônio e no aumento do pH. Posteriormente fontes de carbono como celulose, hemicelulose e lignina são degradadas (Tuomela et al., 2000).

A compostagem é um processo dinâmico realizado por uma rápida sucessão de populações microbianas. Os principais grupos de microrganismos envolvidos são bactérias, actinomicetos e fungos. O número total de microrganismos não varia significativamente durante a compostagem, porém a diversidade microbiana varia durante as fases do processo. A natureza precisa da sucessão e o número de microrganismos envolvidos em cada fase da compostagem é dependente do substrato e dos microrganismos da sucessão anterior (Tuomela et al., 2000).

A compostagem de resíduos orgânicos é influenciada por diversos fatores, tais como:

a) Temperatura: é uma variável determinante no processo de compostagem. O metabolismo microbiano e a dinâmica das populações de microrganismos (composição e densidade) são altamente influenciados pela



temperatura. Elevação da temperatura na compostagem é uma função da temperatura inicial, da evolução do calor metabólico e da conservação do calor. A obtenção de uma temperatura mínima é essencial para um processo de compostagem efetivo e contribui substancialmente para as altas taxas de decomposição obtidas durante o processo (Liang et al., 2003). Segundo Hassen et al. (2001), em termos biológicos as temperaturas de operação podem apresentar uma variação como a seguir: a temperaturas superiores a 55°C ocorre a máxima sanitização, entre 45-55°C a máxima taxa de biodegradação e entre 35-40°C a máxima diversidade microbiana. Porém, a faixa de temperatura ótima para processar a compostagem está entre 23-60°C. Temperaturas abaixo de 23°C tornam o processo muito lento e não eliminam sementes e ovos viáveis presentes na massa. Temperaturas acima de 60°C podem inibir o processo ou cessá-lo rapidamente (Lima,1995), isto pode estar relacionado com o fato da diversidade bacteriana diminuir em temperaturas acima de 60°C (Schwab et al., 1994).

b) Aeração: é o principal mecanismo capaz de evitar altas temperaturas durante o processo, aumentar a velocidade de oxidação do material orgânico e diminuir a emissão de odores (ABEAS, 1999). Considera-se que o conteúdo mínimo de oxigênio no interior da leira seja de 5% (Lima,1995). A aeração pode ser conseguida através de revolvimentos da leira (método Windrow), por injeção e/ou sucção de oxigênio (Mandelli et al.,1991).

c) Umidade: o conteúdo de umidade da mistura de compostagem é uma variável ambiental importante. Ele representa um meio de transporte para nutrientes dissolvidos, necessários para as atividades metabólicas e fisiológicas

dos microrganismos. O baixo conteúdo de umidade pode causar desidratação durante a compostagem, o que poderia interromper o processo, resultando num composto biologicamente instável. Por outro lado, muita umidade produz condições anaeróbias que poderão prevenir ou parar o processo (Liang et al., 2003). Desta maneira, o conteúdo de umidade precisa ser alto o bastante para a manutenção da atividade biológica, mas sem reduzir o fornecimento de oxigênio necessário para os microrganismos aeróbios (Madejón et al., 2002). A matéria orgânica a ser decomposta deve ter umidade ótima entre 40 a 60%. Valores elevados de umidade, acima de 65%, podem causar anaerobiose do sistema e valores muito baixos, inferiores a 40% inibem a atividade microbiológica, diminuindo a velocidade de estabilização do composto (Lima, 1995; ABEAS, 1999).

d) Dimensão das partículas: segundo Kiel (1985) recomenda-se que devam ser usadas partículas com tamanho em torno de 1 a 5 cm. A diminuição do diâmetro facilita o ataque pelo microrganismos e favorece a homogeneização do material em termos de densidade, composição e temperatura. No entanto, partículas muito pequenas podem prejudicar a difusão de oxigênio e a circulação de água, devido à compactação da massa.

e) Relação C/N: serve como indicador da etapa na qual o processo se encontra. No início da compostagem esta relação é alta, na ordem de 30:1 e diminui no final para 10:1 (Lima, 1995). Microrganismos requerem fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e potássio, e outros elementos traços para seu crescimento. O carbono serve, primariamente como fonte de energia para os microrganismos, enquanto uma pequena fração de carbono é incorporada em

suas células. Parte da energia formada é usada para o metabolismo microbiano e o resto é liberado como calor. O nitrogênio é um elemento crítico para os microrganismos, porque ele é um dos componentes das proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, enzimas e coenzimas necessários para o crescimento e funcionamento celular. Se o nitrogênio é um fator limitante durante o processo de compostagem, o processo de degradação poderá ser lento. Em contraste, se há nitrogênio em excesso, ele freqüentemente é perdido do sistema como gás amônia ou outro composto nitrogenado (Tuomela et al., 2000).

A compostagem pode ser usada para estabilizar e diminuir o lodo de esgoto, os resíduos industriais, agrícolas e municipais e também pode ser aplicada para o tratamento de resíduos perigosos como explosivos e resíduos de petróleo (Thassitou and Arvanitoyannis, 2001). Outras vantagens relacionadas a este método são: evita os aspectos estéticos desagradáveis e a emissão de odor, constitui-se num processo de conservação de macro e micronutrientes, evita a produção de fitotoxinas durante a decomposição da matéria orgânica “in natura” no solo, gera um produto final humificado que elimina e controla os patógenos de plantas, retém a umidade necessária para as plantas, regula o pH de solos ácidos, elimina a poluição das águas superficiais e subterrâneas e retém as características químicas e biológicas do solo (ABEAS, 1999). Apesar de todas as vantagens acima citadas, precauções devem ser tomadas durante a aplicação do composto no solo, pois a utilização de um composto imaturo poderá causar deficiência de nitrogênio para as plantas, visto que ele poderá utilizar o nitrogênio pré-existente no solo para completar sua humificação, além disso um composto

imaturo poderá conter microrganismos patogênicos, transformando-se desta forma num risco para a saúde pública.

Indicadores de contaminação fecal podem ser utilizados para monitorar o processo de compostagem. Destes os mais utilizados são: as bactérias do grupo coliforme e os enterococos fecais. Porém outros indicadores de qualidade sanitária podem ser utilizados, estes incluem: os *Staphylococcus*, os quais são importantes causadores de infecções cutâneas o que representa um risco para a saúde das pessoas que trabalham com o composto, e a presença de *Shigella* e *Salmonella* (Hassen et al., 2001). Segundo Déportes et al. (1995), os valores padrões propostos para a qualidade microbiana do composto utilizando indicadores de contaminação são os seguintes:  $5 \times 10^3$  *Enterococcus faecalis* /g,  $5 \times 10^2$  enterobactérias/g, ausência de *Salmonella* em 100g e ausência de ovos de parasitas.

Outro fator importante a ser considerado é a presença de metais pesados. Segundo Hassen et al., (2001) a quantidade destes elementos no composto não poderá alcançar um limiar que prejudique a fertilidade do solo e a cadeia alimentar. Pois isto poderia ocasionar um efeito tóxico contra microrganismos, inibição da mineralização e da humificação, perturbação dos ciclos biogeoquímicos e absorção pelas plantas, homens e animais.

A compostagem sozinha não irá resolver os problemas do destino final do lixo urbano, mas se for utilizada em conjunto com a coleta seletiva, onde a matéria orgânica é separada da inorgânica, poderá diminuir a quantidade de resíduos finais destinados aos aterros sanitários. Segundo Sayago (1998) a

compostagem e a reciclagem além de reduzir a necessidade de expansão dos aterros, ainda aumenta a oferta de matéria-prima reciclada, atenuando a demanda por recursos naturais.

## 2.2. Actinomicetos – Características Gerais

Os actinomicetos são bactérias Gram positivas, com alto conteúdo de G+C no seu DNA (Monciardini et al., 2002). Estes caracterizam-se pela sua diversidade morfológica e de metabólitos. Um exemplo destes são os antibióticos produzidos principalmente, como metabólitos secundários no final da fase exponencial do ciclo de crescimento. Eles também são notórios na produção de pigmentos, enzimas extracelulares e compostos terpenóides que dão o odor característico do solo. A diversidade morfológica dos actinomicetos pode ser exemplificada, primariamente, pelas suas estratégias reprodutivas que levam a formação de uma variedade de estruturas de esporos, como: artrósporos, característicos de *Streptomyces*; endósporos, dos *Thermoactinomyces*; aleuriósporos, das *Micromonospora* e os zoósporos móveis dos membros dos *Actinoplanaceae*, assim como *Oerskovia*, *Geodermatophilus* e *Kitasatoa* (Ensign, 1978).

Os esporos de *Streptomyces* não são resistentes ao calor e são metabolicamente menos ativos do que as células vegetativas, mas possuem algumas enzimas e metabolizam substratos endógenos e exógenos. Os esporos de *Streptomyces streptomycini*, por exemplo, contêm várias enzimas envolvidas no metabolismo central do carbono, nitrogênio e compostos contendo fósforo. As

atividades específicas de algumas enzimas catalizando reações de desidrogenação, são maiores em esporos do que no micélio vegetativo jovem. Atividade de catalase nos esporos de *S. streptomycini* é várias vezes maior do que no micélio vegetativo. Esporos de vários estreptomicetos contêm citocomas a, b e c. Os esporos de estreptomicetos são similares aos esporos de fungos e diferente dos esporos de *Bacillus*, por serem permeáveis a pequenas moléculas (Ensign, 1978).

Os endósporos dos *Thermoactinomyces* assemelham-se morfológica e estruturalmente aos esporos dos *Bacillus*. Eles contêm grande quantidade de íons cálcio e magnésio e ácido diaminopimélico. Estudos respirométricos não detectaram metabolismo endógeno e esta carência de respiração pode estar relacionada com o baixo conteúdo de citocromo a. Os esporos de *Thermoactinomyces* sobrevivem à fervura por períodos de tempo equivalente aos esporos de *Bacillus* e *Clostridium*. Estes endósporos são constitutivamente dormentes, isto significa que eles só germinam após terem sido ativados (Ensign, 1978).

Os membros da família *Actinoplanaceae* possuem esporos, que na maioria das espécies, são móveis e ficam dentro de um esporângio. Esta família divide-se em dois grupos: o primeiro, caracteriza-se por um esporângio esférico ou cilíndrico, contendo milhares de esporos, é representado pelos seguintes gêneros: *Actinoplanes*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*, *Amorphosporangium*, *Ampullariella* e *Pilimelia*. O segundo grupo, é caracterizado por organismos que produzem 3 ou 4 esporos dentro de um esporângio semelhante a dedos, os

membros deste grupo são: *Planobispora*, *Dactylosporangium* e *Kitasatoa*. Os esporos da maioria dos actinoplanace possuem flagelos e são desta maneira zoósporos. Os flagelos são feitos de 5 a 6 subfibrilas que surgem de um disco basal localizado na membrana interna. O número de flagelos varia de 1 a 40 e a maioria forma tufo num dos pólos do esporo. Dentro do esporângio os esporos não são flagelados, tornam-se depois de serem liberados. Desta forma, o flagelo dos zoósporos funciona somente por um curto período durante o ciclo de vida, sugerindo desta forma, que a proteína do flagelo é diferente da flagelina das demais bactérias. *Dactylosporangium*, destaca-se por produzir dois tipos de esporos: os zoósporos, que não são dormentes e aparecem inicialmente no crescimento, têm como função garantir a disseminação do organismo; e os aleuriósporos, os quais são constitutivamente dormentes e têm como função proporcionar sobrevivência por períodos com falta de “alimento” e dissecação (Ensign, 1978).

Segundo Reponen et al., (1998) os esporos de actinomicetos são conhecidos por serem contaminantes do ar em ambientes de trabalho, tais como: instalações agrícolas e usinas de compostagem de resíduos. Eles também são encontrados com frequência em construções com problemas de umidade e mofo e por este motivo são utilizados como indicadores de mofo em construções. Além disso, os esporos de algumas espécies de actinomicetos, como por exemplo: *Thermoactinomyces vulgaris*, *Streptomyces albus* e *Micropolyspora faeni*, estão relacionadas com alta incidência de alveolite alérgica e outros problemas de saúde.

Os actinomicetos possuem uma grande diversidade de habitats. Eles podem ser isolados de humanos, animais, plantas, águas residuais, produtos alimentícios, pedras, construções e obras de arte, mas o seu habitat principal é o solo (Groth et al., 1999). Segundo Kennedy (1999), os actinomicetos compreendem mais de 30% da população total de microrganismos no solo. Eles estão adaptados para crescer sobre substratos sólidos. Segundo McCarthy and Willians (1992), os substratos insolúveis e poliméricos são as fontes primárias de carbono no solo, desta forma eles necessitam da secreção de uma variedade de enzimas extracelulares e hifas penetrando e colonizando o substrato. A ocorrência de actinomicetos em ambientes aquáticos pode estar relacionada com a lixiviação do solo e conforme Araujo (1998), esta hipótese deve-se ao fato da diversidade taxonômica de actinomicetos do solo ser a mesma do ambiente aquático.

Estes microrganismos são metabolicamente diversos e são capazes de utilizar fontes variadas de carbono e energia. Desta maneira eles podem ser autotróficos, heterotróficos, quimiotróficos ou fototróficos (Kennedy,1999). A maioria é aeróbia, mas existem alguns actinomicetos anaeróbios ou anaeróbios facultativos, eles crescem, preferencialmente, em solos de pH neutro à alcalino, embora muitos actinomicetos cresçam em solos ácidos (Araujo, 1998). A sua dispersão na natureza ocorre, principalmente, por meio de esporos hidrofóbicos, adaptados à dispersão aérea, contudo os actinomicetos formadores de esporângio e as micromonosporas, que não formam hifas aéreas, são hidrofílicos e são dispersos pelo movimento da água através do solo (McCarthy and Willians, 1992).



Os actinomicetos desempenham um papel crucial na decomposição de compostos orgânicos e poluentes ativos na natureza (Groth et al., 1999). Eles são ativos na decomposição de materiais orgânicos no solo, incluindo lignina e outros polímeros recalcitrantes e podem degradar resíduos agrícolas e urbanos (Heuer et al., 1997). Em *Streptomyces* e outros gêneros de actinomicetos, a degradação da lignina ocorre durante o crescimento primário e presume-se ser o resultado da atividade metabólica primária (Ramachandra et al., 1988). Nestes organismos a mineralização da lignina a CO<sub>2</sub> é baixa, porém a sua solubilização é alta e está associada a formação de húmus em solos e sedimentos (Ball et al., 1990). Em *Streptomyces viridosporus* T7A, um dos actinomicetos onde a degradação da lignina tem sido mais estudada, observou-se à oxidação, despolimerização e solubilização da lignina com produção de uma ligninina modificada, a ligninina polimérica precipitável em ácido (APPL), como o maior produto da degradação da ligninina (Thomas and Crawford, 1998). Diferente do que ocorre com os fungos, a degradação da lignina não é inibida em altas concentrações de nitrogênio orgânico e inorgânico e a produção de peroxidase, uma enzima envolvida no catabolismo inicial da lignina, também não é inibida por altos níveis de nitrogênio, porém está sujeita a repressão catabólica da glicose (Ramachandra et al., 1988).

A capacidade celulolítica de actinomicetos também já foi verificada e envolve a ação sinérgica de várias enzimas, como: endoglucalase, exoglucanase e  $\beta$ -glucosidase. A primeira possui a habilidade de clivar substitutos derivados da celulose, tais como o carboximetil celulose; a segunda, libera unidades de celobiose de cadeias finais não reduzidas de celulose microcristalina

(Avicel); e a terceira catalisa a hidrólise de celobiose e celooligossacarídeos à glicose (Wachinger et al., 1989). *Micromonospora bispora* parece ser o actinomiceto termofílico mais fortemente celulotítico. Ele possui uma estratégia similar à utilizada por fungos, que é a secreção de múltiplas enzimas, incluindo celobiohidrolase, que agem de forma sinérgica para afetar a degradação e permitir a ramificação das hifas sobre o substrato (McCarthy and Willians, 1992). A celulase pode ser identificada na forma extracelular ou associada ao micélio, e a sua produção parece ser controlada por repressão catabólica. Wachinger et al. (1989) observou uma forte inibição da produção de enzimas na presença da glicose.

Os actinomicetos são qualitativa e quantitativamente importantes na rizosfera. Segundo Crawford et al. (1993), eles podem influenciar o crescimento de plantas e podem proteger as raízes da invasão de fungos patogênicos, podendo desta maneira, serem utilizados no controle biológico de doenças em plantações. Actinomicetos também atuam como um grupo antagonista de fungos e micróbios colonizadores de raízes e podem desempenhar funções na colonização e formação de micorrizas, alguns parecem ser hiper-parasitas de fungos, oósporos ou esclerótia de fungos, outros produzem compostos herbicidas e inseticidas. Pandhare and Deshpande (2002), verificaram a produção de inibidores de protease alcalina por *Streptomyces* sp. Este fato é bastante importante porque estas proteínas são essenciais para o ciclo de vida de muitos organismos fitopatogênicos. Podendo, desta forma, os actinomicetos inibidores de proteases serem utilizados no biocontrole em plantas.

Os actinomicetos também produzem produtos químicos como a tiamina, riboflavina, flavoproteínas, vitamina B<sub>12</sub>, várias porfirinas, compostos contendo ferro e coenzimas que podem promover ou inibir o crescimento de outros organismos (Kennedy, 1999).

Estes microrganismos são importantes degradadores de pesticidas e esta capacidade de degradação não está restrita a um gênero ou família em particular. Os actinomicetos degradadores de pesticidas pertencem aos gêneros das subordens: *Micrococcineae* (*Artrobacter*, *Brevibacterium*, *Clavibacter*), *Corynebacterineae* (*Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*), *Micromonosporineae* (*Micromonospora*), *Propionibacterineae* (*Nocardioides*) e *Streptomycineae* (*Streptomyces*). Estes actinomicetos podem degradar diversos pesticidas, tais como: organoclorados, triazinas simétricas, triazinonas, carbamatos, sulfonilúreas e acetanilidas. A degradação destes pesticidas pode ocorrer através da utilização destes compostos como única fonte de carbono e energia ou pelo cometabolismo (Schrijver and Mot, 1999). Esposito et al. (1998) observaram em seu trabalho que *Streptomyces* sp. apresentavam bom potencial de bioremediação de solos contaminados com Diuron, um dos herbicidas mais utilizados no Brasil, sem a produção de metabólitos secundários.

Os *Streptomyces* possuem a capacidade de produzir grandes quantidades de enzimas com variada potencialidade de uso industrial. Os principais grupos de enzimas são: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e sintases. Na natureza eles desempenham um papel importante na formação do húmus, especialmente pela produção de enzimas extracelulares com

capacidade de degradar compostos celulolíticos (Padilha, 1998). Além disto são importantes produtores de antibióticos.

Membros do gênero *Frankia* fixam nitrogênio em nódulos de plantas não leguminosas (Heuer et al., 1997). Por esta razão são bastante importantes para o balanço mundial do nitrogênio (Araujo, 1998).

*Nocardia* e *Rhodococcus* são importantes componentes da microflora do solo e estão envolvidos na degradação da matéria orgânica e são capazes de decompor compostos químicos, ambientalmente prejudiciais (Groth et al., 1999).

Os *Rhodococcus* desempenham papel importante em processos de bioremediação e biodegradação. Estes microrganismos podem estar naturalmente presentes em ambientes contaminados com hidrocarbonetos e outros produtos químicos, podem persistir nestes solos por períodos longos e podem degradar os poluentes mesmo na presença de fontes de carbono mais facilmente assimiláveis. Estas bactérias conseguem degradar poluentes hidrofóbicos por que as suas células conseguem se aderir à interface água/óleo, e esta capacidade é decorrente do fato destes microrganismos possuírem cadeias alifáticas de ácidos micólicos na sua parede celular, o que lhes conferem natureza hidrofóbica. Além disto, eles também possuem um papel importante na imobilização de metais pesados e na produção de surfactantes, floculantes, amidos e polímeros (Bell et al. 1998).

### 2.3. Actinomicetos em processo de compostagem

Actinomicetos são numerosos no processo de compostagem e desempenham importantes funções na sua decomposição. Esta importância está relacionada com a sua habilidade de degradar moléculas complexas e recalcitrantes, como celulose, lignina e lignocelulose (Ouhdouch et al. 2001). Muitas das espécies são termofílicas, com temperatura ótima em torno de 55°C. A termogênese dentro das pilhas de composto é essencial para proporcionar temperaturas adequadas para crescimento destes microrganismos (Lacey, 1997).

A maioria dos estudos com actinomicetos em processos de compostagem tem sido realizada em compostos de cogumelos e têm mostrado a predominância de *Streptomyces* sp. com micélio aéreo cinza, *Micromonospora* sp. e ocasionalmente *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora* e *Actinobifida* sp.. Neste tipo de material os actinomicetos decompõem ativamente manano e xilano em hemicelulose, celulose e lignina e também podem degradar muitos outros materiais orgânicos (Lacey, 1997). Neste tipo de compostagem podem ser encontrados em torno de  $1,2 \times 10^{10}$  cfu/g de actinomicetos depois de 10 dias a 50°C. A população costuma diminuir ligeiramente, em temperaturas de 65°C, porém crescimento costuma ser inibido em temperaturas inferiores a 28°C e superiores a 75°C (Lacey, 1997).

Há poucos estudos sobre desenvolvimento de actinomicetos em compostagem de resíduos domésticos, mas a sua abundância é demonstrada pelo grande número de esporos aéreos quando o composto é manejado. Resíduos domésticos frescos contém poucos actinomicetos (Lacey, 1997).

Contudo, os números aumentam rapidamente com a evolução do processo (Dees and Ghiorse, 2001). Eles aparecem, predominantemente, durante a fase termofílica assim como na fase de esfriamento e maturação da compostagem, e podem ocasionalmente, tornarem-se tão numerosos que podem ser visíveis na superfície do composto (Tuomela et al., 2000). Jang et al. (2002) também observaram no seu trabalho que a quantidade de actinomicetos isolados durante o processo de compostagem de resíduos alimentares aumentou com o decorrer do processo. Este aumento durante as fases termofílica, esfriamento e maturação foi em torno de  $10^2$ , quando comparado com a fase inicial do processo. O autor atribuiu este crescimento ao fato dos actinomicetos crescerem mais facilmente sobre lignina e celulose residual do que os fungos e demais bactérias.

Os gêneros de actinomicetos predominantemente isolados da compostagem de resíduos sólidos urbanos incluem *Nocardia*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* e *Micromonospora* (Tuomela et al., 2000).

Os esporos de actinomicetos são facilmente dispersos no ar durante o processo de revolvimento das leiras. A concentração pode ser superior a  $2 \times 10^7$  esporos de actinomicetos/ $m^3$  no ambiente de compostagem para cogumelos e superior a  $7,4 \times 10^8$  próximo as leiras em revolvimento. Durante o processo de compostagem de resíduos domésticos estes valores alcançam uma concentração máxima de  $10^6$  cfu/ $m^3$  (Lacey, 1997). Segundo McCarthy and Williams (1992), os actinomicetos que degradam celulose e lignocelulose preferem pH neutro a alcalino, por isto populações grandes destes actinomicetos costumam se

desenvolver em compostagem para o cultivo de cogumelos, por que nestes processos as condições costumam ser alcalinas.

Apesar da importância dos actinomicetos para o processo de compostagem, eles constituem um risco respiratório potencial para os trabalhadores. Segundo Déportes et al. (1995), estes microrganismos estão ligados à poeira produzida pelo composto, especialmente durante o revolvimento das leiras e uma exposição a  $10^8$  células/m<sup>3</sup> destas bactérias podem iniciar a sensibilização e reação alérgica.

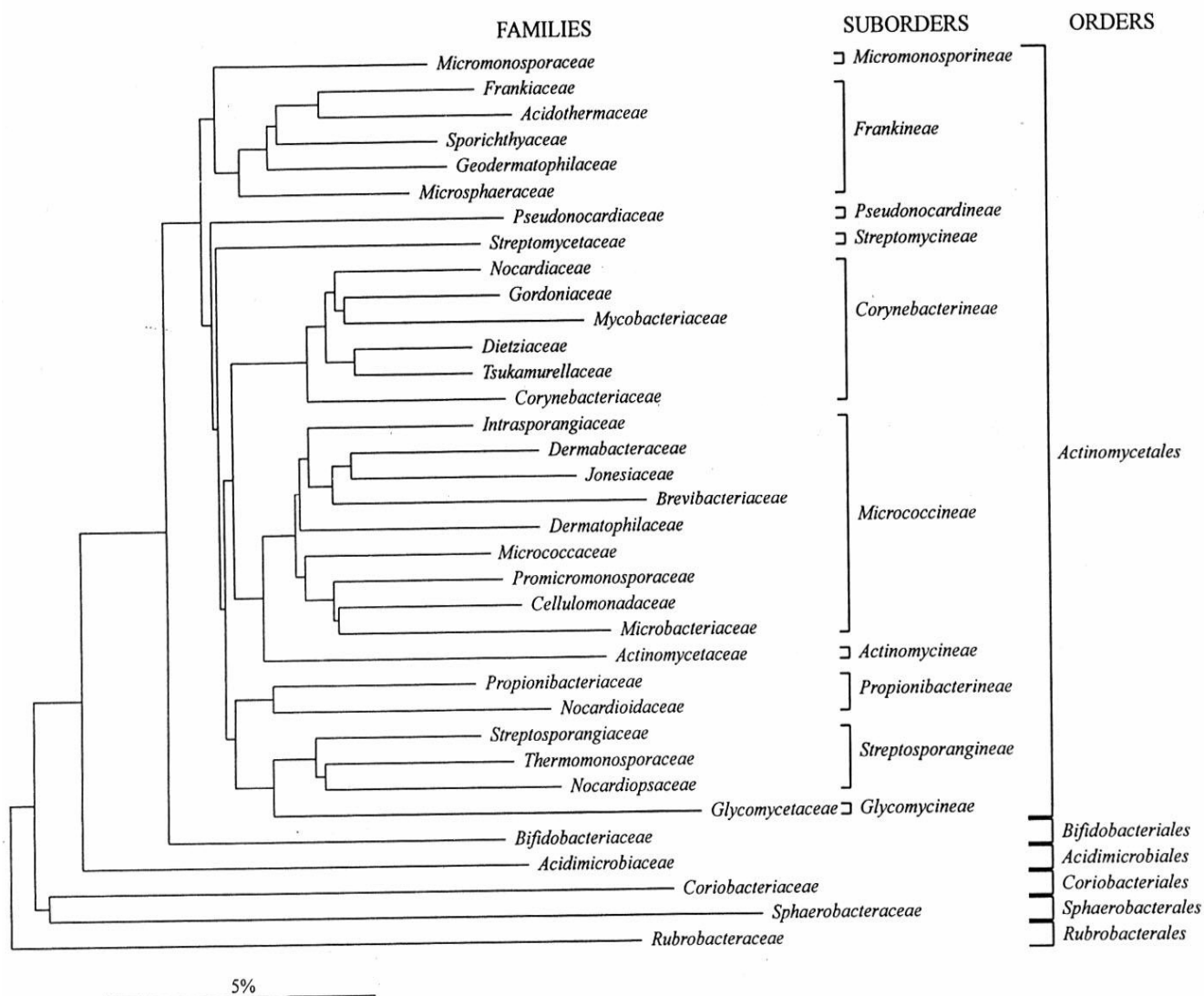
#### **2.4. Identificação e classificação dos actinomicetos**

A sua filogenia e sistemática têm sido alvo de grandes estudos e estes envolvem análises morfológicas, propriedades quimiotaxonômicas e técnicas moleculares, entre outros. De acordo com Embley (1994) vários estudos já foram feitos tentando construir árvores filogenéticas destes microrganismos. Em 1936 e 1941, respectivamente, Kluwyer & Van Niel e Stanier & Van Niel foram um dos primeiros a proporem árvores filogenéticas incluindo os actinomicetos. De acordo com seus esquemas, as formas morfológicamente complexas, como os actinomicetos, evoluíram de formas esféricas simples, e os actinomicetos formadores de micélio deram origem aos proactinomicetos, as micobactérias e as corinebactérias, e as formas ramificadas deram origem às bactérias ácido láctico e ácido propiônico. Por outro lado, no ano de 1945, Krassil'nikov propôs uma origem polifilética de várias linhas bacterianas individuais, das quais a classe Actinomycetes evoluiu de um ancestral que também deu origem aos fungos. Ele

também considerou que a ponte entre as micobactérias e as bactérias ácido láctico e ácido propiônico eram as bifidobactérias. Prauser (1975) usou a morfologia para descrever as tendências evolucionárias e propôs que os nocardioformes formadores de micélio representavam o estágio intermediário entre os corineformes pleomórficos e os actinomicetos morfologicamente complexos formadores de esporos.

Stanley et al. (1989) colocaram os actinomicetos dentro da classe *Tallobacteria* da divisão *Firmicutes*, porém esta classe agrupava organismos muito distintos como as bactérias Gram positivas “simples” e os actinomicetos. Desta forma Stackebrandt et al. (1997) propuseram uma nova classe, a Actinobacteria. Isto foi feito levando-se em consideração três fatores: primeiro, o estabelecimento de propriedades quimiotaxonômicas que detectam diferenças na composição química dos constituintes da célula, tais como peptidoglicano, lipídeos polares, ácidos graxos, quinonas isoprenóis, citocromos e composição de bases do DNA; segundo, a introdução de experimentos de re-associação DNA-DNA, que mediam, de modo geral, as similaridades entre DNA fita única de espécies proximamente relacionadas; terceiro, a determinação de similaridades de seqüências 16S RNAr e DNAr entre linhagens de todos os níveis de relacionamento. Segundo a classificação proposta por Stackebrandt et al.(1997) a classe Actinobacteria possui 6 subclasses, 6 ordens e 34 famílias (Figura 1). Entretanto um ancestral comum entre os actinomicetos e a segunda divisão de bactérias Gram positivas (definidos por *Clostridium*, *Bacillus* e seus relacionados) ainda não foi demonstrado de forma convincente pela análise do 16S RNAr.





**Figura 1:** Dendrograma da classe Actinobacteria mostrando a presença de seis ordens, assim como as 10 subordens da ordem Actinomycetales baseada na comparação de seqüências do 16S DNAr/RNAr (Fonte: Stackebrandt, 1997).

Porém análise de seqüências da glutamina sintetase, glutamato desidrogenase e proteína do choque térmico (HSP70) revelaram um ancestral comum entre as bactérias Gram positivas (Stackebrandt et al., 1997).

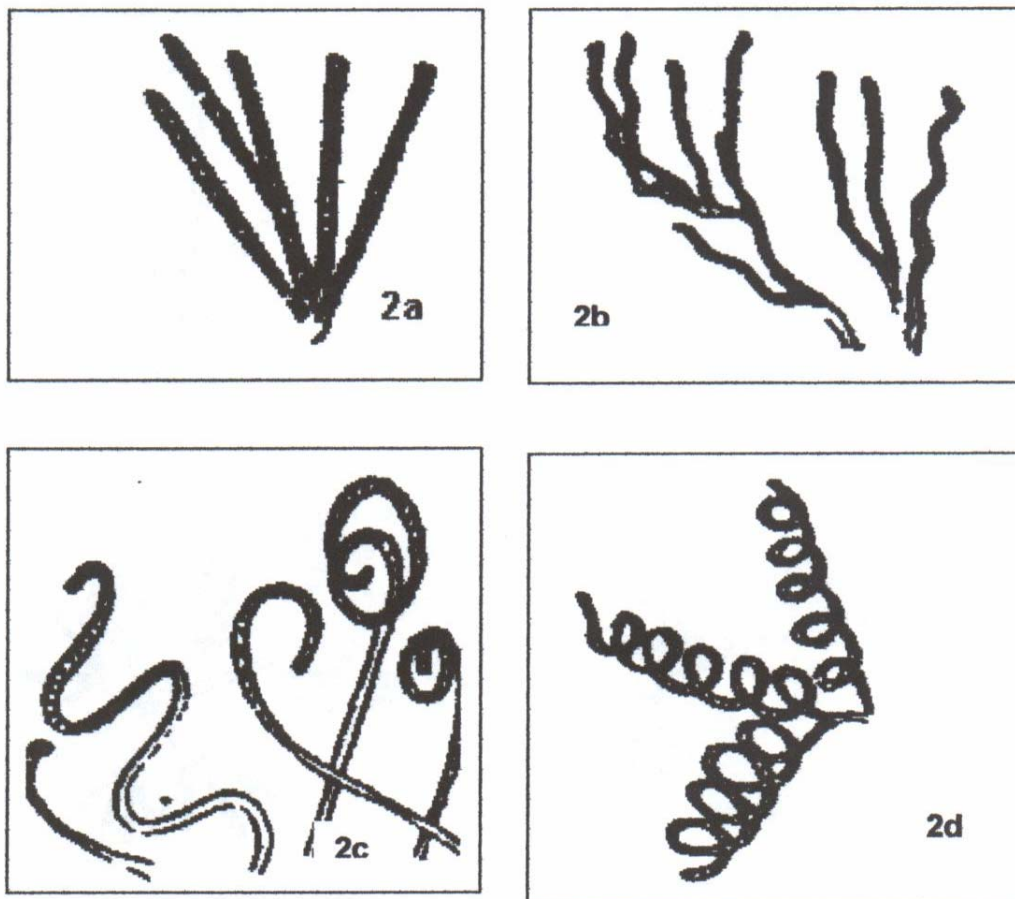
As características morfológicas, tais como: ramificação do micélio sobre o substrato, formação de micélio aéreo e sua fragmentação ou produção de esporos são fatores que auxiliam na identificação dos actinomicetos.

Nos actinomicetos formadores de esporos, observa-se também o tipo e número de esporos, bem com o seu arranjo. Desta maneira os esporos podem ser únicos, como os encontrados em *Micromonospora* e *Thermomonospora*, em pares longitudinais característicos de *Microbispora*, em cadeias de esporos como *Nocardia* e *Streptomyces* ou contidos dentro de um esporângio como em *Actinoplanes* e *Streptosporangio*. Em relação ao arranjo eles podem ser simples ou verticilado. O primeiro poderia produzir cadeias de esporos eretas (Figura 2a), flexíveis (Figura 2b), “Retinaculum-Apertum”-RA (Figura 2c) ou espirais (Figura 2d), e o segundo, o qual caracteriza-se por um verticilo verdadeiro com um eixo principal maior do que as hifas ramificadas e com espaço uniforme entre os verticilos, pode produzir monoverticilos (Figura 3a), monoverticilos espirais (Figura 3b), biverticilos (Figura 3c) ou biverticilos espirais (Figura 3d).

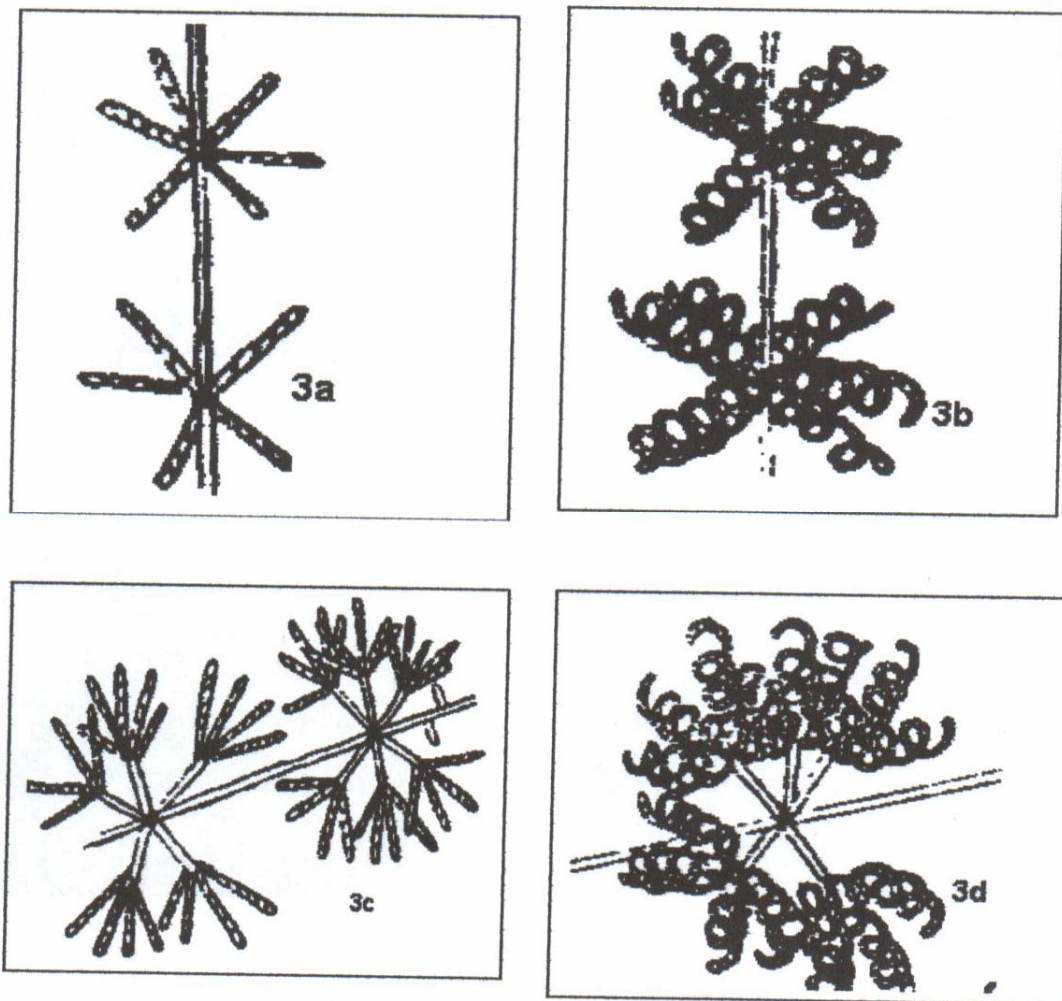
A utilização do microscópio eletrônico pode oferecer algumas informações adicionais sobre a superfície dos esporos, pois através dele pode-se verificar se o esporo possui uma superfície lisa (Figura 4a), enrugada (Figura 4b), espinhosa (Figura 4c) ou felpuda (Figura 4d).

Desta forma os actinomicetos representam um grupo diversificado de microrganismos que podem ser classificados taxonomicamente através da composição e estrutura do peptídeoglicano, morfologia e coloração do micélio e esporângio, característica da superfície e arranjo dos conidiósporos, porcentagem

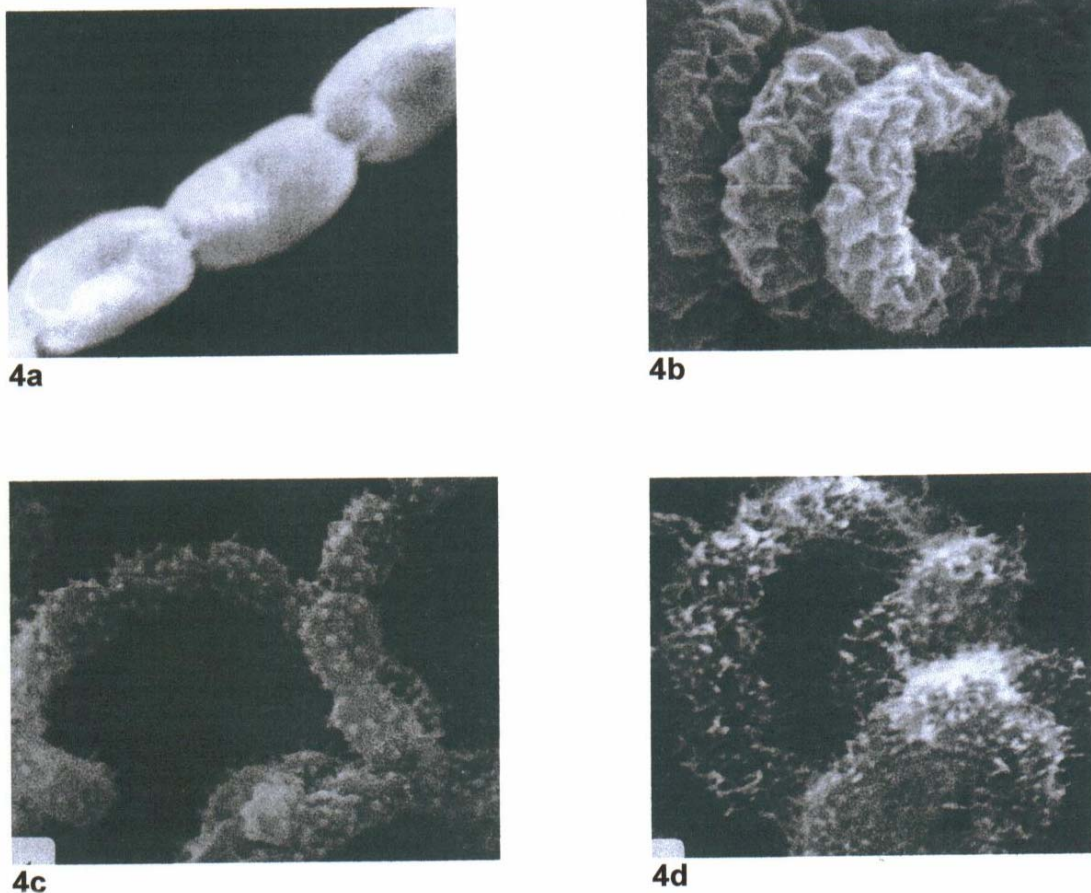
G+C, seqüência de 16S rDNA, composição fosfolipídica da membrana celular e resistência dos esporos ao calor (Prescott, 1993).



**Figura 2:** Tipos de arranjo da cadeia simples de esporos (2a), cadeias retas; (2b), cadeias flexíveis; (2c), cadeias “reticulum-apertum”; (2d), cadeias em espirais (Fonte: Shirling and Gottlieb, 1966).



**Figura 3:** Tipos de arranjo das cadeias verticiladas. (3a), monoverticilo; (3b), monoverticilo espiral; (3c), biverticilo; (3d), biverticilo espiral (Fonte: Shirling and Gottlieb, 1966).



**Figura 4:** Tipos de superfícies dos esporos. (4a), superfície lisa; (4b), superfície rugosa; (4c), superfície espinhosa; (4d), superfície felpuda. (Fonte: Willians et al., 1989a).

## 2.5. DNA/RNA ribossomal

Ribossomos possuem a função básica de traduzir mRNA em peptídeos e proteínas. Desta forma, genes que codificam para RNAs ribossomais estão distribuídos universalmente em sistemas vivos, em número repetido de cópias. Cada repetição dos genes para rRNA é constituída por uma unidade transcricional e uma região espaçadora, chamada IGS. A unidade transcricional é composta por subunidades: 16S e 23S, em bactérias. A região 16S interage diretamente com o

anticodon do RNAt enquanto que a subunidade 23S interage com o sinalizador terminal CCA do RNAt-peptidil (Lewin, 2000).

As subunidades são separadas por espaçadores internos, os ITSs. As subunidades são altamente conservadas, enquanto que os ITSs e os IGSs são mais variáveis. Desta maneira o DNAr é constituído por regiões que evoluíram com velocidades diferentes. Por esta razão o RNAr serve como uma fonte valiosa para o delineamento de relacionamentos filogenéticos e para a identificação de taxon. As regiões mais conservadas são a base para a análise filogenética e para o desenho de sondas de oligonucleotídeos universais e oligonucleotídeos iniciadores usados para a identificação e amplificação do DNAr de membros de taxa superiores (Stackebrandt et al., 1991; Schmalenberger et al., 2001).

Por outro lado, o sequenciamento, a análise de restrição e a tipificação molecular de regiões 16S-23S têm mostrado ser útil para estudos sobre relacionamentos filogenéticos entre organismos proximamente relacionados (Yoon et al., 1998).

A seqüência de espaçadores internos 16S-23S tem alta freqüência de inserção e deleção, resultando num alto índice de evolução. O número de inserções e deleções em seqüências 16S-23S podem constituir importantes diferenças entre organismos (Yoon et al., 1998). Desta forma fragmentos de DNA contendo regiões conservadas, assim como regiões intergênicas variáveis entre os genes 23S e 16S podem ser usadas para distinguir linhagens de diferentes níveis taxonômicos.

A maioria dos organismos possuem múltiplas cópias de genes RNAr. Todas as cópias dos genes RNAr de um organismo são idênticas ou quase idênticas em seqüência de nucleotídeos, esta homogeneidade ocorre pela evolução combinada dos genes repetidos e pela alta pressão seletiva sobre a seqüência primária das moléculas, para manter as interações precisas com os componentes do complexo maquinário de síntese protéica (Wang et al., 1997; Ueda et al., 1999).

No domínio *Bacteria* os genes codificando 5S, 16S e 23S RNAr são tipicamente organizados dentro de um operon. O número de cópias de operons no genoma bacteriano é variável e está relacionado com a taxa de crescimento do organismo. Geralmente, assume-se que cópias múltiplas de operons RNAr em organismos procarióticos são requeridas para se obter altas taxas de crescimento, e isto compreende uma estratégia de resposta à disponibilidade de recursos (Klappenbach et al., 2000).

A presença de dois tipos distintos de genes da subunidade RNAr num único genoma tem sido relatada em organismos pertencendo aos domínios *Eucarya* e *Archaea*. A origem de tipos distintos de um gene RNAr num único genoma tem sido explicado por evolução divergente seguida pela duplicação do gene ou por transferência lateral de genes (Wang et al., 1997).

A análise de diferentes conjuntos de genes também revelou que nem todos são igualmente suscetíveis há transferência lateral. Quando os genes estão agrupados de acordo com funções biológicas envolvidas na transcrição, tradução e duplicação do DNA eles raramente são identificados como produto de

transferência lateral. O fato do sucesso da transferência de um gene estar inversamente relacionado com a complexidade de interações dos seus produtos com outros componentes celulares chama-se: hipótese da complexidade. Os genes RNAr podem estar entre aqueles raramente transferidos lateralmente, isto porque, os RNAr precisam interagir de maneira altamente coordenada com mais de 100 produtos de genes, para formar os ribossomos e realizar a síntese de polipeptídeos. Porém sugere-se a transferência de partes dos genes de maneira que este processo pode ocorrer repetidamente, envolvendo diferentes partes de um gene e levando a mudanças graduais da seqüência nucleotídica, isto chama-se hipótese da complexidade simplificada (Wang and Zhang, 2000). Segundo estes autores os níveis de heterogeneidade não possuem sérios problemas no estabelecimento de relacionamentos relativamente distantes, porém devem ser considerados na determinação de relacionamentos em nível de espécie ou subespécie.

Técnicas de biologia molecular têm se mostrado uma ferramenta importante para a análise da estrutura e composição das espécies da comunidade microbiana. Entre estas, destaca-se à análise de seqüências RNAr, que tem sido explorada para inferir relacionamentos filogenéticos entre microrganismos, para o desenvolvimento de sondas de nucleotídeos, para a detecção de taxa microbianos individuais, para a determinação da diversidade genética das comunidades microbianas e para a identificação de microrganismos ainda não cultiváveis (Muyzer et al., 1993). Além disto o isolamento de genes RNAr para análise filogenética pode ser menos seletivo e proporcionar uma visão mais representativa



da estrutura da comunidade microbiana do que as técnicas clássicas (Reysenbach et al., 1992). Levando-se em consideração as vantagens anteriormente citadas o emprego da região 16S DNAr, como um marcador molecular para análise de microrganismos presentes no processo de compostagem, vem crescendo gradualmente. Blanc et al. (1999), utilizaram oligonucleotídeos iniciadores universais para amplificar seletivamente o 16S RNAr e posteriormente clivou os produtos obtidos com endonucleases de restrição para avaliar a diversidade microbiana durante o processo. Peters et al. (2000), também utilizaram oligonucleotídeos iniciadores específicos para as regiões V4-V5 dos genes 16S DNAr de eubactérias, a região V3 dos genes 16S DNAr de actinomicetos e a região V8-V9 dos genes 18S DNAr de fungos, posteriormente os autores submeteram os produtos do PCR com a análise do polimorfismo da conformação da fita única (SSPC) para detectar a sucessão de espécies durante o processo.

## **2.6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Ferramentas moleculares tornaram-se um grande potencial para auxiliar a detecção de bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo. Uma dessas ferramentas moleculares é a amplificação por PCR de regiões variáveis de genes codificando 16SrRNA (16S rDNA) pelo uso de oligonucleotídeos homólogos a regiões conservadas do gene (Heuer et al., 1997). O 16S DNAr completo pode ser amplificado diretamente ou depois da transcrição do RNAr com um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores ligados as regiões conservadas do 16S RNAr/DNAr (Wintzingerode et al., 1997).

PCR é uma técnica que permite a amplificação *in vitro* de segmentos do DNA, usando dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que hibridizam com fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. Ela consiste de ciclos repetitivos de desnaturação do DNA, anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e extensão pela DNA polimerase (Búa and Porcel, 1994).

Um parâmetro crítico para o sucesso do PCR é o desenho correto dos oligonucleotídeos iniciadores. A seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores selecionados determina o tamanho e a localização do produto PCR, assim como define a  $T_m$  da região amplificada, um parâmetro físico importante na formação do produto (Dieffenbach et al., 1995). A especificidade de um oligonucleotídeo iniciador para anelar a uma única seqüência é obtida pela homologia ao sítio alvo, o seu comprimento e conteúdo G+C. Após o anelamento ter ocorrido, a extensão dos oligonucleotídeos iniciadores é o próximo passo sensível ao mal pareamento oligonucleotídeo/alvo (Heuer et al., 1997). A especificidade e a eficiência do PCR são dois parâmetros importantes para medir a eficácia do PCR. Um PCR altamente específico gera somente um produto, que corresponde à seqüência alvo pretendida. Por outro lado, a eficácia de uma amplificação corresponde à formação de mais produtos com poucos ciclos.

Segundo Dees and Ghiorse (2001), estudos sobre estrutura e diversidade da comunidade microbiana no composto que utilizam somente técnicas de cultivo têm falhado para detectar e identificar apropriadamente uma significativa porção da microflora do composto. Desta forma, técnicas independente de cultivo para perfil genético do PCR amplificando genes da

pequena subunidade rRNA tem surgido para caracterizar a diversidade e sucessão de comunidades microbianas durante compostagem de substrato orgânico. Sessitsch et al. (2002), em seu trabalho para analisar a população de eubactérias e actinomicetos endófitos de batata, utilizaram a reação em cadeia da polimerase para amplificar a região 16S DNAr utilizando oligonucleotídeos iniciadores universais para eubactérias, posteriormente os autores submeteram o produto obtido, a um segundo PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para actinomicetos e depois utilizaram estes produtos para clonagem e análise através do DGGE. Monciardini et al. (2002) desenvolveram seis pares de oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação específica da região 16S DNAr de diferentes grupos de actinomicetos. Xu et al. (2002), desenharam oligonucleotídeos iniciadores abrangendo regiões conservadas e hipervariáveis do 16S DNAr de *Thermoactinomyces*, o que permitiu a identificação de todos os isolados deste gênero associados com a “mushroom work’s lung”, uma alveolite alérgica causada pela inalação de vários organismos termófilos envolvidos no processo de compostagem. Wilson et al. (1998) utilizaram a PCR-análise do modelo de enzimas de restrição (PRA) para a identificação de actinomicetos aeróbios de isolados clínicos. Os autores amplificaram um segmento de 439 pb dos genes da proteína do choque térmico e depois clivaram o produto obtido com cinco endonucleases de digestão. Dees and Ghiorse (2001) avaliaram a diversidade microbiana no composto empregando a técnica da PCR, para isto utilizaram oligonucleotídeos iniciadores específicos para os domínios *Bacteria* e

*Archaea* e também para actinomicetos e fungos. Posteriormente clonaram, sequenciaram e digeriram os produtos com endonucleases de restrição.

Desta maneira os métodos baseados em PCR têm afetado enormemente o entendimento global da diversidade microbiana porque tem contribuído para a rápida diferenciação e identificação de microrganismos cultivados e o acesso a maioria dos microrganismos que ainda não foram cultivados em laboratório (Scmalenberger et al., 2001).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Coleta das amostras**

Para a realização deste trabalho foram realizadas seis coletas em leiras de compostagem de lixo urbano da Central de Triagem e Compostagem de Resíduos Sólidos de Sapiranga (CETRISA) e três coletas numa pilha de compostagem da Faculdade de Agronomia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

A CETRISA está localizada em Sapiranga, uma cidade à 61 Km de Porto Alegre e ocupa uma área de 4,5 hectares. A central de triagem é composta por 16 leitos de compostagem, onde cada um contém uma leira com as seguintes dimensões: 22 metros de comprimento, 2,6 metros de largura e 70 centímetros de altura. As leiras possuem um sistema de aeração forçada e são alimentadas com os resíduos sólidos urbanos, os quais sofrem um processo de triagem através de catação manual e peneiramento.

A pilha de compostagem da UFRGS está localizada na Faculdade de Agronomia e é formada por esterco animal, poda de árvores, grama, e cama de animais.

As coletas foram efetuadas na pilha e nas leiras que estivessem na fase de maturação do processo. Pequenas alíquotas do material foram coletadas em

diferentes pontos e profundidades para depois serem reunidas num saco plástico para juntas formarem uma amostra de aproximadamente 3 Kg. Após a coleta, as amostras foram conduzidas para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para ser realizado o cultivo e o isolamento dos actinomicetos.

### **3.2. Isolamento dos Actinomicetos**

As amostras coletadas foram processadas de três maneiras diferentes (Tabela 1), isto foi realizado com o objetivo de melhorar as condições de isolamento dos actinomicetos. A primeira amostra coletada na CETRISA (maio/2001), foi homogeneizada ao chegar no laboratório e posteriormente foi retirada uma alíquota de 10 gramas, a qual foi adicionada a 90 ml de água peptonada estéril 0,1%, obtendo-se, desta maneira, a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta diluição foram feitas as diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . Posteriormente foram semeados 100µl, em duplicata, através da técnica de espalhamento em superfície (Antunes, 1995) em placas contendo ágar Jaunsen (Anexo I.1.1). Estas placas foram incubadas a 37°C e a temperatura ambiente por 14 dias.

A amostra proveniente da 2ª coleta (CETRISA-julho/2001) foi homogeneizada e diluída da mesma forma como foi descrito anteriormente, porém somente a diluição  $10^{-3}$  foi utilizada. Foram semeados 100 µl desta diluição em placas contendo ágar Jaunsen e o ágar 72C (Anexo I.1.2) (Gerhardt, 1981) e incubadas a 37°C e a temperatura ambiente por 14 dias.

As amostras obtidas a partir da 3<sup>a</sup> coleta da CETRISA (agosto/2001) e todas da composteira da Agronomia foram processadas da seguinte forma: as amostras foram homogeneizadas e posteriormente 3 alíquotas, cada uma contendo 10 gramas da amostra, foram retiradas e adicionadas em três enlenmeyers contendo 90 ml de água peptona estéril. As diluições obtidas foram processadas da seguinte maneira: a primeira foi colocada na estufa com agitação (Certomat<sup>®</sup>BS1) a uma temperatura de 50°C e velocidade de 100 rpm por um período de 10 minutos; a segunda foi submetida a uma temperatura de 37°C, com agitação de 100 rpm e por um período de 10 minutos; a terceira alíquota foi submetida a uma temperatura de 45°C, com agitação de 100 rpm por um período de 16 horas. Transcorridos os tempos de incubação, foram feitas as diluições 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>. Foram semeados 100 µl da diluição 10<sup>-3</sup>, em triplicata, através da técnica de espalhamento, em placas contendo ágar caseína amido (ACA) (Anexo I.1.3) (Frighetto & Valarini, 2000). Após, as placas foram incubadas a 37°C, 50°C e a temperatura ambiente por um período de 14 dias.

### **3.3. Coloração de Gram**

Após o período de incubação, colônias características de actinomicetos, obtidas da pilha da UFRGS e as obtidas da 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> coletas da CETRISA foram selecionadas e semeadas nos meios Jaunsen e 72C (2<sup>a</sup> coleta) e ACA (demais coletas) através da técnica de esgotamento (Antunes, 1995). Posteriormente foi realizada a coloração de Gram para verificar a pureza da cultura e se os microrganismos eram Gram positivos ou Gram variáveis e ainda se os mesmos

apresentavam uma forma filamentosa ou se fragmentavam em bacilos, cocos ou cocobacilos.

### **3.4. Identificação morfológica**

Uma vez tendo sido feito a coloração de Gram das amostras, as mesmas foram submetidas à análise das características morfológicas microscópicas. Para a análise destas características foi realizado um microcultivo de cada um dos isolados conforme descrito por Holt et al.(1989). O microcultivo foi montado em placas de Petri contendo no seu interior dois palitos sobre os quais foi depositada uma lâmina de microscópio e ao seu lado um pedaço de algodão de aproximadamente 2cm x 2cm. Cada conjunto foi embalado e esterelizado por duas horas no forno de Pasteur. Depois com o auxílio de uma micropipeta foram adicionados, sobre a lâmina, 700 µl de ágar nutriente 1,8% a uma temperatura de aproximadamente 45°C. Após a solidificação do meio uma alíquota do isolado foi semeada com o auxílio de uma alça, num arisco transversal à lâmina e posteriormente foi adicionado 1ml de água estéril sobre o algodão. Feito isto, as placas foram fechadas e incubadas em uma estufa a 37°C por um período de 10 dias ou até que o micélio estivesse bem desenvolvido.

Após o período de incubação foram observadas características como ramificação do micélio sobre o substrato, formação do micélio aéreo bem como a sua fragmentação ou produção de esporos. Esta observação foi feita no microscópio óptico (Olympus CX40) com o aumento de 400X.



### **3.5. Identificação bioquímica**

A identificação bioquímica dos actinomicetos foi realizada através de 34 provas bioquímicas. As provas bioquímicas para avaliar a utilização de fontes de carbono e nitrogênio bem como a observação da produção de melanina, coloração do micélio, aéreo ou sobre o substrato, foram realizados sobre meio sólido e de acordo com a bibliografia recomendada para a identificação de actinomicetos (Holt et al., 1989; Willians et al., 1983 a; Willians et al., 1983b e Shirling and Gottlieb, 1966). Os demais testes foram realizados segundo a bibliografia utilizada para a identificação das demais bactérias MacFaddin (2000). Os resultados obtidos foram comparados com as grades de identificação (Holt et al., 1989; Willians et al., 1983a e Willians et al., 1983 b).

#### **3.5.1. Crescimento sobre uma única fonte de carbono:**

Neste experimento foram utilizadas as seguintes fontes de carbono: l-arabionose, rafinose, d-manose, manitol, d-xilose, d-frutose, acetato de sódio, d-melezitose, d-galactose, meso-inisitol, l-raminose, lactose, salicina, trealose, d-xilose e celobiose.

Para verificar se os microrganismos utilizavam ou não as fontes de carbono acima citadas, foi preparado um sistema contendo três placas: uma placa continha a fonte de carbono a ser testada, a outra, o controle positivo, e a terceira continha o controle negativo.

O meio para utilização de fonte de carbono consistia de ágar basal de sais minerais (Anexo I.1.4). Este meio era preparado em triplicata e posteriormente

esterilizado na autoclave a 121°C por 15 minutos. Também foi preparada uma solução de glicose 10%, bem como as fontes de carbono a serem testadas e estas eram esterilizadas na autoclave a 121°C por 10 minutos. Após a esterilização, os meios eram deixados para esfriar e quando o ágar basal atingia uma temperatura de aproximadamente 60°C adicionava-se a solução de glicose ao meio que corresponderia ao controle positivo, ao meio correspondente ao controle negativo não era acrescentada nenhuma fonte de carbono, e no terceiro ágar basal adicionava-se a solução contendo a fonte de carbono que seria testada (Shirling and Gottlieb, 1966). Depois estes meios eram vertidos em placas de Petri estéreis.

Cada placa do sistema foi dividida em seis quadrantes e em cada um destes foi inoculado um isolado de actinomiceto. A semeadura foi realizada com o auxílio de uma alça e na forma de estrias. Posteriormente, as placas foram incubadas a temperatura de 37°C por 14 dias e após foi verificada a utilização ou não da fonte de carbono, comparando o crescimento da bactéria nas diferentes placas do sistema. O resultado era considerado positivo quando o crescimento sobre a fonte de carbono a ser testada era maior do que sobre o controle negativo e igual ou maior do que sobre o controle positivo.

### **3.5.2. Crescimento sobre única fonte de nitrogênio:**

Neste experimento foram testadas as seguintes fontes de nitrogênio: nitrato de potássio, l-cisteína, l-fenilalanina, l-histidina e arginina. O meio para utilização das fontes de nitrogênio (Anexo I.1.5) segue a referência de Willians, (1983a). Da mesma forma como para as fontes de carbono, três sistemas foram

preparados: controle negativo, somente o meio basal; controle positivo, meio basal acrescentado de 1% de l-asparagina; meio basal com a fonte de nitrogênio a ser testada. Preparados os três sistemas, estes eram autoclavados por 15 minutos a 121°C e posteriormente quando atingiam uma temperatura de aproximadamente 50°C eram vertidos nas placas de Petri estéreis.

Procedimento para a realização destes testes foi semelhante ao utilizado para as fontes de carbono, ou seja, consistia em comparar as placas contendo a fonte de nitrogênio a ser testada com o controle positivo e o negativo.

### **3.5.3. Redução do nitrato:**

Foi estudada em tubos contendo 2ml de caldo nitrato (Anexo I.1.6). Depois de 14 dias de incubação a 37°C a redução do nitrato foi verificada adicionando 500 µl do reagente A (N-N-Dimetil- $\alpha$ -Naftalamina) e 500 µl do reagente B (Ácido Sulfanílico 0,8%). Os tubos foram agitados e a formação de uma coloração vermelha (resultado +) foi observada. Nos tubos com reação negativa foi adicionado zinco. O desenvolvimento de uma coloração vermelha confirmou a presença do nitrato (resultado negativo) e os tubos que permaneceram com a cor inalterada indicaram que o nitrato foi reduzido a produtos voláteis como o óxido nitroso ou N<sub>2</sub>, portanto eram positivos.

### **3.5.4. Degradação da caseína:**

As placas contendo meio caseína (Anexo I.1.7) foram divididas em 5 quadrantes e com o auxílio de uma agulha, em cada um foi semeado um isolado

diferente. Após 14 dias de incubação a 37°C, a formação de uma zona clara ao redor do crescimento indicou o resultado positivo.

#### **3.5.5. Degradação do amido:**

As placas de meio amido (Anexo I.1.8) foram divididas em 5 quadrantes e em cada um deles foi semeado, em picada, um microrganismo diferente. Depois de 14 dias de incubação a 37°C, 200 µl de lugol foram adicionados sobre as colônias. A formação de uma zona clara em torno da colônia foi considerada positiva para o teste de degradação do amido.

#### **3.5.6. Degradação da gelatina:**

A degradação da gelatina foi estudada semeando os actinomicetos em tubos de ensaio contendo 2ml de gelatina nutriente. Após 14 dias de incubação a 37°C os tubos foram colocados por 20 minutos na geladeira, após este período observou-se se o meio permanecia líquido (resultado positivo) ou não (resultado negativo).

#### **3.5.7. Degradação da xantina:**

As placas contendo meio xantina (Anexo I.1.9) foram divididas em cinco quadrantes e em cada um foi feita a semeadura, em estrias, de diferentes actinomicetos. Após um período de incubação de 14 dias a 37°C o desaparecimento dos grânulos de xantina, inicialmente presentes no meio, foi interpretado como resultado positivo.

### **3.5.8. Degradação da tirosina:**

As placas contendo este meio (Anexo I.1.10) foram divididas em cinco quadrantes e em cada um deles foi semeado, em estrias, um actinomiceto diferente. As placas foram incubadas a 37°C por 14 dias. Após este período a capacidade do organismo degradar ou não a tirosina foi avaliada observando se os grânulos de tirosina haviam desaparecido (resultado positivo) ou não (resultado negativo) do meio.

### **3.5.9. Degradação da esculina:**

As placas contendo ágar esculina (Anexo I.1.14) foram divididas em cinco quadrantes e em cada um deles foi semeado, em picada, um actinomiceto diferente. Após um período de 14 dias de incubação a 37°C a degradação da esculina foi observada através do escurecimento do meio.

### **3.5.10. Crescimento em diferentes concentrações de NaCl:**

A capacidade dos actinomicetos crescerem em diferentes concentrações de NaCl foi estudada semeando estes microrganismos em 2ml de caldo nutriente contendo NaCl (Anexo I.1.11) nas seguintes concentrações: 7, 10 e 13%. Após 14 dias de incubação a 37°C foram considerados positivos os tubos que apresentaram crescimento.

### **3.5.11. Pigmentação**

#### **3.5.11.1. Cor da massa de esporos:**

A coloração dos esporos foi determinada semeando actinomicetos sobre placas de meio Amido /Sais Minerais (Anexo I.1.12) incubadas por 14 dias a 37°C. Após este período a coloração da massa de esporos foi observada sob condições padrões, ou seja, sempre no mesmo local, horário e sobre um fundo claro (Williams et al., 1983b).

#### **3.5.11.2. Cor do micélio sobre o substrato:**

Este parâmetro foi determinado usando culturas com crescimento de 14 dias sobre o ágar Glicerol-asparagina (Anexo I.1.13). Após o período de incubação as placas foram invertidas e, sob condições padrões, a cor do micélio sobre o substrato foi observada (Williams et al., 1983b).

#### **3.5.12. Produção de melanina:**

Para verificar se o actinomiceto era capaz ou não de produzir melanina, uma alíquota do mesmo foi semeada em estrias no meio ágar tirosina (Anexo I.1.15). Após um período de 14 dias de incubação a 37°C, as placas foram analisadas para verificar se o meio havia mudado sua coloração para uma tonalidade escura (resultado positivo) (Shirling and Gottlieb, 1966).

### **3.6. Caracterização Molecular**

Após a identificação bioquímica dos isolados o trabalho teve prosseguimento com a identificação molecular utilizando oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação do fragmento do DNAr 16S dos isolados. Foi empregada a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a posterior digestão dos produtos obtidos com endonucleases de restrição. Para a digestão com as endonucleases de restrição foram selecionados três isolados de cada espécie identificada bioquimicamente.

#### **3.6.1. Extração do DNA cromossomal dos actinomicetos:**

O DNA cromossomal dos actinomicetos foi extraído, segundo o protocolo descrito por Hopwood et al. (2000), com modificações. Para o isolamento do DNA genômico, os actinomicetos foram inoculados em 25 ml de caldo BHI (Anexo I.1.17) e incubados a temperatura de 37°C, agitação de 100 rpm por um período de 24-48 horas. As células foram obtidas após centrifugação a 13000 rpm (Centrífuga Sigma Laborzentrifugen 2K 15) por 4 minutos e depois foram ressuspendidas em tampão SET (75mM NaCl, 25mM EDTA pH 8.0, 20mM Tris-HCl pH 7.5) (Anexo I.2.1). Lisozima (Anexo I.2.2) a uma concentração final de 1mg/ml foi adicionada à mistura e esta foi incubada em banho de água a 37°C por uma hora. Após este período, foram adicionados SDS (Anexo I.2.3) a uma concentração final 1% e uma solução de proteinase K (Anexo I.2.4) a uma concentração final 0,5 mg/ml. A mistura foi incubada, a uma temperatura de 55° por 2 horas. Após este período, uma solução NaCl 5M, a uma concentração final de 1,25mM foi adicionado a mistura e esta foi

homogeneizada por inversão. Após, 1 volume de clorofórmio foi adicionado e novamente misturado por inversão por 30 minutos e depois a solução foi centrifugada por mais 20 minutos à 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e extraído uma vez com fenol, duas vezes com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1) (Anexo I.2.5) e duas vezes com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) (Anexo I.2.6). O sobrenadante foi retirado e o DNA foi precipitado com 0,6 volumes de isopropanol e incubado por 18 horas a – 20°C. Após este período o material foi centrifugado por 20 minutos, o sobrenadante foi retirado e o DNA foi lavado com NaCl 1M (Anexo Item 27) e deixado secar a temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em 200 µl de TE (Anexo I.2.7).

### **3.6.2. Extração do DNA cromossomal das bactérias controle:**

Para a extração do DNA cromossomal das bactérias utilizadas como controle negativo, ou seja, não actinomicetos, foi utilizado o protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). Desta maneira 20ml de caldo BHI foi inoculado, com as bactérias de interesse, e incubado a 37°C, com agitação de 100rpm por um período de 16 horas. Posteriormente as células bacterianas foram coletadas, centrifugando 2ml da cultura por 1 minuto a 13000rpm em um tubo eppendorf. O sobrenadante foi retirado e o “pellet” foi lavado uma vez com NaCl 1M e ressuscitado em TE 1X (Anexo I.2.8). SDS, lisozima e RNase foram adicionados, respectivamente, nas seguintes concentrações finais: 0,6%, 0,2mg/ml e 0,3mg/ml e a mistura foi incubada a 37°C por uma hora em banho de água. Após este período, foi adicionada proteinase K a uma concentração final de 0,6mg/ml e a mistura foi incubada, à 56°C



por 15 minutos. Transcorrido este período de incubação, 1 volume de fenol foi adicionado a mistura e esta foi homogeneizada e então centrifugada por 10 minutos a 13000rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de microcentrífuga e a extração com fenol foi repetida. Posteriormente, foi realizada uma extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:1:24) e duas extrações com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) repetindo-se os tempos de centrifugação anterior. Ao sobrenadante resultante foi adicionado 0,7 volumes de isopropanol, a mistura foi deixada a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 16 horas e depois centrifugada por 20 minutos a 13000rpm. O isopropanol foi desprezado e o DNA foi deixado para secar a temperatura ambiente e posteriormente ressuspendido em 50 $\mu\text{l}$  de TE (10mM TRIS, 1mM EDTA, pH 8.0).

### **3.6.3. Quantificação do DNA por comparação da intensidade de banda:**

A quantificação do DNA dos actinomicetos por comparação da intensidade de banda foi realizada em um gel de agarose 0,8% (Anexo I.2.9) contendo brometo de etídeo (Anexo I.2.10). Sobre este gel foi colocado 1 $\mu\text{l}$  do DNA lambda (Invitrogen) nas seguintes concentrações: 0,05, 0,25, 0,1 e 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  e 1 $\mu\text{l}$  do DNA extraído. Posteriormente o gel foi levado ao transluminador de UV e a intensidade de banda do DNA extraído foi comparada com as concentrações conhecidas do DNA lambda.

### **3.6.4. Quantificação do DNA através de espectrofotometria:**

O DNA extraído também foi quantificado pelo espectrofotômetro (Metrolab 1700). Para a quantificação, 5 $\mu\text{l}$  do DNA extraído foi diluído em 995 $\mu\text{l}$  de água destilada estéril. Como controle foram utilizadas amostras de DNA lambda nas

seguintes concentrações 1 e 2µg/ml. A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. O cálculo da concentração de DNA foi realizado multiplicando o resultado obtido no comprimento de onda de 260nm por 50, valor correspondente a uma OD, e posteriormente dividindo o valor obtido por 5. Uma vez que o volume de DNA usado foi 5µl. Dividindo-se o resultado obtido no comprimento de 260 nm pelo de 280 nm pode-se também verificar a pureza do DNA extraído.

### 3.6.5. Oligonucleotídeos Iniciadores:

Os oligonucleotídeos iniciadores F243 e R513 foram utilizados para amplificar um fragmento de DNA da região 16S do DNAr dos actinomicetos. O primeiro foi desenhado por Heuer et al. (1997) e é específico para a região 16S do DNAr dos actinomicetos. O segundo, anela a um domínio universalmente conservado, porém o fato de possuir uma base adenina na extremidade 3', faz com que ele anele preferencialmente com bactérias Gram positivas e β-proteobactérias. Este par de oligonucleotídeos iniciadores anela na região V3 variável do 16S DNAr e produz um fragmento de 302 pares de base.

Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores são:

**F243: Actinomycetes (226-243) → 5'GGATGAGCCCGCGGCCTA3'**

**R513: Actinomycetes e outros (513-528) → 5'CGGCCGCGGCTGCTGG**

**CACGTA3'**

### 3.6.6. Condições de amplificação:

As condições de amplificação descritas por Heuer et al. (1997), foram utilizadas neste trabalho com modificações. PCR foi realizado em um aparelho termociclador (Minicycler™MJ Research). Para amplificação específica do fragmento 16S DNAr dos actinomicetos foi utilizada a seguinte mistura de reação: DNA molde (50ng), 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão de reação 1X, 158nM de oligonucleotídeos iniciadores (GibcoBRL), 0,3mM de cada um dos desoxinucleotídeos (Amersham Pharmacia Biotech) ( Anexo I.2.11), 100ng de albumina de soro bovino (BSA) (Amersham Pharmacia Biotech), 1 unidade da enzima DNA Taq polimerase (Invitrogen) e água MiliQ estéril para completar o volume de 25µl. Antes de ser levada ao termociclador, a mistura foi coberta com 20µl de óleo mineral estéril para evitar a evaporação do material.

Os controles negativos e positivos utilizados na reação de PCR com o objetivo de avaliar a especificidade da reação encontram-se na tabela 1. As misturas de reação e as temperaturas de anelamento testadas encontram-se respectivamente nas tabelas 2 e 3.

As condições de amplificação foram as seguintes:

- 5 minutos de desnaturação inicial à 94°C.
- 35 ciclos: 1 minuto de desnaturação à 94°C
  - 1 minuto de anelamento à 63°C
  - 2 minutos de extensão à 72°C
- 2 minutos extensão final à 72°C

**Tabela 1:** Controles negativos e controle positivo utilizados para avaliar a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

Controle positivo	Controle negativo
<i>Streptomyces rochei</i> INCQS 00320	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 15290
	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076
	<i>Escherichia coli</i> ATCC11105
	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 00106
	<i>Salmonella paratyphi</i> IAL 1207
	<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 9750
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468
	<i>Paenebacillus alvei</i> ATCC 6344
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Bacillus cereus</i>
	<i>Bacillus polymyxa</i>

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – FIOCRUZ; ATCC: American Type Culture Collection; IAL: Instituto Adolfo Lutz

### 3.6.7. Eletroforese em gel de agarose:

Os fragmentos obtidos através da técnica do PCR foram observados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo (5µl/100ml de gel). O gel foi submetido a uma voltagem de 75Volts (Eletroforesis Power Supply EPS301- Amersham Pharmacia Biotech) em tampão TAE 1X (Anexo I.2.12), por um período

de 45 minutos e foram visualizados através do transluminador de luz ultra violeta e fotografados pelo programa Kodak 1D.

**Tabela 2:** Sistemas testados para a amplificação de um fragmento da região 16S do DNAr dos actinomicetos.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Tampão	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub>	2,5mM	2,5mM	2,5mM	2,5mM	2,5mM	2,5mM	2,5mM	2,5mM	2,5mM	2,5mM	2,5mM
F243	158µM	158µM	158µM	316nM	474nM	158nM	632nM	474nM	474nM	316nM	158nM
R513	158µM	158µM	158µM	316nM	474nM	158nM	632nM	474nM	474nM	316nM	158nM
DNTPs	0,6mM	0,6mM	0,6mM	0,6mM	0,6mM	0,6mM	0,6mM	0,6mM	0,3mM	0,3mM	0,3mM
Enzima	1U	1U	1U	1U	1U	1U	1U	1U	1U	1U	1U
BSA	200ng	100ng	200ng	200ng	200ng	200ng	100ng	100ng	100ng	100ng	100ng
DNA	30ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng

### 3.6.8. Digestão com endonucleases de restrição

Para a realização da clivagem com as endonucleases de restrição a mistura de PCR foi preparada com um volume final de 50µl. 10µl do produto amplificado por PCR foram submetidos à clivagem com as seguintes endonucleases de restrição: *Hinfl*, *MspI*, *XhoI*, *NarI*, *BanII*, *MluI*, *PvuI* e *SmaI*. As concentrações dos tampões, a temperatura e o tempo de incubação utilizados foram os recomendados pelo fabricante.

**Tabela 3:** Temperaturas de anelamento testadas, utilizando o sistema XI, para a amplificação específica do fragmento 16S DNAr de actinomicetos.

Linhasgens padrão	51°C	52°C	55°C	60°C	63°C
<i>Streptomyces rochei</i> INCQS 00320	+	+	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 15290	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 00106	-	-	-	-	-
<i>Salmonella entereditis</i> ARCC 13076	-	-	-	-	-
<i>Salmonella paratyphi</i> IAL1207	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11105	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 9750	-	-	-	-	-
<i>Paenebacillus alvei</i> ATCC 6344	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	+	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	+	+	+	+	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-	-	-
<i>Bacillus polymyxa</i>	+	+	-	-	-

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – FIOCRUZ/ ATCC: American Type Collection; IAL: Instituto Adolf Lutz;

+: amostras que amplificaram

-: amostras que não amplificaram

Os fragmentos obtidos através da digestão com enzimas de restrição foram resolvidos em gel de agarose 2,5% e submetidos a uma voltagem de 75Volts por um período de três horas em TBE 0,5X (Anexo I.2.13). Para a visualização da corrida destes fragmentos nos géis foi utilizado o tampão de amostra azul de bromofenol (Anexo I.2.14). Os fragmentos puderam ser visualizados através do

transluminador de luz ultravioleta. Os géis foram fotografados pelo programa Kodak 1D e o peso molecular das bandas foi analisado pelo programa Kodak 1D versão 3.5.2.

#### **3.6.9. Marcadores Moleculares:**

O marcador Ladder 50bp (Invitrogen) foi utilizado como marcador molecular para verificar se o peso molecular do fragmento amplificado através do PCR estava de acordo com o esperado (302 bp) e também para avaliar o tamanho dos fragmentos obtidos com a ação das endonucleases de restrição.

#### **3.7. Análise estatística**

Para verificar se a diferença entre as espécies encontradas nas leiras da CETRISA e as encontradas na composteira da Faculdade de Agronomia era significativa ou não, foi realizada a análise de variância ANOVA através do programa Excel. Valores de p-crítico inferior a 0,05 informam que as diferenças são significativas, por outro lado valores superiores revelam uma diferença estatisticamente não significativa.

#### **3.8. Microscopia eletrônica**

A microscopia eletrônica foi utilizada para verificar, principalmente, a superfície dos esporos. Inicialmente, foi realizada a técnica do microcultivo, após o tempo de incubação adequado, a amostra foi preparada para a visualização através de microscopia eletrônica utilizando o protocolo descrito por Ciftcioglu and Kajander

(1998), com modificações. As amostras foram cobertas com glutaraldeído por um período de 18 horas, após foram submetidas a diferentes concentrações de álcool (50 e 100%) e posteriormente a acetona 100%. Posteriormente as amostras foram metalizadas no Departamento de Engenharia da UFRGS.

### **3.9. Análise Filogenética**

A análise filogenética dos 31 isolados, submetidos à clivagem com endonucleases de restrição e também das provas bioquímicas destes isolados foi realizada através do programa Statistical Package for the Social Sciences 2ª ed (SPSS). A análise foi realizada utilizando o coeficiente de similaridade de Dice para a formação dos grupos de similaridade e construídos os dendrogramas das distâncias genéticas entre os isolados.

Foram considerados “1” ou “0” para a presença ou ausência de um determinado fragmento resultante da restrição, bem como para a resposta das provas bioquímicas. Os agrupamentos hierárquicos foram feitos por UPGMA – “Unweighted pair Group Method with Arithmetical Averages ” (Sneath and Sokal, 1973), que consiste em considerar todos os caracteres com a mesma importância para a formação do agrupamento dos microrganismos analisados.



## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1. Isolamento dos actinomicetos:**

Para a realização deste trabalho foram realizadas 9 coletas de resíduos em processo de compostagem (Tabela 4). Destas, seis foram realizadas na Central de Triagem e Compostagem de Resíduos Sólidos de Sapiranga (CETRISA) e as outras três, numa pilha de compostagem da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

A primeira coleta foi realizada, na CETRISA, numa leira na fase de maturação do processo e foi realizada com o objetivo de estabelecer as melhores condições de isolamento para os actinomicetos. As diluições da amostra foram semeadas em meio Jaunsen, no entanto, os resultados não foram satisfatórios, pois, predominantemente no meio, houve o crescimento de fungos e de bactérias cuja morfologia sugeria pertencerem ao gênero *Bacillus*. O crescimento destes microrganismos foi bastante grande e sobrepôs ao dos actinomicetos. Algumas colônias de actinomicetos que haviam crescido juntamente com os fungos, foram semeadas em placas de ágar Jaunsen contendo cicloheximida (50µg/ml), na tentativa de isolá-los, porém isto não foi possível e desta forma nenhum actinomiceto foi isolado desta amostra.

**Tabela 4:** Condições de isolamento empregadas durante as coletas realizadas na CETRISA e na UFRGS.

	<b>Local da Coleta</b>	<b>Etapa do processo</b>	<b>Meio e temperatura de isolamento</b>	<b>Nº de isolados obtidos</b>
1 <sup>a</sup>	CETRISA	150 dias maturação	Jaunsen, 37°C	0
2 <sup>a</sup>	CETRISA	180 dias maturação	Jaunsen e 72C, 37°C	12
3 <sup>a</sup>	CETRISA	60 dias maturação	ACA, 37°C, 50°C e ambiente	30
4 <sup>a</sup>	CETRISA	60 dias maturação	ACA, 37°C, 50°C e ambiente	30
5 <sup>a</sup>	CETRISA	30 dias termofílica	ACA, 37°C, 50°C e ambiente	0
6 <sup>a</sup>	CETRISA	30 dias termofílica	ACA, 37°C, 50°C e ambiente	0
7 <sup>a</sup>	UFRGS	180 dias termofílica	ACA, 37°C, 50°C e ambiente	30
8 <sup>a</sup>	UFRGS	90 dias maturação	ACA, 37°C, 50°C e ambiente	30
9 <sup>a</sup>	UFRGS	120 dias maturação	ACA, 37°C, 50°C e ambiente	30

A segunda coleta, na CETRISA, também foi realizada numa leira na fase de maturação do processo. Nesta amostra foi utilizada somente a diluição  $10^{-3}$  e também foi testado um novo meio de cultura, o 72C (Gerhard, 1981). O meio Jaunsen novamente não se mostrou eficiente para o isolamento de actinomicetos,

pois como anteriormente, houve o predomínio de fungos e de *Bacillus*. No meio 72C o crescimento destes microrganismos não ocorreu de forma tão acentuada como no meio Jaunsen. O meio 72C é pobre em fontes de carbono e conseqüentemente o número de microrganismos (fungos e bactérias) competidores foi bem menor. Entretanto, apesar de diminuir a contaminação por outros microrganismos, este meio ainda não se mostrou muito eficaz para o isolamento dos actinomicetos, pois somente 12 colônias foram isoladas desta amostra, desta forma uma nova metodologia foi testada.

A terceira e a quarta coletas da CETRISA e as realizadas na pilha de compostagem da Faculdade de Agronomia foram realizadas durante a fase de maturação do processo, porém um novo meio de cultura foi utilizado, o ágar Amido Caseína (ACA), e novas condições de incubação para as placas semeadas foram testadas. Este meio mostrou-se bastante adequado para o isolamento dos actinomicetos, visto que o mesmo favoreceu o crescimento de actinomicetos em detrimento dos demais microrganismos. As temperaturas de incubação testadas, 37°C, 50°C e temperatura ambiente mostraram-se igualmente boas para o isolamento dos actinomicetos mesofílicos e termofílicos existentes no processo de compostagem. De cada uma destas coletas foram escolhidos, aleatoriamente, 30 isolados, os quais foram posteriormente identificados. Assim, 153 isolados foram identificados neste trabalho.

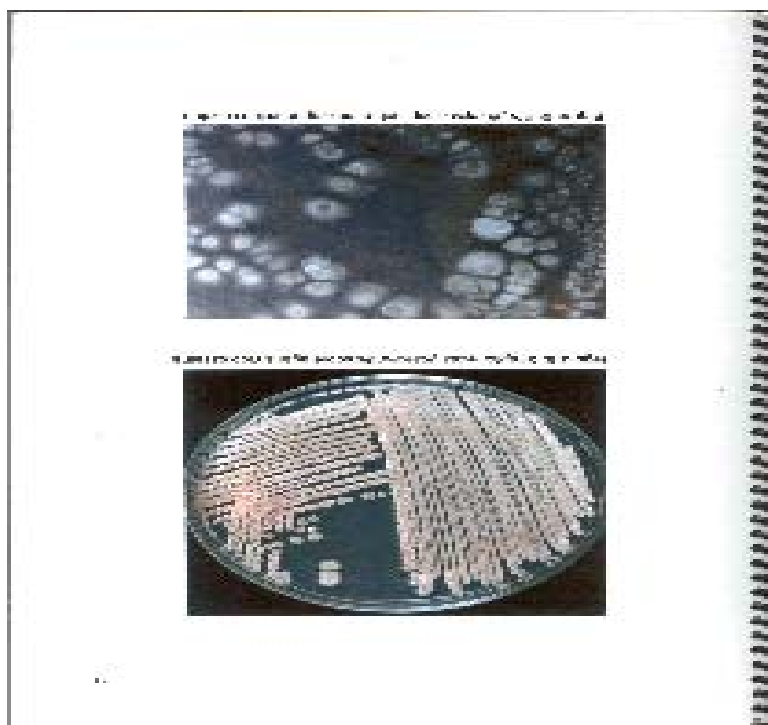
A quinta e a sexta coleta realizadas na CETRISA foram realizadas em leiras no estágio inicial da fase termofílica. Isto ocorreu porque a quantidade de resíduo urbano recolhida diariamente na cidade de Sapiranga aumentou muito,

enquanto que as instalações onde o processo de compostagem ocorre permaneceram as mesmas, conseqüentemente a alternativa escolhida pela prefeitura municipal foi a redução no tempo de compostagem. O material que inicialmente ficava nas leiras por um período de aproximadamente 120 dias, até alcançar a maturação e desta forma ter um composto final estabilizado próprio para o uso, passou a ficar por um prazo máximo de 30 dias. Desta maneira o processo passou a ser interrompido na etapa inicial da fase termofílica, o que corresponde um risco para a saúde e para o meio ambiente.

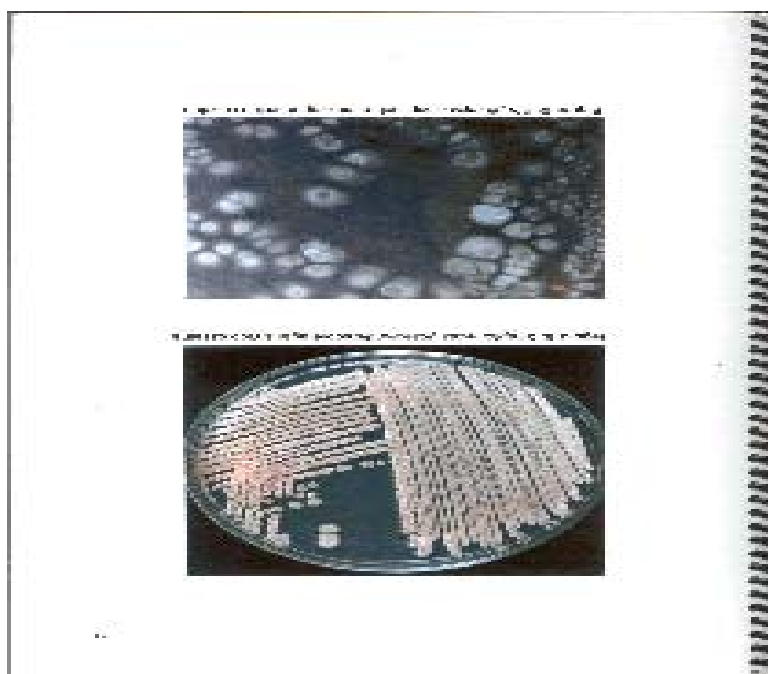
Nestas duas coletas o isolamento dos actinomicetos não foi favorecido e isto pode estar relacionado com o estágio no qual as coletas foram realizadas. Durante a fase termofílica ocorre a eliminação ou inativação de um grande número de microrganismos, conseqüentemente o crescimento dos actinomicetos torna-se favorecido. Como estas coletas foram realizadas no início deste estágio esta inativação ou eliminação não foi suficiente para proporcionar o crescimento dos actinomicetos, os quais são maus competidores. Outro fator que pode ter influenciado é o pH, que provavelmente deveria ainda estar ácido, dificultando desta maneira o crescimento dos actinomicetos que tem a sua atuação fortemente influenciada por esta variável. Segundo McCarthy and Willians (1992), os actinomicetos preferem pH neutro a alcalino. No início do processo de compostagem de resíduo doméstico, o pH pode atingir valores próximos a 4,8 e isto deve-se aos produtos da fermentação dos resíduos, mas com desenvolvimento do processo, o pH pode alcançar valores em torno de 9,0 devido a amonificação dos componentes nitrogenados no composto (Jang et al., 2002).

Resultados semelhantes foram encontrados por Peters et al. (2000), Jang et al. (2002) e Dees and Ghiorse (2001), os autores observaram que a quantidade e a diversidade dos actinomicetos aumentava nos estágios termofílicos e de maturação. Jang et al. (2002) atribuíram este aumento ao fato dos actinomicetos crescerem mais facilmente sobre lignina residual ou celulose do que as demais bactérias e fungos. Segundo McCarthy and Willians (1992), os actinomicetos são capazes de tolerar temperaturas e pH mais elevados do que os fungos, desta forma crescem melhor em pH alcalino. Dees and Ghiorse (2001), no seu trabalho sobre diversidade microbiana no composto, observaram que os actinomicetos estavam presentes em todas as amostras de composto entre 50°C e 74°C, enquanto que fungos foram detectados somente nas amostras de 50°C.

Os actinomicetos apresentam uma grande variedade nas características morfológicas, o que possibilitou diferenciá-los facilmente das demais bactérias. Entre estas características encontram-se a produção de micélio, o que lhes proporciona uma aparência pulverulenta característica (Figura 5), produção de hifas filamentosas e ramificadas (Figura 6) e produção de pigmentos.



**Figura 5:** *Streptomyces griseoviridis* sobre ágar amido caseína



**Figura 6:** *Streptomyces* sp. sobre meio agar amido caseína

## **4.2. Identificação dos actinomicetos**

### **4.2.1. Identificação morfológica dos actinomicetos**

Durante a realização deste trabalho foram isolados e identificados 153 actinomicetos. A identificação teve início com a coloração de Gram e prosseguiu com a observação das características morfológicas, o que possibilitou classificá-los em nível de gênero, e com o emprego de provas bioquímicas, os actinomicetos puderam ser classificados em nível de espécie.

O emprego da coloração de Gram teve como objetivo verificar a pureza da cultura e a forma predominante como os actinomicetos se apresentavam, ou seja, se eles possuíam uma forma filamentosa ou se fragmentavam em bacilos, cocos ou cocobacilos. Neste estágio do trabalho, já se pode verificar a diversidade de formas existentes neste grupo de microrganismos, pois puderam ser observadas desde formas totalmente fragmentadas observadas no gênero *Nocardia* (Figura 7) até formas filamentosas observadas no gênero *Streptomyces* (Figura 8). Esta variedade de formas morfológicas já havia sido mencionada por Connell (2001). No seu trabalho a autora considera os actinomicetos um grupo de microrganismos com características morfológicas variadas, que compreende bactérias que se dividem por fissão binária, tais como *Corynebacterium*, espécies com envelope celular e ramificações como *Mycobacterium* e *Nocardia*, até espécies amplamente ramificadas e filamentosas como os *Streptomyces*.

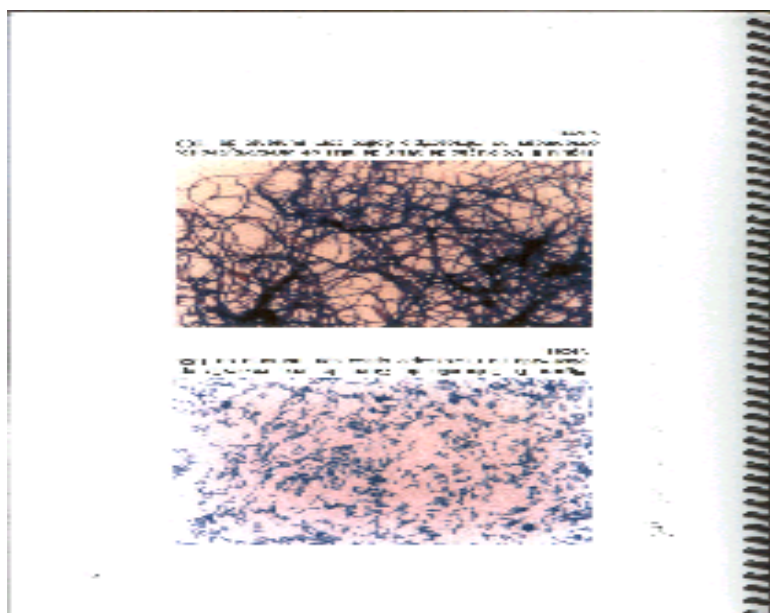
Após a coloração de Gram foram realizados microcultivos de todas as amostras. A técnica do microcultivo descrita por Stanley et al. (1989) possibilitou a observação de várias características morfológicas, tais como: ramificação do micélio

sobre o substrato, formação de micélio aéreo e sua fragmentação ou produção de esporos. Nos actinomicetos formadores de esporos observou-se também a organização dos esporos em cadeias como nos gêneros *Nocardia* e *Streptomyces*.

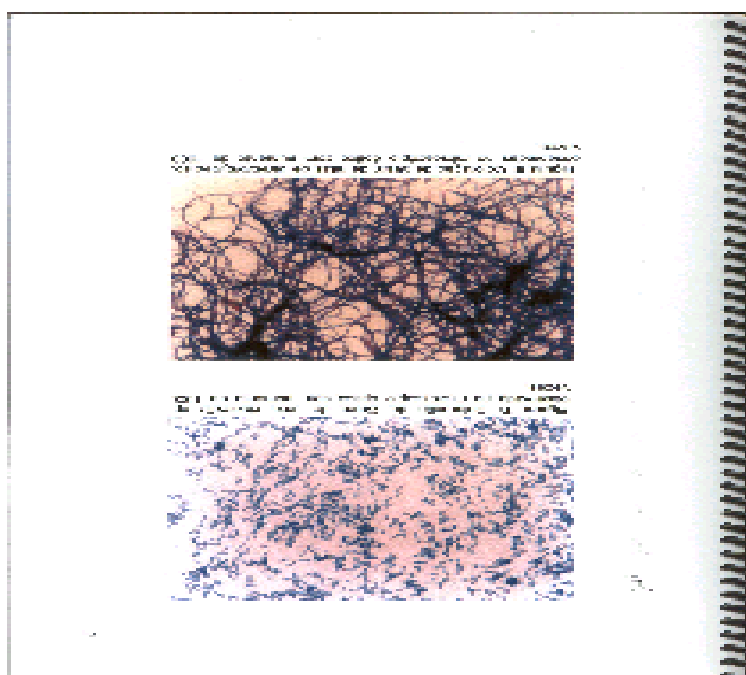
A observação destas características possibilitou a classificação em nível de gênero. Neste estudo analisando as características morfológicas observou-se o predomínio dos gêneros *Streptomyces* e *Nocardia*, resultados semelhantes foram encontrados por Lacey (1997). No seu trabalho sobre actinomicetos em processo de compostagem o autor observou que os gêneros predominantes eram: *Streptomyces* e *Nocardia*, seguidos de *Thermoactinomyces*, *Thermomonosporas* e *Micromonospora*.

Os estreptomicetos identificados possuíam micélio aéreo bem desenvolvido e a maioria possuía esporos em cadeias espirais (Figura 9), com alguns apresentando cadeias flexíveis (Figura 10). A maioria das nocardias observadas, possuíam micélio aéreo e sobre o substrato bastante ramificado e fragmentado (Figura 11). O gênero *Terrabacter* caracterizou-se pela ausência de micélio aéreo e por um micélio sobre o substrato bastante fragmentado, formando bacilos e cocobacilos. O *Micromonospora* caracterizou-se pela ausência de micélio aéreo e pela produção de esporos únicos no micélio sobre o substrato. *Thermomonospora* possuía esporos em grupos sobre o micélio aéreo e foi diferenciada de *Thermoactinomyces* pelo aquecimento a 90°C por 30 minutos. *Streptoverticillum* apresentou esporos em cadeias formando monovorticilos. *Nocardiopsis* possuía hifas aéreas formando cadeias longas, ramificadas e em ziguezague.

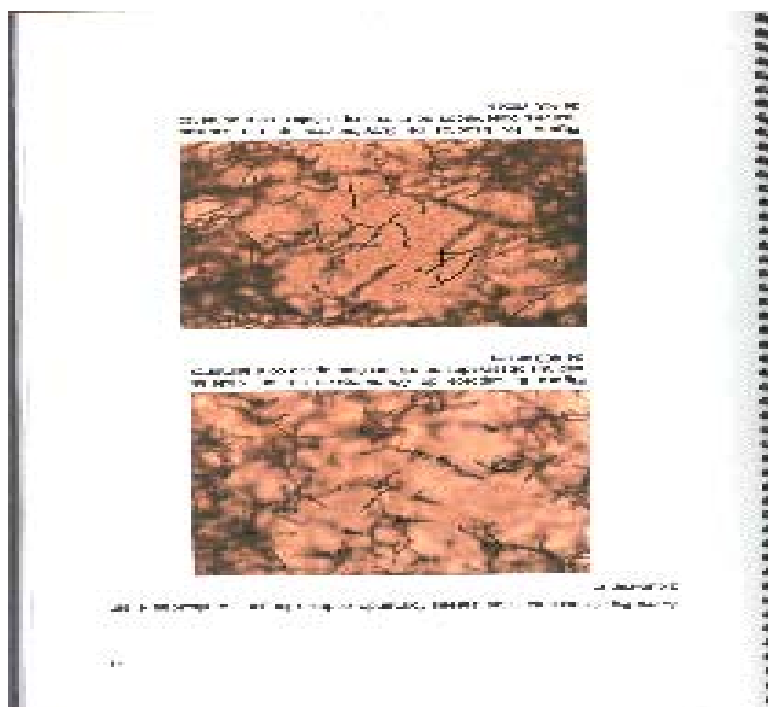




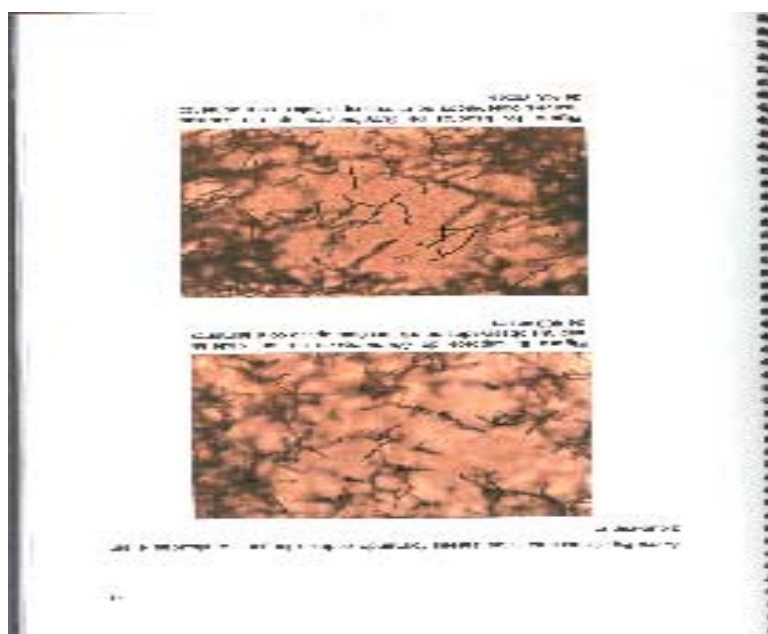
**Figura 7:** Coloração de Gram de uma *Nocardia* sp. observada no microscópio óptico com aumento de 1000 vezes.



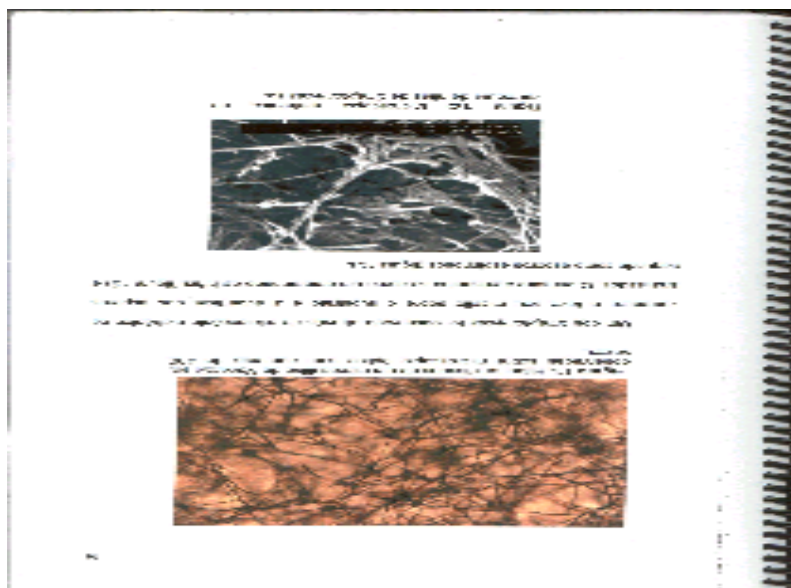
**Figura 8:** Coloração de Gram de hifas de *Streptomyces* sp. observadas no microscópio óptico com aumento de 1000 vezes.



**Figura 9:** Esporos de *Streptomyces* sp. em cadeias espirais observados no microscópio óptico com aumento de 400 vezes.

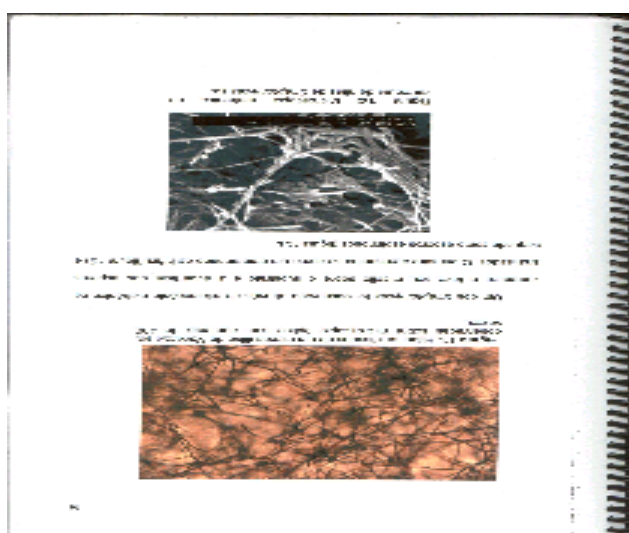


**Figura 10:** Esporos de *Streptomyces* sp. em cadeias flexíveis observados no microscópio óptico com aumento de 400 vezes.

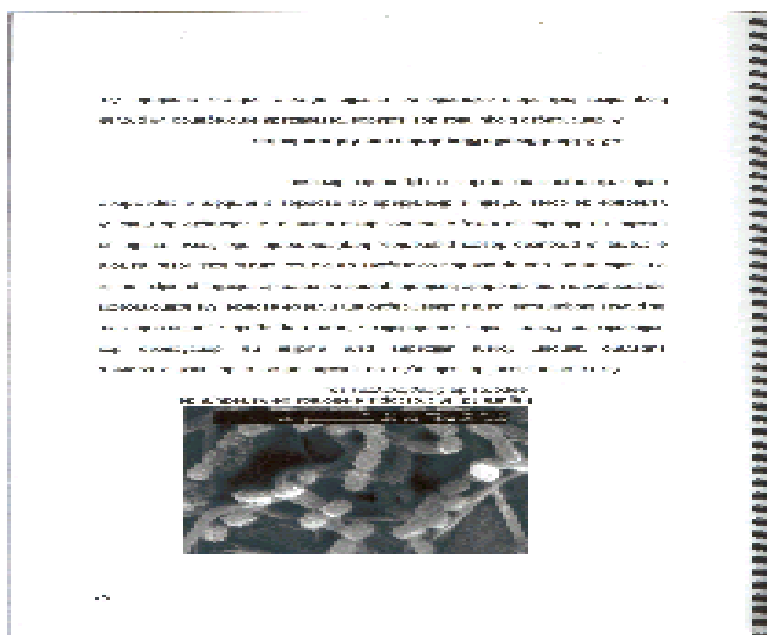


**Figura 11:** Hifas ramificadas de um microcultivo de *Nocardia* sp. observadas sobre microscópio óptico com aumento de 400 vezes.

Um dos *Streptomyces* foi observado através de microscópio eletrônico de varredura e teve seu micélio sobre o substrato e a superfície dos esporos analisados. O primeiro apresentou-se como um emaranhado de hifas (Figura 12) e o segundo como esporos espinhosos (Figura 13).



**Figura 12:** Microscopia eletrônica de varredura de hifas de *Streptomyces* sp.



**Figura 13:** Microscopia eletrônica de varredura de esporos de *Streptomyces* sp.

As características de coloração do micélio aéreo e do micélio sobre o substrato também foram utilizadas para auxiliar na identificação dos actinomicetos. Porém, estas características foram empregadas, juntamente com as provas bioquímicas, para a classificação em nível de espécie. Os actinomicetos apresentavam uma variedade bastante grande de cores de micélio, principalmente o micélio aéreo, que apresentou colorações de branco, cinza, azul, rosa, marrom e creme. A produção destes pigmentos, freqüentemente, não ficava restrita ao micélio, ela se difundia no meio, alterando, desta maneira, a coloração do meio. A variedade de cores refletiu a diversidade de espécies e também a capacidade destes microrganismos produzirem pigmentos diversos.

#### **4.2.2. Identificação Bioquímica dos Actinomicetos**

A identificação bioquímica dos isolados foi realizada empregando 34 provas bioquímicas, incluindo a coloração do micélio aéreo e sobre o substrato. As provas para avaliar a utilização de fontes de carbono e nitrogênio tiveram que ser realizadas sobre meio sólido e específico para actinomicetos.

As provas para verificar a utilização de fontes de carbono foram repetidas três vezes, utilizando o protocolo descrito por MacFaddin (2000). O indicador de pH, púrpura de bromofenol, foi utilizado duas vezes e o indicador vermelho de fenol, uma vez, porém os resultados obtidos foram sempre negativos. Este resultado não era esperado, visto que estes microrganismos são conhecidos pela sua capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono. Desta maneira, os testes foram repetidos sobre meio sólido específico (Holt et al., 1989) e a maioria dos resultados que, anteriormente, haviam sido negativos, passaram a dar resultados positivos. Uma das possibilidades para os resultados negativos quando da utilização do meio de cultura com indicadores de pH, pode ser que a produção de ácidos decorrentes da utilização dos carboidratos não tenha sido suficiente para ser detectada pelo indicador de pH. Holt et al. (1989), utilizaram meios sólidos específicos para a classificação dos actinomicetos. Porém, neste trabalho não houve nenhuma referência do porquê da utilização dos meios sólidos específicos. O principal diferencial do meio utilizado como base para prova dos carboidratos é a presença de diferentes sais e isto também é uma característica da maioria dos meios empregados para o isolamento dos actinomicetos. Nestes meios de cultura a interpretação é realizada comparando

o crescimento do microrganismo nas placas com fonte de carbono controle e sem fonte de carbono.

As provas para verificar a utilização da arginina, l-cisteína, l-histidina e l-fenilalanina foram repetidas três vezes utilizando o protocolo descrito por MacFaddin (2000) para aminoácidos. Porém, as amostras testadas não puderam ser consideradas nem positivas, nem negativas, pois os dois tubos, o controle e o contendo a fonte de nitrogênio a ser testada, permaneceram inalterados. Desta maneira, as provas tiveram que ser realizadas sobre o meio sólido para a utilização de fontes de nitrogênio descrito para actinomicetos (Holt et al., 1989). Na maioria das vezes, os resultados passaram a ser positivos. Sendo a interpretação feita de forma semelhante à da fonte de carbono.

A produção do pigmento melanina foi verificada empregando o meio ágar tirosina, mas também pôde ser observada muitas vezes no caldo BHI, através do escurecimento do meio. Apesar da produção de melanina ser visualizada no caldo BHI, este meio não é o mais utilizado por que outros pigmentos podem ser produzidos neste meio, resultando num falso positivo. Desta maneira, os meios empregados para a produção de melanina são: o ágar tirosina e o ágar ferro extrato de levedura e peptona.

As demais provas bioquímicas seguiram os protocolos utilizados para a identificação das demais bactérias (MacFaddin, 2000; Holt et al., 1994).

Os 153 actinomicetos identificados ficaram distribuídos em 8 gêneros e 24 espécies (Tabela 5). Os gêneros predominantes foram *Streptomyces* sp. (n=61), *Nocardia* sp. (n=60) e *Terrabacter* sp. (n=21). A alta incidência de *Streptomyces*

pode estar relacionada com o fato deste microrganismo ter crescimento mais rápido do que os demais actinomicetos. Segundo Araujo (1998) a maioria dos actinomicetos tem um ciclo celular de 2 a 3 dias. Enquanto que o dos *Streptomyces* é de 1,7 dias. Além disto os *Streptomyces* produzem compostos que controlam o crescimento de outras bactérias e fungos, o que os torna melhores competidores (Suutari et al., 2001). Por outro lado, o freqüente aparecimento do gênero *Nocardia* pode ser devido a sua ampla distribuição no ambiente. Lacey (1997) observou o predomínio de *Streptomyces* e *Nocardia* no seu trabalho sobre actinomicetos em processo de compostagem. O gênero *Terrabacter* comumente não é citado como um gênero predominante durante o processo de compostagem. No entanto, isto pode estar relacionado com o tipo de material presente nas leiras, visto que, a diversidade das populações microbianas é grandemente influenciada pelo tipo de material a ser decomposto, e também pode refletir a falta de trabalhos publicados nesta área, pois certamente muitos microrganismos presentes durante o processo ainda não foram cultivados e identificados. Dees and Ghiorse (2001) no seu trabalho sobre diversidade bacteriana em composto, utilizaram seqüências 16S DNAr para a identificação de microrganismos durante o processo de compostagem e observaram que havia seqüências relacionadas a microrganismos que ainda não haviam sido isolados e identificados durante o processo.

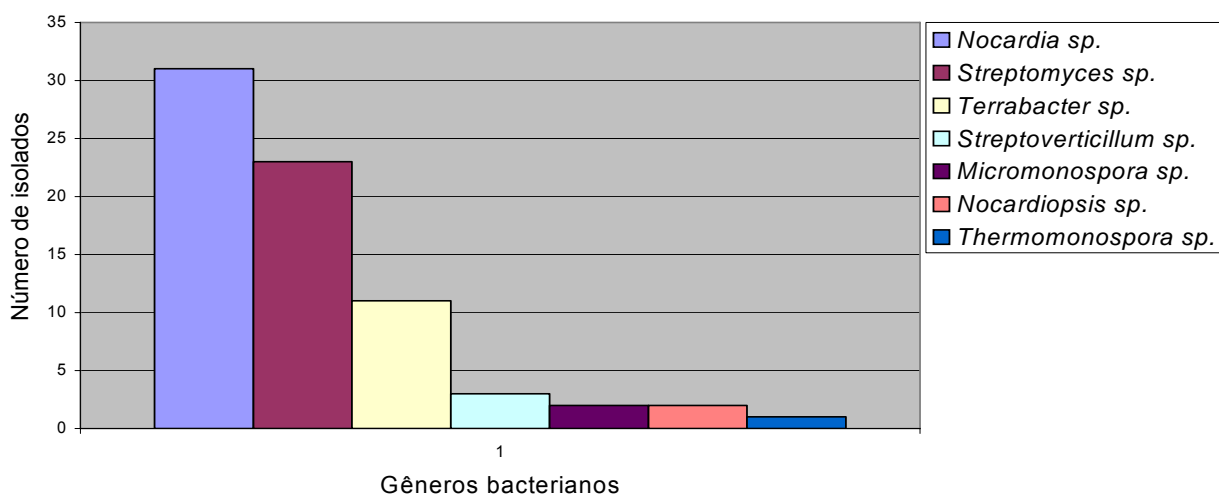
Nas leiras de compostagem da CETRISA ocorreu o predomínio do gênero *Nocardia* sp. (Figura14), enquanto que na pilha da Faculdade de Agronomia predominou o gênero *Streptomyces* sp. (Figura 15). Apesar do predomínio dos gêneros *Nocardia* e *Streptomyces* nas pilhas da CETRISA e Agronomia,

respectivamente, a diversidade das espécies nos dois pontos não foi significativa. Utilizando a análise de variância ANOVA foi possível constatar-se que a distribuição das espécies de *Streptomyces*, *Nocardia* e *Micromonospora* presentes na CETRISA não eram significativamente diferentes daquelas encontradas na pilha de compostagem da Faculdade de Agronomia. Para todas as espécies analisadas o valor de p-crítico foi menor do que 0,05 (Tabela 6), apesar do material utilizado como substrato para o processo de compostagem ter origens bastante diferentes. As leiras da CETRISA, recebiam resíduos sólidos urbanos, enquanto a pilha da UFRGS recebia material proveniente de podas, esterco e cama de animais e desta maneira esperava-se encontrar uma diversidade maior entre os dois processos. O gênero *Terrabacter* também foi submetido a análise de variância ANOVA, porém como havia somente uma espécie, não foi possível a aplicação do teste.

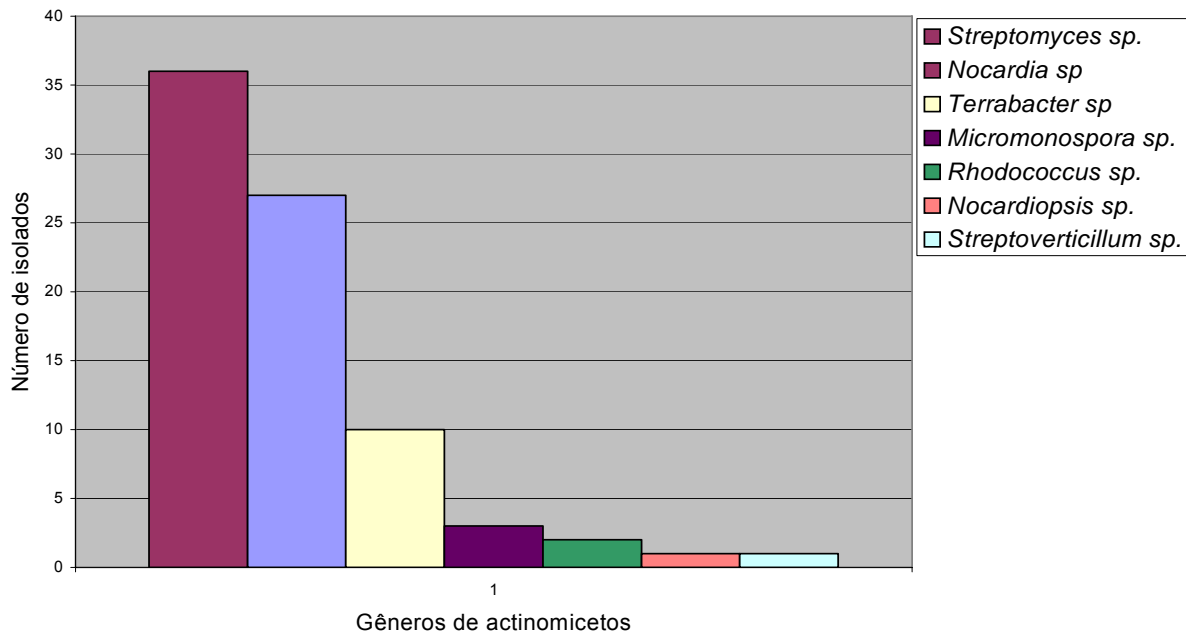


**Tabela 5:** Espécies de actinomicetos isolados de pilhas de compostagem da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e de leiras da Central de Triagem e Compostagem de Resíduos Sólidos de Saporanga (CETRISA)

	Agronomia	CETRISA	Total
<i>Streptomyces griseoviridis</i>	12	5	17
<i>Streptomyces Grupo C</i>	6	4	10
<i>Streptomyces cyaneus</i>	5	6	11
<i>Streptomyces lavendulae</i>	3	2	5
<i>Streptomyces violaceus</i>	3	1	4
<i>Streptomyces diastaticus</i>	2	0	2
<i>Streptomyces rochei</i>	2	1	3
<i>Streptomyces rimosus</i>	2	3	5
<i>Streptomyces antibioticus</i>	1	0	1
<i>Streptomyces fulvissimus</i>	0	1	1
<i>Nocardia brasiliensis</i>	6	10	16
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	6	6	12
<i>Nocardia vaccinii</i>	6	4	10
<i>Nocardia autotrophica</i>	5	2	7
<i>Nocardia amarae</i>	1	5	6
<i>Nocardia asteroides</i>	2	4	6
<i>Nocardia nova</i>	1	0	1
<i>Micromonospora carbonacea</i>	2	1	3
<i>Micromonospora echinospora</i>	1	1	2
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	1	2	3
<i>Terrabacter tumescens</i>	10	11	21
<i>Thermomonospora chromogena</i>	0	1	1
<i>Streptoverticillum verticillum</i>	1	3	4
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	2	0	2
<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>73</b>	<b>153</b>



**Figura 14:** Gêneros bacterianos isolados de leiras de compostagem da CETRISA (n=73)



**Figura 15:** Gêneros de actinomicetos isolados e identificados de uma pilha de compostagem da Faculdade de Agronomia da UFRGS (n=80)

**Tabela 6:** Valores de p-crítico encontrados para a análise de variância ANOVA para as espécies de *Nocardia*, *Streptomyces* e *Micromonospora* encontradas nas leiras de compostagem da CETRISA e na pilha de compostagem da Faculdade de Agronomia.

	p-crítico	F	F-crítico
<i>Nocardia</i> sp.	0,71	0,14	7,74
<i>Streptomyces</i> sp.	0,36	0,87	4,49
<i>Micromonospora</i> sp.	0,42	1	18,5

O trabalho de identificação de actinomicetos em processo de compostagem é dificultado pela falta de dados para comparação dos resultados encontrados. A maioria dos trabalhos sobre o processo de compostagem visa avaliar as variáveis físicas do processo e os trabalhos envolvendo identificação estão relacionados, principalmente, com a identificação de microrganismos indicadores de contaminação. A maioria dos trabalhos com actinomicetos em processo de compostagem utilizam técnicas moleculares para constatar a presença ou ausência destes microrganismos, pouco tem sido feito em relação à identificação deles durante o processo, resultando desta maneira na falta de dados comparativos.

### **4.3. Caracterização Molecular**

#### **4.3.1. Extração do DNA cromossomal dos actinomicetos**

O protocolo inicialmente utilizado para a extração do DNA cromossomal dos actinomicetos, foi o descrito por Sambrook et al. (1989). Porém a quantidade de DNA obtida com este protocolo foi muito pequena, provavelmente isto deve ter ocorrido por que o número de células lisadas foi pequeno. Podia-se visualizar, após o período de incubação com lisozima e proteinase K, que a grande maioria das células permaneciam agrupadas formando grumos, característico do crescimento de actinomicetos em meio líquido.

Desta forma o protocolo descrito por Hopwood et al., (2000) passou a ser utilizado, com uma produção satisfatória de DNA. Este protocolo foi descrito para *Streptomyces*, mas funcionou igualmente bem para todos os actinomicetos. Ele difere do protocolo descrito por Sambrook et al., (1989) principalmente, por aumentar a concentração de lisozima, que passou de 0,2mg/ml para 1mg/ml, e também por aumentar o tempo de incubação com lisozima e proteinase K de uma hora para duas horas.

#### **4.3.2. Condições de amplificação**

A Reação em Cadeia da Polimerase foi a técnica empregada para amplificar a região 16S DNAr dos actinomicetos. O par de oligonucleotídeos iniciadores utilizado foi o F243/R513 desenhado por Heuer et al (1997). Este par de oligonucleotídeos inicia na região variável V3 do 16S e produz um

fragmento de 302 pares de base. Sua especificidade deve-se principalmente as últimas três bases do oligonucleotídeo F243 que é específica para actinomicetos.

Várias condições de amplificação foram testadas (Tabela 2) com um controle positivo e um negativo com o objetivo de avaliar a especificidade da reação. Após vários testes, o melhor sistema encontrado foi o XI. Estabelecida a melhor mistura de reação, estabeleceu-se a melhor temperatura de anelamento para amplificação específica de actinomicetos (Tabela 3).

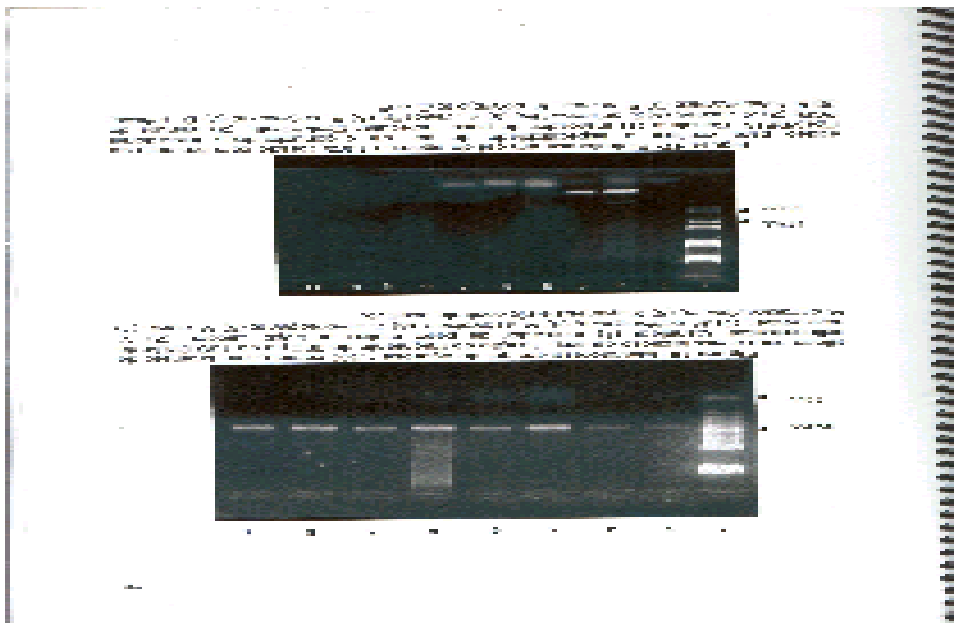
Os resultados obtidos na tabela 3, demonstram que a temperatura de anelamento adequada para amplificar especificamente a região 16S DNAr de actinomicetos foi a de 63°C (Figura 16). Esta temperatura está 3°C acima da temperatura ótima de anelamento calculada para o par de oligonucleotídeos utilizados, mas foi este aumento na temperatura que garantiu a especificidade do produto de amplificação (Figura 17). Heuer et al., (1997) também utilizaram a temperatura de 63°C para amplificação de actinomicetos e sugeriram que a mesma poderia ser aumentada até 68°C, para aumentar a sua especificidade. Porém, neste trabalho a temperatura de 63°C foi suficiente para amplificar somente o DNA de actinomicetos. O DNA dos 153 actinomicetos identificados através das características morfológicas e dos testes bioquímicos foi submetido à amplificação e todos obtiveram resultados positivos. Resultados semelhantes foram encontrados por Dees and Ghiorse (2001), os quais conseguiram amplificar especificamente a região 16S DNAr dos actinomicetos, com este par de oligonucleotídeos iniciadores, utilizando a temperatura de anelamento de 63°C

Embora o par de oligonucleotídeos utilizado seja específico para actinomicetos, algumas ampliações inespecíficas podem ocorrer. Heuer et al. (1997) testaram, este par de oligonucleotídeos iniciadores, com 2270 seqüências de 16S DNAr de culturas puras de não actinomicetos e obtiveram um número de 13 ampliações inespecíficas. Porém, quando o par de oligonucleotídeos iniciadores F243/R513 foi utilizado para a análise de comunidades de solo e de rizosfera, os autores observaram que as ampliações inespecíficas desapareceram quando os actinomicetos estavam presentes, mesmo quando estes estavam numa concentração 100 vezes menor. Isto deve-se ao fato deste par de oligonucleotídeos possuir maior afinidade com o DNA dos actinomicetos devido a especificidade da extremidade 3' do F243 e desta maneira, a presença de actinomicetos inibe a amplificação do DNA de não actinomicetos.

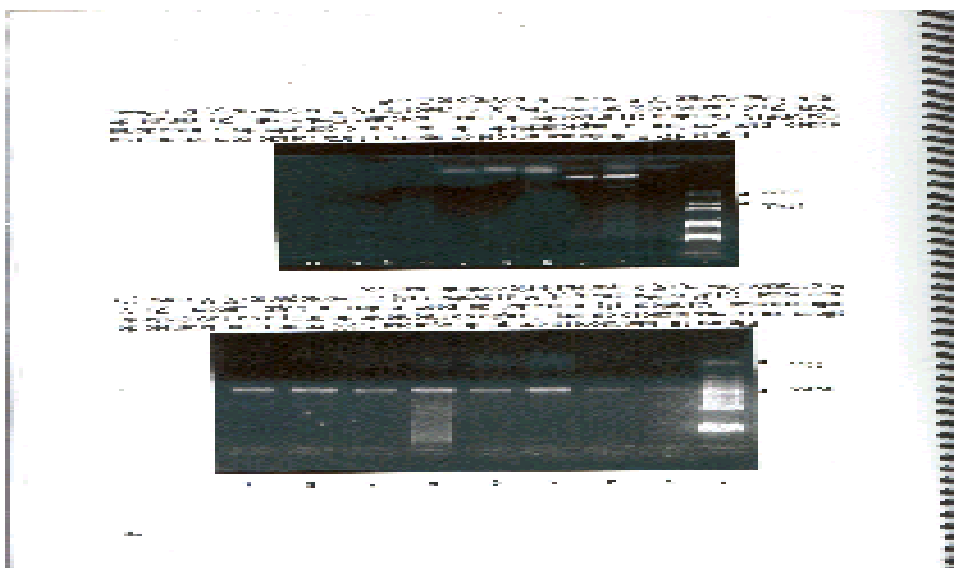
#### **4.3.3. Digestão com endonucleases de restrição**

O produto obtido com a amplificação da região 16S do DNAr dos actinomicetos foi submetido a clivagem com endonucleases de restrição. Isto foi realizado com o objetivo de tentar classificar os actinomicetos em nível de gênero e se possível em espécie, através dos perfis obtidos com as endonucleases e também para verificar se os resultados obtidos com a metodologia clássica eram semelhantes aos encontrados com a molecular.

Para a realização da digestão com as endonucleases de restrição foram selecionados 31 dos isolados identificados através das provas bioquímicas, representando os gêneros *Nocardia* (10 isolados), *Streptomyces* (18 isolados),



**Figura 16:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo para visualização da amplificação do fragmento de 302pb do 16S DNAr de actinomicetos. Canaleta (1) marcador de peso molecular 50pb Ladder; (2) *N. dassonvillei*; (3) *M. echinospora*; (4) *N. asteróides*; (5) *T. chromogena*; (6) *N. nova*; (7) *N. otitidiscaviarium*; (8) *S. cyaneus* e (9) controle positivo.



**Figura 17:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo para verificar a especificidade do par de oligonucleotídeos iniciadores F243/R513. Canaleta (1) marcador de peso molecular *Eco/HindIII*; (2) mistura de PCR; (3) *S. rochei*; (4) *S. griseoviridis*; (5) *A. faecalis*; (6) *B. polymyxa*; (7) *B. subtilis*; (8) *B. licheniformis*, (9) *B. cereus* e (10) *B. polymyxa*, (11) *E. coli*.

*Micromonospora* (1 isolado), *Streptoverticillum* (1 isolado) e *Thermomonospora* (1 isolado). As espécies de *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces cyaneus*, *Nocardia otitidiscaviarium* e *Nocardia brasiliensis* tiveram vários isolados selecionados e isto foi feito com o objetivo de verificar possíveis variações intraespecíficas no DNA destes microrganismos utilizando endonucleases de restrição. Martin et al. (2000) utilizaram o polimorfismo do DNA amplificado randomicamente (RAPD) para avaliar diferenças inter e intraespecífica em *Streptomyces*. Os autores observaram que havia diferenças intraespecíficas em *Streptomyces* e sugeriram que estas variações devem-se, principalmente, as instabilidades genéticas destes microrganismos.

Para a realização da clivagem com endonucleases de restrição, o produto obtido com PCR foi processado de três maneiras diferentes: primeira, o produto foi digerido sem ser purificado; segunda, o produto foi purificado com acetato de sódio 3M; a terceira, o produto foi submetido a uma extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e clorofórmio/álcool isoamílico. Porém não houve diferença entre as três metodologias aplicadas e desta forma o material a ser digerido com as endonucleases de restrição passou a ser usado sem ser purificado, após a amplificação por PCR.

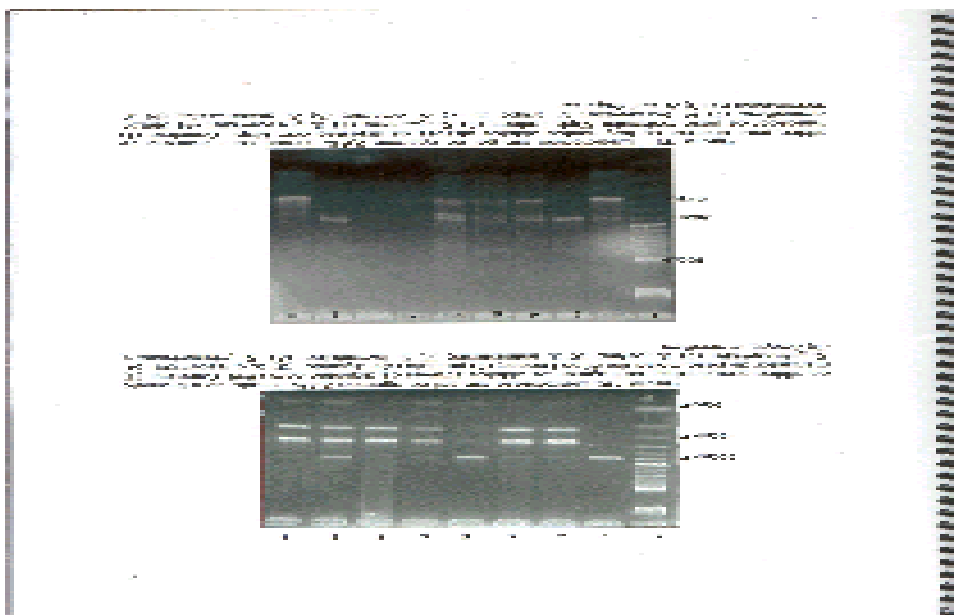
O fragmento de 302 pares de base obtido com o PCR foi submetido à clivagem com as seguintes endonucleases de restrição: *Hinfl*, *Mspl*, *XhoI*, *NarI*, *BanII*, *MluI*, *PvuI* e *SmaI* com concentrações da endonucleases variando de 1U a 2,5U. A escolha destas endonucleases de restrição foi realizada baseando-se em



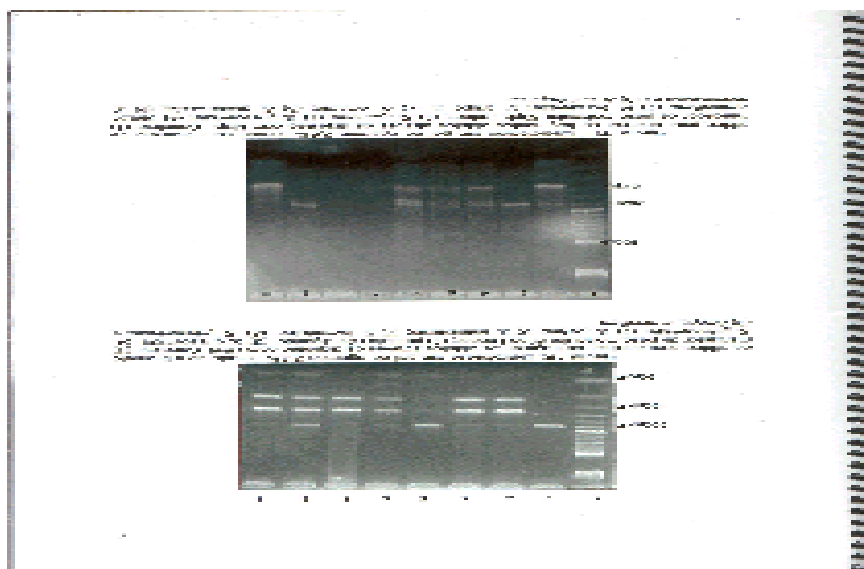
trabalhos anteriores com actinomicetos isolados de amostras clínicas, porém utilizando outros oligonucleotídeos iniciadores.

A maioria dos trabalhos empregando endonucleases de restrição, utilizaram o produto amplificado do gene da proteína do choque térmico. Wilson et al. (1998), o seu trabalho sobre análise do modelo de enzimas de restrição para identificação de actinomicetos, utilizaram 8 endonucleases de restrição para a análise do fragmento amplificado do gene da proteína do choque térmico e obtiveram o reconhecimento de 274 dos 293 actinomicetos analisados. Com o emprego destas endonucleases, os autores conseguiram distinguir até mesmo, espécies de *Nocardia* morfologicamente não distinguíveis. Steingrube et al. (1998) no seu trabalho sobre identificação de actinomicetos de importância clínica, também utilizaram endonucleases de restrição, mas novamente foi para o produto obtido da amplificação do gene da proteína do choque térmico. Neste trabalho, os autores testaram 28 endonucleases de restrição, mas somente a *MspI* e a *HinI* produziram produtos que diferenciaram satisfatoriamente os isolados testados.

Resultados semelhantes aos de Steingrube et al. (1998) foram encontrados neste trabalho, pois das endonucleases testadas somente a *HinI* (figura 18) e a *MspI* (Figura 19) encontraram sítio de reconhecimento no produto amplificado.



**Figura 18:** Eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo para analisar os fragmentos obtidos através da digestão com *Hinf*I. Canaleta (1) marcador de peso molecular 50pb Ladder; (2) produto não digerido; (3) *S. griseoviridis*; (4) *S. griseoviridis*; (5) *S. rochei*; (6) *S. antibioticus*; (7) *S. antibioticus*; (8) *S. griseoviridis* e (9) *Strept. verticillum*.



**Figura 19:** Eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo para analisar os fragmentos obtidos através da digestão com *Msp*I. Canaleta (1) marcador de peso molecular 50pb Ladder; (2) *S. cyaneus*; (3) *S. griseoviridis*; (4) *Strept. verticillum*; (5) *N. brasiliensis*; (6) *S.* do grupo C; (7) *N. amarae*; (8) *S. griseoviridis*, (9) *S. griseoviridis* e (10) *N. autotrophica*.

A razão de somente duas das enzimas testadas, terem encontrado sítios alvo no fragmento amplificado, deve-se ao fato de não se ter conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeos do fragmento amplificado de nenhuma espécie de actinomiceto. A maioria dos trabalhos realizados com o par de oligonucleotídeos iniciadores F243/R513 fazem a análise dos fragmentos através do Gel de Eletroforese com Gradiente de Desnaturação (DGGE).

Heuer et al. (1997), analisaram a comunidade de actinomicetos através da amplificação do 16S DNAr utilizando os oligonucleotídeos iniciadores F213/R513 e separaram os fragmentos através do DGGE. Com o emprego desta técnica os autores conseguiram diferenciar os isolados em nível de gênero e muitos em nível de espécie. Dees and Ghiorse (2001), no seu trabalho sobre diversidade microbiana no composto foram os únicos a utilizar o modelo de análise de restrição do DNAr amplificado, neste trabalho os autores utilizaram o par de oligonucleotídeos F243/R513 e as enzimas *HaeIII* e *HhaI* e conseguiram, através desta técnica diferenciar os actinomicetos encontrados em nível de gênero.

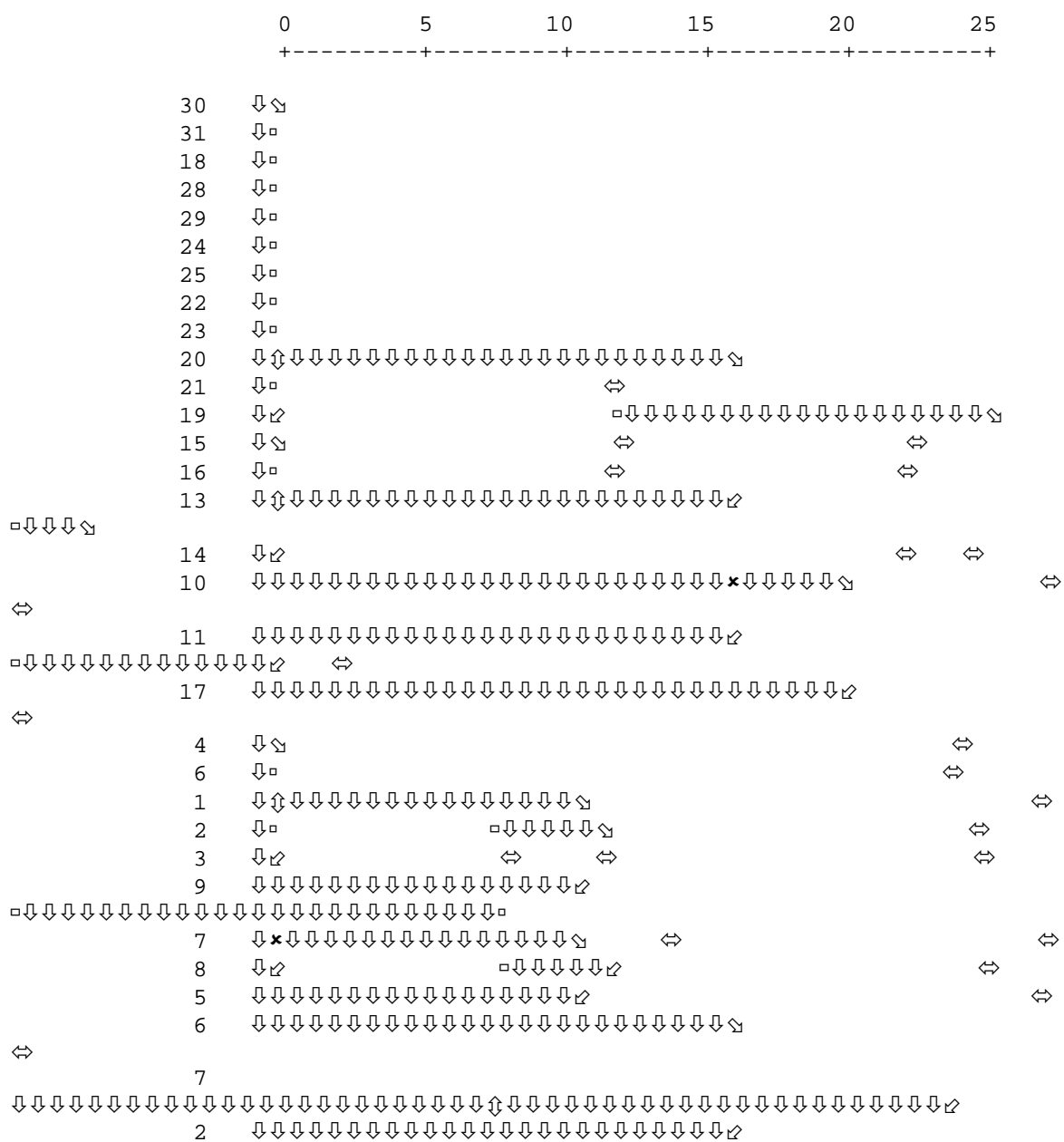
Desta forma mais enzimas deveriam ter sido utilizadas, ou deveria ter sido realizado o seqüenciamento de alguns dos produtos amplificados para que se pudesse escolher enzimas que gerassem padrões melhores de RFLP.

#### **4.4. Análise Filogenética**

A análise filogenética foi realizada através da análise dos fragmentos obtidos com as endonucleases de restrição *Hinfl* e *MspI* e também através das provas bioquímicas dos 31 isolados selecionados para as digestões.

O dendrograma da análise filogenética obtida com *HinfI* possibilitou a formação de 4 grupos em uma distância de 10 (Figura 20): grupo A, (isolados 30 a 19) com 100% de similaridade é constituído por um grupo diversificado, incluindo *Streptomyces* sp., *Nocardia* sp., *Micromonospora* sp. e *Thermomonospora* sp.; o grupo B com 100% de similaridade (isolados 15 a 14) constituído por *N. vaccinii*, *N. nova* e *S. griseoviridis*; o grupo C (isolados 4 a 9), com *S. antibioticus*, *S. griseoviridis*, *Strept. verticillum* apresentando 100% de similaridade entre eles e 67% com *N. otitidiscaviarium* (isolado 9); grupo D (isolados 7 a 5), sendo que os isolados 7 (*S. cyaneus*) e 8 (*N. brasiliensis*) apresentam 100% de similaridade entre eles e 66% com o isolado 5 (*N. otitidiscaviarium*) (Tabela 7). Os isolados 10, 11, 17, 26, 27 e 12 ficaram isolados, porém uniram-se posteriormente, numa distância maior. A endonuclease de restrição *HinfI* não foi eficiente para a separação dos isolados em nível de gênero, pois principalmente, o grupo A ficou bastante diversificado, onde os isolados apresentaram um alto índice de similaridade, mesmo os pertencentes a gêneros diferentes. Ao analisar-se o perfil de restrição, com a enzima, pode-se observar que este é o mesmo, não havendo distinção entre os gêneros (Figura 21).

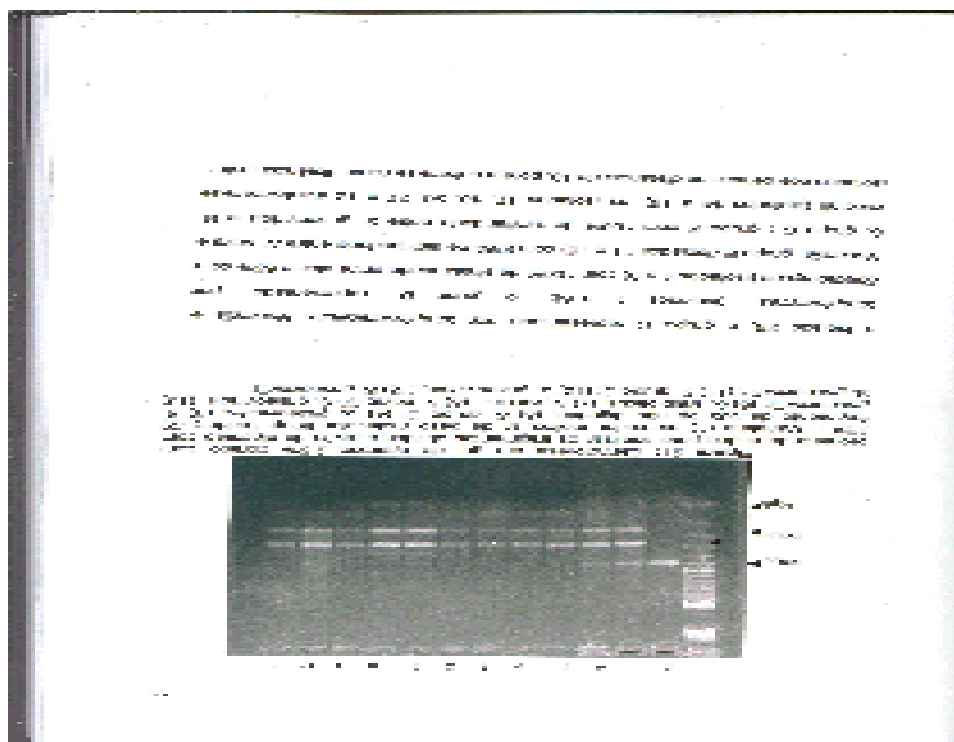
### Escala da distância entre grupos



Analisando o dendrograma obtido com a endonuclease *MspI* (Figura 22) observou-se a formação de 3 grupos em uma distância de 10: o grupo A, contendo *Streptomyces* sp. que possuem sítios alvo para a *MspI* (isolados 16 a 8) com 100% de similaridade (Tabela 8), o grupo B, incluindo *Nocardia* sp. com sítio alvo para a *MspI* (isolados 28 a 20) e o grupo C, o qual contém, principalmente *Streptomyces* sp. sem sítio alvo para *MspI* (isolados 25 a 3). Neste grupo ficaram todos os *Streptomyces griseoviridis* analisados e também a *Nocardia otitidiscaviarium*.

Através da análise com as enzimas *MspI* e *HinfI* observou-se que havia alto índice de similaridade entre as linhagens de *Streptomyces griseoviridis* e *Streptomyces antibioticus* e também entre *Nocardia amarae*, *Nocardia autotrophica*, *Streptomyces fulvissimus*, *Streptomyces cyaneus* e *Micromonospora*. Verificou-se que as linhagens de *Streptomyces griseoviridis* não apresentavam similaridade com as espécies de *Streptomyces cyaneus* e com *Streptomyces* do Grupo C (Tabela 9). Variações nos índices de similaridades foram observadas entre as linhagens de *Streptomyces griseoviridis* (índices variando entre 1 e 0,25) e isto pode ser decorrente de variações intraespecíficas no DNA destes microrganismos. Através do dendrograma obtido com os resultados da digestão com *HinfI* e *MspI* (Figura 23) pode-se observar a formação de 6 grupos em uma distância de 10: o grupo A (isolados 25 a 22) com *T. chromogena* e S. Grupo C com 100% de similaridade entre eles e 80% com *N. brasiliensis*; Grupo B (isolados 29 a 23) com 100% de similaridade entre os isolados 23 a 19 e 90% com o isolado 23; o grupo C representado por *Streptoverticillum*, *Nocardia* e *Streptomyces* (isolados 1 a 6); o grupo D representado por *Streptomyces* (isolados 4 a 9) com 100% de similaridade

entre eles e 66% com *Nocardia*; Grupo E (isolados 11 a 16) com 85% de similaridade entre *N. nova* e *S.* Grupo C; grupo F com 100% de similaridade entre *S. griseoviridis* e *N. vaccinii* (isolados 14 a 13); os isolados 17, 10, 26, 27 e 12 mantiveram-se isolados dos demais na distância de 10, porém uniram-se numa distância maior.



**Figura 21:** Eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo para analisar os fragmentos obtidos através da digestão com *HinfI*. Canaleta (1) marcador de peso molecular 50pb Ladder; (2) fragmento de 302pb não digerido; (3) *S.* Grupo C; (4) *S. griseoviridis*; (5) *S. griseoviridis*; (6) *S. antibioticus*; (7) *N. vaccinii*; (8) *N. nova*, (9) *S. griseoviridis*, (10) *S. griseoviridis*; (11) *S* Grupo C; (12) *S. griseoviridis* e (13) *S. griseoviridis*.

A matriz de similaridade com a utilização das provas bioquímicas mostrou índices bastante altos entre as nocardias, com pequenas variações entre elas. Já a análise entre os estreptomicetos mostrou variações maiores e com índices de similaridade, entre eles, mais baixos. Talvez isto esteja relacionado com o fato dos

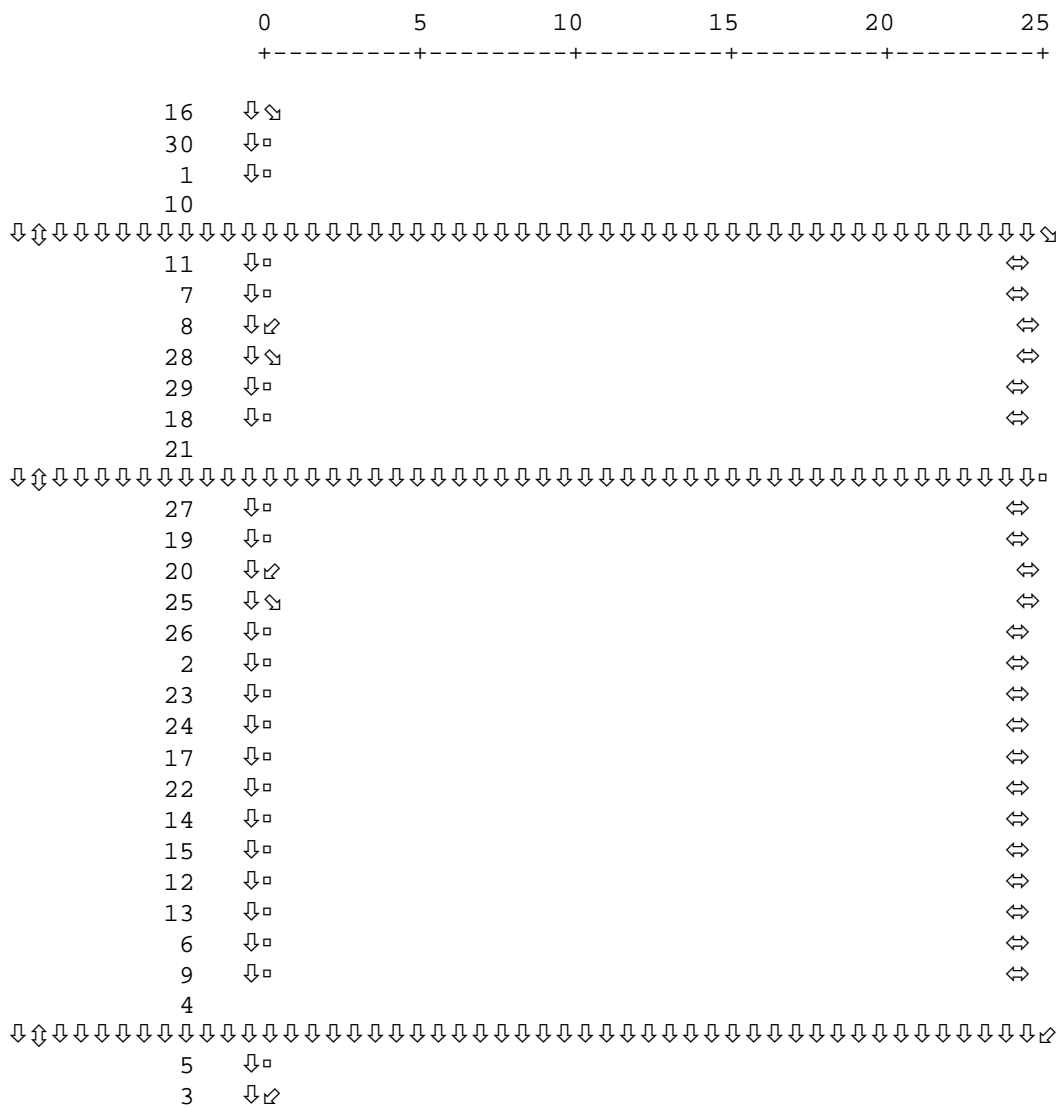
*Streptomyces* apresentarem uma diversidade bioquímica maior. Willians et al. (1983), dividiram os *Streptomyces* em 23 grupos maiores, 20 grupos menores e 25 grupos membro único. As espécies pertencentes ao grupo maior, contém quatro ou mais linhagens, as definidas no grupo menor contém 2 ou 3 linhagens e as pertencentes ao grupo único possuem apenas uma. Os *Streptomyces* identificados neste trabalho, pertencem ao grupo maior desta classificação, desta maneira possuem algumas variações no seu perfil bioquímico o que conseqüentemente pode ser evidenciado através de índices de similaridade diferente de 1 (Tabela 10), mesmo em linhagens de uma mesma espécie.

O dendrograma resultante das provas bioquímicas (Figura 24) não formou grupos bem definidos, pois todo agrupamento ficou bastante homogêneo. Considerando a distância de 10, pode-se observar a formação de 5 grupos: o grupo A (isolados 18 a 26), constituído por pequenos subgrupos incluindo *Nocardia* e *Streptomyces*, o grupo B (isolados 2 e 31) com 75% de similaridade entre *S. griseoviridis* e *M. echinospora* e o grupo C (isolados 4 e 19) com 89% de similaridade entre *S. antibioticus* e *S. cyaneus*, o grupo D (isolados 20 e 25) com 87% de similaridade entre *N. autotrophica*; e grupo E (isolados 12 e 14) com 83% de similaridade entre *S. Grupo C* e *S. griseoviridis*. Os demais isolados ligaram-se a estes grupos em uma distância maior.

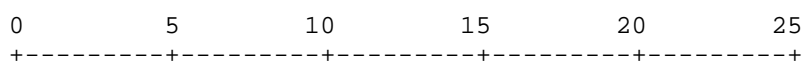
Em geral, as endonucleases de restrição HinfI e MspI possibilitaram a separação em nível de gênero. Porém, mais enzimas deveriam ser testadas para tentar a separação em nível de espécie.



### Escala da distância entre grupos



### Escala da distância entre grupos







## 5. Conclusões

1. A identificação de actinomicetos através de provas bioquímicas requer o emprego de alguns protocolos específicos, como o empregado para verificar a utilização de fontes de carbono e nitrogênio e os utilizados para verificar a coloração do micélio.

2. Não ocorreu uma variação significativa entre a população de actinomicetos encontrada nas leiras de compostagem da CETRISA e na pilha da UFRGS, apesar do material a ser compostado ser diferente.

3. *Streptomyces* e *Nocardia* foram os gêneros predominantes nos dois locais de coleta.

4. A especificidade do par de oligonucleotídeo iniciador F243/R513 é fortemente influenciada pela temperatura de anelamento utilizada, sendo necessário utilizar uma temperatura mínima de 63°C.

5. As endonucleases de restrição *XhoI*, *NarI*, *BanII*, *MluI*, *PvuI* e *SmaI* não se mostraram eficientes para a clivagem do fragmento obtido com a técnica do PCR utilizando o par de oligonucleotídeos F243/R513.

6. As endonucleases de restrição *HinfI* e *MspI* agruparam, na sua maioria, os isolados em nível de gênero.

## 6. Perspectivas

1. Testar mais endonucleases de restrição, entre elas a *HaeIII* e a *HhaI*, para tentar uma melhor separação dos isolados em nível de gênero e espécie.

2. Utilizar endonucleases de restrição combinadas, buscando uma melhor distinção entre os isolados.

3. Testar par de oligonucleotídeos iniciadores específicos para *Streptomyces*.

4. Sequenciar fragmentos amplificados dos gêneros para se fazer uma comparação entre os mesmos.

## 7. Referências bibliográficas

ABEAS- Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Programa de pesquisa em saneamento básico: metodologias e técnicas de minimização, reciclagem, e reutilização de resíduos sólidos urbanos.** Rio de Janeiro: ABEAS, 1999. 65p.

ANTUNES, G.S. **Manual de diagnóstico bacteriológico.** 2.ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 278p.

ARAUJO, J.M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana.** Jaguariúna: Embrapa, 1998. p.351-367.

BALL, A.S. et al. Lignocarbohidrate solubilization from straw by actinomycetes. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.56, n.10, p.3017-3022, 1990.

BARI, Q.H.; KOENING, A. Effect of air recirculation and reuse on composting of organic solid waste. **Resource conservation & recycling**, Amsterdam, v.33, p.93-111, 2001.

BARRINGTON, S. et al. Effect of carbon source on compost nitrogen and carbon losses. **Bioresource technology**, Amsterdam, v.83, p.189-194, 2002.

BELL, K.S. et al. The genus *Rhodococcus*. **Journal of applied microbiology**, Washington, v.85, p. 195-210, 1998.

BERNAL, M.P. et al. Maturity and stability parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes. **Bioresource technology**, Amsterdam, v.63, p.91-99, 1998.

BLANC, M. et al. Thermophilic bacterial communities in hot composts as revealed by most probable number counts and molecular (16S rDNA) methods. **FEMS microbiology ecology**, Amsterdam, v.28, p.141-149, 1999.

BÚA, J.; PORCEL, B.M. The polymerase chain reaction. In: BUIZ, R.M.; BÚA, J. **Obtainment an characterization of parasite molecules**. [s.l.], CABBIO, 1994. p.24-28.

CIFTCIOGLU, N.; KAJANDER, E.O. Interaction of nanobacteria with cultured mammalian cells. **Pathophysiology**, Baltimore, v.4, p.259-270, 1998.

CONNELL, N.D. Expression systems for use in actinomycetes and related organisms. **Current opinion in biotechnology**, Cleveland, v.12, p.446-449, 2001.

CRAWFORD, D. et al. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.59, n.11, p.3899-3905, 1993.

DEES, P.M.; GHIORSE, W.C. Microbial diversity in hot syntetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. **FEMS microbiology ecology**, Amsterdam, v.35, p.207-216, 2001.

DÉPORTES, I.; BENOIT-GUYOD, J.-L.; ZMIROU, D. Hazard to man and the enviroment posed by use of urban waste compost: a review. **The Science of the total environment**, Amsterdam, v.172, p.197-222, 1995.



DÉPORTES, I.; BENOIT-GUYOD, J.L.; ZMIROU, D. Microbial disinfection capacity of municipal solid waste (MSW) composting. **Journal of applied microbiology**, Washington, v.85, p.238-246, 1998.

EMBLEY, T.M. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. **Annual review microbiology**, Boston, v.48, p.257-289, 1994.

ENSIGN, J.C. Formation, properties, and germination of actinomycetes spores. **Annual review microbiology**, Boston, v.32, p.185-219, 1978.

ESPOSITO, E.; PAULILO, S.M.; MANFIO, G.P. Biodegradation of the herbicide diuron in soil by indigenous actinomycetes. **Chemosphere**, New York, v.37, p.541-548, 1998.

FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI, P.J. **Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2000. 198p.

GERHARDT, P. **Manual of methods for general bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology, 1981. p.79-111.

GROTH, I. et al. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). **Journal of microbiological methods**, Amsterdam, v.36, p.115-122, 1999.

HASSEN, A. et al. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. **Bioresource technology**, Amsterdam, v.80, p.217-225, 2001.

HEUER, H. et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.63, n.8, p.3233-3241, 1997.

HOLT, J.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

HOLT, J.G.; WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. v.4, p.2300-2648.

HOPWOOD, D.A. et al. **Practical Streptomyces genetics**. Baltimore. The John Innes Centre, 2000.

JANG, J. et al. Glucose effect on the biodegradation of plastics by compost from food garbage. **Polymer degradation and stability**, Oxford, v.76, p.155-159, 2002.

JOHNSON, G.E.; CRAWFORD, S.L. Evaluating compost quality. **Resource recycling**, Amsterdam, p.50-54, disponível em [WWW.p2pays.org/ref/06/05498.pdf](http://WWW.p2pays.org/ref/06/05498.pdf), acessado em janeiro de 2003

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture ecosystems & environment**, Amsterdam, v.74, p. 65-76, 1999.

KIEHL, E.J. **Fertilizantes orgânicos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1985. 429p.

KLAPPENBACH, J.; DUNBAR, J.M.; SCHMIDT, T.M. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.66, n.4, p.1328-1333, 2000.

LACEY, J. Actinomycetes in composts. **Actinomycetes in composts**, Koge, v.4, p.113-121, 1997.

LEWIN, B. **Genes VII**. New York: Oxford University Press, 2000. 980p.

LIANG, C.; DAS, K.C.; MCCLENDON, R.W. The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend. **Bioresource technology**, Amsterdam, v.86, p.131-137, 2003.

LIMA, L.M.Q. **Tratamento de lixo**. São Paulo: Hemus, 1995. 242p.

MACFADDIN, J.M. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. 3th. ed. Baltimore: Pippincott Williams & Wilkins. 1999, 912p.

MADEJÓN, E. et al. New approaches to establish optimum moisture content for compostable materials. **Bioresource technology**, Amsterdam, v.85, p.73-78, 2002.

MANDELLI, S.M.C.; LIMA, C.M.Q.; OJIMA, M.K. **Tratamento de resíduos sólidos**. Caxias do Sul: [s.n.], 1991. 291p.

MARTIN, P. et al. Identification and typing of *Streptomyces* strains: evaluation of interspecific, intraspecific and intraclonal differences by RAPD fingerprinting. **Research in microbiology**, Paris, v.151, p.853-864, 2000.

MCCARTHY, A.J.; WILLIAMS, S.T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment – a review. **Gene**, Viena, v.115, p.189-192, 1992.

MONCIARDINI, P. et al. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. **FEMS microbiology ecology**, Amsterdam, v.1414, p.1-11, 2002.

MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITERLINDEN. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.59, n.3, p.695-700, 1993.

OUHDOUCH, Y.; BARAKATE, M.; FINANCE, C. Actinomycetes of moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. **European journal soil biology**, Montraique, v.37, p.69-74, 2001.

PADILHA, G. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I. S. e AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p.327-347.

PANDHARE, J.; ZOG, K.; DESHPANDE, V.V. Differential stabilities of alkaline protease inhibitors from actinomycetes: effect of various additives on thermostability. **Bioresource technology**, Amsterdam, v.84, p.165-169, 2002.

PEREIRA NETO, J.T. **Tratamento e destinação de resíduos provenientes de empreendimentos agrícolas**. Viçosa: ABEAS- Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior. 1996. 77p.

PETERS, S. et al. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism-Based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.66, n.3, p.930-936, 2000.

PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; Keim, D.A. **Microbiology**. 2. ed. New York: Brown Publishers, 1993, 340p.

RAMACHANDRA, M.; CRAWFORD, D.L.; HERTEL, G. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomicete *Streptomyces viridosporus*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.54, n.12, p.3057-3063, 1998.

REYSENBACH, A. et al. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.58, p.3417-3418, 1992.

REPONEN, T.A. et al. Characteristics of airborne actinomycete spore. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.64, p.3807-3812, 1998.

SAYAGO, D.E.; **Resíduos sólidos**: propostas de instrumentos econômicos ambientais. Brasília: Ministério do Planejamento e Orçamento, Secretaria de Política Urbana, 1998. 145p.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: CSHL Press . 1989.

SCHMALENBERGER, A.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.67, n.8, p.3557-3563, 2001.

SCHRIJVER, A.; MOT, R. Degradation of pesticides by actinomycetes. **Critical reviews in microbiology**, Boca Raton, v.25, p.85-119, 1999.

SCHWAB, B.S. et al. Characterization of compost from a pilot plant-scale composter utilizing simulated solid waste. **Waste management & research**, Amsterdam, v.12, n. 12, p.289-303, 1994.

SESSITSCH, A. et al. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. **FEMS microbiology ecology**, Amsterdam, v.39, p.23-32, 2002.

SHIRLING, E.B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International journal of systematic bacteriology**, Washington, v.16, p.313-340, 1966.

STACKEBRANDT, E. et al. Designation of Streptomycece 16S and 23S rRNA-based target regions for oligonucleotide probes. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.57, n.5, p.1468-1477, 1991.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F.A.; WARD-RAINEY, N.L. Proposal for a new Hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. **International journal of systematic bacteriology**, Washington, v.47, p.479-491, 1997.



STEINGRUBE, V. et al. Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic Actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v.35, n.4, p.817-822, 1997.

SUUTARI, M. et al. Characterization of *Streptomyces* spp. Isolated from water-damaged buildings. **FEMS microbiology ecology**, Amsterdam, v.39, p.77-84, 2002.

THASSITOU, P.K. ; ARVANITTOYANNIS,I.S. Bioremediation: a novel approach to food waste management.**Trends in food science e technolohy**, Amsterdam, v.12, p.185-196, 2001.

THOMAS, L.; CRAWFORD, D.L. Cloning of clustered *Streptomyces viridosporus* T7A lignocellulose catabolism genes encoding peroxidase and endoglucanase and their extracellular expression in *Pichia pastoris*. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v.44, p.364-372, 1998.

TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environmental: a review. **Bioresource technology**, Washington, v.72, p.169-183, 2000.

UEDA, K. et al. Two distinct mechanisms caused heterogeneity of 16S rRNA. **Journal of bacteriology**, Tokyo, v.181, n.1, p.78-82, 1999.

XU, J. et al. Improved molecular identification of *Thermoactinomyces* spp. associated with mushroom worker's lung by 16S rDNA sequence typing. **Journal medical microbiology**, Spencers Wood, v.51, p.1117-1127, 2002.

WACHINGER, G. et al. Identification of mycelium-associated cellulase from *Streptomyces reticuli*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.55, n.10, p.2653-265, 1989.

WANG, Y.; ZHANG, Z. Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes. **Microbiology**, Algeria, v.146, p.2845-2854, 2000.

WANG, Y.; ZHANG, Z.; RAMANAN, N. The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes. **Journal of bacteriology**, Tokyo, v.179, n.10, p.3270-3276, 1997.

WILLIAMS, S.T. et al. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **Journal of general microbiology**, Tokyo, v.129, p.1743-1813, 1983a.

WILLIAMS, S.T. et al. A probability matrix for identification of some Streptomyces. **Journal of general microbiology**, Tokyo, v.129, p.1815-1830, 1983b.

WILSON, R. et al. Clinical application of PCR-restriction enzyme pattern analysis for rapid identification of aerobic actinomycete isolates. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v.36, n.1, p.148-152, 1998.

WINTZINGERODE, F.V.; GÖBEL, U.B.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. **FEMS microbiology reviews**, Amsterdam, v.21, p.213-229, 1997.

YOON, J.H; LEE, T.; PARK, Y.H. Genetic analyses of the genus *Nocardioides* and related taxa based on 16S-23S rDNA internally transcribed spacer sequences. **International journal of systematic bacteriology**, Washington, v.48, p.641-650, 1998.

## I. Apêndices

### 1. Meios de cultura utilizados para o isolamento e identificação dos actinomicetos

#### I.1.1- Ágar Jausen g/l

Glicose	2,0 g
Caseína	0,2 g
Fosfato de potássio	0,5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
Cloreto de Ferro	0,02 g
Ágar	15,0 g

#### I.1.2- Ágar 72C g/l

Glicose	10,0 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,06 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,65 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,38 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7,9 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 g
Elementos traços: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	6,4 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg

### **I.1.3- Ágar Amido Caseína (ACA) g/l**

Amido	10,0g
Caseína	0,3g
Nitrato de Potássio	2,0g
NaCl	2,0g
Fosfato de Potássio dibásico	2,0g
Sulfato de Magnésio	0,05g
Sulfeto Ferroso	0,01g
Agar	18,0g

### **I.1.4- Meio base para utilização de fontes de carbono g/l**

#### **Solução Basal I**

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,64g
------------------------------	-------

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,38g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	5,65g
$\text{MgSO}_4$	1,0g
Solução I	1,0ml
Agar	18,0g

**Solução I – Solução de Pridham and Gottlied /100ml**

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,64g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,11g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,79g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,15g

\*Controle Positivo: adiciona-se 1ml de uma solução de glicose 10% (concentração final 1%).

\*Controle negativo : nenhuma fonte de carbono é adicionada

\*Fonte de carbono a ser testada: adiciona-se 1ml de uma solução 10% (concentração final de 1%).

**I.1.5- Meio base para utilização de fontes de nitrogênio g/l**

Glicose	1,0g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05g
$\text{NaCl}$	0,05g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,1g
Agar	1,2g

\* Fonte de Nitrogênio de nitrogênio a ser testada adiciona-se 0,1g

\* Controle negativo não tem nitrogênio.

\* Controle positivo tem 0,1g de l-asparagina ou prolina.

#### **I.1.6- Caldo Nitrato (Difco) g/l**

Extrato de carne 3,0g

Peptona 5,0g

Nitrato de Potássio 1,0g

#### **I.1.7- Meio para degradação da Caseína g/200ml**

**Solução A:** Leite em pó desnatado 10,0g

Água 90,0ml

**Solução B:** Agar 3,0g

Água 97,0ml

Após autoclavar mistura-se as duas soluções

#### **I.1.8- Meio para degradação do Amido g/l**

Amido 1,0g

Peptona 0,5g

Extrato de carne 0,3g

Nacl 0,5g

Agar	2,0g
------	------

#### **I.1.9 Meio para degradação da Xantina g/l**

<b>Meio Basal:</b> Extrato de Carne	3,0g
-------------------------------------	------

Peptona	5,0g
---------	------

Agar	15,0g
------	-------

<b>Suspensão:</b> Xantina	0,5g
---------------------------	------

Água	100,0ml
------	---------

\* Misturar o meio basal e a solução depois de autoclavar.

#### **I.1.10- Meio para degradação da Tirosina g/l**

<b>Meio Basal:</b> Extrato de Carne	3,0g
-------------------------------------	------

Peptona	5,0g
---------	------

Agar	15,0g
------	-------

<b>Suspensão:</b> Tirosina	0,4g
----------------------------	------

Água	100,0ml
------	---------

Misturar o meio basal e a solução depois de autoclavar

#### **I.1.11- Caldo NaCl 7, 10 e 13%**

Caldo BHI (Biobrás) mais NaCl nas concentrações de 7, 10 e 13%.



**I.1.12- Ágar Amido Sais Minerais g/l**

Amido	10,0g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0g
CaCO <sub>3</sub>	2,0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0g
NaCl	1,0g
Ágar	20,0g

**I.1.13- Ágar glicerol asparagina**

Glicerol	10,0g
L-asparagina	1,0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0g
Agar	20,0g

**I.1.14- Ágar Esculina g/100ml**

Extrato de levedura	5,0g
Ágar nutriente	1,5g
Esculina	0,1g
Citrato férrico amoniacal	0,05g

**I.1.15- Ágar Tirosina**

Glicerol	15,0g
L-tirosina	0,5g
L-asparagina	1,0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5g
NaCl	0,5g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01g
Água	1000,0ml
Solução traço	1,0ml
<b>Solução traço:</b> FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,1g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1g
Água	100,0ml

**I.1.16- Caldo Infuso de cérebro e Coração – BHI (Biobrás) g/l**

Cloreto de sódio	5,0g
Dextrose	2,0g
Fosfato Bibásico de Sódio	2,5g
Infuso de Cérebro e Coração	17,5g

Peptona de Carne	5,0g
Peptona de Caseína	5,0g

## **2. Soluções utilizadas na etapa de biologia molecular**

### **I.2.1- Tampão SET (75mM NaCl, 25mM EDTA, 20mM Tris, pH 7.5)**

NaCl 1M	7,5ml
EDTA 0,5M	5,0ml
Tris	2,0ml
Água	85,5ml

### **I.2.2 -Lisozima [10mg/ml]**

Lisozima	0,01g
Água	1,0ml

### **I.2.3- SDS 10%**

SDS	10,0g
Água	100,0ml

### **I.2.4- Proteinase K [20mg/ml]**

Proteinase K	0,02g
Água	1,0ml

**I.2.5- Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1)**

Fenol	48,0ml
Clorofórmio	48,0ml
Álcool isoamílico	2,0ml

**I.2.6-Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1)**

Clorofórmio	96,0ml
Álcool isoamílico	4,0ml

**I.2.7-TE (10mM Tris, 1mM EDTA pH8.0)**

Tris	1,0ml
EDTA	0,2ml
Água	98,8ml

**I.2.8-TE (10mM Tris, 25mM EDTA, pH8.0)**

Tris	1,0ml
EDTA	5,0ml
Água	94,0ml

**I.2.9-Gel de agarose 0,8%**

Agarose	0,8g
TAE	100,0ml

**I.2.10. Brometo de etídeo**

Brometo de etídeo	0,50mg
Álcool etílico	1000,0ml

**1.2.11.Desoxinucleotídeos:**

dATP	5,0µl
dTTP	5,0µl
dCTP	5,0µl
dGTP	5,0µl
Água MiliQ	180,0µl

**1.2.12.TAE 1X**

TAE 50X	20,0ml
Água	980,0ml

**1.2.13. TBE**

TBE 5X	100,0ml
Água	900,0ml

**1.2.14. Azul de Bromofenol**

Azul de bromofenol	0,0025g
Glicerol	0,3ml
Água para completar	1ml

**Soluções estoque****Tris 1M**

Tris	12,1g
Água	100,0ml

**EDTA 0,5M**

EDTA	18,6g
Água	100,0ml

**TAE 50X**

Tris	240,0g
Ácido acético glacial	57,1ml

EDTA 0,5M	100,0ml
-----------	---------

Água para completar	1000,0ml
---------------------	----------

**TBE 5X**

Tris	54,0g
------	-------

Ácido bórico	27,5g
--------------	-------

EDTA 0,5M	20,0ml
-----------	--------

Água para completar	1000,0ml
---------------------	----------

## Tabelas

**Tabela 7:** Matriz de similaridade obtida através da análise dos fragmentos resultantes da clivagem com a endonuclease de restrição *Hinfl*. Número (1) *Strept. verticillum*; (2) *S. griseoviridis*; (3) *S. griseoviridis*; (4) *S. antibioticus*; (5) *N. otitidiscaviarium*; (6) *S. griseoviridis*; (7) *S. cyaneus*; (8) *N. brasiliensis*; (9) *N. otitidiscaviarium*; (10) *S. cyaneus*; (11) *S. grupo C*; (12) *S. grupo C*; (13) *S. griseoviridis*; (14) *S. griseoviridis*; (15) *N. vaccinii*; (16) *N. nova*; (17) *S. cyaneus*; (18) *N. amarae*; (19) *N. autotrophica*; (20) *S. fulvissimus*; (21) *N. brasiliensis*; (22) *N. asteróides*; (23) *S. griseoviridis*; (24) *M. echinospora*; (25) *T. chromogena*; (26) *S. griseoviridis*; (27) *S. griseoviridis*; (28) *N. amarae*; (29) *S. cyaneus*; (30) *N. autotrophica*; (31) *S. grupo C*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1,000														
2	1,000	1,000													
3	1,000	1,000	1,000												
4	1,000	1,000	1,000	1,000											
5	0,333	0,333	0,333	0,333	1,000										
6	1,000	1,000	1,000	1,000	0,333	1,000									
7	0,667	0,667	0,667	0,667	0,667	0,667	1,000								
8	0,667	0,667	0,667	0,667	0,667	0,667	1,000	1,000							
9	0,667	0,667	0,667	0,667	0,667	0,667	0,333	0,333	1,000						
10	0,400	0,400	0,400	0,400	0,000	0,400	0,000	0,000	0,400	1,000					
11	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	1,000				
12	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	1,000			
13	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,000	1,000		
14	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,000	1,000	1,000	
15	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,000	1,000	1,000	1,000
16	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,000	1,000	1,000	1,000
17	0,000	0,000	0,000	0,000	0,333	0,000	0,000	0,000	0,333	0,400	0,400	0,000	0,400	0,400	0,400
18	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,500
19	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,500
20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,500
21	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,500
22	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,500
23	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,500
24	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,500
25	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,500
26	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000
27	0,000	0,000	0,000	0,000	0,400	0,000	0,000	0,000	0,400	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000
28	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,500
29	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,500
30	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,500
31	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,500



## Continuação da tabela 7:

	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
11																
12																
13																
14																
15																
16	1,000															
17	0,400	1,000														
18	0,500	0,000	1,000													
19	0,500	0,000	1,000	1,000												
20	0,500	0,000	1,000	1,000	1,000											
21	0,500	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000										
22	0,500	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000									
23	0,500	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000								
24	0,500	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000							
25	0,500	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000						
26	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000					
27	0,000	0,400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	1,000				
28	0,500	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000			
29	0,500	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000		
30	0,500	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	
31	0,500	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000

**Tabela 8:** Matriz de similaridade obtida através da análise dos fragmentos resultantes da clivagem com a endonuclease de restrição *MspI*. Número (1) *Strept. verticillum*; (2) *S. griseoviridis*; (3) *S. griseoviridis*; (4) *S. antibioticus*; (5) *S. griseoviridis*; (6) *N. otitidiscaviarium*; (7) *S. cyaneus*; (8) *N. brasiliensis*; (9) *N. otitidiscaviarium*; (10) *S. cyaneus*; (11) *S. grupo C*; (12) *S. grupo C*; (13) *S. griseoviridis*; (14) *S. griseoviridis*; (15) *N. vaccinii*; (16) *N. nova*; (17) *S. cyaneus*; (18) *N. amarae*; (19) *S. cyaneus*; (20) *N. autotrophica*; (21) *S. fulvissimus*; (22) *N. brasiliensis*; (23) *S. griseoviridis*; (24) *M. echinospora*; (25) *T. chromogena*; (26) *S. griseoviridis*; (27) *S. griseoviridis*; (28) *N. amarae*; (29) *S. cyaneus*; (30) *N. autotrophica*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1,000														
2	0,000	1,000													
3	0,000	1,000	1,000												
4	0,000	1,000	1,000	1,000											
5	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000										
6	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000									
7	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000								
8	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000							
9	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000						
10	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000					
11	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000				
12	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000			
13	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000		
14	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	
15	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000
16	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,00	0,000	0,000	0,000	0,000
17	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000
18	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
19	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
21	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
22	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000
23	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000
24	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000
25	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000
26	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000
27	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
28	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
29	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
30	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000

## Continuação da tabela 8:

	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
11																
12																
13																
14																
15																
16	1,000															
17	0,000	1,000														
18	0,000	0,000	1,000													
19	0,000	0,000	1,000	1,000												
20	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000											
21	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000										
22	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000									
23	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000								
24	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000							
25	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000						
26	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
27	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000				
28	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000			
29	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000		
30	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	
31	0,500	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000

**Tabela 9:** Matriz de similaridade obtida através da análise dos fragmentos resultantes da clivagem com a endonuclease de restrição *Msp* e *Hinfl*. Número (1) *Strept. verticillum*; (2) *S. griseoviridis*; (3) *S. griseoviridis*; (4) *S. antibioticus*; (5) *S. griseoviridis*; (6) *N. otitidiscaviarium*; (7) *S. cyaneus*; (8) *N. brasiliensis*; (9) *N. otitidiscaviarium*; (10) *S. cyaneus*; (11) *S. grupo C*; (12) *S. grupo C*; (13) *S. griseoviridis*; (14) *S. griseoviridis*; (15) *N. vaccinii*; (16) *N. nova*; (17) *S. cyaneus*; (18) *N. amarae*; (19) *S. cyaneus*; (20) *N. autotrophica*; (21) *S. fulvissimus*; (22) *N. brasiliensis*; (23) *S. griseoviridis*; (24) *M. echinospora*; (25) *T. chromogena*; (26) *S. griseoviridis*; (27) *S. griseoviridis*; (28) *N. amarae*; (29) *S. cyaneus*; (30) *N. autotrophica*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1,000														
2	0,500	1,000													
3	0,500	1,000	1,000												
4	0,500	1,000	1,000	1,000											
5	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000										
6	0,750	0,333	0,333	0,333	0,333	1,000									
7	0,750	0,667	0,667	0,667	0,667	0,667	1,000								
8	1,000	0,500	0,500	0,500	0,500	0,750	0,750	1,000							
9	0,500	0,667	0,667	0,667	0,667	0,667	0,333	0,500	1,000						
10	0,000	0,400	0,400	0,400	0,400	0,000	0,000	0,000	0,400	1,000					
11	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,333	0,000	0,500	0,333	0,400	1,000				
12	0,286	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,286	0,000	0,000	0,400	1,000			
13	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,400	0,000	1,000		
14	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,400	0,000	1,000	1,000	
15	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,400	0,000	1,000	1,000	1,000
16	0,444	0,000	0,000	0,000	0,000	0,286	0,000	0,444	0,286	0,333	0,857	0,333	0,667	0,667	0,667
17	0,250	0,000	0,000	0,000	0,000	0,333	0,000	0,250	0,333	0,400	0,667	0,000	0,400	0,400	0,400
18	0,364	0,444	0,444	0,444	0,444	0,222	0,444	0,364	0,222	0,000	0,000	0,000	0,250	0,250	0,250
19	0,364	0,444	0,444	0,444	0,444	0,222	0,444	0,364	0,222	0,000	0,000	0,000	0,250	0,250	0,250
20	0,364	0,444	0,444	0,444	0,444	0,222	0,444	0,364	0,222	0,000	0,000	0,000	0,250	0,250	0,250
21	0,364	0,444	0,444	0,444	0,444	0,222	0,444	0,364	0,222	0,000	0,000	0,000	0,250	0,250	0,250
22	0,250	0,333	0,333	0,333	0,333	0,000	0,333	0,250	0,000	0,000	0,000	0,000	0,400	0,400	0,400
23	0,200	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,200	0,250	0,000	0,000	0,000	0,286	0,286	0,286
24	0,364	0,444	0,444	0,444	0,444	0,222	0,444	0,364	0,222	0,000	0,000	0,000	0,250	0,250	0,250
25	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,500
26	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000
27	0,286	0,000	0,000	0,000	0,000	0,400	0,000	0,286	0,400	0,000	0,400	0,500	0,000	0,000	0,000
28	0,364	0,444	0,444	0,444	0,444	0,222	0,444	0,364	0,222	0,000	0,000	0,000	0,250	0,250	0,250
29	0,364	0,444	0,444	0,444	0,444	0,222	0,444	0,364	0,222	0,000	0,000	0,000	0,250	0,250	0,250
30	0,364	0,444	0,444	0,444	0,444	0,222	0,444	0,364	0,222	0,000	0,000	0,000	0,250	0,250	0,250

## Continuação da tabela 9:

	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
11																
12																
13																
14																
15																
16	1,000															
17	0,571	1,000														
18	0,200	0,222	1,000													
19	0,200	0,222	1,000	1,000												
20	0,200	0,222	1,000	1,000	1,000											
21	0,200	0,222	1,000	1,000	1,000	1,000										
22	0,286	0,000	0,667	0,667	0,667	0,667	1,000									
23	0,222	0,250	0,909	0,909	0,909	0,909	0,500	1,000								
24	0,200	0,222	0,000	1,000	1,000	1,000	0,667	0,909	1,000							
25	0,333	0,000	0,500	0,500	0,500	0,500	0,800	0,571	0,500	1,000						
26	0,000	0,000	0,250	0,250	0,250	0,250	0,000	0,286	0,250	0,000	1,000					
27	0,333	0,400	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	1,000				
28	0,200	0,222	1,000	1,000	1,000	1,000	0,667	0,909	1,000	0,500	0,250	1,000	1,000			
29	0,200	0,222	1,000	1,000	1,000	1,000	0,667	0,909	1,000	0,500	0,250	1,000	1,000	1,000		
30	0,200	0,222	1,000	1,000	1,000	1,000	0,667	0,909	1,000	0,500	0,250	1,000	1,000	1,000	1,000	
31	0,333	0,000	0,500	0,500	0,500	0,500	0,800	0,571	0,500	1,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,500	1,000

**Tabela 10:** Matriz de similaridade obtida através da análise do perfil bioquímico dos 31 isolados. Número (1) *Strept. verticillum*; (2) *S. griseoviridis*; (3) *S. griseoviridis*; (4) *S. antibioticus*; (5) *N. otitiscaviarium*; (6) *S. griseoviridis*; (7) *S. cyaneus*; (8) *N. brasiliensis*; (9) *N. otitiscaviarium*; (10) *S. cyaneus*; (11) *S. grupo C*; (12) *S. grupo C*; (13) *S. griseoviridis*; (14) *S. griseoviridis*; (15) *N. vaccinii*; (16) *N. nova*; (17) *S. cyaneus*; (18) *N. amarae*; (19) *N. autotrophica*; (20) *S. fulvissimus*; (21) *N. brasiliensis*; (22) *N. asteróides*; (23) *S. griseoviridis*; (24) *M. echinospora*; (25) *T. chromogena*; (26) *S. griseoviridis*; (27) *S. griseoviridis*; (28) *N. amarae*; (29) *S. cyaneus*; (30) *N. autotrophica*; (31) *S. grupo C*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1,000														
2	0,750	1,000													
3	0,810	0,650	1,000												
4	0,783	0,727	0,783	1,000											
5	0,773	0,705	0,773	0,333	1,000										
6	0,818	0,810	0,773	0,792	0,913	1,000									
7	0,837	0,878	0,744	0,766	0,889	0,889	1,000								
8	0,844	0,837	0,800	0,816	0,936	0,936	0,957	1,000							
9	0,791	0,829	0,744	0,809	0,933	0,978	0,864	0,913	1,000						
10	0,837	0,829	0,744	0,809	0,889	0,933	0,909	0,913	0,955	1,000					
11	0,750	0,842	0,700	0,727	0,857	0,762	0,780	0,837	0,780	0,780	1,000				
12	0,619	0,700	0,667	0,783	0,773	0,727	0,698	0,756	0,744	0,744	0,750	1,000			
13	0,844	0,884	0,800	0,816	0,936	0,936	0,913	0,917	0,913	0,913	0,791	0,756	1,000		
14	0,683	0,769	0,780	0,800	0,837	0,791	0,714	0,773	0,810	0,762	0,769	0,829	0,818	1,000	
15	0,818	0,810	0,818	0,792	0,913	0,957	0,889	0,936	0,933	0,889	0,762	0,773	0,936	0,837	1,000
16	0,791	0,732	0,791	0,766	0,844	0,933	0,864	0,913	0,909	0,909	0,780	0,791	0,870	0,810	0,933
17	0,870	0,773	0,286	0,840	0,875	0,917	0,894	0,939	0,894	0,894	0,773	0,783	0,898	0,800	0,917
18	0,818	0,810	0,818	0,792	0,913	0,957	0,889	0,936	0,933	0,889	0,762	0,773	0,936	0,837	1,000
19	0,744	0,732	0,744	0,894	0,756	0,756	0,818	0,783	0,727	0,773	0,634	0,698	0,826	0,714	0,756
20	0,756	0,698	0,800	0,857	0,766	0,766	0,783	0,792	0,739	0,739	0,651	0,711	0,792	0,773	0,766
21	0,563	0,457	0,500	0,500	0,588	0,588	0,545	0,629	0,545	0,485	0,533	0,438	0,571	0,516	0,588
22	0,800	0,837	0,800	0,816	0,936	0,979	0,870	0,917	0,957	0,913	0,791	0,756	0,958	0,818	0,936
23	0,844	0,791	0,800	0,857	0,851	0,851	0,826	0,875	0,826	0,826	0,791	0,756	0,875	0,773	0,851
24	0,750	0,789	0,750	0,727	0,857	0,810	0,780	0,837	0,780	0,732	0,789	0,650	0,837	0,667	0,810
25	0,744	0,780	0,698	0,766	0,800	0,800	0,773	0,783	0,773	0,727	0,683	0,744	0,826	0,714	0,800
26	0,864	0,810	0,727	0,833	0,826	0,826	0,844	0,851	0,844	0,889	0,810	0,727	0,851	0,791	0,826
27	0,826	0,864	0,826	0,840	0,958	0,917	0,936	0,980	0,894	0,894	0,864	0,783	0,939	0,800	0,916
28	0,818	0,810	0,818	0,792	0,913	0,957	0,889	0,936	0,933	0,889	0,762	0,773	0,936	0,837	1,000
29	0,857	0,800	0,762	0,739	0,864	0,909	0,884	0,889	0,884	0,884	0,750	0,714	0,933	0,780	0,855
30	0,800	0,837	0,844	0,816	0,936	0,936	0,870	0,917	0,913	0,870	0,791	0,800	0,958	0,864	0,979
31	0,800	0,895	0,650	0,727	0,810	0,762	0,878	0,837	0,780	0,829	0,789	0,700	0,791	0,718	0,762

## Continuação da tabela 10:

	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
11																
12																
13																
14																
15																
16	1,000															
17	0,894	1,000														
18	0,933	0,917	1,000													
19	0,727	0,766	0,756	1,000												
20	0,739	0,816	0,766	0,870	1,000											
21	0,545	0,556	0,588	0,485	0,571	1,000										
22	0,913	0,898	0,936	0,783	0,792	0,571	1,000									
23	0,826	0,939	0,851	0,783	0,792	0,571	0,875	1,000								
24	0,732	0,818	0,810	0,683	0,698	0,533	0,837	0,837	1,000							
25	0,727	0,766	0,800	0,773	0,870	0,606	0,826	0,783	0,780	1,000						
26	0,844	0,875	0,826	0,756	0,766	0,529	0,809	0,851	0,714	0,711	1,000					
27	0,894	0,920	0,917	0,908	0,816	0,611	0,939	0,898	0,864	0,809	0,833	1,000				
28	0,933	0,917	1,000	0,756	0,766	0,588	0,936	0,851	0,810	0,800	0,826	0,917	1,000			
29	0,984	0,870	0,955	0,744	0,711	0,563	0,889	0,800	0,750	0,744	0,818	0,870	0,955	1,000		
30	0,913	0,898	0,979	0,783	0,792	0,571	0,958	0,875	0,837	0,826	0,809	0,939	0,979	0,933	1,000	
31	0,732	0,864	0,762	0,683	0,698	0,400	0,744	0,837	0,737	0,683	0,857	0,818	0,762	0,750	0,744	1,000

**Figura 20:** Dendrograma obtido através da análise dos fragmentos resultantes da clivagem com a endonuclease de restrição *Hinfl*. Número (1) *Strept. verticillum*; (2) *S. griseoviridis*; (3) *S. griseoviridis*; (4) *S. antibioticus*; (5) *N. otitiscaviarium*; (6) *S. griseoviridis*; (7) *S. cyaneus*; (8) *N. brasiliensis*; (9) *N. otitiscaviarium*; (10) *S. cyaneus*; (11) *S. grupo C*; (12) *S. grupo C*; (13) *S. griseoviridis*; (14) *S. griseoviridis*; (15) *N. vaccinii*; (16) *N. nova*; (17) *S. cyaneus*; (18) *N. amarae*; (19) *N. autotrophica*; (20) *S. fulvissimus*; (21) *N. brasiliensis*; (22) *N. asteroides*; (23) *S. griseoviridis*; (24) *M. echinospora*; (25) *T. chromogena*; (26) *S. griseoviridis*; (27) *S. griseoviridis*; (28) *N. amarae*; (29) *S. cyaneus*; (30) *N. autotrophica*; (31) *S. grupo C*.



**Figura 22:** Dendrograma obtido através da análise dos fragmentos resultantes da clivagem com a endonuclease de restrição *MspI*. Número (1) *Strept. verticillum*; (2) *S. griseoviridis*; (3) *S. griseoviridis*; (4) *S. antibioticus*; (5) *S. griseoviridis*; (6) *N. otitidiscaviarium*; (7) *S. cyaneus*; (8) *N. brasiliensis*; (9) *N. otitidiscaviarium*; (10) *S. cyaneus*; (11) *S. grupo C*; (12) *S. grupo C*; (13) *S. griseoviridis*; (14) *S. griseoviridis*; (15) *N. vaccinii*; (16) *N. nova*; (17) *S. cyaneus*; (18) *N. amarae*; (19) *S. cyaneus*; (20) *N. autotrophica*; (21) *S. fulvissimus*; (22) *N. brasiliensis*; (23) *S. griseoviridis*; (24) *M. echinospora*; (25) *T. chromogena*; (26) *S. griseoviridis*; (27) *S. griseoviridis*; (28) *N. amarae*; (29) *S. cyaneus*; (30) *N. autotrophica*.

**Figura 23:** Dendrograma obtido através da análise dos fragmentos resultantes da clivagem com as endonucleases de restrição *MspI* e *Hinfl*. Número (1) *Strept. verticillum*; (2) *S. griseoviridis*; (3) *S. griseoviridis*; (4) *S. antibioticus*; (5) *S. griseoviridis*; (6) *N. otitidiscaviarium*; (7) *S. cyaneus*; (8) *N. brasiliensis*; (9) *N. otitidiscaviarium*; (10) *S. cyaneus*; (11) *S. grupo C*; (12) *S. grupo C*; (13) *S. griseoviridis*; (14) *S. griseoviridis*; (15) *N. vaccinii*; (16) *N. nova*; (17) *S. cyaneus*; (18) *N. amarae*; (19) *S. cyaneus*; (20) *N. autotrophica*; (21) *S. fulvissimus*; (22) *N. brasiliensis*; (23) *S. griseoviridis*; (24) *M. echinospora*; (25) *T. chromogena*; (26) *S. griseoviridis*; (27) *S. griseoviridis*; (28) *N. amarae*; (29) *S. cyaneus*; (30) *N. autotrophica*; (31) *S. grupo C*.

**Figura 24:** Dendrograma obtido através da análise do perfil bioquímico dos 31 isolados. Número (1) *Strept. verticillum*; (2) *S. griseoviridis*; (3) *S. griseoviridis*; (4) *S. antibioticus*; (5) *S. griseoviridis*; (6) *N. otitidiscaviarium*; (7) *S. cyaneus*; (8) *N. brasiliensis*; (9) *N. otitidiscaviarium*; (10) *S. cyaneus*; (11) *S. grupo C*; (12) *S. grupo C*; (13) *S. griseoviridis*; (14) *S. griseoviridis*; (15) *N. vaccinii*; (16) *N. nova*; (17) *S. cyaneus*; (18) *N. amarae*; (19) *S. cyaneus*; (20) *N. autotrophica*; (21) *S. fulvissimus*; (22) *N. brasiliensis*; (23) *S. griseoviridis*; (24) *M. echinospora*; (25) *T. chromogena*; (26) *S. griseoviridis*; (27) *S. griseoviridis*; (28) *N. amarae*; (29) *S. cyaneus*; (30) *N. autotrophica*; (31) *S. grupo C*.

