



MONIQUE SUELA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS EM
SOLOS DE CERRADO MINEIRO DURANTE
ESTAÇÃO DE BAIXA PLUVIOSIDADE**

LAVRAS - MG

2012

MONIQUE SUELA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS EM SOLOS DE CERRADO
MINEIRO DURANTE ESTAÇÃO DE BAIXA PLUVIOSIDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Disney Ribeiro Dias

Coorientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Silva, Monique Suela.

Identificação de actinobactérias em solos de cerrado mineiro durante estação de baixa pluviosidade / Monique Suela Silva. – Lavras : UFLA, 2012.

100 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Disney Ribeiro Dias.

Bibliografia.

1. Bacteriologia do solo. 2. Espécies. 3. Diversidade bacteriana. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.92

MONIQUE SUELA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS EM SOLOS DE CERRADO
MINEIRO DURANTE ESTAÇÃO DE BAIXA PLUVIOSIDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2012.

Dr. Whasley Ferreira Duarte

UFLA

PhD. Patrícia de Fátima Pereira Goulart

UNILAVRAS

Orientador

Dr. Disney Ribeiro Dias

LAVRAS - MG

2012

Aos meus pais, por todo amor e carinho,
A minha irmã, Magali, pelo apoio e incentivo,
Ao meu noivo, Daniel, pelo amor e companheirismo,
E aos amigos, pela força e alegria.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelos ensinamentos e momentos de reflexão, sem o qual nada seria possível.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

Ao professor Disney Ribeiro Dias, pela confiança, apoio e ensinamentos.

À professora Rosane Freitas Schwan, pela coorientação, ensinamentos e apoio.

Aos membros da banca examinadora, professora Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart e ao professor Dr. Whasley Ferreira Duarte, pelas contribuições no término deste trabalho.

Aos meus pais, Lázaro e Marcília, por acreditarem e confiarem em mim; a minha irmã, Magali e ao meu noivo, Daniel, pelo amor e incentivo.

Aos amigos e colegas de trabalho, pelo convívio, pelos momentos de descontração e, principalmente, pelo apoio e ajuda.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho, muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Distribuição da vegetação de cerrado no Brasil (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997) 15
- Figura 2 Árvore filogenética de Actinobacteria baseado na sequência de 1.500 nucleotídeos do gene 16s rRNA. Algumas famílias contendo membros sujeitos ao sequenciamento completo do genoma são destacadas em negrito (VENTURA et al., 2007) 311
- Figura 3 Esquema do ponto de amostragem: amostra de solo composta por 12 subamostras 522
- Figura 4 Comparação entre quantidade e diversidade morfológica bacteriana entre os dois meios. À esquerda (A), o meio Aaronson's e à direita (B), o meio vitamina-ácido húmico. Ambos apresentam crescimento de colônias filamentosas, entretanto, há predominância no meio vitamina-ácido húmico, o qual também demonstra menor densidade populacional 611
- Figura 5 Dendrogramas dos isolados obtidos pelo plaqueamento em meio Aaronson's (A) e vitamina-ácido húmico (B) de solos da região de Arcos, durante a estação seca 622
- Figura 6 Dendrogramas dos isolados obtidos pelo plaqueamento em meio Aaronson's (A) e vitamina-ácido húmico (B) de solos da região de Luminárias, durante a estação seca 633
- Figura 7 Dendrogramas dos isolados obtidos pelo plaqueamento em meio Aaronson's (A) e vitamina-ácido húmico (B) de solos da região de Passos, durante a estação seca 644
- Figura 8 Análise de similaridade entre os perfis de banda (REP-PCR) dos isolados cultiváveis de solos do cerrado das três regiões: Arcos, Passos e Luminárias, MG e a identificação das espécies encontradas pertencentes ao filo Actinobacteria. 2- *Microbacterium* sp.; 4, 6- *Arthrobacter* sp.4N2-2; 9- *Microbacterium azadirachtae*, *Microbacterium phyllosphaerae*; 10, 11, 12, 152, 153- *Arthrobacter alkaliphilus*; 15- *Streptomyces castaneoglobisporus*; 16 - *Arthrobacter* sp. S2.TSA.004; 17 - *Leifsonia shinshuensis*; 25- *Streptomyces gilvosporeus*, *Streptomyces natalensis*, *Streptomyces albulus*; 31- *Arthrobacter* sp. ACT2K; 33, 60, 61- *Arthrobacter ramosus*; 38- *Arthrobacter* sp. S2.TSA.004; 49, 51- *Streptomyces* sp. HB200; 52, 54- *bacterium* Ellin5075; 57, 62- *Amycolatopsis rubida*; 128, 129, 131- *Microbacterium phyllosphaerae*; 130- *Streptomyces* sp. BK14; 133- *Arthrobacter nitroguajacolicus*, *Arthrobacter*

	<i>boritolerans</i> , <i>Arthrobacter ilicis</i> ; 164 - <i>Arthrobacter</i> sp. S2.TSA.004; 165- <i>Streptomyces chromofuscus</i> 655
Figura 9	Gêneros de Actinobacteria encontrados em amostras de solos de Arcos – meio Aaronson’s e meio vitamina-ácido húmico 69
Figura 10	Gêneros de Actinobacteria encontrados em amostras de solos de Luminárias – meio Aaronson’s e meio vitamina-ácido húmico..... 69
Figura 11	Gêneros de Actinobacteria encontrados em amostras de solos de Passos – meio Aaronson’s e meio vitamina-ácido húmico 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição de alguns gêneros de cada família de Actinobacteria encontrados no solo.....	21
Tabela 2	Dados da produção de antibióticos por microrganismos, publicados no Jornal do Antibiótico nos anos de 1984 a 1993	29
Tabela 4	Classificação de Actinobacteria quanto à composição da parede celular e à presença de açúcares.....	344
Tabela 5	Localização geográfica dos pontos de amostragem no Cerrado mineiro	522
Tabela 6	Densidade bacteriana em solos de cerrado de Minas Gerais, Brasil, durante a estação de baixa pluviosidade	58
Tabela 7	Caracterização físico-química das amostras de solo durante a estação seca.....	59

RESUMO

Os solos abrigam grande diversidade de espécies microbianas fundamentais para a saúde dos mesmos, uma vez que a população bacteriana presente pode alterar a composição química e física do solo. Ela contribui para a sustentabilidade das cidades, da agricultura e participa da maioria dos ciclos biogeoquímicos do planeta, além de ser fonte importante de novas drogas e outros metabólitos de interesse industrial. Actinobactérias colonizam principalmente os solos. É um grupo de bactérias gram-positivas, capazes de degradar macromoléculas presentes no solo, principalmente proteínas. Os solos do cerrado abrigam uma rica diversidade de populações de actinobactérias ainda não muito bem exploradas, constituindo uma excelente fonte para a busca de novas enzimas. Solos de cerrado de Minas Gerais, das regiões dos municípios de Arcos, Luminárias e Passos, foram analisados quanto às características físico-químicas e à diversidade microbiana na estação seca. As amostras de solos das três regiões mostraram-se ácidas, sendo que em Luminárias observou-se elevada concentração de alumínio (0,6-1,5 mol/dm³). A população bacteriana, durante a estação seca, nas cidades de Arcos, Luminárias e Passos, no meio Aaronson's foi, respectivamente, de 7,274; 7,124 e 7,33 log UFC/ml e, no meio vitamina-ácido húmico, foi de 6,568; 6,864 e 6,738 log UFC/ml, na mesma ordem. As espécies de Actinobacteria encontradas em cada região diferiram entre si e entre os meios de cultura utilizados, comprovando que meios de cultura diferentes resultam em maior diversidade de espécies. Três gêneros predominaram em todas as amostras de solos: *Arthrobacter*, *Streptomyces* e *Microbacterium*, que são microrganismos ubíquos e colonizam tipicamente os solos. Diversas espécies isoladas apresentaram dados da literatura que corroboram a sua utilização em diversos processos biotecnológicos e na biorremediação, principalmente sugerindo pesquisas futuras.

Palavras-chave: Actinobactéria. Diversidade bacteriana. Solos de cerrado.

ABSTRACT

Soils house a broad range of microbial species fundamental to the health of them, since the present bacterial population can alter the chemical and physical composition of the soil. It contributes towards the sustainability of cities and towns, of farming and takes part in most of the biogeochemical cycles in the planet, in spite of being an important source of new drugs and other metabolites of industrial interest. Actinobacteria colonize mainly the soils. It is a group of gram-positive bacteria capable of degrading macromolecules present in soil, mainly proteins. The cerrado soils house a rich diversity of populations of actinobacteria yet not very well explored, constituting an excellent source for the search of new enzymes. Minas Gerais cerrado soils of the regions of Arcos, Luminárias and Passos, were surveyed as to the physicochemical characteristics and to the microbial diversity in the dry season. The samples of soils of the three regions proved acidic, though, in Luminárias, a high concentration of aluminum ($0.6-1.5 \text{ mol/dm}^3$) was found. The bacterial population during the dry season in the towns of Arcos, Luminárias and Passos, in Aaronson's medium was, respectively, of 7.274; 7.124 and 7.33 log CFU/ml and in the vitamin-humic acidic medium, it was of 6.568; 6.864 and 6.738 log UFC/ml, in the same order. The species of Actinobacteria found in each region differ from one another and among the culture media utilized; proving that different culture media result into greater species diversity. Three genera predominated in all the soil samples: *Arthrobacter*, *Streptomyces* and *Microbacterium*, which are ubiquitous microorganisms and colonize typically the soils. A number of species isolated presented literature data which corroborate its use in several biotechnological processes and in bioremediation, chiefly suggesting further research.

Keywords: Actinobacteria, bacterial diversity, cerrado soils.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	12
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Cerrado brasileiro	15
2.2	Diversidade bacteriana dos solos	17
2.3	Actinobactérias	19
2.4	Isolamento de actinobactérias	255
2.5	Isolamento de actinobactérias do solo	266
2.6	Aplicação das biomoléculas produzidas por actinobactérias	28
2.7	Técnicas de identificação de actinobactérias	300
2.8	Métodos tradicionais	311
2.8.1	Identificação morfológica	322
2.8.2	Quimiosistemática	32
2.9	Identificação por assimilação de fontes de carbono	366
2.10	Identificação molecular	377
3	CONCLUSÃO	400
	REFERÊNCIAS	411
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO	477
	Identificação de actinobactérias cultiváveis em solos de cerrado mineiro durante estação de baixa pluviosidade	477

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A vegetação típica de savana brasileira é denominada de cerrado (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997). O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, depois da Amazônia, cuja rica biodiversidade encontra-se ameaçada de extinção, devido, principalmente, a ações antrópicas (KLINK; MACHADO, 2005).

Os solos, dentre todos os habitats terrestres, abrigam a maior diversidade de espécies microbianas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). As comunidades microbianas presentes no solo são fundamentais para a manutenção da saúde do mesmo, contribuem para a sustentabilidade das cidades e da agricultura e participam da maioria dos ciclos biogeoquímicos do planeta, além de serem fontes importantes de novas drogas e outros metabólitos de interesse industrial (CURTIS; SOLAN, 2005). As bactérias do solo fazem parte de diversas associações bióticas com plantas, invertebrados, protozoários e fungos, realizando funções de fixação de nitrogênio, nitrificação, desnitrificação, redução de sulfato e degradação de detritos vegetais (DOBROVOL'SKAYA et al., 2001).

Actinobactérias são habitantes principalmente de solos e compreendem mais de 30% da população total de microrganismos nesse ambiente (KENNEDY, 1999). Também estão presentes em ambientes aquáticos (marinhos e de água doce), podem ser patogênicos a plantas e animais, inclusive o homem, e simbioses fixadores de nitrogênio com plantas não leguminosas (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983).

O filo Actinobacteria compreende bactérias com elevada quantidade de guanina e citosina em seu DNA, cuja bioquímica, morfologia e relação com o

oxigênio são extremamente diversificadas (STACH et al., 2003). Os representantes desse grupo sintetizam enzimas extracelulares que degradam macromoléculas complexas encontradas nos solos, como proteínas, amido, quitina, húmus, celulose e lignocelulose, bem como a substância geosmina, a qual é responsável pela produção de odor semelhante ao de terra molhada, característico do grupo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Actinobacterias representam um grupo economicamente e biotecnologicamente importante (STACH et al., 2003). Estão envolvidos em processos de ciclagem da matéria orgânica, na biorremediação de xenobióticos, sintetizam vitaminas e enzimas de aplicação industrial, participam da conversão e produção de biocombustíveis (MIAO; DAVIES, 2010) e na produção de metabólitos secundários biologicamente ativos, principalmente os antibióticos, em especial os produzidos pelas espécies do gênero *Streptomyces* (VENTURA et al., 2007).

Os antibióticos merecem destaque, uma vez que 90% dos que são comercializados atualmente originam-se deste gênero e mais da metade das substâncias biologicamente ativas de origem microbiana é produzida por estes microrganismos (HAMAKI et al., 2005).

Os solos de cerrado, devido às suas características ambientais especiais e à riqueza de actinobactérias ainda não muito bem exploradas, constituem excelente fonte para a busca de novas enzimas e substâncias bioativas (AZEREDO et al., 2004). Portanto, o trabalho em questão justifica-se pela relevância de se realizar levantamento das espécies microbianas presentes em diferentes habitats, em destaque para Actinobacteria presente em solos de cerrado mineiro durante a estação de baixa pluviosidade (setembro a abril), a fim de que, futuramente, as espécies encontradas possam ser exploradas quanto à produção de metabólitos e enzimas bioativas de aplicação industrial, bem como

pelo conhecimento de meios de cultura adequados para analisar a diversidade de actinobactérias presentes nestes solos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cerrado brasileiro

A vegetação de savana brasileira é chamada de cerrado (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997) e constitui o segundo maior bioma do Brasil, depois da Amazônia (KLINK; MACHADO, 2005). O Cerrado cobre cerca de 2 milhões de km² do Brasil Central (Figura 1), representando de 21% (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997) a 24% (VERONEZ et al., 2010) da superfície do país. Em 2002, 55% da cobertura de cerrado foi devastada e transformada por ações antrópicas; somente 2,2% da área estão sob proteção legal (KLINK; MACHADO, 2005).

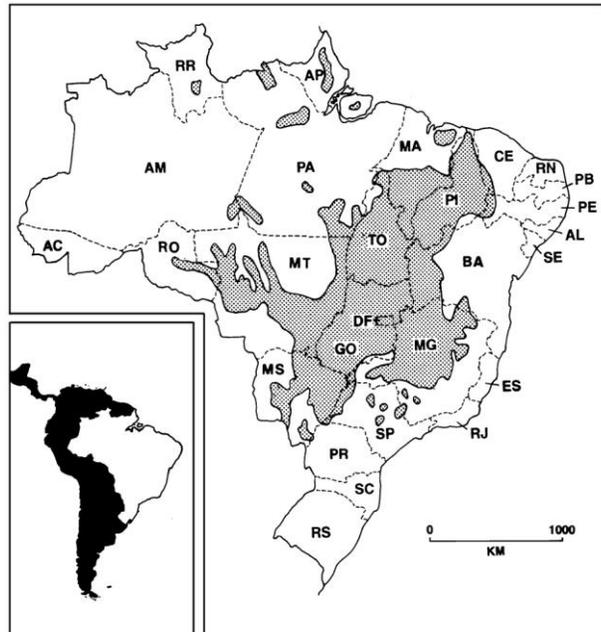


Figura 1 Distribuição da vegetação de cerrado no Brasil (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997)

As regiões de cerrado estendem desde a floresta amazônica, margeando o estado do Paraná, até o sudeste do estado de São Paulo (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997), e uma pequena área no leste da Bolívia e no noroeste do Paraguai (VERONEZ et al., 2010). O clima do Cerrado é sazonal, úmido entre os meses de outubro a março e seco de abril a setembro, com média anual de chuvas de 1.500 mm e temperaturas de 22 °C a 27 °C (KLINK; MACHADO, 2005). As árvores apresentam troncos tortuosos, de baixo porte (12-15 m), ramos retorcidos, cascas espessas e folhas grossas, cujas características se devem não à falta de água, pois existe uma grande e densa rede hídrica nesse bioma, mas devido a fatores do solo, como o desequilíbrio na quantidade de micronutrientes, como o alumínio (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, 2010). A maioria dos solos de cerrado apresenta pH baixo, disponibilidade de cálcio e magnésio reduzida e elevada quantidade de alumínio (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997).

O Cerrado brasileiro apresenta rica biodiversidade, com mais de 7.000 espécies de plantas vasculares, sendo 44% correspondentes a plantas endêmicas. Em relação à fauna de mamíferos, esta é bem pobre, apresentando 199 espécies. A fauna de aves, pelo contrário, é rica, formada por 830 espécies, aproximadamente, sendo o endemismo muito baixo (KLINK; MACHADO, 2005). O cerrado também compreende 150 espécies de anfíbios, das quais 45 são endêmicas e 120 espécies de répteis, com 45 espécies endêmicas (IBAMA, 2010). Os invertebrados são pobremente conhecidos, mas estima-se que alcancem 9.000 espécies. Sabe-se, contudo, que numerosas espécies de plantas e animais são ameaçadas de extinção. Estima-se que 20% das espécies endêmicas e ameaçadas não ocorram em áreas protegidas (KLINK; MACHADO, 2005).

O Cerrado brasileiro abriga, também, enorme diversidade de espécies microbianas de significância comercial, tais como as actinobactérias, muito

exploradas devido à sua aplicação biotecnológica (BARROS et al., 2003). Entretanto, a transformação deste ecossistema gera, além de elevado custo econômico e ambiental (uma vez que favorece a perda da biodiversidade, a erosão do solo, a poluição das águas, o desequilíbrio do ciclo de carbono e prováveis modificações climáticas, entre outros) (KLINK; MACHADO, 2005), consequências, também, na população microbiana, a qual representa importante e promissora fonte de recursos biotecnológicos.

2.2 Diversidade bacteriana dos solos

Os solos, dentre todos os habitats terrestres, abrigam a maior diversidade de espécies microbianas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). As comunidades microbianas presentes no solo são fundamentais para a saúde do mesmo, contribuem para a sustentabilidade das cidades, da agricultura e participam da maioria dos ciclos biogeoquímicos do planeta, além de serem fontes importantes de novas drogas e outros metabólitos de interesse industrial (CURTIS; SOLAN, 2005). As bactérias do solo fazem parte de diversas associações bióticas com plantas, invertebrados, protozoários e fungos, realizando funções de fixação de nitrogênio, nitrificação, desnitrificação, redução de sulfato e degradação de detritos vegetais (DOBROVOL'SKAYA et al., 2001).

Os microrganismos são os organismos dominantes tanto em biomassa quanto em diversidade e seu potencial genético e funcional excede o encontrado nos organismos superiores. Entretanto, as condições de cultivo comumente utilizadas favorecem o crescimento de um pequeno número de microrganismos, provavelmente uma fração ínfima dos microrganismos presentes no ambiente. Além do mais, o estresse ambiental e o manejo agrícola influenciam negativamente a diversidade bacteriana (TORSVIK; SORHEIM; GOKSOYR, 1996).

Os solos abrigam uma diversidade de populações bacterianas ainda pouco estudadas, devido ao fracasso no cultivo destes microrganismos em meios de cultura convencionais (DAVIS; JOSEPH; JANSSEN, 2005). O domínio Bacteria compreende 52 filos, tendo 12 sido descritos por Woese em 1987 e 40 acrescentados posteriormente, dos quais 14 correspondem a microrganismos cultiváveis e 26 a microrganismos não cultiváveis (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Apenas 1%, aproximadamente, das células bacterianas presentes em um grama de solo são capazes de formar colônias em meios laboratoriais (DAVIS; JOSEPH; JANSSEN, 2005). Por conseguinte, novas metodologias são requeridas para a identificação destes microrganismos (HAMAKI et al., 2005).

A diversidade microbiana dos solos pode ser analisada por meio da identificação fenotípica das colônias bacterianas em nível de gênero, identificação por técnicas moleculares ou por quimiosistemática (DOBROVOL'SKAYA et al., 2001). Embora o cultivo deste grupo de microrganismos seja difícil, alguns avanços têm sido obtidos na identificação de bactérias raramente isoladas do solo, por meio da utilização de novas formulações de meios de cultura, os quais têm permitido seu crescimento e identificação (DAVIS; JOSEPH; JANSSEN, 2005).

Segundo Janssen et al. (2002), a aplicação de novos meios de cultura, aliada à realização de técnicas de sonicação da amostra do solo, extensão do tempo de incubação (12 semanas, por exemplo), substituição de ágar por goma gelana e adição de cloreto de cálcio (CaCl_2), tem demonstrado bons resultados em processos de isolamento de bactérias consideradas não cultiváveis. A adição de ágar em meios de cultura sólidos pode provocar efeitos tóxicos em alguns grupos de microrganismos; a adição de cloreto de cálcio, além de fornecer cátions bivalentes que facilitam a formação do gel, tem sido demonstrada ser eficiente para o cultivo de bactérias do solo; a sonicação tem efeito comprovado em aumentar a desagregação das partículas e a contagem de células viáveis e a

extensão do tempo de incubação permite o crescimento daqueles microrganismos de desenvolvimento lento (JANSSEN et al., 2002).

Contudo, as novas técnicas baseadas em biologia molecular, tais como reassociação DNA-DNA e sequenciamento do rDNA ou rRNA 16S, utilizadas para identificação de microrganismo dos solos, apresentam algumas vantagens em relação às técnicas tradicionais. Uma das vantagens é a economia de tempo, uma vez que dispensam o cultivo dos microrganismos e o seu isolamento em cultura pura; além do mais, apresentam resultados confiáveis e superiores aos métodos de rotina, permitindo a detecção dos microrganismos não cultiváveis e revelando novas linhagens evolucionárias sobre a árvore filogenética de procariotos (DOBROVOL'SKAYA et al., 2001).

2.3 Actinobactérias

Em princípio, Actinobacteria, ou Actinomiceto, era classificado como fungo, uma vez que compartilha algumas características com este grupo, tais como formação de hifas e esporos de disseminação. Entretanto, a não constatação de um núcleo, além da observação de flagelo típico bacteriano e sensibilidade a fagos e a antibióticos antibacterianos, bem como a falta de esteróis na parede celular, dentre outras características, levaram os pesquisadores a crerem que, na verdade, tratava-se de microrganismos pertencentes ao domínio Bacteria (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1967).

Atualmente, Actinobacteria constitui um dos maiores filos dentro do domínio Bactéria e compreende bactérias gram-positivas com elevado conteúdo de G+C (guanina e citosina) no seu DNA (GAO; PARAMANATHAN; GUPTA, 2006; MIAO; DAVIES, 2010; VENTURA et al., 2007).

As actinobactérias podem ser aeróbias estritas, anaeróbias facultativas, microaerófilas ou anaeróbias estritas (SERVIN et al., 2008). Quanto ao tipo de

metabolismo, elas podem ser autotróficas, heterotróficas, quimiotróficas ou fototróficas (KENNEDY, 1999). Esse grupo apresenta ampla diversidade morfológica. Alguns microrganismos possuem forma de cocos (*Micrococcus*) e coco-bacilo (*Arthrobacter*) e outros em forma de hifas curtas e rudimentares (*Nocardia* spp.) e micélio ramificado (*Streptomyces* spp.) (VENTURA et al., 2007). Alguns gêneros são, ainda, formadores de esporos, podendo ser zoósporos móveis (*Streptosporangium*) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) ou propágulos especializados (endósporos - *Nocardia*) (GAO; GUPTA, 2005), ambos resistentes à dessecação (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983). A dispersão destes microrganismos na natureza ocorre, principalmente, por meio de esporos hidrofóbicos, adaptados à dispersão aérea. Contudo, as actinobactérias formadoras de esporângio e as micromonosporas, que não formam hifas aéreas, são hidrofílicas e dispersas pelo movimento da água através do solo (MCCARTHY; WILLIAMS, 1992). A reprodução de actinobactérias ocorre por fragmentação de hifas ou por esporos, podendo penetrar no substrato ou constituir hifas aéreas, cujo diâmetro varia de 0,5 a 2µm (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Seus representantes incluem patógenos de plantas e animais (inclusive humanos), como *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Tropheryma* spp., *Corynebacterium* spp. e *Propionibacterium* spp., habitantes do solo (*Streptomyces* spp.), comensais de plantas (*Leifsonia* spp.), simbiontes fixadores de nitrogênio (*Frankia* spp.), habitantes do trato gastrointestinal (*Bifidobacterium* spp.) e de ambientes aquáticos (*Rhodococcus*) (BULL et al., 2005). Nos solos, a população de actinobactérias é relevante, alcançando um milhão de células por grama de solo. Na Tabela 1 observam-se os principais gêneros de Actinobacteria encontrados no solo. O solo também abriga uma diversidade de estirpes produtoras de antibióticos, bem como de outros metabólitos usuais (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983).

Tabela 1 Descrição de alguns gêneros de cada família de Actinobacteria encontrados no solo

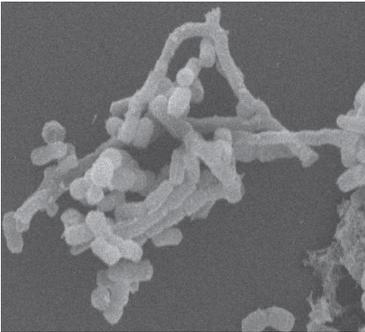
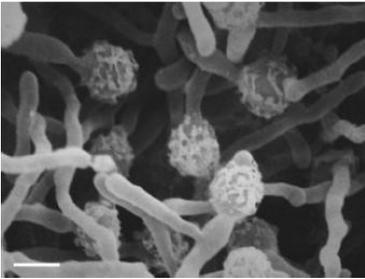
Família/gêneros	Descrição do gênero característico
Nocardiaceae:	
 <p data-bbox="435 888 716 982"><i>Nocardia asteroides</i> (micrografia eletrônica) (RIBEIRO et al., 2008)</p>	<p data-bbox="824 552 1263 982"><i>Nocardia</i>: Possui filamentos não estáveis que se fragmentam em elementos cocoides ou em bastões. Podem apresentar hifas aéreas ou hifas aéreas e no substrato. São aeróbios e mesofílicos. Decompositores de matéria orgânica e patógenos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Alguns representantes produzem importantes moléculas bioativas, tais como antibióticos e enzimas (VENTURA et al., 2007).</p>
Micromonosporaceae	
 <p data-bbox="370 1480 776 1604"><i>Micromonospora</i> sp. (micrografia eletrônica) (JONGRUNGUANGCHOK; TANASUPAWAT; KUDO, 2008)</p>	<p data-bbox="824 1230 1263 1461"><i>Micromonospora</i>: apresenta micélio ramificado e esporos formados em micélio no substrato. Crescimento ótimo entre 20 °C e 40 °C e não acima de 50 °C. Produz pigmentos solúveis de várias cores (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).</p>

Tabela 1, continuação

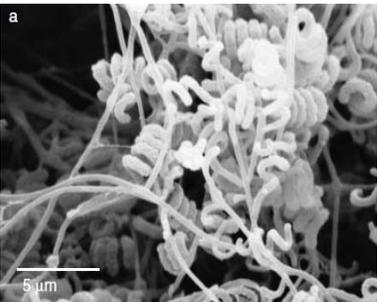
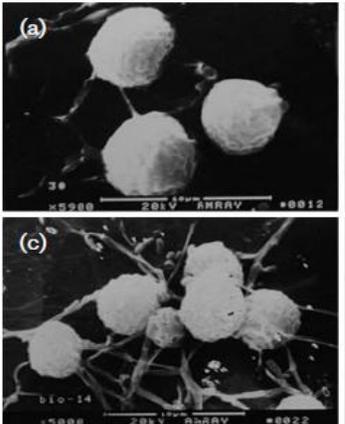
Família/gêneros	Descrição do gênero característico
Streptomycetaceae	
 <p data-bbox="402 840 747 974"><i>Streptomyces violaceusniger</i> (micrografia eletrônica) (HAYAKAWA; YOSHIDA; LIMURA, 2004)</p>	<p data-bbox="824 571 1263 903"><i>Streptomyces</i>: colônias extensivamente ramificadas, apresentando cadeias de três a vários esporos, geralmente aéreos. Crescimento ótimo em 25 °C a 35 °C. São grandes produtores de antibióticos e abundantes no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Importantes na reciclagem de matéria orgânica (VENTURA et al., 2007).</p>
Streptosporangiaceae	
	<p data-bbox="824 1176 1263 1537"><i>Streptosporangium</i>: micélio aéreo ramificado (não fragmentável), apresentando hifas aéreas que se diferenciam em cadeias curtas de artrósporos ou esporângios. Esporos móveis ou não. Contêm madurose (galactose metilada) em hidrolisados de hifa e produzem vários antibióticos e enzimas de valor comercial (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).</p>
<p data-bbox="354 1549 743 1642"><i>Streptosporangium</i> sp (Micrografia eletrônica) (ZHANG; JIANG; CHEN, 2005)</p>	

Tabela 1, continuação

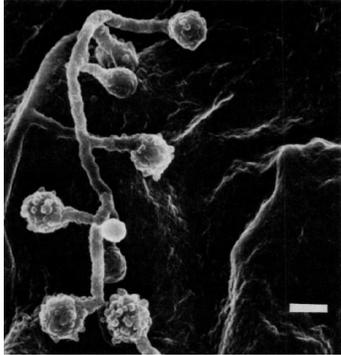
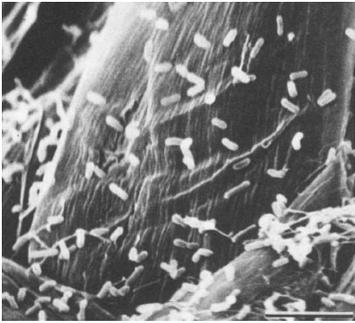
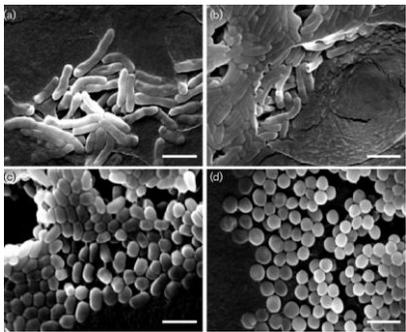
Família/gêneros	Descrição do gênero característico
<p data-bbox="435 436 717 466">Thermomonosporaceae:</p>  <p data-bbox="380 892 769 1024"><i>Thermomonospora formosensis</i>. (micrografia eletrônica) (HASEGAWA; TANIDA; ONO, 1986)</p>	<p data-bbox="824 506 1269 800"><i>Thermomonospora</i>: os filamentos não são fragmentáveis, sendo os esporos formados em grupos nas pontas de esporósporos ramificados. O crescimento ótimo entre 37 °C e 50 °C. Comum em esterco, compostos e feno apodrecidos. Excretam várias enzimas extracelulares termoestáveis (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).</p>
<p data-bbox="456 1094 691 1123">Cellulomonadaceae</p>  <p data-bbox="358 1518 789 1612"><i>Cellulomonas</i> sp. (micrografia eletrônica) (HALSSALL; GOODCHILD, 1986)</p>	<p data-bbox="824 1230 1269 1461"><i>Cellulomonas</i>: apresentam filamentos que podem ramificar-se e fragmentar-se em bastonetes irregulares. Maioria das espécies tem flagelos polares multitríqueos e capacidade de degradar celulose (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).</p>

Tabela 1, continuação

Família/gêneros	Descrição do gênero característico
<p data-bbox="477 470 669 499">Micrococcaceae</p> <div data-bbox="370 533 776 865">  </div> <p data-bbox="409 869 737 961">Arthrobacter sp. (micrografia eletrônica) (KAGEYAMA et al., 2008)</p>	<p data-bbox="824 533 1263 903"><i>Arthrobacter</i>: espécies que variam entre células cocoides a bastonetes, estando relacionadas com status nutricional do meio. São aeróbios obrigatórios e a temperatura ótima de incubação varia entre 25 °C e 30 °C. Extremamente numerosos no solo. Versáteis nutricionalmente; degradam herbicidas, pesticidas e outras moléculas sintéticas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).</p>

Estes microrganismos são fontes promissoras de metabólitos secundários ou compostos bioativos de baixo peso molecular com potencial aplicação industrial. Os metabólitos secundários são sintetizados ao final da fase de crescimento exponencial (GAO; GUPTA, 2005), não sendo essenciais ao desenvolvimento do microrganismo (VINING, 1990). Muitas espécies de Actinobacteria apresentam aplicação biotecnológica, como, por exemplo, na biorremediação de xenobióticos, na produção de vitaminas, na conversão e na produção de biocombustíveis (MIAO; DAVIES, 2010) e, principalmente, na produção de antibióticos, em especial pelas bactérias do gênero *Streptomyces* (VINING, 1990). Outros metabólitos secundários são ainda pesquisados quanto à sua possível aplicação na medicina e na indústria (VENTURA et al., 2007).

Devido à sua importância farmacêutica, industrial e ambiental, a filogenia e a taxonomia de actinobactéria são de grande interesse (EMBLEY; STACKEBRANDT, 1994; GAO; GUPTA, 2005). Com base nas sequências de

rRNA 16S, o filo Actinobacteria compreende 39 famílias e 130 gêneros (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A princípio, a classificação de Actinobacteria baseava-se unicamente nas características morfológicas. Atualmente, com as tecnologias e o avanço no conhecimento, outras metodologias são empregadas, geralmente utilizadas em conjunto para a taxonomia de microrganismos, tais como análise de padrões quimiotaxonômicos, principalmente açúcares da parede celular, aminoácidos e lipídeos, assim como análises das sequências de proteínas e ácidos nucleicos e hibridização DNA-rRNA ou DNA-DNA. A maioria destas metodologias mostra-se ineficaz para a identificação de actinobactérias de grupos taxonômicos muito próximos, sendo o sequenciamento da região 16s do RNA ribossomal uma excelente ferramenta para a construção de árvores filogenéticas, uma vez que consiste em moléculas ubiquamente distribuídas e altamente conservadas (EMBLEY; STACKEBRANDT, 1994).

2.4 Isolamento de actinobactérias

Os métodos de isolamento consistem, basicamente, na escolha do substrato, na composição do meio de cultivo para o isolamento, na realização de um pré-tratamento da amostra, bem como na definição das condições de incubação apropriadas, na seleção das colônias e posterior purificação. A escolha do meio, as condições de incubação e o pré-tratamento são considerados os passos mais importantes que influenciam o crescimento do microrganismo (OKUDOH; WALLIS, 2007). Alguns pré-tratamentos empregados no isolamento de actinobactérias incluem procedimentos de diluições seriadas da amostra (de forma a reduzir o número de colônias em crescimento na placa de Petri e obter colônias isoladas), tratamento pelo calor (visando isolar gêneros de *Actinomadura*, *Microbispora*, *Streptomyces* e *Rhodococcus* resistentes à

dessecação), realização de filtração em membrana e centrifugação, para isolar actinobactérias de habitats aquáticos (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983).

A maioria dos representantes de Actinobacteria cresce em meios bacteriológicos convencionais usados no laboratório (HOLT et al., 1994). Contudo, conforme Goodfellow e Williams (1983), os meios mais comumente utilizados para o isolamento são: meio ágar acrescido de sais minerais e quitina coloidal, meio ágar acrescido de caseína e amido e meio “M3”, sendo que em muitos meios adicionam-se antibióticos para aumentar a sua seletividade. O pH pode ser outro fator limitante ao crescimento, uma vez que a maioria dos microrganismos deste grupo apresenta pH ótimo para seu desenvolvimento próximo à neutralidade, com alguns representantes crescendo entre pH 4,5-5,0. A temperatura para incubação usual é de 25 °C a 30 °C (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983) e o tempo de incubação varia de dias a meses, sendo possível observar, após 24 horas de incubação, com auxílio de microscópio óptico, o crescimento micelial, desde que em superfície de ágar transparente. Após 3 a 4 dias é possível visualizar colônias a olho nu. Todavia, os micélios maduros com esporos são encontrados apenas com 7 a 14 dias de cultivo, sendo, algumas vezes, requerido um tempo superior a um mês (HOLT et al., 1994).

2.5 Isolamento de actinobactérias do solo

Dentre as actinobactérias habitantes do solo, o gênero *Streptomyces* é o mais abundante e comumente estudado, devido à sua capacidade de produzir metabólitos bioativos de interesse industrial. Alguns estudos taxonômicos têm fornecido formulações de meios de cultivo específicos para isolamento de grupos de streptomicetos (HAYAKAWA; YOSHIDA; LIMURA, 2004), bem como para isolamento de outras actinobactérias, principalmente para aquelas de difícil cultivo.

O meio vitamina-ácido húmico (HV), formulado conforme Hayakawa e Nonomura (1987), suplementado com ciclo-heximida para impedir crescimento fúngico, é comumente utilizado para isolar streptomicetos (HAYAKAWA; YOSHIDA; LIMURA, 2004; OTOGURO et al., 2001). Este meio de cultivo é muito utilizado para isolamento de actinobactérias raras provenientes do solo, além de restringir o crescimento de bactérias não filamentosas (HAYAKAWA; NANOMURA, 1987). Conforme Hayakawa, Yoshida e Limura (2004), o meio HV, combinado ao pré-tratamento das amostras com fenol a 1,5% por 30 minutos, a 30 °C, tem demonstrado eficiência no isolamento de membros menos abundantes de *Streptomyces violaceusinger* de amostras do solo.

Outro método eficiente e rápido para o isolamento de actinobactérias zoospóricas diretamente do solo consiste na reidratação e na centrifugação da amostra. Nesta técnica, a amostra seca é imersa em fosfato de potássio, a 10 mM (pH 7,0) e incubada, a 30 °C, por 90 minutos, seguindo-se centrifugação da solução e plaqueamento do sobrenadante em meio HV contendo ácido húmico como única fonte de carbono e nitrogênio, suplementado com ácido nalidíxico e trimetoprima para inibir o crescimento de bactérias gram-negativas e bacilos (HAYAKAWA et al., 2000; OTOGURO et al., 2001). De acordo com Hayakawa et al. (2000), o sucesso desta metodologia está na utilização de fosfato, o qual promove a liberação de zoósporos móveis da amostra de solo e na centrifugação que elimina streptomicetos e outras actinobactérias não móveis. Algumas actinobactérias móveis isoladas por esta técnica foram *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, *Actinokineospora*, *Catenuloplanes*, *Kineosporia*, *Actinosynnema*, *Geodermatophilus* e *Sporichthya*.

Outra abordagem para isolamento seletivo de actinobactérias de amostras do solo baseia-se no aquecimento e na filtração da suspensão, seguida por plaqueamento em meio de cultura contendo propionato de sódio. Conforme Zakharova, Zenova e Zvyagintsev (2003), o aquecimento da suspensão aumenta

a quantidade e a variedade de gêneros raros de actinobactérias, tais como *Actinomadura* e *Micromonospora*. Desse modo, os autores sugerem que o isolamento de espécies do gênero *Actinomadura* é melhorado pelo tratamento pelo calor das amostras de solo à temperatura de 120 °C, por 1 hora e plaqueamento em meio Gauze 1 e 2, acrescido de nistatina, rubomicina ou carminomicina e ácido nalidíxico.

Não existe um meio de cultivo ideal para o crescimento e o isolamento de todos os grupos de actinobactérias, mas um novo meio mínimo (MM), contendo glicose, extrato de levedura e sais minerais, tem sido bem sucedidamente empregado para isolamento seletivo e enumeração de actinobactérias dos solos de deserto (HOZZEIN; ALI; RABIE, 2008). Conforme Hamaki et al. (2005), os meios nutricionalmente pobres têm demonstrado viabilidade para o cultivo e o isolamento de microrganismos não cultiváveis, uma vez que os meios de cultivo convencionais utilizados para crescimento bacteriano são ricos, apresentando mais de 1% de extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte ou amido.

Diante das técnicas moleculares, o isolamento em cultura pura de membros microbianos de comunidades complexas apresenta significativa vantagem, uma vez que permite a identificação do potencial ecológico e metabólico ou fisiológico da estirpe (ATALAN et al., 2000).

2.6 Aplicação das biomoléculas produzidas por actinobactérias

Os microrganismos têm sido utilizados como fonte da maioria das drogas em uso atualmente. Destas, 45% são produzidas por actinobactérias, 38% por fungos e 17% por bactérias (LIU et al., 2010). Segundo Miyadoh (1993), cerca de 100 novos antibióticos de origem microbiana são patenteados

anualmente e, dentre os microrganismos produtores de antibióticos, as actinobactérias são as maiores produtoras (Tabela 2).

Tabela 2 Dados da produção de antibióticos por microrganismos, publicados no Jornal do Antibiótico nos anos de 1984 a 1993

	'84	'85	'86	'87	'88	'89	'90	'91	'92	'93	TOTAL (%)
Actinobacteria	52	72	70	71	67	84	69	70	76	26	657 (74%)
Fungo	10	9	13	10	16	15	15	16	35	15	154 (17%)
Bactéria	13	10	9	9	13	8	8	3	8	4	75 (8%)
Outros	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	4 (1%)
Streptomyces	38	56	51	52	45	65	54	51	57	21	490 (75%)
Actinobactérias raras	13	15	15	17	22	19	15	17	16	5	154 (23%)
Não identificadas	1	1	4	2	0	0	0	2	3	0	13 (2%)

Fonte: Miyadoh (1993)

As actinobactérias formam um dos mais eficientes grupos produtores de metabólitos secundários e muito importantes, do ponto de vista industrial. Dentre os gêneros de actinobactérias, *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* e *Actinoplanes* destacam-se por serem os maiores produtores de biomoléculas comercialmente importantes. Algumas aplicações dos metabólitos secundários produzidos por actinobactérias compreendem ação antibacteriana, antifúngica, antitumoral, imunossupressora, herbicida, anti-helmíntica e antioxidante, entre outras (SOLANKI; KHANNA; LAL, 2008).

A biossíntese de metabólitos secundários é fortemente influenciada pelos fatores nutricionais e pelas condições de crescimento, assim como pelas mudanças ambientais. Dessa forma, a espécie *Streptomyces griseoviridis*, quando inoculada na presença de diferentes suplementos, produz vários compostos acil e fenil α -L-ramnopiranosídeos. Portanto, a elaboração de novos

meios de cultura para maximizar a produção de metabólitos secundários é um importante guia para a produção de biomoléculas novas (LIU et al., 2010).

2.7 Técnicas de identificação de actinobactérias

O sistema hierárquico de classificação de Actinobacteria compreendia táxons delineados exclusivamente por critérios morfológicos e fisiológicos (EMBLEY; STACKEBRANDT, 1994; STACKEBRANDT; SCHUMANN, 2006). Contudo, com o surgimento de novas tecnologias, os critérios utilizados para identificação de membros do grupo actinobactéria compreendem a análise das propriedades quimiotaxonômicas. Nesta metodologia se avaliam as diferenças na composição química dos constituintes da célula e a classificação por base nas similaridades entre o DNA de espécies intimamente relacionadas, na determinação de similaridades de sequências 16S rRNA e rDNA entre as linhagens em geral, bem como a percentagem de G-C em seu DNA. Podem-se realizar, ainda, para a identificação de alguns grupos de actinobactérias, provas bioquímicas, nas quais se avaliam a utilização, pelo microrganismo, de diversas fontes de carbono e nitrogênio e a produção de enzimas extracelulares. Estas estratégias em conjunto têm sido bem sucedidamente empregadas para a classificação de microrganismos, sendo denominada taxonomia polifásica (STACKEBRANDT; RAINEY; WARD-RAINEY, 1997).

A taxonomia de Actinobacteria, baseada nas análises de sequências de rRNA 16sm tem reconhecido a constituição de 130 gêneros e 39 famílias pertencentes à classe Actinobacteria (Figura 2) (VENTURA et al., 2007).

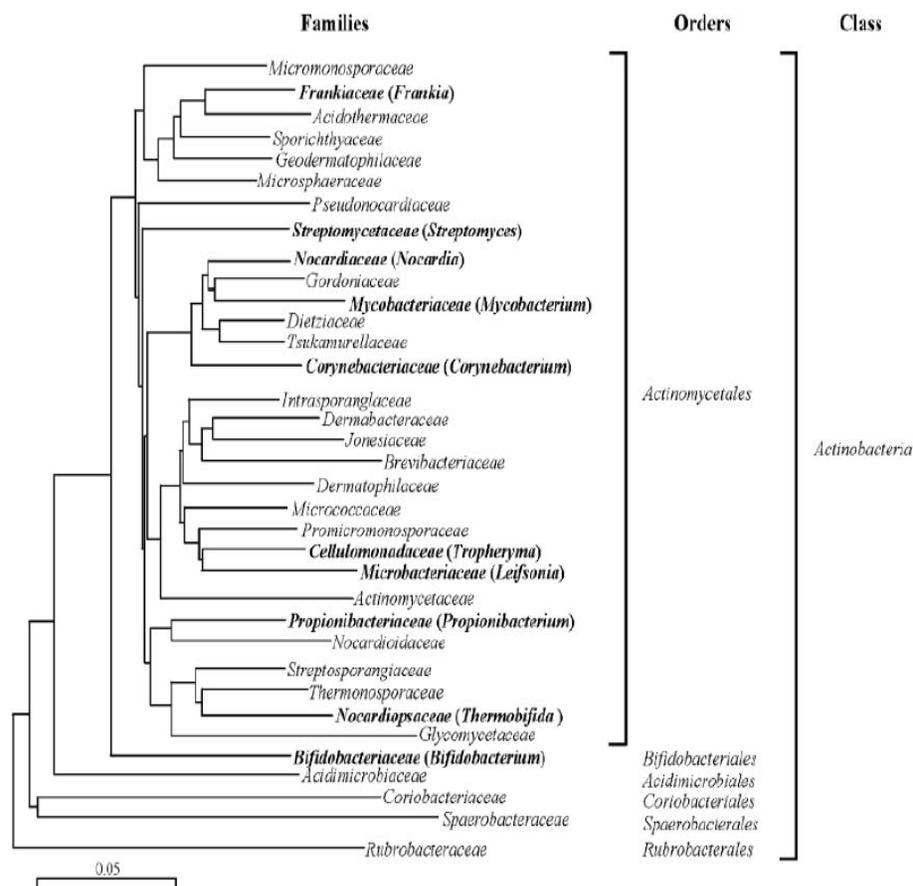


Figura 2 Árvore filogenética de Actinobacteria baseado na sequência de 1.500 nucleotídeos do gene 16S rRNA. Algumas famílias contendo membros sujeitos ao sequenciamento completo do genoma são destacadas em negrito (VENTURA et al., 2007)

2.8 Métodos tradicionais

Os métodos tradicionais de identificação baseiam-se na observação das características macro e microscópicas das colônias crescidas em meio nutriente e na análise da composição química da célula (ENSIGN, 1992). Actinobactérias, em sua maioria, são capazes de crescer nos meios comumente utilizados em

laboratório, entretanto, a densidade e a consistência das colônias variam de acordo com a composição do meio. Os melhores meios de cultura para observação da morfologia de actinobactérias, segundo Holt et al. (1994), são aqueles nutricionalmente pobres, assim como agar água acrescido de elementos traços, como hidrolisados de caseína, extrato de levedura ou amido.

2.8.1 Identificação morfológica

Actinobactérias apresentam-se, basicamente, sob duas formas: nocardioforme e na forma de micélio aéreo. Na primeira, os indivíduos exibem colônias macias ou friáveis, cujas hifas se fragmentam em bastonetes ou cocos. No crescimento de hifas aéreas, típico de *Streptomyces*, as hifas crescem para cima da colônia e são circundadas por um halo hidrofóbico, sendo inicialmente brancas, modificando-se após a formação do esporo (HOLT et al., 1994).

As características morfológicas são muito utilizadas para a caracterização de gêneros. Basicamente, são observados o tipo do micélio (aéreo ou aderido ao substrato), a forma do conídio (esporos assexuais que podem ser clamidósporos ou esporangiósporos), o tipo do esporângio (estrutura que contém os esporos), a formação de esporângio multilocular e a presença de esclerótia (estrutura globosa contendo lipídios ao invés de esporos) (HOLT et al., 1994). Estas estruturas devem ser analisadas junto ao Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, de forma a correlacionar a estirpe em questão ao possível gênero da espécie.

2.8.2 Quimiosistemática

A quimiosistemática, ou quimiotaxonomia, é o estudo da distribuição de componentes químicos, tais como aminoácidos de parede celular, lipídeos

polares, proteínas, quinonas isoprenoides e açúcares, entre microrganismos de diferentes táxons e o uso de tal informação na classificação e na identificação destes. Os métodos mais comumente utilizados incluem composição da parede celular ou membrana como peptidoglicanos, ácidos, lipídeos polares, composição de ácidos graxos, lipopolissacarídeos, quinonas e poliaminas.

As actinobactérias podem ser agrupadas de acordo com a presença de açúcares, aminoácidos e lipídios contidos na parede celular ou no hidrolisado celular. Contudo, a composição da parede celular varia consideravelmente entre os diversos grupos de actinobactéria, mas alguns grupos conseguem ser diferenciados baseando-se na presença de aminoácidos dibásicos na parede celular ou pelo diagnóstico de açúcares na célula hidrolisada (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1967) por técnicas de cromatografia (HOLT et al., 1994). Dessa forma, avaliando-se a presença de aminoácidos dibásicos (principalmente o ácido diaminopimélico), juntamente aos diferentes açúcares presentes na parede celular, foi elaborado um sistema de classificação das actinobactérias consistindo em diferentes grupos que variam de I a VIII. Todos os tipos de parede celular contêm alanina, ácido glutâmico, glucosamina e ácido murâmico, mas apresentam algumas diferenças (Tabela 4) (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1967). Esse método é valioso para a identificação de Streptomyces que perderam sua capacidade característica de produzir micélio aéreo esporulante (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1970).

A diferenciação de algumas estirpes, como *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Nocardia*, não pode ser feita por meio da composição da parede celular. Em vez desta técnica, realiza-se a comparação dos perfis de ácidos graxos totais da célula (ANDERSON; WELLINGYON, 2001; LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1970). Nestes gêneros são encontrados lipídeos característicos capazes de distingui-los. Assim, em *Mycobacteria*, são encontrados lipídeos com esqueleto de 80 átomos de carbono, aproximadamente,

constituindo os ácidos micólicos, enquanto em nocardiae são visualizados lipídios com cerca de 50 carbonos originando os ácidos nocárdicos e, em corynebacteria, lipídeos com cerca de 32 átomos, denominados ácido corinomicólico (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1970).

A classificação por perfil de ácidos graxos baseia-se na capacidade das bactérias em sintetizar diferentes ácidos graxos (CHUN et al., 1997). Os lipídeos são importantes componentes celulares sintetizados por sistemas enzimáticos altamente regulados e estáveis o suficiente para serem utilizados como critério taxonômico. Os lipídeos mais amplamente estudados por sua aplicabilidade na sistemática bacteriana são os ácidos graxos, os ácidos micólicos, os lipídeos polares (fosfolipídeos) e as quinonas isoprenoides (KOMAGATA; SUZUKI, 1987). A análise dos perfis de ácidos graxos é feita por meio de cromatografia gasosa dos ácidos graxos extraídos (CHUN et al., 1997).

Tabela 4 Classificação de Actinobacteria quanto à composição da parede celular e à presença de açúcares

Agrupamento de actinobactérias aeróbicas contendo ácido meso-diaminopimélico		
Tipo de parede celular	Padrão de açúcar	Organismo
I Glicina e ácido LL 2,6 diaminopimélico	Sem padrão de açúcar característico	<i>Streptomyces (Streptoverticillium, Chainia, Actinopycnidium, Actinosporangium, Elytrosporangium); Microellobosporia; Sprorichthya e Intrasporangium</i>
II Glicina e ácido meso-diaminopimélico **	Xilose e arabinose	<i>Actinoplanes; Amorphosporangium; Ampullariella; Dactylosporangium e Micromonospora</i>

Tabela 4, continuação

Tipo de parede celular	Padrão de açúcar	Organismo
III Ácido meso-diaminopimélico	Madurose, sem arabinose ou xilose	<i>Actinomadura; Microbispora; Streptosporangium; Spirillospora; Planomonospora</i> e <i>Dermatophilus</i>
IV Ácido meso-diaminopimélico, arabinose e galactose	Nenhum açúcar	<i>Actinomadura; Thermoactinomyces; Actinobifida</i> e <i>Geodermatophilus</i>
V Lisina, ornitina e glicina*	Galactose, arabinose e sem xilose	<i>Mycobacterium; Nocardia</i> ; algumas corinebactérias; <i>Micropolyspora; Pseudonocardia</i> e <i>Thermomonospora</i>
VI Lisina, ácido aspártico e glicina*	Sem padrão de açúcar característico	<i>Actinomyces</i> ; algumas corinebactérias; algumas <i>Cellulomonas</i>
VII Ácido 2,4 diaminobutírico, lisina, ácido aspártico e glicina*		<i>Actinomyces</i> (tipo bovis); <i>Rothia; Oerskovia</i> e <i>Arthrobacter</i>
VIII Ácido aspártico e glicina*		<i>Erysipelothrix</i> ; algumas corinebactérias
IX Muitos aminoácidos presentes	Sem padrão de açúcar característico	<i>Cellulomonas</i> <i>Mycoplana</i>

* Glicina é variável neste grupo

** Ácido hidróxi-2,6 diaminopimélico pode estar presente

FONTE: Lechevalier e Lechevalier (1970)

2.9 Identificação por assimilação de fontes de carbono

A habilidade dos microrganismos de utilizarem compostos orgânicos como única fonte de carbono para o crescimento aeróbico pode ser utilizada como critério de identificação, sendo muito útil para diferenciar espécies de leveduras (BARNETT; PAYNE; YARROW, 2000; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011), bactérias e Actinobacteria (BENNEDICKT et al., 1955).

Em 1919, Waksman propôs a utilização da técnica de assimilação de fontes de carbono para a identificação de espécies do gênero *Streptomyces* e, em 1948, Pridham e Gottlieb estenderam sua aplicação para outros dois gêneros: *Nocardia* e *Micromonospora* (BENNEDICKT et al., 1955).

O teste de assimilação de fontes de carbono pode ser realizado tanto em meio líquido quanto em meio sólido. Nos testes que se emprega meio líquido, pode-se mantê-los sob agitação ou não, enquanto os meios sólidos podem utilizar tubos inclinados, auxanogramas ou réplica plating (BARNETT; PAYNE; YARROW, 2000; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

A formulação dos meios de cultura é variável, mas, geralmente, se utilizam meios nutricionalmente pobres, acrescidos de uma solução de elementos traço (BARNETT; PAYNE; YARROW, 2000; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Da mesma forma, o tempo de incubação é distinto para cada grupo de microrganismos.

O resultado do teste de assimilação de fontes de carbono é obtido pela análise do crescimento do microrganismo nas fontes testadas, comparada ao controle negativo, meio basal, sem adição de fonte de carbono e ao controle positivo, acrescido de glicose. No teste em que são utilizados tubos inclinados, são feitas estrias simples e o crescimento é comparado com o dos controles. Na técnica de auxanograma, comumente utilizada para a identificação de leveduras, o microrganismo é semeado por "pour plate" ou "spread plate". Alíquotas dos

diferentes carboidratos são adicionadas na superfície dos meios inoculados e, posteriormente, incubados. Após a incubação, avalia-se a capacidade do microrganismo de assimilar e crescer em volta de determinadas fontes, de acordo com o metabolismo característico de sua espécie. Os resultados positivos são constatados por meio da formação de halos de turvação, e comparados com tabelas existentes na literatura. A réplica plating consiste na inoculação simultânea de diferentes isolados nas fontes de carbono avaliadas. A técnica pode ser realizada com o auxílio de um veludo estéril, aderido a um cilindro de metal ou alumínio. O veludo é prensado sobre a placa mãe, contendo as culturas em crescimento e, em seguida, friccionado sobre os diferentes meios. A alternativa a esta técnica é um inoculador multiponto. Este aparato consiste numa base com poços, os quais recebem os isolados em solução, e um “carimbo” de aço inoxidável com projeções ou conjunto de agulhas que transportam o inóculo. O carimbo é friccionado nos diferentes meios e as estirpes são inoculadas (BARNETT; PAYNE; YARROW, 2000; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

2.10 Identificação molecular

Dentre as técnicas moleculares disponíveis para a identificação de actinobactérias, a reassociação DNA-DNA e o sequenciamento do rDNA e rRNA 16s são as metodologias mais comumente empregadas (STACKEBRANDT; RAINEY; WARD-RAINEY, 1997). Contudo, o sequenciamento de fragmentos do rRNA constitui a melhor opção para a identificação e a construção de árvores filogenéticas de bactérias (principalmente o rRNA 16s), uma vez que esta molécula é universal, constante e não sofre alterações devido a mudanças ambientais (WOESE, 1992).

O rRNA é facilmente isolado em quantidades relativamente grandes e parece não estar sujeito à transferência gênica lateral, podendo ser sequenciado diretamente, sem que se recorra à clonagem de genes (WOESE, 1992). Há alguns anos não era possível determinar sequências completas de rRNA e, por muito tempo, os rRNAs foram caracterizados em termos de catálogos de oligonucleotídeos. Oligonucleotídeos curtos, aproximadamente 20 bases, eram produzidos por digestão de rRNA 16S com ribonuclease T1 (que cliva especificamente resíduos G), gerando uma coleção de fragmentos. Estas sequências deram origem a um catálogo de oligonucleotídeos específico para cada espécie bacteriana (WOESE, 1987). Desse modo, a comparação entre estes catálogos permitiu a identificação de agrupamentos filogenéticos. Embora este catálogo fosse suficiente para definir grande parte dos filos bacterianos, para algumas ordens e subdivisões este sistema era precário. Atualmente, com os avanços tecnológicos, o sequenciamento direto do gene ou de partes dos genes 16S e 23S com técnicas de PCR e oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) apropriados é preferido (VANDAMME et al., 1996).

Fragmentos de sequências gênicas do rRNA 16s são amplificados utilizando-se de *primers* universais ou específicos. Os produtos amplificados são purificados por meio de kits específicos, para, então, iniciar o sequenciamento (DASTAGER et al., 2009).

No processo de reassociação, a porcentagem de ligação DNA-DNA e a razão relativa de ligação são parâmetros indiretos que analisam as similaridades das sequências entre dois genomas. A hibridização é uma ferramenta útil para distinção entre espécies (WAYNE et al., 1987). A obtenção de um nível de reassociação entre dois isolados superior a 70% revela que ambos pertencem à mesma espécie. Porém, diferentes metodologias são utilizadas, com aplicação de diferentes critérios de avaliação, o que torna difícil a reprodutibilidade da técnica. Dessa forma, o valor de 70% de similaridade deve ser considerado como

indicativo da espécie e não ser tomado como um valor absoluto. Além disso, a metodologia de reassociação DNA-DNA pode tornar-se demasiadamente demorada, pois envolve comparações par-a-par, fazendo com que o número de comparações seja menor que o desejável. Mesmo assim, o resultado de formação de DNA heteroduplex é estável e suporta bem as definições de espécies (YOUNG, 2000).

Todas as técnicas utilizadas na classificação e na sistemática têm suas vantagens e limitações. Por isso, a combinação de diferentes métodos tem sido o melhor caminho para o entendimento da diversidade, da filogenia, da ecologia, da evolução e da taxonomia dos microrganismos.

3 CONCLUSÃO

A diminuição das áreas de Cerrado é preocupante, uma vez que este bioma apresenta corredores de floresta importantes para a circulação de animais entre este e os outros biomas, bem como pela perda de inúmeras espécies microbianas ainda não identificadas e exploradas quanto ao seu potencialmente biotecnológico.

As actinobactérias representam um grupo de bactérias com enorme aplicação industrial, devido à versatilidade de seus compostos secundários. Além do mais, inúmeras espécies estão envolvidas em processos de degradação e bioacumulação de metais pesados. A importância deste filo se deve, portanto, não somente à ciclagem de matéria orgânica e fixação de nitrogênio, como também à aplicação na indústria farmacêutica, na medicina e na agricultura, visto que seus compostos bioativos apresentam aplicação antimicrobiana, antitumoral e herbicida, entre outros.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, A. S.; WELLINGTON, E. M. H. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 3, p. 797-814, May 2001.

AZEREDO, L. A. I. et al. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, n. 3/4, p. 354-358, Mar. 2004.

ATALAN, E. et al. Biosystematic studies on novel streptomycetes from soil. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 77, n. 4, p. 337-353, May 2000.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and Identification**. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University, 2000. 1134 p.

BARROS, E. V. S. A. et al. *Nocardia cerradoensis* sp. nov., a novel isolate from cerrado soil in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 29-33, Jan. 2003.

BENEDICT, R. G. et al. Further studies in the evaluation of carbohydrate utilization tests as aids in the differentiation of species of streptomyces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 3, n. 1, p. 1-6, Jan. 1955.

BULL, A. T. et al. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 87, n. 3, p. 65-79, Apr. 2005.

CHUN, J. et al. A proposal to reclassify *Nocardia pinenses* Blackall et al., as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 47, n. 1, p. 127-131, Jan. 1997.

CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T. Exploring microbial diversity: a vast below. **Science**, New York, v. 309, n. 5739, p. 1331-1333, Aug. 2005.

DASTAGER, S. G. et al. *Leifsonia kribbensis* sp. nov., isolated from soil. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, n. 1, p. 18-21, Jan. 2009.

DAVIS, K. E. R.; JOSEPH, S. J.; JANSSEN, P. H. Effect of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 826-834, Apr. 2005.

DOBROVOL'SKYA, T. G. et al. Analysis of soil bacterial diversity: methods, potentiality and prospects. **Microbiology**, New York, v. 70, n. 1, p. 119-132, Jan. 2001.

EMBLEY, T. M.; STACKEBRANDT, E. The molecular phylogeny and systematics of the Actinomycetes. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 48, p. 257-289, Oct. 1994.

ENSIGN, J. C. Introduction to the Actinomycetes. In: BALOWS, A. et al. (Ed.). **The Prokaryotes**. New York: Springer, 1992. p. 811-815.

GAO, B.; GUPTA, R. S. Conserved indels in proteins sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 90, p. 2401-2412, Nov. 2005.

GAO, B.; PARAMANATHAN, R.; GUPTA, R. S. Signature proteins that are distinctive characteristics of Actinobacteria and their subgroups. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 69-91, Jan. 2006.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of Actinomycetes. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 37, p. 189-216, Oct. 1983.

HALSSALL, D.; GOODCHILD, D. Nitrogen fixation associated with development and localization of mixed populations of *Cellulomonas* sp. and *Azospirillum brasilense* grown on cellulose or wheat straw. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, n. 4, p. 849-854, Apr. 1986.

HAMAKI, T. et al. Isolation of novel Bacteria of Actinomycetes using soil-extract agar medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 99, n. 5, p. 485-492, Sept. 2005.

HASEGAWA, T.; TANIDA, S.; ONO, H. *Thermomonospora formosensis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 36, n. 1, p. 20-23, Jan. 1986.

HAYAKAWA, M. et al. Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 171-185, Aug. 2000.

HAYAKAWA, M.; NANOMURA, H. Humic acid-vitamin agar, a new médium for the selective isolation of soil actinomycetes. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v. 65, n. 5, p. 501-509, 1987.

HAYAKAWA, M.; YOSHIDA, Y.; LIMURA, Y. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 5, p. 973-981, Jan. 2004.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 5th ed. Maryland: Williams & Wilkins, 1994. 686 p.

HOZZEIN, W. N.; ALI, M. I. A.; RABIE, W. A new preferential médium for enumeration and isolation of desert actinomycetes. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 1547-1552, Jan. 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Ecosistemas de Cerrado**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/cerrado.htm>>. Acesso em: 4 out. 2010.

JANSSEN, P. H. et al. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria and Verrucomicrobia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2391-2396, Sept. 2002.

JONGRUNGRUANGCHOK, S.; TANASUPAWAT, S.; KUDO, T. *Micromonospora chaiyaphumensis* sp. nov., isolated from Thai soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 4, p. 924-926, Apr. 2008.

KAGEYAMA, A. et al. *Arthrobacter oryzae* sp. nov. and *Arthrobacter humicola* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 1, p. 53-56, Jan. 2008.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 65-76, Jan. 1999.

- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, n. 3, p. 707-713, June 2005.
- KOMAGATA, K.; SUZUKI, K. I. Methods in microbiology: lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. **Methods in Microbiology**, New York, v. 19, p. 161-207, 1987.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**. 15th ed. New York: Elsevier, 2011. v. 1, 279 p.
- LECHEVALIER, H. A.; LECHEVALIER, M. P. Biology of Actinomycetes. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 21, p. 71-100, 1967.
- LECHEVALIER, M. P.; LECHEVALIER, H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 20, n. 4, p. 435-443, 1970.
- LIU, X. et al. Bioprospecting microbial natural product libraries from the marine environment for drug discovery. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 63, n. 8, p. 415-422, Aug. 2010.
- MCCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment: a review. **Gene**, Amsterdam, v. 155, p. 189-192, June 1992.
- MIAO, V.; DAVIES, J. Actinobacteria: the good, the bad and the ugly. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 143-150, Aug. 2010.
- MIYADOH, S. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganism approach. **Actinomycetologica**, Tokyo, v. 7, n. 1, p. 100-106, 1993.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.
- OKUDOH, V. I.; WALLIS, F. M. Antimicrobial activity of rare actinomycetes isolated from natural habitats in KwaZulu-Natal, South África. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v. 103, n. 5, p. 216-222, June 2007.
- OTOGURO, M. et al. An integrated method for the enrichment and selective isolation of *Actinokineopora* spp. In soil and plant litter. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 2, p. 118-130, July 2001.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, London, v. 80, n. 3, p. 223-230, June 1997.

RIBEIRO, M. G. et al. Nocardiosis: an overview and additional report of 28 cases in cattle and dogs. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 3, p. 177-185, jun. 2008.

SERVIN, J. A. et al. Evidence excluding the root of the tree of life from the Actinobacteria. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 25, n. 1, p. 1-4, Jan. 2008.

SOLANKI, R.; KHANNA, M.; LAL, R. Bioactive compounds from marine actinomycetes. **Indian Journal Microbiology**, Chandigarh, v. 48, n. 4, p. 410-431, June 2008.

STACH, J. E. M. et al. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. **Environmental Microbiology**, London, v. 5, n. 10, p. 828-841, Oct. 2003.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 47, n. 2, p. 479-491, Apr. 1997.

STACKEBRANDT, E.; SCHUMANN, P. **Introduction to the taxonomy of Actinobacteria**. 3rd ed. Berlin: Prokaryotes, 2006. 1111 p.

TORSVIK, V.; SORHEIM, R.; GOKSOYR, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities: a review. **Journal of Industrial Microbiology**, Hampshire, v. 17, n. 3/4, p. 170-178, 1996.

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, n. 2, p. 407-438, June 1996.

VENTURA, M. et al. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 71, n. 3, p. 495-548, Mar. 2007.

VERONEZ, V. A. et al. Ticks (Acaris: Ixodidae) within various phytophysiognomies of a Cerrado reserve in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 50, n. 2, p. 169-179, Feb. 2007.

VINING, L. C. Functions of secondary metabolites. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 395-427, Oct. 1990.

WAYNE, L. G. et al. Report of the ad hoc comitee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 37, n. 4, p. 463-464, Oct. 1987.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, n. 2, p. 221-271, June 1987.

_____. **The Prokaryotes**: prokaryote systematics: the evolution of a science. 2nd ed. Berlin: Springer, 1992. v. 1, 939 p.

YOUNG, R. A. Biomedical discovery with DNA arrays. **Cell**, Cambridge, v. 102, n. 1, p. 9-15, Jan. 2000.

ZAKHAROVA, O. S.; ZENOVA, G. M.; ZVYAGINTSEV, D. G. Some approaches to the selective isolation of actinomycetes of the genus *Actinomadura* from soil. **Microbiology**, New York, v. 72, n. 1, p. 126-130, Nov. 2003.

ZHANG, L. P.; JIANG, C. L.; CHEN, W. X. *Streptosporangium yunnanense* sp. nov. and *Streptosporangium purpuratum* sp. nov. from soil in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, n. 2, p. 719-724, Mar. 2005.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS EM SOLOS DE CERRADO MINEIRO DURANTE ESTAÇÃO DE BAIXA PLUVIOSIDADE

¹Monique Suela Silva, ²Rosane Freitas Schwan, ³Disney Ribeiro Dias

Resumo

Os microrganismos presentes no solo contribuem para a sustentabilidade das cidades, da agricultura e estão envolvidos na maioria dos ciclos biogeoquímicos do planeta. Além do mais, são fontes importantes de novas drogas e metabólitos de interesse industrial e, devido a tais características, existe, atualmente, crescente interesse no estudo destes microrganismos. Actinobactérias colonizam, principalmente, os solos e formam um grupo de bactérias gram-positivas, capazes de degradar macromoléculas presentes no solo, principalmente proteínas. Os solos do cerrado abrigam uma rica diversidade de populações de actinobactérias ainda não muito bem explorada, constituindo excelente fonte para a busca de novos metabólitos bioativos. Solos de cerrado de Minas Gerais, das regiões dos municípios de Arcos, Luminárias e Passos, foram analisados quanto às características físico-químicas e à diversidade microbiana, nos períodos de baixa pluviosidade (abril a setembro). As amostras de solos das três regiões mostraram-se ácidas, tendo, em Luminárias, sido observada elevada concentração de alumínio ($1,5 - 0,6 \text{ mg/dm}^3$). A população bacteriana isolada durante a estação seca, nas cidades de Arcos, Luminárias e Passos, no meio Aaronson's, foi, de, respectivamente, 7,274; 7,124 e 7,33 log UFC/g e, no meio vitamina-ácido húmico, foi de 6,568; 6,864 e 6,738 log UFC/g, na mesma ordem. As espécies de Actinobacteria encontradas em cada região diferiram entre si e entre os meios de cultura utilizados, comprovando que o uso em conjunto de meios de cultura diferentes resulta em maior diversidade de espécies. Três gêneros predominaram em todas as amostras de solos: *Arthrobacter*, *Streptomyces* e *Microbacterium*, que são microrganismos ubíquos e colonizam tipicamente os solos. Diversas espécies isoladas apresentaram dados da literatura que corroboram para a sua utilização em diversos processos biotecnológicos e na biorremediação, principalmente sugerindo necessidade de pesquisas futuras.

Termos para indexação: Actinobacteria, diversidade microbiana e solos de cerrado mineiro.

Abstract

The microorganisms present in soil contribute towards to the sustainability of towns and cities, farming and are involved in most of the biogeochemical cycles in the planet. In addition, they are important sources of new drugs and metabolites of industrial interest and, due to such characteristics, there is, currently, a growing interest in the study of these microorganisms. Actinobacteria colonize mainly the soils and form a group of gram-positive bacteria capable of degrading soil-present macromolecules, chiefly proteins. Cerrado soils house a rich diversity of populations of actinobacteria yet not very well explored, constituting an excellent source for the search of new bioactive metabolites. Minas Gerais cerrado soils, of the regions of the municipalities of Arcos, Luminárias and Passos, were surveyed as to the physicochemical characteristics and the microbial diversity in the low rainfall period (April to September). The soil samples of the three regions proved acidic, in Luminárias, a high aluminum concentration ($1.5 - 0.6 \text{ mg/dm}^3$) having been observed. The bacterial population isolated during the dry season in the towns of Arcos, Luminárias and Passos, in Aaronson's medium, was, of, respectively, 7.274; 7.124 and 7.33 log CFU/g and, in the vitamin-humic acid medium, was of 6.568; 6.864 and 6.738 log CFU/g, in the same order. The Actinobacteria species found in each region differed from one another and among the culture media utilized; proving that the joint use of different culture media results into greater species diversity. Three genera predominate in all the soil samples: *Arthrobacter*, *Streptomyces* and *Microbacterium*, which are ubiquitous microorganisms and colonize typically the soils. Several species presented literature data which corroborate to its use in several biotechnological processes and in bioremediation, chiefly suggesting need for further research.

Indexterms: Actinobacteria, microbial diversity and Minas Gerais cerrado soils.

Introdução

O interesse pelo estudo de microrganismos presentes no solo é cada vez maior, uma vez que estes exercem importantes funções na regulação e no funcionamento dos ecossistemas (VAL-MORAES et al., 2009). A população microbiana presente pode alterar a composição química e física do solo, bem como o manejo das terras pelo homem pode, também, modificar a constituição das comunidades microbianas (PEREIRA et al., 2007).

Os solos, dentre todos os habitats terrestres, abrigam a maior diversidade de espécies microbianas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A diversidade de populações bacterianas ainda é pouco estudada, provavelmente devido às dificuldades no cultivo destes microrganismos em meios de cultura convencionais (DAVIS; JOSEPH; JANSSEN, 2005).

O domínio Bacteria compreende 52 filos, tendo 12 sido descritos por Woese, em 1987 e 40 acrescentados posteriormente, dos quais 14 correspondem a microrganismos cultiváveis e 26 a microrganismos não cultiváveis (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Aproximadamente 1% das células bacterianas presentes em um grama de solo são capazes de formar colônias em meios laboratoriais (DAVIS; JOSEPH; JANSSEN, 2005).

A diversidade microbiana dos solos pode ser analisada por meio da identificação fenotípica das colônias bacterianas em nível de gênero, identificação por técnicas moleculares ou por quimiosistemática (DOBROVOL'SKAYA et al., 2001). Embora o cultivo deste grupo de microrganismos seja difícil, alguns avanços têm sido obtidos na identificação de bactérias raramente isoladas do solo por meio da utilização de novas formulações de meios de cultura, os quais têm permitido seu crescimento e identificação (DAVIS; JOSEPH; JANSSEN, 2005).

Actinobactérias colonizam principalmente os solos, compreendendo mais de 30% da população total de microrganismos nesse ambiente (KENNEDY, 1999). Além de estarem presentes no solo, existem, também, representantes aquáticos (marinhos e de água doce), patógenos de plantas e animais, inclusive o homem, e simbioses fixadores de nitrogênio com plantas não leguminosas (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983).

Actinobacteria constitui um dos maiores filos dentro do domínio Bacteria, compreendendo bactérias gram-positivas com elevado conteúdo de G+C (guanina e citosina) no seu DNA (GAO; PARAMANATHAN; GUPTA, 2006; MIAO; DAVIES, 2010; VENTURA et al., 2007), cuja bioquímica, morfologia e relação com o oxigênio são extremamente diversificadas (STACH et al., 2003). O filo representa um importante grupo de microrganismos produtores de enzimas extracelulares capazes de degradar macromoléculas complexas encontradas nos solos, como proteínas, amido, quitina, húmus, celulose e lignocelulose. A maioria das actinobactérias sintetiza uma substância característica do grupo, a geosmina, responsável pelo odor semelhante ao da terra molhada (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Baseando-se na taxonomia polifásica, a classe Actinobacteria compreende 130 gêneros e 39 famílias (VENTURA et al., 2007). Esta classificação leva em consideração os critérios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e enzimáticos de uma espécie, a porcentagem de G-C presente em seu DNA (57 - 75%) (LO et al., 2002), além das técnicas moleculares, hibridização DNA-DNA ou sequenciamento de regiões do rRNA ou rDNA (EMBLEY; STACKEBRANDT, 1994; STACKEBRANDT; RAINEY; WARD-RAINEY, 1997; STACKEBRANDT; SCHUMANN, 2006).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de isolar e identificar actinobactérias presentes em solos de cerrado nas regiões de Arcos, Luminárias e Passos, MG, visando caracterizar a microbiota destes ambientes durante

estação seca e avaliar a eficácia dos meios de cultivo utilizados para o crescimento de Actinobacteria.

Material e métodos

Caracterização da área de estudo e amostragem

As amostras de solo dos municípios de Arcos, Luminárias e Passos, localizados no estado de Minas Gerais, cujo bioma típico é o cerrado, foram analisadas quanto à diversidade de actinobactérias durante a estação seca (entre abril a setembro, quando a precipitação do mês mais seco é inferior a 60 mm) (GOMES, 2004). Em cada região foram coletadas cinco amostras compostas do solo, durante o período de baixa pluviosidade, cujas coordenadas geográficas estão descritas na Tabela 5. Cada amostra composta foi constituída de 12 subamostras simples distribuídas em dois círculos concêntricos com raios de 3 e 6 m em relação ao ponto central (Figura 3), e a uma profundidade de 0-20 cm. A coleta dos solos procedeu-se com o auxílio de um trado flambado, sempre após a mudança para uma nova área de amostragem.

Tabela 5 Localização geográfica dos pontos de amostragem no Cerrado mineiro

Região		Localização
Arcos	Ponto A	21°37'51,0"S; 044°58'22,7"W
	Ponto B	21°37'50,6"S; 044°58'22,7"W
	Ponto C	21°37'51,5"S; 044°59'11,0"W
	Ponto D	21°37'55,3"S; 044°59'29,3"W
	Ponto E	21°37'54,6"S; 044°59'54,0"W
Luminárias	Ponto A	20°16'27,7"S; 045°29'14,6"W
	Ponto B	20°14'47,9"S; 045°25'35,9"W
	Ponto C	20°14'51"S; 045°31'40,8"W
	Ponto D	20°14'48,6"S; 045°31'33,4"W
	Ponto E	20°14'58,0"S; 045°31'54,0"W
Passos	Ponto A	20°49'57,7"S; 046°30'29,3"W
	Ponto B	20°49'56,8"S; 046°30'30,1"W
	Ponto C	20°49'48,0"S; 046°30'54,9"W
	Ponto D	20°49'47,1"S; 046°30'54,5"W
	Ponto E	20°49'47,8"S; 046°30'51,5"W

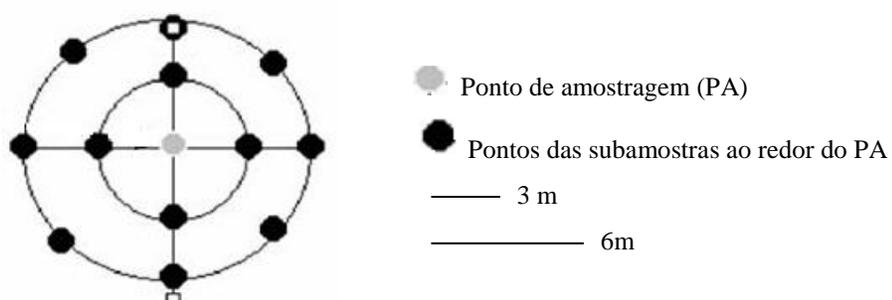


Figura 3 Esquema do ponto de amostragem: amostra de solo composta por 12 subamostras

As amostras de solo coletadas em cada região foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e mantidas sob refrigeração para o transporte até o Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Lavras, onde foram conservadas, a 4 °C, até o plaqueamento.

Análise físico-química dos solos

As amostras dos solos foram submetidas a análises físico-químicas, no Laboratório de Ciências do Solo, na Universidade Federal de Lavras, onde foram avaliados concentração de alumínio (Al), fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg), matéria orgânica (MO), pH, concentração de hidrogênio + alumínio (H+Al), cálculo de bases intercambiáveis (SB) e a textura dos solos.

Isolamento de Actinobactéria

Os solos coletados foram peneirados com malha de 2 mm para a retirada de raízes e pedras. Uma alíquota de 10 g de cada amostra foi homogeneizada em 90 ml de água peptonada estéril a 0,1%, constituindo a diluição 10^{-1} . Esta solução foi submetida à agitação, a 125 rpm, por 30 minutos e ao sonicador, por mais cinco minutos, ambos utilizados para promover a desagregação das partículas do solo e a homogeneização. Em seguida, na capela de fluxo laminar, realizaram-se diluições seriadas das amostras até a diluição 10^{-8} . Todas as diluições foram plaqueadas em triplicata por espalhamento em superfície nos meios de cultura Aaronson's, conforme utilizado por Silva et al. (2009) e, no meio vitamina ácido húmico, de acordo com Hayakawa, Yoshida e Limura (2004) e Otoguro et al. (2001).

As placas incubadas a 28 °C, por 5 dias, foram submetidas à contagem e à caracterização das colônias. Para o isolamento, foram utilizadas as placas que

apresentaram contagem entre 30 a 300 colônias e o número de isolados determinado pela raiz quadrada do número total dos diferentes morfotipos encontrados.

Identificação morfológica

As colônias da diluição escolhida foram caracterizadas de acordo com a morfologia das colônias, além de textura, cor, brilho, tamanho, formato e produção de exsudado. Aquelas com características semelhantes foram agrupadas em morfotipos e esses morfotipos, posteriormente, purificados. As colônias já puras foram preservadas em duplicatas, em criotubos contendo 900 µl de caldo nutriente, seguida por incubação, a 28 °C, por 48-72 horas, acrescido de 900 µl de glicerol 40% e mantidas à temperatura de -20 °C.

A coloração de Gram foi realizada para certificar a pureza dos isolados e para a caracterização celular.

Assimilação de fontes de carbono

Os isolados foram submetidos a testes de assimilação de fontes de carbono, sendo utilizadas estirpes crescidas por sete dias em meio Aaronson's sólido. Cada isolado foi padronizado de acordo com a escala MacFarland 0,5, em água peptonada 0,1% estéril e inoculado, nas diferentes fontes de carbono, pela técnica de *replica plating*, conforme Dias e Schwan (2010) e incubadas, a 28 °C, por 10 dias. O meio de cultura basal utilizado para este teste foi elaborado conforme Shirling e Gottlieb (1966), acrescido das 21 fontes de carbono testadas: cisteína, valina, fenilalanina, histidina, sacarose, inositol, raminose, rafinose, adonitol, melibiose, xilitol, celobiose, galactose, lactose, maltose, celulose, salicina, xilose, amido, arbutina e manitol.

O crescimento das estirpes nas fontes analisadas foi comparado ao crescimento das mesmas no controle negativo e positivo, tendo o controle negativo consistido do meio basal sem adição de fonte de carbono e, como controle positivo, o meio acrescido de 1% de glicose.

Os resultados dos testes de assimilação de fontes de carbono e a caracterização morfológica dos isolados foram submetidos à análise de grupos, no programa BioDiversity Pro ver.2 (MCALEECE et al., 1997). A partir dos dendogramas gerados, foram selecionadas estirpes representativas de cada grupo para a caracterização molecular.

Extração de DNA genômico

A extração do DNA total das células foi realizada conforme Pereira et al. (2010). As colônias foram cultivadas em meio Aaronson's sólido, por três dias. Depois, retirou-se uma alíquota de cada colônia pura, homogeneizando-se a amostra em eppendorfs de 0,2 ml contendo 15 µl de água ultrapura estéril (água mili-Q). Em seguida, as amostras foram submetidas a um aquecimento de 95 °C, por 15 minutos, em um aparelho termociclador para a promoção do rompimento celular.

Agrupamento molecular baseado na amplificação do DNA genômico pela técnica de REP-PCR

A PCR que utiliza *primers* consenso para sequências palindrômicas extragênicas repetitivas (*repetitive extragenic palindromic*, REP), encontradas em muitos cromossomos bacterianos, tem demonstrado ser aplicável em uma variedade de espécies bacterianas e é conhecida como REP-PCR (SNELLING et al., 1996).

O agrupamento molecular utilizando a técnica de REP-PCR seguiu metodologia de Mohapatra, Broersma e Mazumder (2007). Sendo assim, 2 µL de DNA foram acrescidos a 12,5 µL Taq PCR Master Mix (Qiagen, São Paulo, Brasil); 8 µL de H₂O; 0,25 µL de BSA; 0,25 µL de formamida e 2 µL do *primer* GTG 5 (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3'). A amplificação realizou-se da seguinte maneira: 5 minutos de desnaturação inicial, a 94 °C; 30 ciclos de 95 °C, por 30 segundos; 45 °C, por 60 segundos; 60 °C, por 5 minutos e, por fim, 60 °C, por 16 minutos.

Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 2%, a 70V/4 horas, para a separação dos perfis. No preparo, 10 µl da amostra foram homogeneizados, a 1,5 µl de SYBR Green (Invitrogen, Foster City, CA, USA) e visualizados em um aparelho transiluminador. Os perfis obtidos foram analisados e agrupados no programa Bionumerics 2,50 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica), utilizando-se o coeficiente de Jacard como perfil de similaridade.

Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

A confirmação da identidade dos isolados foi obtida pelo sequenciamento da região 16S rRNA. Para tal, realizou-se a PCR acrescentando-se 2 µL de DNA a 30 µL de Taq PCR Master Mix (Qiagen, São Paulo, Brasil); 26 µL de H₂O, 1 µL de *primer* 27f (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1 µL de *primer* 1512r (5-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3'). As condições para a amplificação foram: desnaturação inicial, a 95 °C, por 10 minutos, seguida de 25 ciclos de 93 °C, por 1 minuto; 50 °C, por 1 minuto; 72 °C, por 1 minuto e 30 segundos e uma elongação final, a 72 °C, por mais 5 minutos.

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1%, a 70V/30 m, para verificar a presença das amostras; 5 µL da amostra foram acrescidos de

1,5 µL de SYBR Green (Invitrogen, Foster City, CA, USA) e visualizados em um aparelho transiluminador. Após averiguação, os produtos da amplificação foram enviados para o sequenciamento realizado na Macrogen (Macrogen, Inc., Seul, Coreia) e as sequências comparadas com a base de dados do GenBank (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2011).

Resultados e discussão

Análise físico-química dos solos

As concentrações de fósforo e magnésio foram similares entre os solos de Arcos, Luminárias e Passos, não havendo, portanto, diferenças estatísticas significativas (Tabela 6).

Os solos de cerrado, normalmente, apresentam-se ácidos e com elevadas concentrações de alumínio. Considerando-se as três regiões analisadas, os solos da região de Passos apresentaram a maior concentração de potássio (54,0 – 137,28 mg/dm³), aumento também observado para a concentração de alumínio, principalmente nos solos de Luminárias (0,6 – 1,5 mg/dm³) e concentração de Al + H nos solos de Arcos (7,0 – 17,1 mol/dm³) e Luminárias (6,3 – 10,9 mol/dm³). Ambos os solos mostraram-se ácidos; em Arcos, o pH variou entre 4,2 a 4,8; em Luminárias, entre 5,0 a 5,2 e, em Passos, de 4,7 a 5,2, sendo a maior acidez observada em Arcos.

A concentração de matéria orgânica em cada amostra de solo analisada apresentou uma pequena variação, sendo os solos de Luminárias o de maior concentração (2,2 – 3,1 dag/kg). A textura dos solos de Arcos, referente a todos os pontos, foi caracterizada como argilosa, enquanto em Passos e em Luminárias observaram-se variações na textura.

População bacteriana

A escolha do meio de cultivo, a definição das condições de incubação apropriadas e o pré-tratamento da amostra são de fundamental importância para o sucesso do isolamento de microrganismos.

Os meios de cultura utilizados para o isolamento de actinobactérias do solo neste trabalho (Aaronson's e vitamina-ácido húmico) demonstraram significativa diferença na densidade populacional. A população de bactérias isoladas, durante a estação seca, nas cidades de Arcos, Luminárias e Passos, no meio Aaronson's foi, respectivamente, de 7,274; 7,124 e 7,33 log UFC/ml e, no meio vitamina-ácido húmico, de 6,568; 6,864 e 6,738 log UFC/ml, na mesma ordem (Tabela 6). A análise desses resultados evidencia um leve aumento populacional no meio de cultivo Aaronson's (apêndice 1) em relação ao meio vitamina-ácido húmico (apêndice 2). Isto se deve, provavelmente, às diferenças nutricionais de ambos os meios, uma vez que o primeiro constitui um meio mais pobre, quando comparado ao segundo.

Tabela 6 Densidade bacteriana em solos de cerrado de Minas Gerais, Brasil, durante a estação de baixa pluviosidade

	Densidade bacteriana log UFC/ml	
	Aaronsons's	Vitamina-ácido húmico
Arcos	7,274	6,568
Luminárias	7,124	6,864
Passos	7,33	6,738

Tabela 7 Caracterização físico-química das amostras de solo durante a estação seca

Região/ ponto	pH	P mg/dm ³	K mg/dm ³	Mg mg/dm ³	Al mg/dm ³	H+Al C mol/dm ³	MO dag/kg	SB mg/dm ³	Textura
AR A	4,7±0,1a	2,0±0,1a	149,7±1b	0,1±0,0a	0,4 ±0,1a	8,7±0,1a	2,4±0,1a	1,3±0,1a	Argilosa
AR B	4,8±0,1a	1,4±0,1a	48,3±1a	0,6±0,0a	0 ±0,1a	7,0±0,1a	1,8 ±0,1a	0,2±0,1a	Argilosa
AR C	4,3±0,1a	1,4±0,1a	54,6±1a	0,1±0,0a	0,1 ±0,1a	15,3±1b	2,8 ±0,1a	0,3±0,1a	Argilosa
AR D	4,2±0,1a	1,7±0,1a	39±1a	0,1±0,0a	0 ±0,1a	17,1±1b	3,0 ±0,1a	0,2±0,1a	Argilosa
AR E	4,8±0,1a	1,2±0,1a	84,2±2b	0,1±0,0a	0,1±0,1a	10,9±1b	1,9±0,1a	0,4±0,1a	Argilosa
LU A	5,1±0,1a	2,5±0,1a	37,4±1a	0,1±0,0a	0,6±0,1a	6,3±0,1a	2,2±0,1a	0,1±0,1a	Argilosa
LU B	5,1±0,1a	0,9±0,1a	37,4±1a	0,1±0,0a	1,5±0,1b	7,0±0,1a	2,8±0,1a	0,2±0,1a	Argilosa
LU C	5,2±0,1a	0,9±0,1a	39 ±1a	0,1±0,0a	0,7±0,1a	7,8±0,1a	2,8±0,1a	0,2±0,1a	Arenosa
LU D	5,0±0,1a	1,2 ±0,1a	46±1a	0,1±0,0a	1,5±0,1b	10,9±0,1b	3,0±0,1a	0,3±0,1a	Média
LU E	5,0±0,1a	1,2 ±0,1a	67±1b	0,1±0,0a	1,4 ±0,1b	9,88±0,1b	3,1±0,1a	0,3±0,1a	Argilosa
PA A	4,7±0,1a	1,7±0,1a	113,8±1b	0,1±0,0a	0,2±0,1a	13,7±0,1b	3,9±0,1a	0,5±0,1a	Arenosa
PA B	5,1±0,1a	1,7±0,1a	88,9±1b	0,1±0,0a	0,4±0,1a	5,6 ±0,1a	2,4±0,1a	0,7±0,1a	Média
PA C	5,1±0,1a	1,4±0,1a	137,28 ±1b	0,1±0,0a	0,4±0,1a	4,5±0,1a	2,2±0,1a	0,8±0,1a	Média
PA D	5,1±0,1a	1,7±0,1a	117±1b	0,1±0,0a	0,5±0,1a	5,0±0,1a	1, 9±0,1a	0,9±0,1a	Média
PA E	5,2±0,1a	1,4 ±0,1a	54 ±1b	0,1±0,0a	0,2 ±0,1a	4,5 ±0,1a	1,7±0,1a	0,4±0,1a	Média

Médias dos valores duplicados; ± desvio padrão (0,0; 0,1; 1 e 2). Letras distintas indicam diferenças significativas (P<0,05). Abreviações: PA - Passos; LU - Luminárias; AR – Arcos; MO – matéria orgânica; SB – soma de bases trocáveis (Ca, Mg, Na e K)

O meio vitamina-ácido húmico, formulado conforme Hayakawa e Nonomura (1987), é comumente utilizado para isolar actinobactérias de solos, principalmente estreptomicetos. Por se tratar de um meio rico, o qual contém solução de vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina, pirodoxina, inositol, Ca-pantotenato, ácido p-aminobenzoico e biotina) e ácido húmico, entre outros compostos, este meio também restringe o crescimento de bactérias não filamentosas.

A maioria dos representantes de Actinobacteria cresce em meios bacteriológicos convencionais usados no laboratório, os quais são nutricionalmente ricos, normalmente apresentam mais de 1% de extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte ou amido (HOLT et al., 1994). Contudo, conforme Goodfellow e Williams (1983), os meios mais comumente utilizados para o isolamento desse grupo de microrganismos são o meio ágar acrescido de sais minerais e quitina coloidal, e o meio ágar acrescido de caseína e amido, sendo ambos, nutricionalmente pobres. Embora não exista um meio de cultivo ideal para o crescimento e o isolamento de todos os grupos de actinobactérias, aqueles nutricionalmente pobres têm sido bem sucedidamente empregado para isolamento seletivo e enumeração de actinobactérias dos solos de deserto (HOZZEIN; ALI; RABIE, 2008). O meio Aaronson's demonstrou maior densidade bacteriana, pois permitiu o crescimento de bactérias tanto cremosas quanto filamentosas, enquanto o meio vitamina-ácido húmico favoreceu o crescimento daquelas filamentosas em detrimento das outras (Figura 4). Ou seja, este último provou ser eficiente para o seu propósito, de isolar, principalmente, *Streptomyces*.

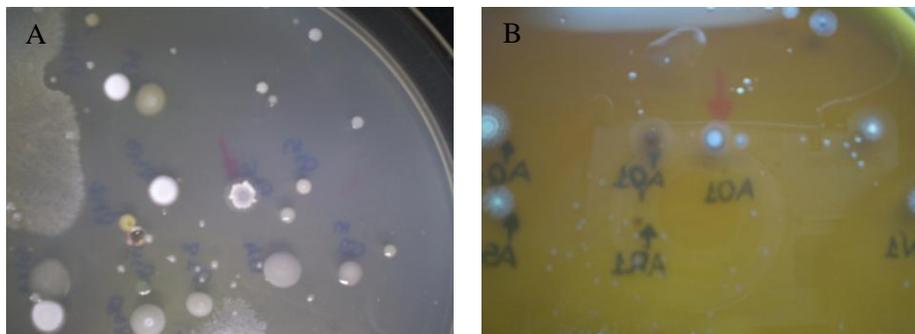


Figura 4 Comparação entre quantidade e diversidade morfológica bacteriana entre os dois meios. À esquerda (A), o meio Aaronson's e à direita (B), o meio vitamina-ácido húmico. Ambos apresentam crescimento de colônias filamentosas, entretanto, há predominância no meio vitamina-ácido húmico, o qual também demonstra menor densidade populacional

Agrupamento e identificação

Os 459 isolados analisados quanto às características morfológicas e à capacidade de assimilar compostos orgânicos distintos foram agrupados (Figuras 5 a 7). A partir deste agrupamento, selecionaram-se isolados representativos de cada grupo. Estes 382 isolados foram submetidos ao REP-PCR e agrupados novamente, de acordo com o perfil de similaridade das bandas, resultando num total de 281 isolados, os quais foram sequenciados (Figura 8).

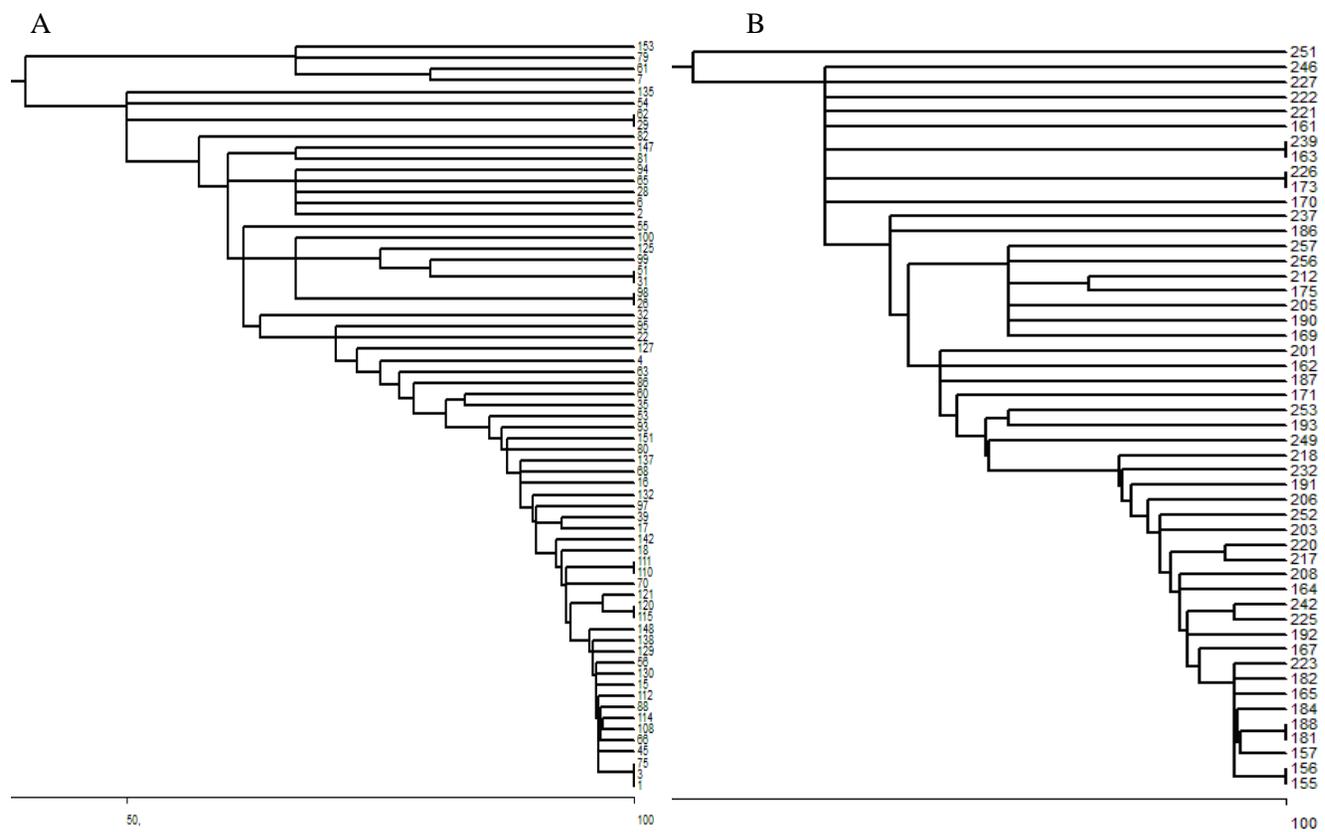


Figura 5 Dendrogramas dos isolados obtidos pelo plaqueamento em meio Aaronson's (A) e vitamina-ácido húmico (B) de solos da região de Arcos, durante a estação seca

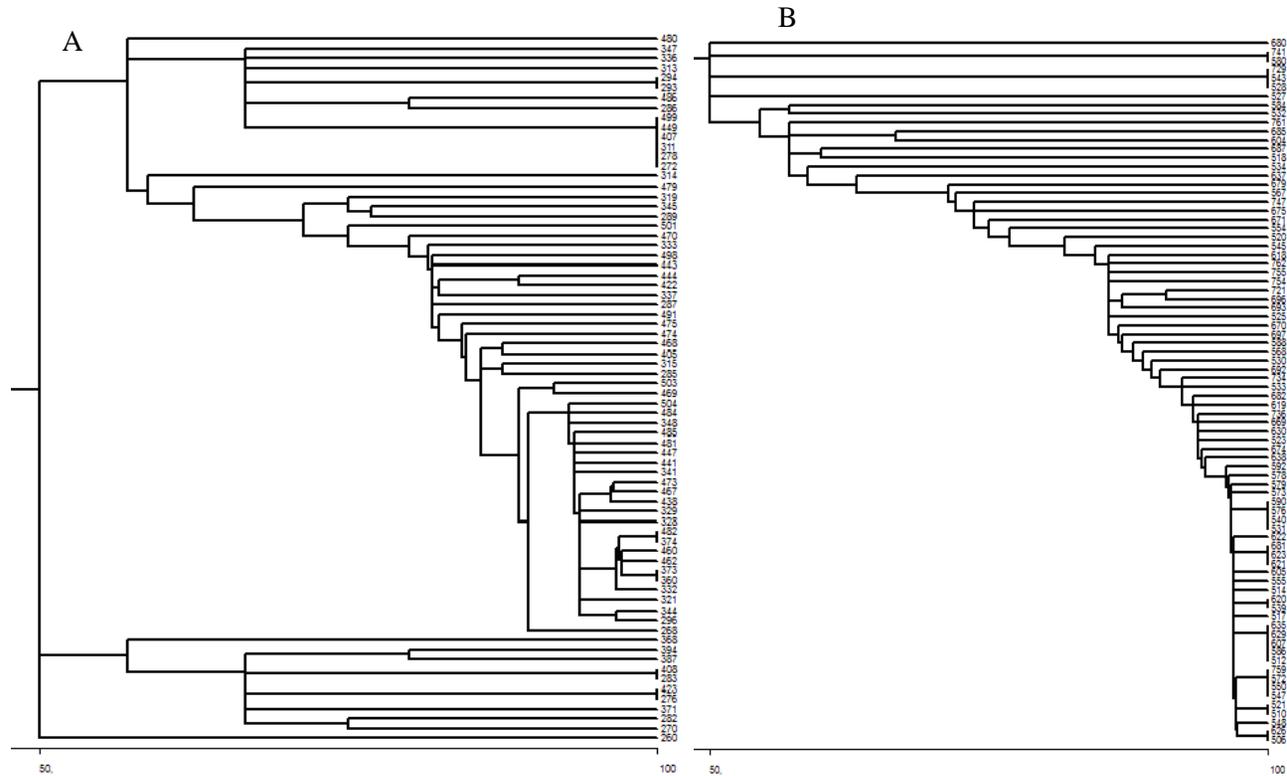


Figura 6 Dendrogramas dos isolados obtidos pelo plaqueamento em meio Aaronson's (A) e vitamina-ácido húmico (B) de solos da região de Luminárias, durante a estação seca

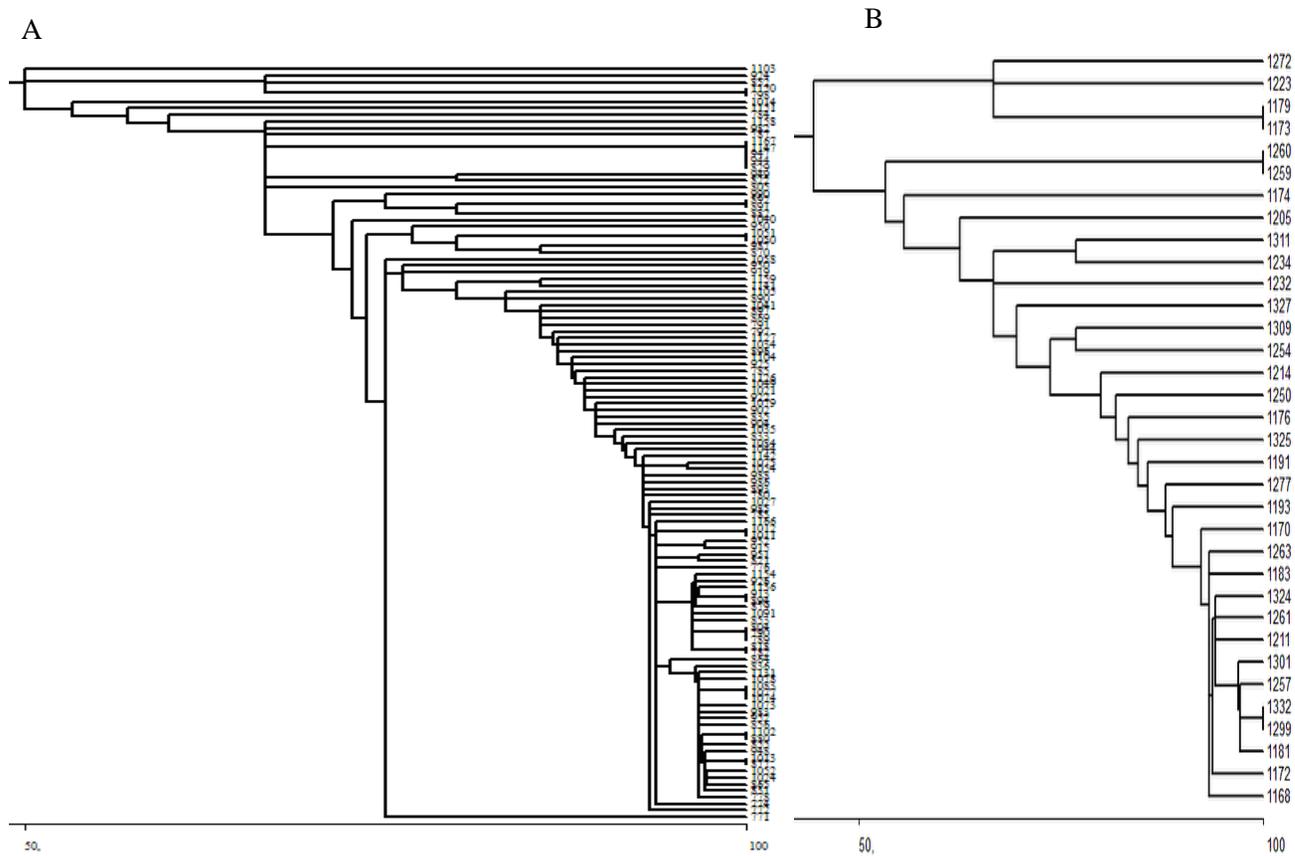


Figura 7 Dendrogramas dos isolados obtidos pelo plaqueamento em meio Aaronson's (A) e vitamina-ácido húmico (B) de solos da região de Passos, durante a estação seca

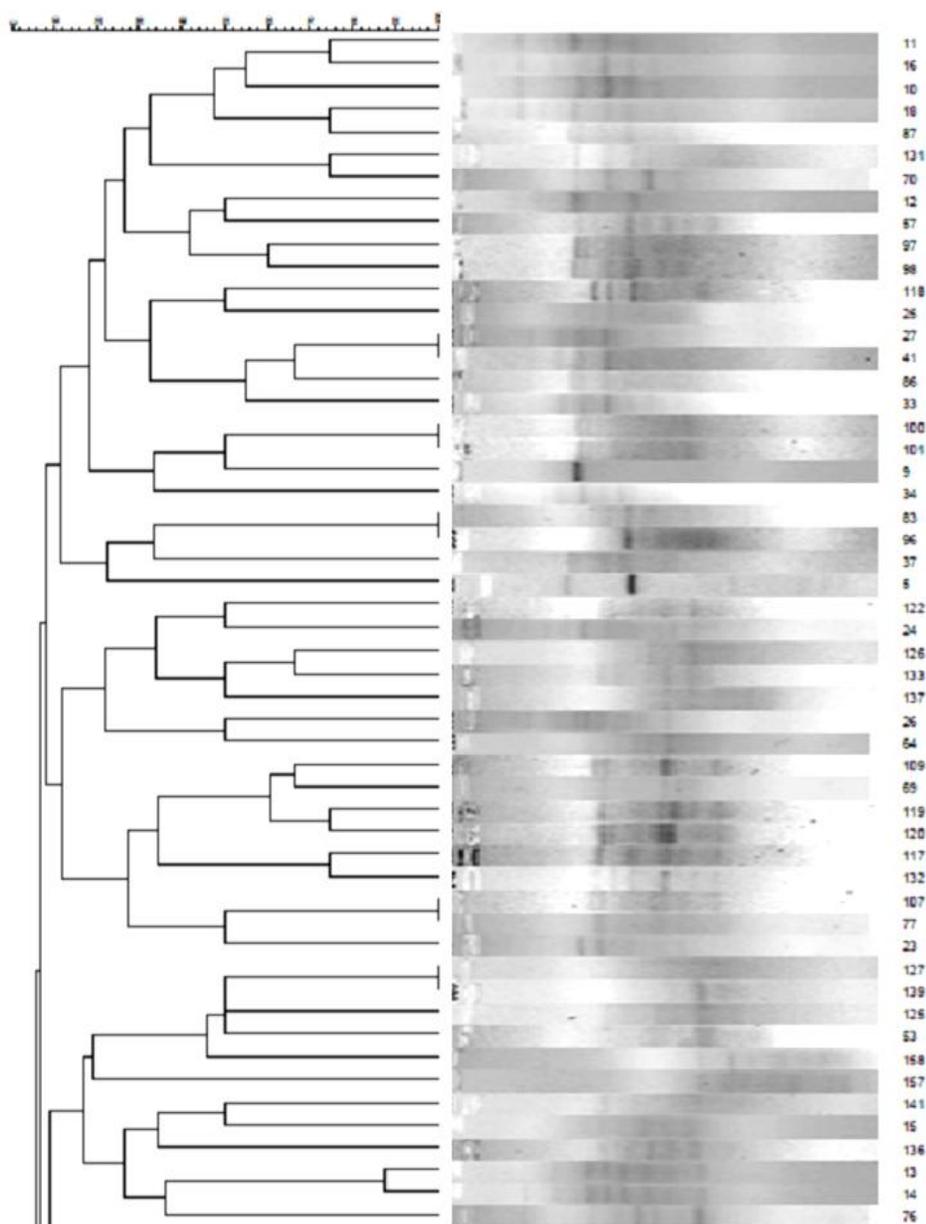
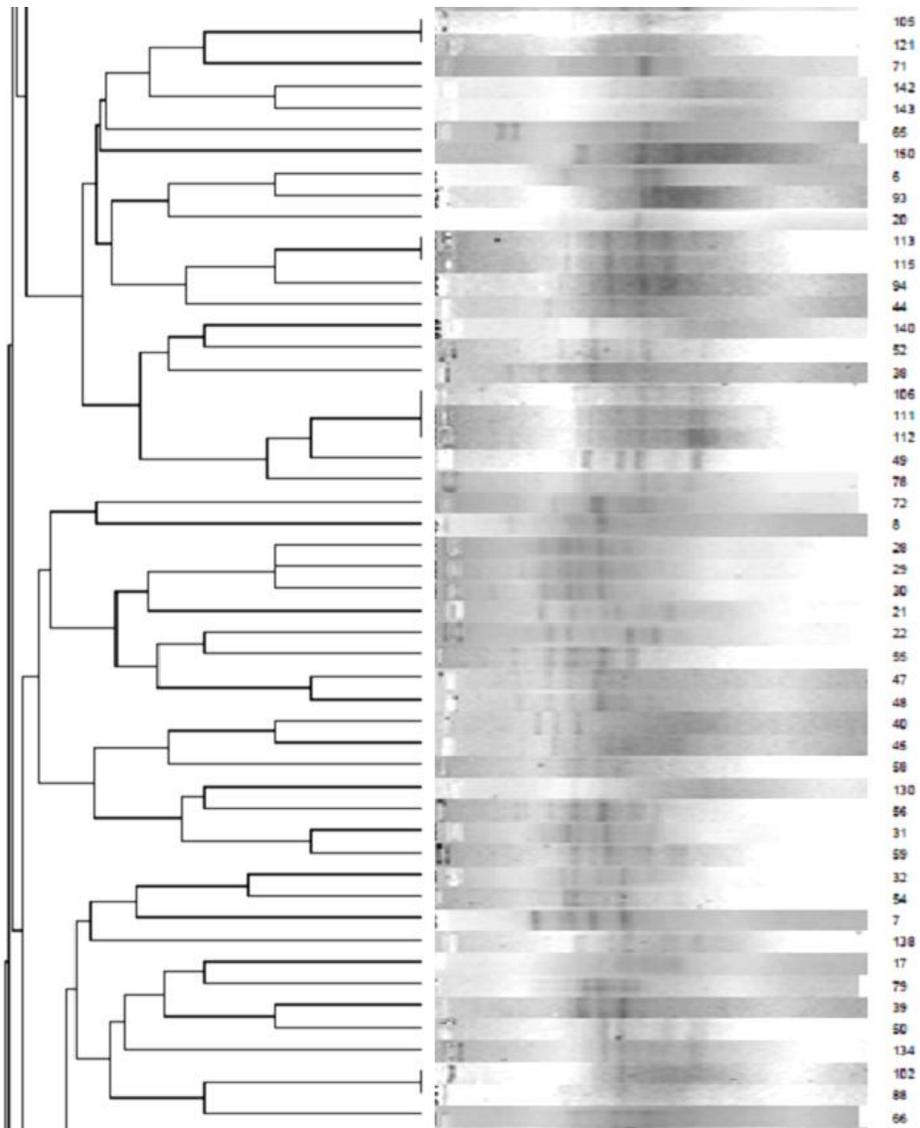
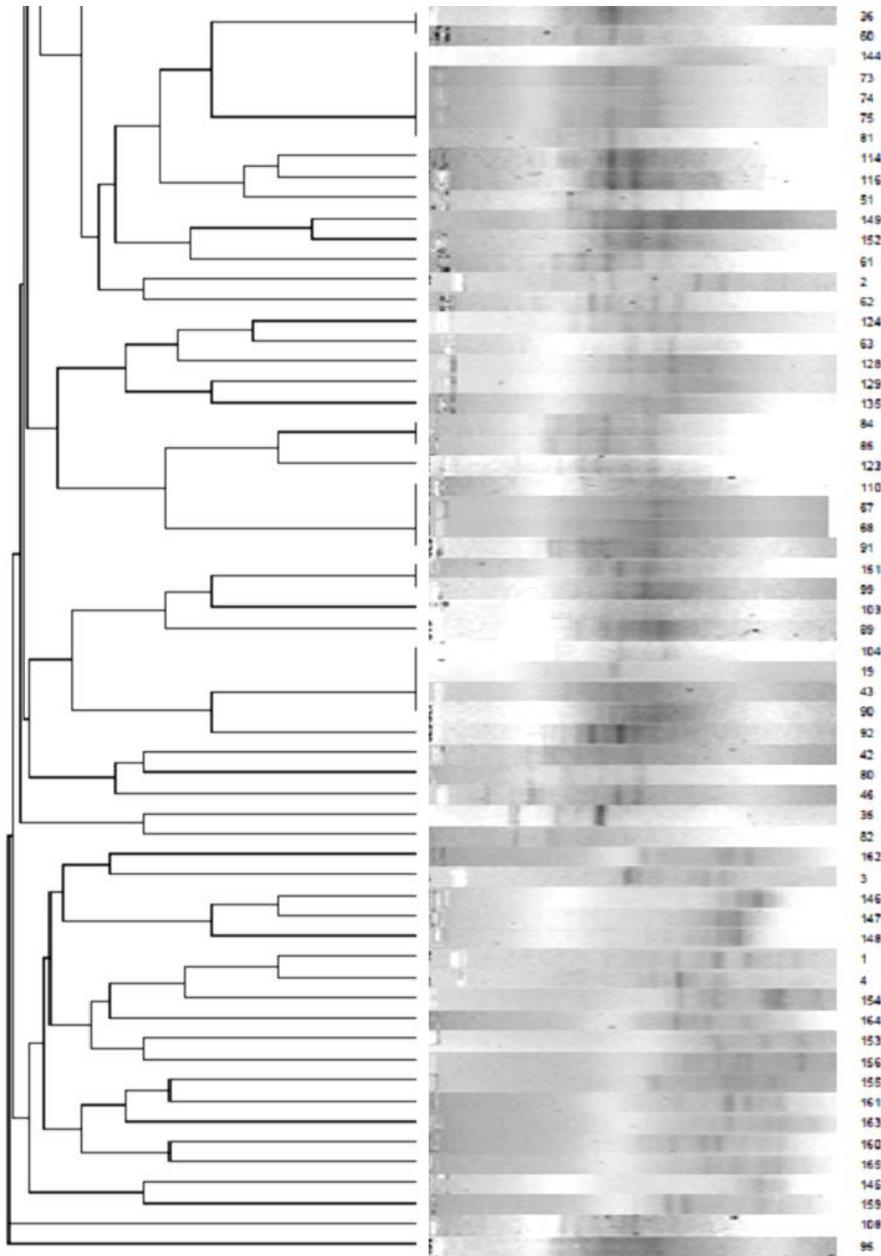


Figura 8 Análise de similaridade entre os perfis de banda (REP-PCR) dos isolados cultiváveis de solos do cerrado das três regiões: Arcos, Passos e Luminárias, MG e a identificação das espécies encontradas pertencentes ao filo Actinobacteria. 2- *Microbacterium* sp.; 4, 6- *Arthrobacter* sp.4N2-2; 9- *Microbacterium azadirachtae*,

Microbacterium phyllosphaerae; 10, 11, 12, 152, 153- *Arthrobacter alkaliphilus*; 15- *Streptomyces castaneoglobisporus*; 16 - *Arthrobacter* sp. S2.TSA.004; 17 - *Leifsonia shinshuensis*; 25- *Streptomyces gilvosporeus*, *Streptomyces natalensis*, *Streptomyces albulus*; 31- *Arthrobacter* sp. ACT2K; 33, 60, 61- *Arthrobacter ramosus*; 38- *Arthrobacter* sp. S2.TSA.004; 49, 51- *Streptomyces* sp. HB200; 52, 54- bacterium Ellin5075; 57, 62- *Amycolatopsis rubida*; 128, 129, 131- *Microbacterium phyllosphaerae*; 130- *Streptomyces* sp. BK14; 133- *Arthrobacter nitroguajacolicus*, *Arthrobacter boritolerans*, *Arthrobacter ilicis*; 164 - *Arthrobacter* sp. S2.TSA.004; 165- *Streptomyces chromofuscus*

(...continua...)





A maior diversidade de gêneros de Actinobacteria foi encontrada no meio Aaronson's, na região de Arcos (Figura 9 a 11) e, em conjunto com o meio vitamina-ácido húmico, apresentou a maior riqueza de espécies dentre as três regiões (apêndice 4). *Streptomyces*, *Arthrobacter* e *Microbacterium* foram predominantes nos solos analisados, uma vez que são típicas deste hábitat.

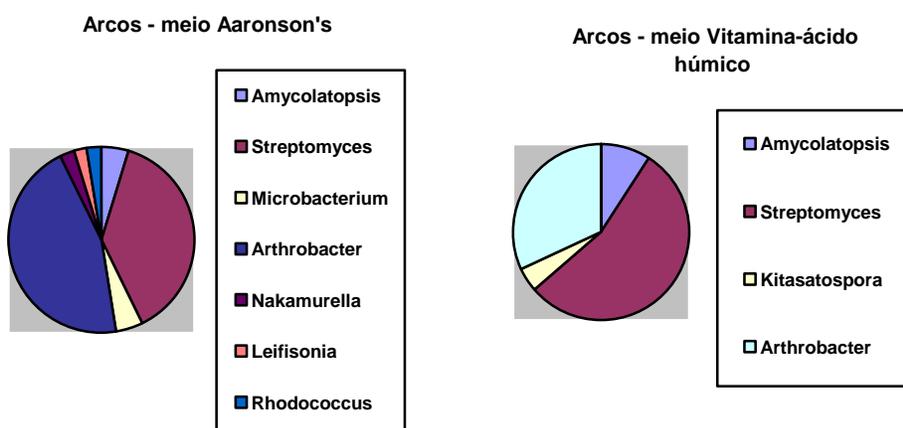


Figura 9 Gêneros de Actinobacteria encontrados em amostras de solos de Arcos – meio Aaronson's e meio vitamina-ácido húmico

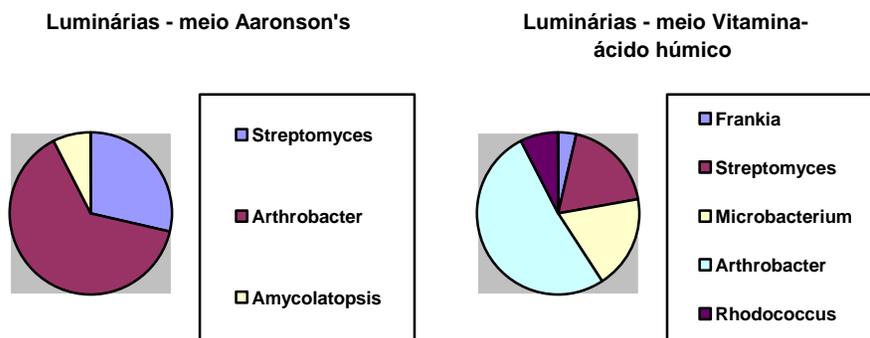


Figura 10 Gêneros de Actinobacteria encontrados em amostras de solos de Luminárias – meio Aaronson's e meio vitamina-ácido húmico

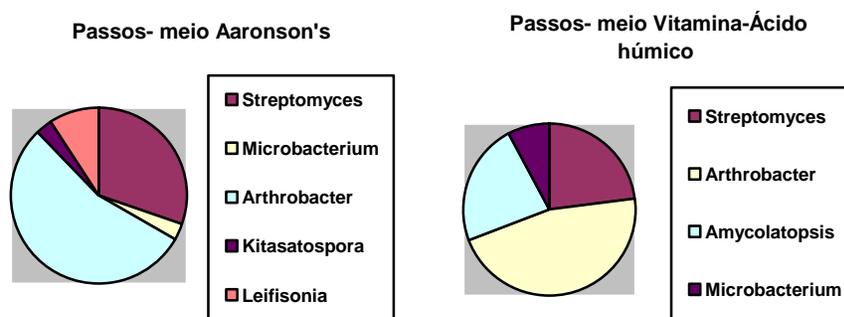


Figura 11 Gêneros de Actinobacteria encontrados em amostras de solos de Passos – meio Aaronson's e meio vitamina-ácido húmico

Membros do gênero *Arthrobacter* são amplamente distribuídos nos ecossistemas, podendo ser isolados de ambientes como ar, água (doce e salgada), solos, óleo, infecções transmitidas pelo ar, folhas de tabaco, pele humana, pinturas, esgoto e lodo ativado (CONN; DIMMICK, 1947; HEYRMAN et al., 2005; KOCH et al., 1995; LI et al., 2004; MARGESIN et al., 2004; RZECHOWSKA, 1976; SGUROS, 1955; SKERMAN et al., 1980; STACKEBRANDT et al., 1983; TAKEUCHI; YOKOTA, 1991; WESTERBERG et al., 2000; citados por DING; HIROSE; YOKOTA, 2009). Exibem grande versatilidade metabólica, sendo capazes de degradar poluentes e xenobióticos, tais como os metais pesados (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, V e Zn) (BAFANA et al., 2010). Uma das espécies identificadas neste trabalho, presente em Arcos, foi *Arthrobacter ramosus*, envolvida na síntese de protease, enzima importante para indústria alimentícia, farmacêutica, indústria de couro e de detergentes (NILEGAONKAR et al., 2002). Apresenta grande resistência a uma diversidade de metais pesados, podendo ser utilizada em processos de biorremediação (BAFANA et al., 2010).

O gênero *Streptomyces* representa uma considerável proporção da comunidade de actinobactérias do solo, intrinsecamente ligada à qualidade e à

função do mesmo. Tem sido o foco de pesquisas, não somente devido à aplicabilidade comercial das substâncias produzidas como também pela sistemática desse grupo, que tem sofrido modificações com os avanços da biologia molecular (SOUZA et al., 2008). Dentre as espécies isoladas, destaca-se *Streptomyces cavourensis*, produtor do antibiótico Cromomicina (SKARBEEK; BRADY, 1978) e *Streptomyces michiganensis*, envolvida na síntese de substâncias anti-helmínticas e antiprotozoários (CASSINELLI et al., 1970) encontrados nos solos de Arcos.

Microbacterium, assim como os outros dois gêneros mais abundantes encontrados neste trabalho, apresenta habitats ubíquos. Eles podem ser isolados do ar, do solo, da água, de fungos, de plantas e de humanos (LIN et al., 2012). Muitos apresentam significância na saúde humana, na indústria, na agricultura, no ambiente, na bioengenharia e na biotecnologia (FUNKE et al., 1997; KAKU et al., 2000; LAFFINEUR et al., 2003 citados por LIN et al., 2012), bem como aplicabilidade na produção de exopolissacarídeo (MATSUYAMA et al., 1999 citados por LIN et al., 2012), degradação de óleo (SCHIPPERS et al., 2005 citados por LIN et al., 2012), degradação de xilana (KIM et al., 2005 citados por LIN et al., 2012), tolerância a metais pesados (ACHOUR-ROKBANI et al., 2010 citados por LIN et al., 2012), produção de biossurfactantes (ANISZEWSKI et al., 2010; ORTEGA-MORALES et al., 2007 citados por LIN et al., 2012), degradação de dimetilsulfeto (SHU; CHEN, 2009 citados por LIN et al., 2012), degradação de lactona (MOROHOSHI et al., 2009; WANG et al., 2010 citados por LIN et al., 2012) e promotor de crescimento em plantas (MADHAIYAN et al., 2010; SHENG et al., 2009 citados por LIN et al., 2012). Uma das espécies encontradas nas três regiões foi *Microbacterium phyllosphaera*, a qual, em associação com *Burkholderia* sp. e *Candida tropicalis*, realiza processos de degradação de clorofenóis de baixo peso molecular. Essa substância é comumente utilizada pela indústria química como produto intermediário na

síntese de inseticida, fungicida e herbicida, provocando sérios danos ambientais (SALMERON-ALCOCER et al., 2007).

A utilização conjunta dos meios de cultura Aaronson's e vitamina-ácido húmico provou ser eficiente para a obtenção de maior diversidade de actinobactérias. O meio ácido-húmico confirmou o seu propósito de isolar bactérias filamentosas, enquanto o de Aaronson's permitiu o crescimento de ambas, bactérias filamentosas e cremosas.

Os solos de cerrado brasileiro apresentam peculiaridades ainda não muito bem elucidadas e uma riqueza de novas espécies de actinobactérias não identificadas e exploradas (AZEREDO et al., 2004). Sendo assim, constituem importante fonte de enzimas e substâncias bioativas, possivelmente com potencial aplicação biotecnológica. Nesta pesquisa foram abordadas apenas algumas espécies de Actinobactérias com aplicação industrial e, devido à diversidade das espécies encontradas envolvidas em processo biotecnológicos, é um fato sugestivo para pesquisas futuras, visando investigar a possível produção e aplicabilidade dessas espécies.

Conclusão

As diferenças na composição química e no pH dos solos podem ter interferido na população de Actinobactérias, uma vez que pH baixo restringe o crescimento bacteriano. Tal fato é observado pelas diferenças populacionais obtidas em cada região amostrada. Os solos da região de Passos apresentaram maior densidade bacteriana em relação aos solos de Arcos e Luminárias, cujo pH e concentração de matéria orgânica eram levemente inferiores. A textura dos solos pode ser outro fator a influenciar a população de Actinobactéria, uma vez que elas predominam em solos áridos. Grande parte das actinobactérias tem pigmentos carotenoides e melanoídes que as protegem da exposição à radiação

ultravioleta, enquanto, em solos úmidos, os principais microrganismos colonizadores são as proteobactérias, organismos tipicamente aquáticos. Dessa forma, os solos de Passos, que apresentaram textura média, intermediária entre argilosa e arenosa, podem ter favorecido o predomínio de bactérias do filo Actinobacteria, em detrimento das bactérias de outros filios.

Os meios de cultura utilizados provaram ser eficientes para o estudo de diversidade de Actinobacteria presentes em solos. O meio de cultura vitamina-ácido húmico foi eficiente para o crescimento de bactérias filamentosas, enquanto o meio de cultura Aaronson's possibilitou o crescimento de ambas as bactérias, filamentosas e cremosas.

A técnica de REP-PCR foi eficaz para agrupar as espécies de Actinobacteria, podendo ser recomendada para pesquisas de identificação de actinobactérias. Os resultados do sequenciamento mostraram grande variedade de espécies de Actinobacteria com aplicação biotecnológica, sugerindo investigações futuras. Os resultados do sequenciamento também apresentaram espécies bacterianas de outros filios, mencionadas no Apêndice 5.

REFERÊNCIAS

- AZEREDO, L. A. I. et al. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, n. 3/4, p. 354-358, Mar. 2004.
- BAFANA, A. et al. Heavy metal resistance in *Arthrobacter ramosus* strain G2 isolated from mercuric saltcontaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 15, n. 177, p. 481-486, May 2010.
- CASSINELLI, G. et al. Thaimicins: new anthelmintic and atiprotozoal antibiotics produced by *Streptomyces michiganensis* var. amylolyticus var. nova. **Archivs Mikrobiologic**, New York, v. 70, n. 3, p. 197-210, 1970.
- DAVIS, K. E. R.; JOSEPH, S. J.; JANSSEN, P. H. Effect of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 826-834, Apr. 2005.
- DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Isolamento e identificação de leveduras. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. (Org.). **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA, 2010. p. 227-277.
- DING, L.; HIROSE, T.; YOKOTA, A. Four novel *Arthrobacter* species isolated from filtration substrate. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, n. 4, p. 856-862, Apr. 2009.
- DOBROVOL'SKYA, T. G. et al. Analysis of soil bacterial diversity: methods, potentialyitis and prospects. **Microbiology**, New York, v. 70, n. 1, p. 119-132, Jan. 2001.
- EMBLEY, T. M.; STACKEBRANDT, E. The molecular phylogeny and systematics of the Actinomycetes. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 48, p. 257-289, Oct. 1994.
- GAO, B.; PARAMANATHAN, R.; GUPTA, R. S. Signature proteins that are distinctive characteristics of Actinobacteria and their subgroups. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 69-91, Jan. 2006.

- GOMES, J. B. V. Análise de componentes principais de atributos físicos, químicos e mineralógicos de solos do bioma cerrado. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 137-153, jan./fev. 2004.
- GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of Actinomycetes. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 37, p. 189-216, Oct. 1983.
- HAYAKAWA, M.; NANOMURA, H. Humic acid-vitamin agar, a new médium for the selective isolation of soil actinomycetes. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v. 65, p. 501-509, 1987.
- HAYAKAWA, M.; YOSHIDA, Y.; LIMURA, Y. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 5, p. 973-981, Jan. 2004.
- HOZZEIN, W. N.; ALI, M. I. A.; RABIE, W. A new preferential médium for enumeration and isolation of desert actinomycetes. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 1547-1552, Jan. 2008.
- KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 65-76, Jan. 1999.
- LIN, L. et al. The actinobacterium *Microbacterium* sp. 16SH accepts pBBR1-based pPROBE vectors, forms biofilms, invades roots, and fixes N₂ associated with micropropagated sugarcane plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 93, n. 3, p. 1185-1195, Feb. 2012.
- LO, C. W. et al. **Actinomycetes isolated from soil samples from the Crocker range sabah**. Frankfurt: ABERC, 2002. 7 p.
- MCALEECE, N. et al. **Biodiversity professional statistics analysis software**. London: Scottish Association for Marine and Natural History Museum, 1997.
- MIAO, V.; DAVIES, J. Actinobacteria: the good, the bad and the ugly. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 143-150, Aug. 2010.
- MOHAPATRA, B. R.; BROERSMA, K.; MAZUMDER, A. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 277, n. 1, p. 98-106, Dec. 2007.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Basic Local Alignment Search Tool - BLAST**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acesso em: 10 dez. 2011.

NILEGAONKAR, S. S. et al. Production, isolation and characterization of extracellular protease of an alkaliphilic strain of *Arthrobacter ramosus*, MCM B-351 isolated from the alkaline lake of Lonar, India. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 18, n. 8, p. 785-789, Aug. 2002.

OTOGURO, M. et al. An integrated method for the enrichment and selective isolation of *Actinokineopora* spp. In soil and plant litter. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 1, p. 118-130, July 2001.

PEREIRA, A. A. et al. Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 31, n. 6, p. 1397-1412, nov./dez. 2007.

PEREIRA, G. V. M. et al. Use of specific PCR primers to identify three important industrial species of *Saccharomyces* genus: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*. **Applied Microbiology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 131-137, Aug. 2010.

SALMERON-ALCOCER, A. et al. Continuous biodegradation of single and mixed chlorophenols by a mixed microbial culture constituted by *Burkholderia* sp., *Microbacterium phyllosphaerae*, and *Candida tropicalis*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 37, n. 2, p. 201-211, Nov. 2007.

SILVA, C. F. et al. Microbial diversity in a bagasse-based compost prepared for the production of *Agaricus brasiliensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 590-600, Sept. 2009.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods of characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.

SKARBEK, J. D.; BRADY, L. R. *Streptomyces cavourensis* sp. nov. (nom. rev.) and *Streptomyces cavourensis* subsp. *washingtonensis* subsp. nov., a Chromomycin-Producing Subspecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 28, n. 1, p. 45-53, Jan. 1978.

SNELLING, A. M. et al. Validation of use of whole-cell repetitive method to the investigation of a hospital baumannii complex and application of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter* (REP-PCR) for typing strains belonging to the extragenic palindromic sequence-based PCR outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 5, p. 1193-1202, Sept. 1996.

SOUZA, R. F. et al. *Streptomyces lunalinharesii* sp. nov., a chitinolytic streptomycete isolated from cerrado soil in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 12, p. 2774-2778, Dec. 2008.

STACH, J. E. M. et al. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. **Environmental Microbiology**, London, v. 5, n. 10, p. 828-841, Oct. 2003.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 47, n. 2, p. 479-491, Apr. 1997.

STACKEBRANDT, E.; SCHUMANN, P. **Introduction to the taxonomy of Actinobacteria**. 3rd ed. Berlin: Prokaryotes, 2006. 1111 p.

VAL-MORAES, S. P. et al. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 40, n. 1, p. 7-16, 2009.

VENTURA, M. et al. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 71, n. 3, p. 495-548, Mar. 2007.

APÊNDICE

Apêndice 1.

Fórmula meio de cultura Aaronson's g/L

KNO ₃	2,0
Caseína	0,8
NaCl	2,0
K ₂ HPO ₄	2,0
MgSO ₄ .H ₂ O	0,50
CaCO ₃	20,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	40,0
Ágar	20,0

Apêndice 2.

Fórmula meio de cultura vitamina-ácido húmico g/L

Ácido húmico	1,0 g/l	(dissolver em 10 ml 0,2 N NaOH)
NaHPO ₄	0,5g/l	
KCl	1,7 g/l	
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,05 g/l	
FeSO ₄ . 7H ₂ O	10 ,0 mg/l	
CaCO ₃	10,0 mg/l	
Ágar	15,0 g/l	

Ajustar pH 7,2

Solução de vitaminas 0,5 ml/100 ml meio

Tiamina HCl	0,00005%
Riboflavina	0,00005%
Niacina	0,00005%

Apêndice 2, continuação

Pirodoxina HCl	0,00005%
Inositol	0,00005%
Ca-pantotenato	0,00005%
Ácido p-aminobenzoico	0,00005%
Biotina	0,000025%

Depois de autoclavado e resfriado, acrescentar a solução de vitaminas filtrada-esterilizada ao meio.

Apêndice 3.

Meio de cultura basal para teste de assimilação de fontes de carbono

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64 g/L
KH ₂ PO ₄	2,38 g/L
K ₂ HPO ₄	4,31 g/L
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,0 g/L
Solução I	1 ml/L

Solução I – solução de elementos traço

CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,64 g/L
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,11 g/L
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,15 g/L
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,79 g/L

Apêndice 4

Tabela contendo as espécies de Actinobacteria encontradas nos distintos meios das regiões de Arcos, Luminárias e Passos, durante estação de baixa pluviosidade

Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
Arcos meio Aaronson's			
UFLA B ces 1	<u>AM039435.1</u>	<i>Arthrobacter ramosus</i>	97%
UFLA B ces 2	<u>AB327251.1</u>	<i>Amycolatopsis albidoflavus</i>	97%
UFLA B ces 3	<u>NR_025083.1</u>	<i>Arthrobacter methylotrophus</i>	97%
UFLA B ces 4	<u>HQ021203.1</u>	<i>Amycolatopsis hippodromi</i>	97%
UFLA B ces 6	<u>HQ607438.1</u>	<i>Streptomyces</i> <i>castaneoglobisporus</i>	98%
UFLA B ces 7	<u>NR_043851.1</u>	<i>Streptomyces cavourensis subsp.</i> <i>cavourensis</i>	98%
UFLA B ces15	<u>AM039435.1</u>	<i>Arthrobacter ramosus</i>	97%
UFLA B ces16	<u>HQ833039.1</u>	<i>Microbacterium</i> sp. 4N2-2	97%
UFLA B ces18	<u>AB248530.1</u>	<i>Arthrobacter</i> sp. LC9	97%
UFLA B ces 28	<u>NR_041071.1</u>	<i>Streptomyces michiganensis</i>	98%
UFLA B ces 28	<u>NR_043847.1</u>	<i>Streptomyces xanthochromogenes</i>	98%
UFLA B ces 36	<u>NR_025083.1</u>	<i>Arthrobacter methylotrophus</i>	97%
UFLA B ces 51	<u>AB184452.2</u>	<i>Streptomyces</i> <i>castaneoglobisporus</i>	97%
UFLA B ces 53	<u>EU912487.1</u>	<i>Microbacterium azadirachtae</i>	97%
	<u>JF700409.1</u>	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	

Apêndice 4, continuação

Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
UFLA B ces 54	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
UFLA B ces 56	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
UFLA B ces 60	<u>NR_043847.1</u>	<i>Streptomyces xanthochromogenes</i>	97%
	<u>NR_041071.1</u>	<i>Streptomyces michiganensis</i>	
UFLA B ces 63	<u>AB184452.2</u>	<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	97%
UFLA B ces 65	<u>CP001737.1</u>	<i>Nakamurella multipartita</i> DSM 44233	100%
UFLA B ces 66	<u>HM063855.1</u>	<i>Arthrobacter</i> sp. S2.TSA.004	98%
UFLA B ces 68	<u>DQ334864.1</u>	<i>Leifsonia shinshuensis</i>	99%
UFLA B ces 79	<u>EU841608.1</u>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	97%
	<u>NR_041177.1</u>	<i>Streptomyces crystallinus</i>	
		<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	
	<u>EU594477.1</u>		
UFLA B ces 93	<u>AB045861.1</u>	<i>Streptomyces microflavus</i>	97%
	<u>HQ680451.1</u>	<i>Streptomyces termitum</i>	
	<u>AY999741.1</u>	<i>Streptomyces showdoensis</i>	
UFLA B ces 94	<u>GQ181046.1</u>	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	97%
UFLA B ces 95	<u>DQ487015.1</u>	<i>Streptomyces</i> sp. 4728	97%

Apêndice 4, continuação

Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
	<u>HQ995503.1</u>	<i>Streptomyces anulatus</i>	
	<u>CP002475.1</u>	<i>Streptomyces flavogriseus</i>	
UFLA B ces 98	<u>FJ486284.1</u>	<i>Streptomyces chromofuscus</i>	98%
UFLA B ces 100	<u>FJ196597.1</u>	<i>Streptomyces gilvosporeus</i>	98%
	<u>AB184356.2</u>	<i>Streptomyces natalensis</i>	
		<i>Streptomyces albulus</i>	
	<u>JN566022.1</u>		
UFLA B ces 108	<u>AB248530.1</u>	<i>Arthrobacter</i> sp. LC9	96%
	<u>AM237085.1</u>	<i>Arthrobacter</i> sp. 21S1	97%
UFLA B ces 110	<u>HM587731.1</u>	<i>Arthrobacter</i> sp. ACT2K	98%
UFLA B ces 125			
UFLA B ces 127	<u>AB184761.2</u>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	97%
	<u>NR_041177.1</u>	<i>Streptomyces crystallinus</i>	
		<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	
	<u>FJ799175.1</u>	<i>Streptomyces melanogenes</i>	
	<u>NR_041089.1</u>		
UFLA B ces 129	<u>AM039435.1</u>	<i>Arthrobacter ramosus</i>	97%
UFLA B ces 130	<u>HM063919.1</u>	<i>Arthrobacter</i> sp. S5.TSA.012	97%
UFLA B ces 135	<u>FJ486284.1</u>	<i>Streptomyces chromofuscus</i>	97%
UFLA B ces 137	<u>FR874236.1</u>	<i>Arthrobacter</i> sp. J9	97%

Apêndice 4, continuação

Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
UFLA B ces 138	AM039435.1	<i>Arthrobacter ramosus</i>	97%
UFLA B ces 141	AM039435.1	<i>Arthrobacter ramosus</i>	97%
UFLA B ces 142	AM039435.1	<i>Arthrobacter ramosus</i>	97%
UFLA B ces 147	HM230830.1	<i>Streptomyces globosus</i>	97%
UFLA B ces 148	HM063855.1	<i>Arthrobacter</i> sp. S2.TSA.004	99%
UFLA B ces 151	HQ202829.1	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	97%
	GU726138.1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	
		<i>Rhodococcus globerulus</i>	
	HM217119.1		
Arcos – Meio vitamina-ácido húmico			
UFLA B ces 156	NR_041401.1	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
UFLA B ces 162	HQ610450.1	<i>Streptomyces cavourensis</i>	97%
	FJ792550.1	<i>Streptomyces bacillaris</i>	
	JN180187.1	<i>Streptomyces mauvecolor</i>	
UFLA B ces 165	AM039435.1	<i>Arthrobacter ramosus</i>	97%
UFLA B ces 170	AB184798.1	<i>Streptomyces rameus</i>	97%
	AB184534.1	<i>Streptomyces spinichromogenes</i>	97%
UFLA B ces 171	AY999735.1	<i>Streptomyces michiganensis</i>	98%
UFLA B ces 173	EU741111.1	<i>Streptomyces gelaticus</i>	97%

Apêndice 4, continuação

Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
	<u>FJ486374.1</u>	<i>Streptomyces pulveraceus</i>	97%
	<u>AB184497.1</u>	<i>Streptomyces nodosus</i> subsp. <i>asukaensis</i>	
UFLA B ces 175	<u>GQ863917.1</u>	<i>Streptomyces</i> sp. HB200	97%
UFLA B ces 181	<u>NR_025083.1</u>	<i>Arthrobacter methylotrophus</i>	97%
	<u>GU171380.1</u>	<i>Arthrobacter aurescens</i>	
	<u>HQ202810.1</u>	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	
UFLA B ces 184	<u>AY234492.1</u>	<i>bacterium</i> Ellin5075	99%
UFLA B ces 190	<u>AY234492.1</u>	<i>bacterium</i> Ellin5075	99%
UFLA B ces 191	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
UFLA B ces 193	<u>NR_025072.1</u>	<i>Amycolatopsis rubida</i>	97%
UFLA B ces 205	<u>HQ021203.1</u>	<i>Amycolatopsis hippodromi</i>	97%
	<u>HQ021202.1</u>	<i>Amycolatopsis circi</i>	97%
	<u>HQ021204.1</u>	<i>Amycolatopsis equine</i>	97%
UFLA B ces 206	<u>AM039435.1</u>	<i>Arthrobacter ramosus</i>	97%
UFLA B ces 212	<u>HQ680451.1</u>	<i>Streptomyces termitum</i>	98%
	<u>FJ972687.1</u>	<i>Streptomyces laurentii</i>	
	<u>EU124781.1</u>	<i>Streptomyces showdoensis</i>	
UFLA B ces 218	<u>EF657884.1</u>	<i>Streptomyces</i> sp. RB72	97%
UFLA B ces 221	<u>NR_043370.1</u>	<i>Streptomyces xanthocidicus</i>	97%

Apêndice 4, continuação

Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
	<u>AB184594.1</u>	<i>Streptomyces tsukiyonensis</i>	
UFLA B ces 223	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
	<u>NR_025083.1</u>	<i>Arthrobacter methylotrophus</i>	
UFLA B ces 232	<u>AM039435.1</u>	<i>Arthrobacter ramosus</i>	97%
UFLA B ces 249	<u>AJ781341.1</u>	<i>Kitasatospora kifunensis</i>	97%
UFLA B ces 253	<u>HM062992.1</u>	<i>Streptomyces recifensis</i>	97%
UFLA B ces 257	<u>JF915307.1</u>	<i>Streptomyces mauvecolor</i>	97%
Luminárias meio Aaronson's			
UFLA B ces 260	<u>EU741111.1</u>	<i>Streptomyces gelaticus</i>	97%
UFLA B ces 268	<u>AM039435.1</u>	<i>Arthrobacter ramosus</i>	97%
UFLA B ces 270	<u>HQ021203.1</u>	<i>Amycolatopsis hippodromi</i>	97%
	<u>HQ021202.1</u>	<i>Amycolatopsis circi</i>	
	<u>HQ021204.1</u>	<i>Amycolatopsis equina</i>	
UFLA B ces 276	<u>GQ284335.1</u>	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	97%
UFLA B ces 296	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
UFLA B ces 313	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
	<u>HQ202810.1</u>	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	
	<u>JN662517.1</u>	<i>Arthrobacter aurescens</i>	

Apêndice 4, continuação

Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
	<u>NR_025083.1</u>	<i>Arthrobacter methylotrophus</i>	97%
		<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	
	<u>HQ202809.1</u>		
UFLA B ces 329	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilu</i>	97%
UFLA B ces 347	<u>FJ492849.1</u>	<i>Streptomyces</i> sp. SIIA 2050	97%
UFLA B ces 360	<u>HM587728.1</u>	<i>Arthrobacter</i> sp. ACT2G	97%
UFLA B ces 371	<u>FR692071.1</u>	<i>Streptomyces</i> sp. BK14	97%
UFLA B ces 387	<u>AB184461.2</u>	<i>Streptomyces roseogriseus</i>	97%
		<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	
	<u>EU367978.1</u>	<i>Streptomyces corchorusii</i>	
		<i>Streptomyces olivaceoviridis</i>	
	<u>FJ461617.1</u>		
	<u>NR_041108.1</u>		
UFLA B ces 460	<u>NR_025083.1</u>	<i>Arthrobacter methylotrophus</i>	97%
		<i>Arthrobacter aurescens</i>	
	<u>GU171380.1</u>		
UFLA B ces 482	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
		<i>Arthrobacter methylotrophus</i>	
	<u>NR_025083.1</u>		
Luminárias meio vitamina-ácido húmico			
UFLA B ces 506	<u>AM039435.1</u>	<i>Arthrobacter ramosus</i>	97%
	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	

Apêndice 4, continuação

Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
UFLA B ces 512	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
UFLA B ces 523	<u>AM039435.1</u>	<i>Arthrobacter ramosus</i>	97%
UFLA B ces 539	<u>AM039435.1</u>	<i>Arthrobacter ramosus</i>	97%
UFLA B ces 545	<u>JF768719.1</u>	<i>Microbacterium</i> sp. PSSUR4	97%
UFLA B ces 547	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
UFLA B ces 554	<u>CT573213.2</u>	<i>Frankia alni</i> ACN14a	100%
UFLA B ces 579	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
UFLA B ces 584	<u>AY999741.1</u>	<i>Streptomyces showdoensis</i>	97%
		<i>Streptomyces termitum</i>	
	<u>EU521702.1</u>	<i>Streptomyces violaceorectus</i>	
	<u>EU570697.1</u>	<i>Streptomyces lipmanii</i>	
	<u>AB045861.1</u>	<i>Streptomyces laurentii</i>	
	<u>FJ972687.1</u>		
UFLA B ces 588	<u>DQ026664.1</u>	<i>Streptomyces carpinensis</i>	97%
UFLA B ces 590	<u>AM039435.1</u>	<i>Arthrobacter ramosus</i>	97%
UFLA B ces 620	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
UFLA B ces 621	<u>JF700409.1</u>	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	98%
		<i>Microbacterium azadirachtae</i>	
	<u>EU912487.1</u>		
UFLA B ces 622	<u>AM039435.1</u>	<i>Arthrobacter ramosus</i>	97%
UFLA B ces 635	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%

Apêndice 4, continuação

Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
	<u>AM039435.1</u>	<i>Arthrobacter ramosus</i>	97%
UFLA B ces 670	<u>AF467106.1</u>	<i>Arthrobacter aurescens</i>	97%
	<u>FN908764.1</u>	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	
UFLA B ces 680	<u>AB288059.1</u> <u>AB184452.2</u>	<i>Arthrobacter boritolersans</i> <i>Streptomyces</i> <i>castaneoglobisporus</i>	97%
	<u>NR_041105.1</u>	<i>Streptomyces malachitofusus</i>	
UFLA B ces 681	<u>FN908764.1</u>	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	97%
	<u>JF700433.1</u>	<i>Arthrobacter aurescens</i>	
	<u>AB288059.1</u>	<i>Arthrobacter boritolersans</i>	
UFLA B ces 685	<u>EF608231.1</u>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	97%
	<u>HQ202829.1</u>	<i>Rhodococcus qingshengii</i> <i>Rhodococcus globerulus</i>	
UFLA B ces 692	<u>GU332596.1</u>		
	<u>JN382214.1</u>	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	98%
UFLA B ces 697	<u>JF700409.1</u>	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	98%
UFLA B ces 729	<u>FR692071.1</u>	<i>Streptomyces</i> sp. BK14	97%
UFLA B ces 734	<u>JF700409.1</u>	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	97%
UFLA B ces 741	<u>EU841581.1</u>	<i>Streptomyces aureus</i>	97%

Apêndice 4, continuação

Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
UFLA B ces 754	<u>AB649017.1</u>	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	97%
UFLA B ces 759	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
UFLA B ces 761	<u>JF700409.1</u>	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	97%
Passos meio Aaronson's			
UFLA B ces 772	<u>FN908764.1</u>	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	98%
	<u>AB288059.1</u>	<i>Arthrobacter boritolerans</i>	
	<u>FR870442.1</u>	<i>Arthrobacter ilicis</i>	
UFLA B ces 774	<u>NR_025083.1</u>	<i>Arthrobacter methylotrophus</i>	97%
		<i>Arthrobacter aurescens</i>	
UFLA B ces 783	<u>GU171380.1</u>	<i>Arthrobacter oxydans</i>	97%
UFLA B ces 793	<u>DQ122301.1</u>	<i>Streptomyces yokosukanensis</i>	97%
	<u>NR_043496.1</u>		
	<u>AB184473.2</u>	<i>Streptomyces griseochromogenes</i> subsp. <i>suitaensis</i>	
	<u>AB184472.2</u>	<i>Streptomyces globifer</i>	
	<u>AB045858.1</u>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	
UFLA B ces 821	<u>NR_025083.1</u>	<i>Arthrobacter methylotrophus</i>	97%
	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	

Apêndice 4, continuação

Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
UFLA B ces 829	<u>HM230830.1</u>	<i>Streptomyces globosus</i>	97%
	<u>AB184452.2</u>	<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	
	<u>NR_041105.1</u>	<i>Streptomyces malachitofuscus</i>	
UFLA B ces 852	<u>EU841551.1</u>	<i>Streptomyces tendae</i>	97%
	<u>AB184521.1</u>	<i>Streptomyces piomogenus</i>	
	<u>NR_041198.1</u>	<i>Streptomyces stramineus</i>	
	<u>JN180213.1</u>	<i>Streptomyces sannanensis</i>	
UFLA B ces 869	<u>AB184488.1</u>	<i>Streptomyces setonensis</i>	99%
	<u>DQ334864.1</u>	<i>Leifsonia shinshuensis</i>	
UFLA B ces 890	<u>FJ486418.1</u>	<i>Streptomyces setonensis</i>	97%
UFLA B ces 904	<u>EU240417.1</u>	<i>Streptomyces pulveraceus</i>	97%
	<u>EU828545.1</u>	<i>Streptomyces</i> sp. 300b	
UFLA B ces 919	<u>JN866751.1</u>	<i>Streptomyces</i> sp. S-4-11	97%
	<u>FJ481059.1</u>	<i>Streptomyces chartreusis</i>	
	<u>NR_043501.1</u>	<i>Streptomyces prunicolor</i>	
	<u>FR682807.1</u>	<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>	

Apêndice 4, continuação

Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
UFLA B ces 922	GU904704.1	<i>Leifsonia shinshuensis</i>	98%
UFLA B ces 944	NR_041417.1	<i>Streptomyces sanglieri</i>	97%
UFLA B ces 985	U22972.1	<i>Streptomyces</i> sp.	97%
UFLA B ces 1014	JF915307.1	<i>Streptomyces mauvecolor</i>	97%
UFLA B ces 1024	NR_041401.1	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
UFLA B ces 1035	HM063855.1	<i>Arthrobacter</i> sp. S2.TSA.004	99%
UFLA B ces 1041	HM587734.1	<i>Arthrobacter</i> sp. TSA38	97%
UFLA B ces 1049	DQ334864.1	<i>Leifsonia shinshuensis</i>	98%
	EU239168.1	<i>Leifsonia xyli</i>	
UFLA B ces 1052	HM063855.1	<i>Arthrobacter</i> sp. S2.TSA.004	98%
UFLA B ces 058	HQ702486.1	<i>Streptomyces coelicolor</i>	97%
UFLA B ces 1073	HM587737.1	<i>Arthrobacter</i> sp. NA117	97%
UFLA B ces 1074	HM165266.1	<i>Arthrobacter</i> sp. EM0174	97%
UFLA B ces 1075	EU912487.1	<i>Microbacterium azadirachtae</i>	97%
	JF700409.1	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	
UFLA B ces 1078	NR_025083.1	<i>Arthrobacter methylotrophus</i>	97%
	AM039435.1	<i>Arthrobacter ramosus</i>	
UFLA B ces 1079	HM063855.1	<i>Arthrobacter</i> sp. S2.TSA.004	98%
UFLA B ces 1083	NR_041401.1	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
UFLA B ces 1084	AB248530.1	<i>Arthrobacter</i> sp. LC9	97%

Apêndice 4, continuação

Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
UFLA B ces 1102	<u>HM063855.1</u>	<i>Arthrobacter</i> sp. S2.TSA.004	98%
UFLA B ces 1131	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
UFLA B ces 1136	<u>HM063855.1</u>	<i>Arthrobacter</i> sp. S2.TSA.004	98%
UFLA B ces 1141	<u>EU139032.1</u>	<i>Kitasatospora</i> sp. 116A+4	97%
UFLA B ces 1142	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
Pasos meio vitamina-ácido húmico			
UFLA B ces 1179	<u>FJ547130.1</u>	<i>Streptomyces lucensis</i>	97%
	<u>FJ486369.1</u>	<i>Streptomyces ginsengisoli</i>	
UFLA B ces 1181	<u>HM063855.1</u>	<i>Arthrobacter</i> sp. S2.TSA.004	97%
UFLA B ces 1191	<u>HM355745.1</u>	<i>Microbacterium foliorum</i>	97%
	<u>JF700409.1</u>	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	
		<i>Microbacterium aerolatum</i>	
	<u>JF505991.1</u>		
UFLA B ces 1211	<u>NR_025083.1</u>	<i>Arthrobacter methylotrophus</i>	97%

Apêndice 4, continuação

UFLA B ces 1223	<u>AB184460.2</u>	<i>Streptomyces nigrogriseolus</i>	97%
	<u>NR_041172.1</u>	<i>Streptomyces chrysomallus</i> subsp. <i>Fumigatus</i>	
	<u>NR_042292.1</u>	<i>Streptomyces purpureus</i>	
Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
UFLA B ces 1232	<u>AJ781754.1</u>	<i>Streptomyces glomeratus</i>	97%
UFLA B ces 1234	<u>AB184568.1</u>	<i>Streptomyces piloviolofuscus</i>	97%
	<u>HQ021202.1</u>	<i>Amycolatopsis circi</i>	
	<u>HQ021203.1</u>	<i>Amycolatopsis hippodromi</i>	
	<u>HQ021204.1</u>	<i>Amycolatopsis equina</i>	
UFLA B ces 1257 UFLA B ces 1261	<u>AB327251.1</u>	<i>Amycolatopsis albidoflavus</i>	97%
	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	
UFLA B ces 1301 1311 UFLA B ces 1325 UFLA B ces 1332	<u>HM063855.1</u>	<i>Arthrobacter</i> sp. S2.TSA.004	97%
	<u>NR_041401.1</u>	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	97%
	<u>HQ021203.1</u>	<i>Amycolatopsis hippodromi</i>	97%
	<u>HM063871.1</u>	<i>Amycolatopsis</i> sp. S1.CEL.001	97%
	<u>HM063855.1</u>	<i>Arthrobacter</i> sp. S2.TSA.004	99%

Apêndice 5

Tabela contendo as espécies bacterianas encontradas nos distintos meios das regiões de Arcos, Luminárias e Passos, durante estação de baixa pluviosidade.

Arcos meio Aaronson's			
Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
UFLA B ces17	AJ300687.1	<i>Burkholderia</i> sp.14	97%
UFLA B ces 22	HQ238562.1	<i>Bacillus cereus</i>	97%
UFLA B ces 39	AB558205.1	uncultured <i>Burkholderia</i> sp.	97%
UFLA B ces 82	HM566736.1	<i>Bacillus</i> sp. SGE39(2010)	97%
UFLA B ces 132	HM852443.1	<i>Bacillus licheniformis</i>	97%
Arcos – Meio vitamina-ácido húmico			
UFLA B ces 164	HQ238683.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98%
UFLA B ces 201	EU024154.1	<i>Burkholderia graminis</i>	97%
UFLA B ces 222	EF158823.1	<i>Bacillus</i> sp. FRC_Y9-2	97%
UFLA B ces 225	HM854748.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	97%
UFLA B ces 242	JF763856.1	<i>Burkholderia</i> sp. DNBP6-1	98%
UFLA B ces 252	NR_041288.1	<i>Burkholderia ginsengisoli</i>	97%
Luminárias meio Aaronson's			
UFLA B ces 272	JN411393.1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	97%
UFLA B ces 285	FJ605368.1	<i>Pantoea ananatis</i>	100%
UFLA B ces 287	GQ221846.1	<i>Variovorax paradoxus</i>	97%
UFLA B ces 289	GU186109.1	<i>Variovorax paradoxus</i>	97%
UFLA B ces 294	AF288301.1	<i>Alpha proteobacterium</i> 34619	97%
UFLA B ces 311	JN106405.1	<i>Lysinibacillus</i> sp. LMS2	97%
UFLA B ces 319	EF090420.1	<i>Paenibacillus</i> sp. GB	98%
UFLA B ces 321	GU188913.1	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	97%
UFLA B ces 336	JN315893.1	<i>Bacillus cereus</i>	97%
UFLA B ces 337	AB681301.1	<i>Burkholderia ginsengisoli</i>	97%
UFLA B ces 422	JN863504.1	<i>Variovorax</i> sp. LC391	98%

Apêndice 5, continuação

Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
UFLA B ces 441	HQ005421.1	<i>Variovorax paradoxus</i>	97%
UFLA B ces 447	FJ626779.1	<i>uncultured Chelatococcus</i> sp.	100%
UFLA B ces 468	HE614806.1	<i>uncultured beta proteobacterium</i>	97%
UFLA B ces 473	GQ181022.1	<i>Burkholderia phenazinium</i>	98%
UFLA B ces 474	EU169185.1	<i>Variovorax paradoxus</i>	97%
UFLA B ces 475	HQ005421.1	<i>Variovorax paradoxus</i>	97%
UFLA B ces 476	HM151960.1	<i>gamma proteobacterium</i> AH77	97%
UFLA B ces 479	HQ222324.1	<i>Dyella marensis</i>	97%
UFLA B ces 481	HM224393.1	<i>Burkholderia ambifaria</i>	97%
UFLA B ces 485	AY741357.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	97%
UFLA B ces 498	AY677087.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	98%
UFLA B ces 499	GU186109.1	<i>Variovorax paradoxus</i>	97%
UFLA B ces 501	EU571162.1	<i>gamma proteobacterium</i> 17-2	97%
UFLA B ces 504	JN008110.1	<i>Chitinophaga</i> sp. VC-CS451	98%
Luminárias meio vitamina-ácido húmico			
UFLA B ces 525	FN908407.1	<i>Burkholderia tuberum</i>	97%
UFLA B ces 530	FJ266323.1	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	97%
UFLA B ces 534	JN863504.1	<i>Variovorax</i> sp. LC391	97%
UFLA B ces 604	GQ221846.1	<i>Variovorax paradoxus</i>	97%
UFLA B ces 605	FN543679.1	<i>Burkholderia</i> sp. JPY279	97%
UFLA B ces 618	GQ221846.1	<i>Variovorax paradoxus</i>	97%
UFLA B ces 669	GU220488.1	<i>Cupriavidus basilensis</i>	97%
UFLA B ces 671	GQ221846.1	<i>Variovorax paradoxus</i>	97%
UFLA B ces 675	EU169152.1	<i>Variovorax paradoxus</i>	97%
UFLA B ces 679	DQ065753.1	<i>Lysobacter gummosus</i>	99%

Apêndice 5, continuação

Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
UFLA B ces 682	AM502923.1	<i>Variovorax</i> sp. PBD-E37	99%
UFLA B ces 687	CP002026.1	<i>Starkeya novella</i> DSM 506	100%
UFLA B ces 693	HQ005421.1	<i>Variovorax paradoxus</i>	97%
UFLA B ces 736	CP001053.1	<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN	97%
UFLA B ces 755	EU169152.1	<i>Variovorax paradoxus</i>	97%
UFLA B ces 762	AY154372.1	<i>Burkholderia phenazinium</i>	97%
Passos meio Aaronson's			
UFLA B ces 789	AJ300687.1	<i>Burkholderia</i> sp. K14	98%
UFLA B ces 791	CP000653.1	<i>Enterobacter</i> sp. 638	100%
UFLA B ces 804	HQ704709.1	<i>Burkholderia</i> sp. C527	97%
UFLA B ces 805	GQ344802.1	<i>Bacillus mycoides</i>	98%
UFLA B ces 818	AJ300687.1	<i>Burkholderia</i> sp. K14	97%
UFLA B ces 833	FJ429168.1	<i>Burkholderia</i> sp. IMER-A1-3	97%
UFLA B ces 854	DQ065753.1	<i>Lysobacter gummosus</i>	99%
UFLA B ces 865	DQ065753.1	<i>Lysobacter gummosus</i>	99%
UFLA B ces 896	JN183201.1	<i>uncultured beta proteobacterium</i>	100%
UFLA B ces 902	HM113086.1	<i>uncultured beta proteobacterium</i>	97%
UFLA B ces 930	JF496420.1	<i>Bacillus simplex</i>	97%
UFLA B ces 932	JF460751.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>Plantarum</i>	97%
	HQ662589.1	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	
UFLA B ces 948	JF460728.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>Plantarum</i>	97%
	JN862636.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain CL1	

Apêndice 5, continuação

Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
	<u>HQ844455.1</u>	<i>Bacillus tequilensis strain</i> GZAL15	97%
UFLA B ces 950	<u>DQ065753.1</u>	<i>Lysobacter gummosus</i>	99%
UFLA B ces 952	<u>DQ065753.1</u>	<i>Lysobacter gummosus</i>	99%
UFLA B ces 983	<u>DQ065753.1</u>	<i>Lysobacter gummosus</i>	99%
UFLA B ces 986	<u>DQ065753.1</u>	<i>Lysobacter gummosus</i>	97%
UFLA B ces 987	<u>DQ065753.1</u>	<i>Lysobacter gummosus</i>	99%
UFLA B ces 988	<u>DQ065753.1</u>	<i>Lysobacter gummosus</i>	99%
UFLA B ces 990	<u>DQ065753.1</u>	<i>Lysobacter gummosus</i>	97%
UFLA B ces 1012	<u>HM111636.1</u>	<i>uncultured beta proteobacterium</i>	97%
UFLA B ces 1034	<u>FJ392830.1</u>	<i>Burkholderia</i> sp.	97%
UFLA B ces 1054	<u>JN008110.1</u>	<i>Chitinophaga</i> sp.	97%
	<u>AB272340.1</u>	<i>Flexibacter</i> sp.	
UFLA B ces 1091	<u>AY741356.1</u>	<i>Burkholderia cepacia</i>	97%
UFLA B ces 1103	<u>JF495126.1</u>	<i>Variovorax paradoxus</i>	97%
UFLA B ces 1104	<u>EU169152.1</u>	<i>Variovorax paradoxus</i>	97%
UFLA B ces 1105	<u>HQ753296.1</u>	<i>uncultured organism</i>	98%
UFLA B ces 1150	<u>AB366327.1</u>	<i>Bacillus</i> sp.	97%
UFLA B ces 1154	<u>FJ687970.1</u>	<i>Burkholderia</i> sp. T48	98%
UFLA B ces 1158	<u>FJ944683.1</u>	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	99%

Apêndice 5, continuação

Número do isolado	Número de acesso no BLAST	Nome da espécie	Porcentagem de similaridade
Pasos meio vitamina-ácido húmico			
UFLA B ces 1168	<u>EU414476.1</u>	<i>Pseudomonas gingeri</i>	97%
UFLA B ces 1172	<u>GQ181039.1</u>	<i>Dyella marensis</i>	97%
	<u>GQ181038.1</u>	<i>Dyella koreensis</i>	
	<u>GQ181057.1</u>	<i>Dyella japonica</i>	
UFLA B ces 1183	<u>GU292560.1</u>	<i>Burkholderia</i> sp. FA2	97%
UFLA B ces 1254	<u>EU571162.1</u>	<i>gamma proteobacterium</i> 17-2	97%
UFLA B ces 1263	<u>JF701926.1</u>	<i>Burkholderia</i> sp. YXA1-12	97%
UFLA B ces 1309	<u>JN993725.1</u>	<i>Paenibacillus alvei</i>	97%
UFLA B ces 1324	<u>JF265212.1</u>	<i>endophytic bacterium</i> 20(2011)	98%