

PAULO VICTOR PEREIRA BAILO

**IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE BACTÉRIAS CORINEFORMES E
NOCARDIOFORMES DE ORIGEM AMBIENTAL**

PPGVS/ INCQS
FIOCRUZ
2007

**IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
BACTÉRIAS CORINEFORMES E NOCARDIOFORMES DE ORIGEM
AMBIENTAL.**

PAULO VICTOR PEREIRA BAIO

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Dra. Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro

2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

**IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
BACTÉRIAS CORINEFORMES E NOCARDIOFORMES DE ORIGEM
AMBIENTAL.**

Paulo Victor Pereira Baio

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Paola Cardarelli Leite

_____ (UERJ)

Prof. Dra. Ana Luisa Mattos-Guaraldi

_____ (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Ana Carolina Paulo Vicente

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Orientadora: Prof. Dra. Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Baio, Paulo Victor Pereira

Identificação Bioquímica e Caracterização Molecular de
Bactérias Corineformes e Nocardioformes de origem ambiental/ Paulo Victor Pereira
Baio. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2007.

xv., 102 p., il., tab.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de
Janeiro, 2007. Orientador: Verônica Viana Vieira.

1. Identificação Bacteriana 2. Bactérias Corineformes 3. Bactérias Nocardioformes 4.
API CORYNE 5. Análise da seqüência do gene 16S rRNA. I. Título.

Phenotypic and Molecular Characterization of Environmental *Coryneforms* and
Nocardioforms Bacteria.

**Aos meus queridos pais:
Antônio Victor P. Baio (in memoriam)
e Berenice Paixão Baio.**

**“Não é o desafio com que nos deparamos que
determina quem somos e o que estamos nos tornando,
mas a maneira com que respondemos ao desafio.
Somos combatentes, idealistas, mas plenamente
conscientes. Porque o ter consciência não nos obriga
a ter sobre as coisas; só nos obriga a sermos conscientes.
Problemas para vencer, liberdade para provar.
E, enquanto acreditamos em nosso sonho,
nada é por acaso.”**

(Henfil)

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço pela proteção e amor; sou grato por Tua presença constante.

À Dra. Verônica Viana Vieira, pela oportunidade da realização deste estudo, orientação, apoio, motivação, ensinamentos e a amizade sincera.

À Dra. Ana Carolina Paulo Vicente, pela revisão dessa dissertação.

À Rosa Koko Otsuki, tecnologista no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos pelo valioso suporte técnico para a determinação das seqüências nucleotídicas utilizadas neste estudo.

À Dra. Ana Luisa Mattos-Guaraldi pelas sugestões apresentadas na qualificação.

À Coordenadoria da pós-graduação do INCQS/FIOCRUZ.

Ao meu pai Antônio Victor Pereira Baio (in memoriam) que continua vivo em nossos corações. A minha mãe Berenice Paixão Baio pelo amor, carinho, paciência, dedicação e por todos os esforços para eu chegar até aqui. Aos meus irmãos Geraldo, Fernando e Valéria, Avó Ana, meus sobrinhos, afilhados, cunhadas, tios e tias, primos e que são muito importantes na minha vida. À Alessandra pelo carinho, paciência, compreensão e apoio. A todos meus amigos e colegas em especial a Louricy, Wagner, João Vianez, Rodrigo, e Daniela pela força.

Ao Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde (INCQS) na pessoa do seu Diretor, Dr. André Luis Gemal pela oportunidade e todos seus funcionários em particular aos pertencentes ao Departamento de Microbiologia: Dra Paola Cardarelli Leite, Renata, Érica, Dr. Victor Augustus Marin, Marília, Miguel, Claudia Souto, Claudia Andrade e Nilson. Às especiais amigas Carmen Lucia Rocha e Vanda Maria Morgado Alves do Laboratório de Identificação Bacteriana do INCQS/FIOCRUZ que muito colaboraram para a realização deste trabalho e aos colegas João, Grasiela e Priscila, novos integrantes deste laboratório pelo companheirismo.

Ao Coronel Haroldo de Oliveira Gomes, Diretor do Laboratório Químico Farmacêutico do Exército (LQFEx) pela oportunidade e incentivo. Ao Ministério da Defesa e ao Exército pela autorização e liberação para a dedicação exclusiva dada a esse trabalho. Ao Coronel Goulart, Coronel Tinoco, Major Peixoto, Major Izauri, Major Willian, Capitão Eduardo Pinto, Ten. Mônica Castex, Ten. Andréa e todos os colegas civis e militares do LQFEx pelo apoio, e em especial ao Sargento Alisson e Antônio Roberto de Calazans pela grande ajuda e colaboração no Laboratório de Microbiologia do LQFEx.

Finalmente, agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse estudo.

Muito Obrigado.

RESUMO

Os produtos que requerem a característica de esterilidade tais como medicamentos injetáveis, soros, vacinas entre outros, devem ser submetidos ao Ensaio de Esterilidade Bacteriana e Fúngica. Para que este Ensaio tenha validade, a qualidade do ambiente de execução deve ser controlada e conhecida, a fim de evitar resultados falso-positivos. O Setor de Identificação Bacteriana do DM/INCQS tem detectado bastonetes Gram positivos irregulares (bactérias corineformes e nocardioformes) provenientes do controle ambiental da área, onde são realizados os ensaios de esterilidade bacteriana e fúngica, e de contaminantes acidentais, realizados pelo INCQS. Estas bactérias compõem um grupo de espécies que apresenta uma grande diversidade fenotípica que torna a identificação convencional bastante limitada, sendo recomendada na maioria dos casos, a utilização de metodologias complementares. As bactérias corineformes e nocardioformes estão presentes no ambiente, algumas na microbiota humana e de outros animais. Atualmente, tem aumentado o número de relatos de casos de infecção, apontando uma associação entre essas bactérias com infecções humanas.

Neste estudo avaliamos metodologias de identificação fenotípica e molecular para identificação de bastonetes Gram positivos irregulares (bactérias corineformes e nocardioformes). A caracterização fenotípica convencional não concluiu a identificação dos isolados estudados. O sistema API CORYNE possibilitou a identificação de apenas sete (22,58 %) dos 31 isolados testados. Dez isolados (32,26%) apresentaram identificação equivocada e para quatorze (45,16%) isolados este sistema sugeriu dois gêneros prováveis, onde um destes foi identificado após a análise da seqüência do gene 16S rRNA. A análise da seqüência do gene 16S rRNA identificou 94,46% dos isolados ao nível de gênero. Um total de 12 gêneros pertencentes a 11 famílias foi identificado com especial destaque para as famílias *Microbacteriaceae* e *Streptomyetaceae*. O isolado 3117 foi identificado apenas ao nível de família e o isolado 3712 não foi identificado por essa metodologia indicando que pertençam a um gênero e espécie ainda não descritos. O isolado 3345 possivelmente pertence à espécie *Corynebacterium glaucum* que foi descrita para um único isolado, não havendo até o momento relato de outra cepa desta espécie. Este dado proporciona maior credibilidade na existência desta espécie bacteriana. Este estudo mostra a importância da implantação da metodologia da análise da seqüência do gene 16S rRNA para identificação de bactérias corineformes e nocardioformes no setor de identificação bacteriana.

ABSTRACT

The sterility test is applied to pharmaceutical products that are required to be sterile. This test must be carried out under aseptic conditions in control areas. To reduce the hazard of adventitious microbial contamination, the area in which the sterility tests are conducted should be subjected to environmental control. The Bacterial Identification Section of the Microbiology Department of the INCQS has detected irregular Gram-positive rods (coryneforms and nocardioforms) from microbial environment control and as inadvertent contaminants of the test performed in INCQS.

The coryneforms and nocardioforms bacteria are present in the environment, some species are part of humans, and mammals skin micro biota. Currently, recognition of association between these bacteria with human infections has increased. These bacterial species groups demonstrate a wide phenotypic diversity. However, major of these species remained unidentifiable after phenotypic identification and in these situations; molecular methods need to be applied to identification. In our study, we evaluated the phenotypic and molecular methods for irregular Gram-positive rods (coryneforms and nocardioforms bacteria) identification. The conventional phenotypic characterization was not conclusive to identification of the isolated studied.

The API CORYNE system identified only seven (22.58%) of the thirty-one isolates and ten isolates (32.26%) were misidentified. For fourteen (45.16%) isolates, this system suggest two probably genus, whereas 16S rRNA sequencing revealed one of them. The sequence analysis of the 16S rRNA gene identified 94.46% of the isolates at the genus level. A total of 12 genera belonging to 11 families were identified mainly as *Microbacteriaceae* and *Streptomycetaceae* families. The isolate 3117 was identified only at family level, and the isolate 3712 could not be identified by this method and probably represent new taxa. The isolate 3345 assigned to the *Corynebacterium glaucum* without further species assignment. This species was described by only one strain and there are not reported of another strain of this species. This data provides a standing of this bacterial species. This study shows the importance of the implementation of the 16S rRNA gene sequencing to identify coryneform and nocardioform bacteria in the Bacterial Identification Section.

LISTA DE ABREVIATURAS

μg – micrograma

mM - milimolar

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

DNA – ácido desoxiribonucleico

dATP – deoxiadenosinucleosídeo trifosfato

dCTP – deoxicitosinucleosídeo trifosfato

dGTP – deoxiguaninucleosídeo trifosfato

dTTP – deoxitimina trifosfato

dNTP – deoxinucleosídeo trifosfato

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

Kb - kilobase

M – concentração molar

mA – mili ampére

MgCl_2 - cloreto de magnésio

mL - mililitro

N – concentração normal

NaCl – cloreto de sódio

Ng - nanograma

Pb – pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial de hidrogênio

rpm – rotações por minuto

TAE – tris acetato edta

TE – tris edta

Tris – hidroximetil amino metano

U - unidade

UFC – unidade formadora de colônia

V - volume

(-) – negativo

(+) - positivo

(D) – duvidoso

(F) - fraco

H₂S – ácido sulfídrico

h - hora

mm – milímetro

(T) – Tipo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A e 1B: Kit comercial API CORYNE (BioMerieux).....	15
Figura 2: Eletroferograma de uma das seqüências nucleotídicas	19
Figura 3 A: Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3369b (<i>Gordonia sp.</i>).....	22
Figura 3 B: Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3299 (<i>Brevibacterium sp.</i>).....	23
Figura 3 C: Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3020 (<i>Corynebacterium sp.</i>).....	24
Figura 3 D: Características morfológicas coloniais e celulares do isolado TSAB1 (<i>Rhodococcus sp.</i>).....	25
Figura 3 E: Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3207 (<i>Streptomyces sp.</i>).....	26
Figura 3 F: Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3080 (<i>Microbacterium sp.</i>).....	27
Figura 3 G: Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3098 (<i>Agromyces sp.</i>).....	28
Figura 3 H: Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3335 (<i>Cellulomonas sp.</i>).....	29
Figura 3 I: Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3361 (<i>Dermabacter hominis</i>).....	30
Figura 3 J: Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3069 (<i>Exiguobacterium sp.</i>).....	31
Figura 3 K: Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3097 (<i>Curtobacterium sp.</i>).....	32
Figura 3 L. Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3401 (<i>Arthrobacter sp.</i>).....	33
Figura 3 M. Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3117 (<i>Nocardioideae</i>).....	34
Figura 3 N. Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3712	35
Figura 4: Reação de CAMP positiva do isolado 3316 (<i>Corynebacterium sp.</i>).....	39
Figura 5A: Mobilidade dos isolados 3089 e 3097 em meio SIM.....	40

Figura 5B: Isolado 3069 e 3098 nos meios ágar nitrato mobilidade e SIM.....	40
Figura 6. Comparação dos resultados de identificação obtidos pelo API CORYNE em 24 horas e 48 horas de acordo com os resultados da análise das seqüências do gene 16S rRNA.....	43
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose (2%) de amplicons do gene 16S rRNA de aproximadamente 1500 pb.....	46
Figura 8a. Alinhamento das seqüências parciais do gene 16S rRNA dos isolados do gênero <i>Corynebacterium</i>	58
Figura 8b. Alinhamento das seqüências parciais do gene 16S rRNA dos isolados do gênero <i>Exiguobacterium</i>	60
Figura 8c. Alinhamento das seqüências parciais do gene 16S rRNA dos isolados do gênero <i>Microbacterium</i>	62
Figura 8d. Alinhamento das seqüências parciais do gene 16S rRNA dos isolados do gênero <i>Rhodococcus</i>	67
Figura 8e. Alinhamento das seqüências parciais do gene 16S rRNA dos isolados do gênero <i>Streptomyces</i>	69
Figura 9. Dados extraídos do trabalho de Wang e colaboradores (2004).....	84
Figura 10. Posição taxonômica das bactérias Corineformes e Nocardioformes.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Origem e data de isolamento das bactérias estudadas.....	12
Tabela 2: Iniciadores utilizados na PCR e seqüenciamento do gene 16S rRNA.....	17
Tabela 3: Resultados das provas bioquímicas dos isolados estudados.....	36
Tabela 4: Resultados dos testes bioquímicos dos isolados filamentosos <i>Streptomyces</i> sp.....	38
Tabela 5: Resultados da comparação da seqüência do gene 16S rRNA e da identificação fenotípica realizada pelo sistema API CORYNE.....	42
Tabela 6: Testes Complementares do API CORYNE.....	44
Tabela 7. Similaridade entre seqüências obtidas para os isolados estudados com as depositadas em bancos de dados e origem.....	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Teste de esterilidade e área limpa.....	2
1.2 Identificação bacteriana.....	5
1.3 Bastonetes Gram positivos irregulares (bactérias Corineformes e Nocardioformes).....	7
1.4 Relevância.....	8
2. OBJETIVOS	9
2.1 – Objetivo geral.....	10
2.2 – Objetivos específicos.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 – Isolados Bacterianos.....	12
3.2 – Condições de cultivo e manutenção dos isolados bacterianos.....	13
3.3 - Caracterização Fenotípica.....	13
3.4 – Obtenção do DNA bacteriano pelo método de Choque Térmico.....	16
3.5 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	16
3.6 – Eletroforese em gel de Agarose.....	17
3.7 – Determinação das Sequências Nucleotídicas.....	17
4. RESULTADOS	20
4.1 – Caracterização Fenotípica.....	21
4.1.1 – Testes Bioquímicos Convencionais.....	21
4.1.2 – Testes Bioquímicos realizados em Sistema Semi-automatizado.....	41
4.2 - Caracterização do Gene Ribossomal 16S.....	45
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÕES	86
7. BIBLIOGRAFIA	88

1. INTRODUÇÃO

1.1. TESTE DE ESTERILIDADE E ÁREA LIMPA

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) é o órgão de referência Nacional para as questões tecnológicas e normativas relativas ao controle da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária. O INCQS/FIOCRUZ estabelece e executa programas de análise para controle da qualidade em parceria com os serviços das vigilâncias sanitárias federal, estadual e municipal e realiza diversas modalidades de análises laboratoriais de produtos que são submetidos ao controle e fiscalização, previstos na legislação sanitária.

O Setor de Identificação Bacteriana (IDBAC) do Departamento de Microbiologia (DM) do INCQS participa das avaliações microbiológicas realizadas em diferentes produtos que requerem a característica de esterilidade. Estes produtos, tais como medicamentos injetáveis, soros, vacinas entre outros, devem ser submetidos ao Ensaio de Esterilidade Bacteriana e Fúngica que visa verificar a qualidade do processo esterilizante empregado durante a fabricação de produtos estéreis, bem como manipulações assépticas. Segundo as farmacopéias, a condição de esterilidade de um produto deve ser considerada com base no fato de que o mesmo tenha sido processado em condições ótimas e que o resultado de uma amostra representativa e estatisticamente calculada, submetida ao ensaio de esterilidade indique a ausência de microrganismos viáveis (FARMACOPÉIA..., 1988; THE UNITED..., 2004; BRASIL..., 2003).

O critério de interpretação do Ensaio de Esterilidade estabelecido pela Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA..., 1988) considera a possibilidade da realização de até três testes antes de liberar o resultado de uma amostra como satisfatória ou insatisfatória. Quando ocorre crescimento microbiano no primeiro teste, o contaminante pode não corresponder ao produto analisado e só deve ser considerado se for detectado por reteste. Se não houver evidência de crescimento no reteste, a amostra é considerada satisfatória. Se houver crescimento no primeiro reteste é recomendado que seja realizado o isolamento e identificação dos contaminantes microbianos do primeiro reteste e do teste de esterilidade original. Se os dois contaminantes forem diferentes, deve ser realizado um segundo reteste. Estes critérios foram estabelecidos para descartar a possibilidade de contaminação acidental

que pode ocorrer durante a realização deste ensaio mesmo quando são tomados os cuidados recomendados para evitar falha de procedimento relacionadas à técnica, aos operadores e ao monitoramento ambiental estabelecido pelas farmacopéias (FARMACOPÉIA..., 1988; THE UNITED..., 2004; BRASIL..., 2003).

Para que o Ensaio de Esterilidade tenha validade, a qualidade do ambiente de execução deve ser controlada e conhecida, a fim de evitar resultados falso-positivos, sendo assim, este ensaio deve ser realizado em fluxo laminar (classe 100) mantido numa área limpa (classe 10.000). (FARMACOPÉIA..., 1988; THE UNITED..., 2004; BRASIL..., 2003). Área limpa é definida pela “International Organization for Standardization” (ISO) como: “Sala na qual a concentração de partículas no ar é controlada e que é construída e usada de modo a minimizar a introdução, geração, e retenção de partículas dentro desta e nos quais outros parâmetros relevantes como temperatura, umidade e pressão são controladas quando necessários” (ISO 14644-1, 2007). Além dos laboratórios de controle de qualidade, indústrias farmacêuticas e produtos correlatos são as que mais usam áreas limpas uma vez que microrganismos e sujidades não devem ser injetados ou introduzidos no paciente através de seus produtos (WHITE, 2001).

As principais fontes de contaminação por partículas viáveis (microrganismos) e não viáveis (poeira) nas áreas limpas são: suprimento de ar não filtrado, áreas sujas adjacentes à área limpa, superfícies, operadores, equipamentos, matéria prima e embalagens. Na construção de áreas limpas devem ser utilizados materiais especiais, uma vez que materiais de construção convencionais desprendem partículas facilmente. O ar introduzido numa área limpa deve ser filtrado (ultra filtros) e é usado para diluir e remover partículas totais dispersa durante a operação nestas áreas e também para pressurizar a sala certificando a qualidade do fluxo de ar interno (WHYTE, 2001). Quando a área limpa está em operação, os operadores são a principal fonte de partículas viáveis (microrganismos), sendo assim é necessário o uso de roupas e equipamentos que minimizem a dispersão de partículas (REINMULLER; LJUNGQVIST, 2003).

As partículas totais devem ser quantificadas e controladas com a realização de um programa de controle ambiental que visa quantificar, estabelecer medidas para minimizar a

introdução destas na área limpa e reduzir a presença destas nesta área. Os níveis de partículas recomendados devem ser mantidos nos arredores imediatos do produto, sempre que ele estiver exposto ao ambiente e em todas as áreas circundantes. Portanto é necessário monitorar a área limpa para demonstrar que a concentração pré-determinada de partículas não excedeu durante o processo de fabricação ou realização do ensaio de Esterilidade (ORGANIZAÇÃO..., 2002).

A importância do controle ambiental durante o processamento de um produto estéril está enfatizada na RDC nº 210 (BRASIL..., 2003). No item C, na terceira parte (diretrizes suplementares nº 17 que orienta sobre produtos estéreis), o subitem 17.1.5 diz que cada operação de produção requer um nível determinado de pureza do ar para que sejam minimizados os riscos de contaminação por partículas ou de microrganismos nos produtos ou materiais que estiverem sendo manipulados. O subitem 17.19.2 estabelece que o ensaio de esterilidade aplicado ao produto final deve ser considerado como a última de uma série de medidas de controle, através da qual é garantida a esterilidade. O resultado do ensaio somente pode ser interpretado em conjunto com os registros sobre as condições ambientais e os registros relativos à fabricação do lote. O subitem 17.19.3 determina que os lotes que não foram aprovados no ensaio inicial de esterilidade, não podem ser aprovados com base em um segundo ensaio, salvo se for realizada uma investigação do tipo de microrganismo encontrado e dos registros sobre as condições ambientais e sobre o processamento dos lotes, e o resultado desta investigação demonstre que o ensaio inicial não era válido.

Além da preocupação em se manter níveis mínimos de partículas é importante também o conhecimento da microbiota do ambiente, pois proporciona a possibilidade de rastreamento da fonte contaminante e auxilia também na avaliação dos procedimentos de limpeza e sanitização (CUNDELL, 2006; PINTO, 2002 b; SUTTON; CUNDELL, 2004; WHITE; NIVEN, 1989).

1.2 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Os microrganismos não possuem características morfológicas suficientes que permitam a sua distinção, sendo assim os microbiologistas desenvolveram uma variedade de métodos que testam as reações metabólicas, determinam a composição química de estruturas para definir características fenotípicas que possibilitam o agrupamento e identificação destes (TORTORA, *et al.*, 2000).

Os procedimentos convencionais para identificação bacteriana são baseados nas características fenotípicas tais como: reações metabólicas, características coloniais e morfologia celular em esfregaços corados pelo método de Gram. Contrastando com as provas convencionais que são dependentes de crescimento bacteriano para a determinação do resultado, os testes com substratos cromogênicos ou fluorogênicos de enzimas detectam enzimas pré-formadas nas bactérias (KONEMAN *et al.*, 2001).

Os sistemas comerciais compactos de identificação foram desenvolvidos a partir da combinação de provas convencionais e enzimáticas com substratos cromogênicos, estes são, por exemplo, API, Enterotube, Minitek, VITEK, BIOLOG entre outros. Nesses sistemas, diferentes conjuntos de substratos miniaturizados são utilizados e proporcionam resultados rápidos e permitem a identificação dos principais grupos bacterianos de importância clínica. Os perfis metabólicos obtidos são comparados com perfis estabelecidos no banco de dados (BIOMERIEUX, 2000; 2002; 2003; 2007). Vários estudos realizados em laboratórios clínicos e de pesquisa demonstraram uma correspondência de aproximadamente 95% a 97% das identificações realizadas por sistemas compactos com os sistemas convencionais de identificação de vários grupos de microrganismos de origem clínica. Sendo assim, os sistemas compactos encontraram uma ampla aceitação nos laboratórios clínicos como um método confiável para identificação rápida (EIGNER *et al.*, 2005).

As metodologias envolvendo ácidos nucléicos revolucionaram a identificação e classificação dos microrganismos. Dentre estas metodologias, a análise da sequência do gene 16S rRNA tem sido amplamente utilizada para a determinação do relacionamento

filogenético das bactérias. A conservação deste gene é reflexo da importância deste como um componente crítico da célula. Poucos outros genes são conservados como o gene 16S rRNA (WOESE, 1987). O gene 16S rRNA possui aproximadamente 1550 pares de bases e é composto de regiões variáveis e conservadas com polimorfismos interespecíficos que proporcionam distinção e medidas estatisticamente válidas. Em geral, a comparação das seqüências do gene 16S rRNA permite a diferenciação entre gêneros de organismos (WOESE, 1987).

Atualmente, a análise da seqüência do gene 16S rRNA tem sido utilizada não apenas para a determinação do relacionamento filogenético bacteriano, mas também tem contribuído para a identificação bacteriana (BOSSHARD *et al.*, 2003; DRANCOURT, 2004; MIGNARD; FLANDROIS, 2006; RIVAS *et al.*, 2004). A utilização do gene 16S rRNA para fins de identificação tem sido ampla, uma vez que este gene é universal para bactérias e uma grande quantidade de seqüências deste gene está disponível em banco de dados de seqüências de nucleotídeos permitindo assim a comparação das seqüências de isolados desconhecidos (CLARRIDGE, 2004).

A utilização de seqüências parciais do gene 16S rRNA na identificação de isolados bacterianos de origem clínica tem sido realizada (CLOUD *et al.*, 2004; FONTANA *et al.*, 2005; HALL *et al.*, 2003; KATTAR *et al.*, 2001; WOO *et al.*, 2003). Em grande parte destes estudos é utilizado o sistema MicroSeq 500 (Applied Biosystems) que amplifica e seqüencia os primeiros 527 pares de base do gene 16S rRNA. Esta região parece fornecer uma porcentagem maior de diferença entre cepas, porque a região mostra ligeiramente mais diversidade por kilobase seqüenciada (CLARRIDGE, 2004). A análise de seqüências parciais do gene 16S rRNA tem sido empregada também para identificação de bactérias corineformes (BOSSHARD *et al.*, 2003; TANG *et al.*, 2000). Entretanto, há relatos onde os autores mostram a necessidade do seqüenciamento completo do gene para distinguir determinados gêneros e espécies (SACCHI *et al.*, 2002 a, b).

Outros genes conservados do genoma bacteriano têm sido usados para análise taxonômica e identificação baseada na análise da seqüência tais como os genes: 23S rRNA (KAWATA *et al.*, 2004); proteínas do choque térmico (“heat shock proteins”) (RINGUET

et al., 1999), fator de alongamento Tu (gene *tuf*) (PICARD *et al.*, 2004), subunidade beta da RNA polimerase, gene *rpoB* (MOTA *et al.*, 2004).

1.3 BASTONETES GRAM POSITIVOS IRREGULARES (BACTÉRIAS CORINEFORMES E NOCARDIOFORMES)

O Setor de Identificação bacteriana do DM/INCQS tem detectado bastonetes Gram positivos irregulares (bactérias corineformes e nocardioformes) provenientes do controle ambiental da área onde são realizados os ensaios de esterilidade bacteriana e fúngica e de contaminantes acidentais deste. Dentre os bastonetes Gram positivos irregulares, alguns gêneros bacterianos são denominados informalmente como bactérias corineformes, outros como nocardioformes. Estes termos são imprecisos e utilizados por simples conveniência (KONEMAN *et al.*, 2001). Bactérias corineformes são consideradas aquelas que possuem crescimento aeróbico, não esporuladas, não ácido resistente parcial, irregulares, bastonetes Gram positivos (FUNKE *et al.*, 1997). Bactérias nocardioformes se apresentam como Gram positivas, aeróbicas, usualmente filamentosas e ramificadas produzindo micélios similares aos dos fungos, mas sofrem ruptura ou fragmentação originando formas bacilares e cadeias cocóides curtas (KONEMAN *et al.*, 2001).

As bactérias corineformes e nocardioformes compõem um grupo de espécies bacterianas que apresenta uma grande diversidade fenotípica que torna a identificação convencional bastante limitada, sendo recomendada na maioria dos casos, a utilização de metodologias complementares tais como a determinação dos tipos de peptidoglicana, menaquinonas e ácidos graxos da parede celular e técnicas moleculares para fornecer acurada identificação destes microrganismos em termos de gênero e espécie (FUNKE *et al.*, 1997; GROVE, DER-HAROUTIAN, RATCLIFF, 1999; TANG *et al.*, 2000).

As bactérias corineformes e nocardioformes têm origem ambiental ou estão presentes na microbiota humana e de alguns animais (FUNKE *et al.*, 1997; KONEMAN *et al.*, 2001; MCNEIL & BROWN, 1994). Atualmente tem aumentado o número de relatos, apontando uma associação entre bactérias corineformes e nocardioformes com infecções humanas (CAMELLO *et al.*, 2003; FUNKE & BERNARD, 2003; GIL-SANDE *et al.*;

2006). Alguns autores têm destacado a dificuldade da identificação das bactérias corineformes e nocardioformes e a importância desta na associação com infecções humanas e alerta que os métodos usados para a identificação em laboratórios microbiológicos clínicos, são ineficientes quando deparam com a diversidade de organismos que necessitam identificar (COYLE; LIPSKY, 1990; FUNKE *et al.*, 1997; MISTRY *et al.*, 2006). Além disso, há relatos de espécies destas bactérias, até então encontradas no ambiente, em infecção humana (FUNKE, ARAVENA-ROMAN; FRODL, 2005; NICHOLS *et al.*, 2005). Estudos têm demonstrado identificações equivocadas destas bactérias e mostram a necessidade de metodologias moleculares para conclusão da identificação (GIL-SANDE *et al.*, 2006; GROVE *et al.*, 1999; LAU *et al.*, 2002; TANG *et al.*, 2000; WOO *et al.*, 2003).

Abreu e colaboradores (ABREU *et al.*, 2003) concluíram em seus estudos sobre a incidência de microrganismos em áreas limpas que bactérias Gram positivas irregulares foi o terceiro grupo mais frequentemente isolado. O Setor de Identificação Bacteriana DM/INCQS tem observado que estes grupos bacterianos são frequentemente isolados da área onde é realizado o Ensaio de Esterilidade (ROCHA, 2006).

1.4 RELEVÂNCIA

O INCQS, unidade da FIOCRUZ e laboratório de referência Nacional para o Ministério da Saúde e ANVISA, desenvolvem atividades de pesquisa que servem de suporte gerando e validando novas técnicas e procedimentos para auxiliar o sistema de controle da qualidade no país. A análise microbiológica é imprescindível para garantir a qualidade dos produtos em questão, sendo assim, o laboratório deve estar preparado para dar respostas ágeis na avaliação da qualidade de produtos e nas repercussões dos riscos e de agravos sobre a saúde da população. O domínio e a implantação de novas metodologias para a detecção e identificação no Setor de Identificação Bacteriana do DM/INCQS, irão agilizar as respostas e proporcionar resultados muito mais confiáveis.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização de metodologias de identificação convencional e molecular para determinação do gênero de bastonetes Gram positivos irregulares (bactérias corineformes e nocardioformes) provenientes do controle ambiental da área (DM/INCQS) onde são realizados os ensaios de esterilidade bacteriana e fúngica e de contaminantes acidentais deste.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar os isolados de bastonetes Gram positivos irregulares (bactérias corineformes e nocardioformes) utilizando provas bioquímicas convencionais e o Kit comercial API CORYNE;

Realizar a análise de seqüências do gene 16S rRNA dos isolados de bastonetes Gram positivos irregulares (bactérias corineformes e nocardioformes).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolados Bacterianos

Neste estudo foram analisados 36 isolados de bactérias compreendendo bastonetes Gram positivos irregulares (bactérias Corineformes e Nocardioformes) (Tabela 1). Os isolados foram provenientes principalmente de placas contendo meio de cultura utilizadas para o controle ambiental da área de trabalho onde se realizam o ensaio de esterilidade bacteriana e fúngica, área adjacente restrita (vestiário) e de contaminantes acidentais deste ensaio.

Tabela 1. Origem e data de isolamento das bactérias estudadas.

Nº Estoque	Origem	Data de isolamento
TSAB1	Sala	27/3/2002
3020	Fluxo	3/2/2003
3016	Contaminante do ensaio de esterilidade	3/2/2003
3019	Contaminante do ensaio de esterilidade	3/2/2003
3032b	Fluxo	18/2/2003
3069	Vestiário	1/7/2003
3080	Fluxo	25/7/2003
3089	Fluxo	12/8/2003
3098	Vestiário	21/8/2003
3097	Sala	21/8/2003
3117	Fluxo	9/10/2003
3155	Contaminante do ensaio de esterilidade	19/3/2004
3165	Fluxo	28/4/2004
3182	Túnel	27/5/2004
3188	Fluxo	18/6/2004
3207	Sala	20/7/2004
3211a	Vestiário	28/7/2004
3212	Sala	28/7/2004
3223	Vestiário	10/8/2004
3225	Sala	25/8/2004

3227	Vestiário	25/8/2004
3248	Sala	22/9/2004
3249	Contaminante do ensaio de esterilidade	27/9/2004
3268	Fluxo	10/1/2005
3299	Vestiário	15/3/2005
3316	Sala	2/5/2005
3335	Vestiário	4/8/2005
3341	Sala	26/8/2005
3345	Vestiário	6/9/2005
3361	Túnel	21/11/2005
3369a	Sala	14/2/2006
3369b	Sala	14/2/2006
3712	Fluxo	9/3/2006
3401	Sala	24/5/2006
3407b	Vestiário	24/5/2006
3408b	Sala	5/6/2006

3.2 Condições de cultivo e manutenção dos isolados bacterianos

Todos os isolados foram liofilizados e estocados à – 20 °C, em caldo infusão cérebro e coração (Difco) contendo 20% (v/v) de glicerol. As culturas foram também mantidas em ágar cérebro e coração (Difco) inclinado cobertos com óleo mineral previamente esterilizado, após crescimento a 30°C por 24/36 horas. O cultivo dos isolados foi realizado em meios ágar cérebro e coração (Difco), ágar sabouraud (Difco), e ágar cérebro e coração (Difco) contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro.

3.3 Caracterização Fenotípica

A morfologia celular dos isolados foi observada após a coloração pelo método de Gram (KONEMAN, 2001).

Os isolados foram submetidos aos seguintes testes bioquímicos convencionais: catalase, produção de H₂S (TSI – “triple sugar iron”), crescimento em anaerobiose,

descarboxilação da arginina, utilização da glicose, fermentação da sacarose, fermentação da trealose, fermentação da xilose, fermentação da maltose, fermentação do manitol, fermentação da frutose, fermentação da rafinose, fermentação da lactose, fermentação da galactose, hidrólise da esculina, hidrólise da uréia, hidrólise da gelatina, hidrólise do amido, redução do nitrato, mobilidade, prova do vermelho de metila, hidrólise da caseína, produção de DNase, prova de Voges-Proskauer, oxidação da glicose (O/F), fermentação da glicose (O/F), teste da oxidase, cor da colônia após crescimento de 48h em ágar sangue segundo as recomendações de Funke (FUNKE *et al.*, 1997) e Funke e Bernard (FUNKE; BERNARD, 2003). Foi utilizado também o Kit Comercial API CORYNE (Versão 2.0 ref. 20 900 - BioMerieux) conforme as instruções do fabricante (Figura 1A e 1B). Foi realizada a leitura após 24 horas dos testes das galerias e os dados foram analisados no programa APIWEB (Versão 3.0.- BioMerieux).



1A *Galerias API CORYNE*



1B *Galerias API CORYNE*

Figura 1A e 1B Kit comercial API CORYNE (BioMerieux).

3.4 Obtenção do DNA bacteriano pelo método de Choque Térmico

Os isolados bacterianos foram inoculados em tubos contendo 3 mL de caldo BHI e incubados a 37°C por 24/48 horas. Dois mL de cultura de cada isolado foram transferidos para um microtubo e centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos (Eppendorf centrifuge 5415 C). O sobrenadante foi descartado, o sedimento foi resuspenso em 500 µL de água milli-Q esterilizada e submetido a banho-maria fervente (100°C) por 15 minutos. Após esta etapa, a suspensão foi imediatamente congelada a -20°C. Este material foi posteriormente descongelado e centrifugado (14000 rpm por 15 segundos/Eppendorf centrifuge 5415 C). O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e armazenado a -20°C e posteriormente utilizado na reação da PCR.

3.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Para a amplificação de regiões específicas do genoma dos isolados, a reação da PCR foi realizada em um volume final de 50 µL. As reações individuais foram compostas de água esterilizada, tampão de reação 1X (Eppendorf), 3 mM de MgCl₂ (Eppendorf), 10 mM de cada dNTP (dNTP set [dATP, dCTP, dGTP, dTTP]/Eppendorf), 150 ng de cada iniciador (Tabela 2) 1,5 U da enzima *Taq* polimerase (Eppendorf) e 3 µL do DNA obtido pela extração por choque térmico, como descrito anteriormente. A reação foi realizada nas seguintes condições: pré-desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos ou pré-desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e uma etapa final de extensão a 72°C por 7 minutos.

Dois pares de iniciadores foram usados neste estudo para amplificação do gene 16S rRNA, os iniciadores universais pA e pH, e os iniciadores 1831 com 1832 foram usados para reação do seqüenciamento. Para o isolado 3345 foram utilizadas diferentes combinações destes iniciadores: pA com pH, pA com 1832, pH com 1831.

Tabela 2. Iniciadores utilizados na PCR e seqüenciamento do gene 16S rRNA.

Nome do iniciador	Seqüência do iniciador 5' --> 3'	Referência
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Watts <i>et al.</i> (2000)
pH	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	Watts <i>et al.</i> (2000)
1831	GAGGAACACCGATGGCGAAGGC	Watts <i>et al.</i> (2000)
1832	GCCCCGTCAATTCCTTTGAGTT	Watts <i>et al.</i> (2000)

3.6 Eletroforese em gel de Agarose

Os géis de agarose foram preparados dissolvendo a agarose (Promega catálogo nº V3121) em tampão TAE 1X (Invitrogen catálogo nº 15558-042) de modo a obter uma concentração de 1 a 2%. Foi adicionado tampão de corrida nas amostras de DNA (1/5 do volume da solução de DNA). Foram aplicados 7 µL do produto da PCR e 1µL de marcador de peso molecular nos poços do gel. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida TAE 1X sob uma corrente de 60 Volts por 60 minutos. Após a corrida o gel foi corado com brometo de etídio (5 mg/mL) e observado sob luz ultravioleta e registrado em foto com o equipamento VDS (Pharmacia-Biotech).

3.7 Determinação das Seqüências Nucleotídicas

Os produtos obtidos pela PCR foram purificados (Perfectprep Gel Cleanup Kit - eppendorf Catálogo nº 955152051) e utilizados como molde de DNA para a reação de seqüenciamento de suas duas fitas com o sistema comercial (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit - Applied Biosystems Catálogo 4336919) conforme as recomendações dos fabricantes. Posteriormente os produtos desta reação foram precipitados com 80 µL de uma solução com 75% de isopropanol, centrifugados por 45 minutos a 4000 rpm a 21°C e o

sobrenadante desprezado pela inversão cuidadosa da placa em papel de filtro. A placa foi invertida em cima de outro papel de filtro, centrifugada por 1 minuto a 900 rpm a 21°C e foi deixada em estufa a 75°C por 5 minutos. Os sedimentos foram então ressuspensos em 10 µL de formamida, centrifugados por 1 minuto a 900 rpm a 21°C, incubados por 5 minutos a 95°C e resfriados imediatamente em banho de gelo.

Após a corrida no seqüenciador (ABI PRISM 3100 Applied Biosystems DNA Sequencer), as seqüências nucleotídicas foram analisadas e editadas com o auxílio do programa CHROMAS. As seqüências foram comparadas àquelas depositadas no banco de seqüências GeneBank e Ribosomal Database Project II (RDP-II). A qualidade das seqüências obtidas está exemplificada na figura 2.

As seqüências do gene 16S rRNA para os isolados dos gêneros *Corynebacterium*, *Exiguobacterium*, *Microbacterium*, *Rhodococcus* e *Streptomyces* foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON *et al.*, 1997).

4. RESULTADOS

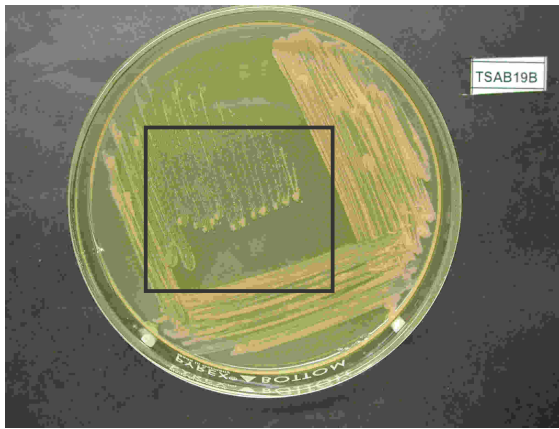
4.1 Caracterização Fenotípica

4.1.1 Testes Bioquímicos Convencionais

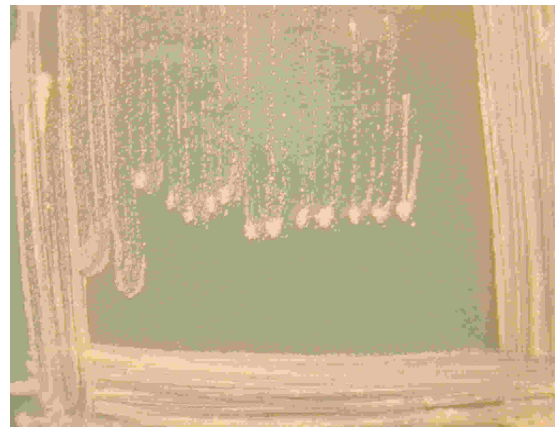
Todos os isolados foram observados quanto às características morfológicas das colônias. As características celulares foram observadas após colorações do crescimento bacteriano em 24/48h e os isolados se apresentaram como bastonetes Gram positivos, irregulares não esporulados com exceção dos isolados 3182, 3207, 3212, 3268 e 3341 que apresentaram estruturas filamentosas, ramificados e com esporos. As figuras 3 A a 3 N mostram características morfológicas coloniais e celulares representativas dos gêneros encontrados e de um isolado identificado ao nível de família e outro não identificado.

Os resultados da caracterização bioquímica dos isolados estudados estão apresentados na Tabela 3 e 4. Todos os isolados apresentaram o teste da catalase positivo. Nenhum deles produziu ácido sulfídrico (H₂S) nem arginina descarboxilase. A reação de CAMP foi observada apenas nos isolados 3316 (*Corynebacterium* sp.) (Figura 4), 3407b (*Microbacterium* sp.) e 3401 (*Arthrobacter* sp.), e nenhum deles apresentou CAMP reverso positivo. Todos isolados crescem em ambiente aeróbio sendo que, os isolados 3211A, 3188, 3316, 3345, 3089, 3335, 3069, 3225 apresentaram crescimento anaeróbio facultativo.

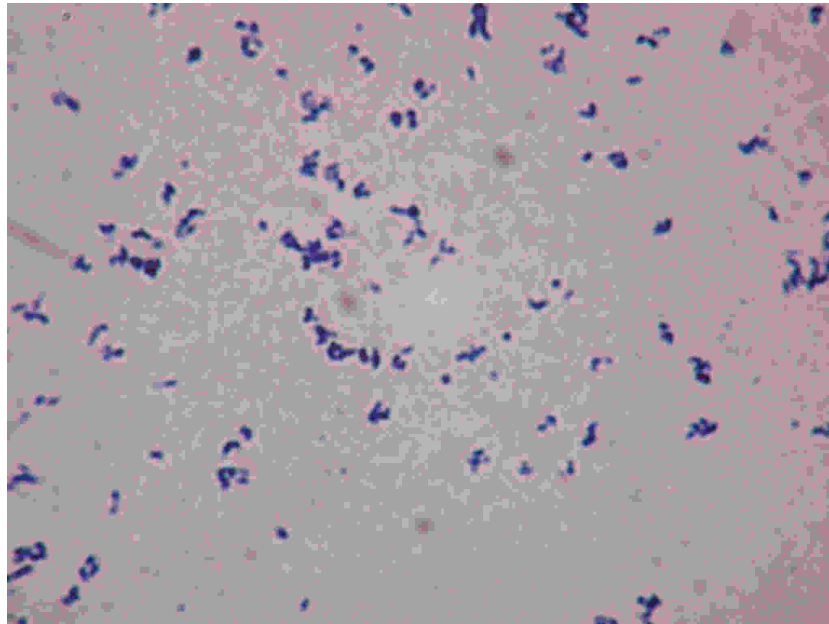
A mobilidade dos isolados 3069 e 3098 nos meios ágar nitrate mobilidade e ágar semi-sólido sulfeto-indol-motilidade (SIM) foi característico, logo abaixo da superfície do ágar observamos o crescimento bacteriano em forma de “guarda chuva” (característica também encontrada na espécie *Listeria monocytogenes*) e “prato de circo” respectivamente. Para os isolados 3097 e 3089 observamos o crescimento característico em forma de “cogumelo” no meio SIM (Figura 5A e 5B).



Colônias vistas no ágar BHI

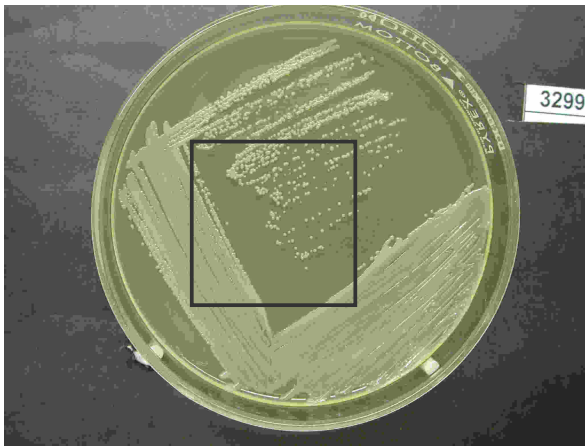


Detalhe aproximado das colônias

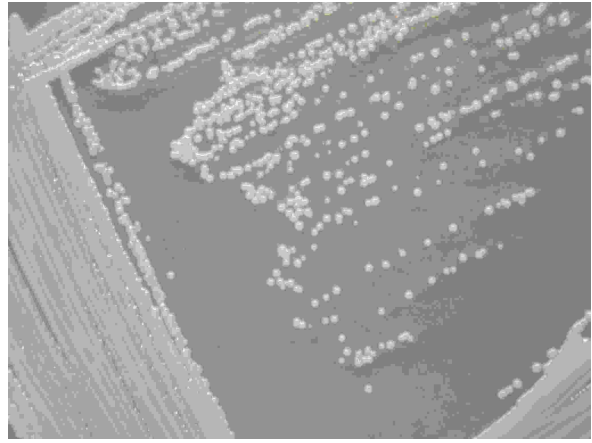


Observação microscópica

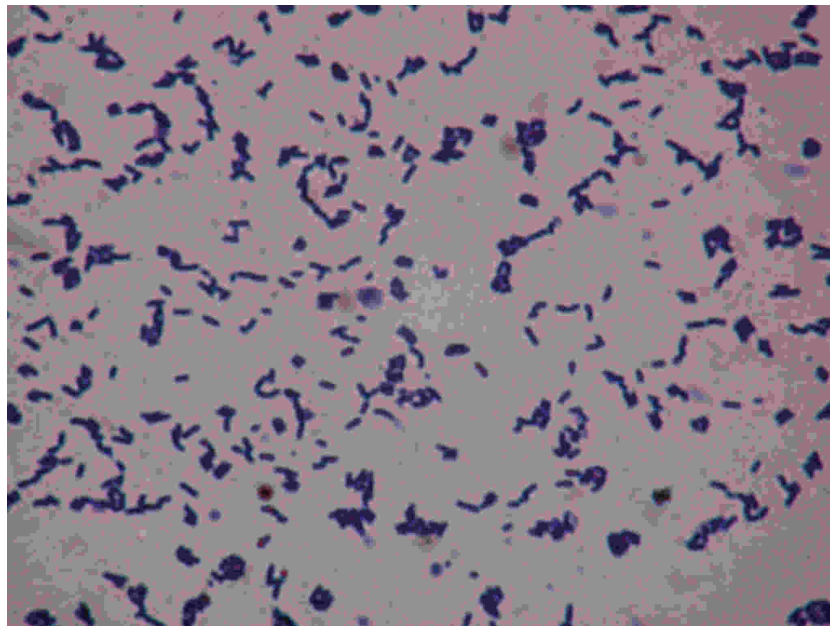
Figura 3 A. Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3369b (*Gordonia sp.*).



Colônias vistas no ágar BHI

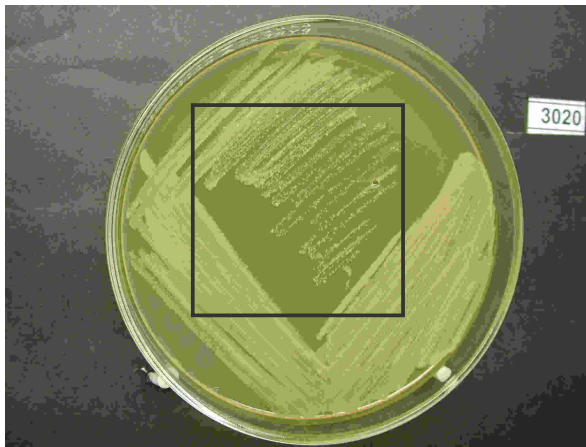


Detalhe aproximado das colônias

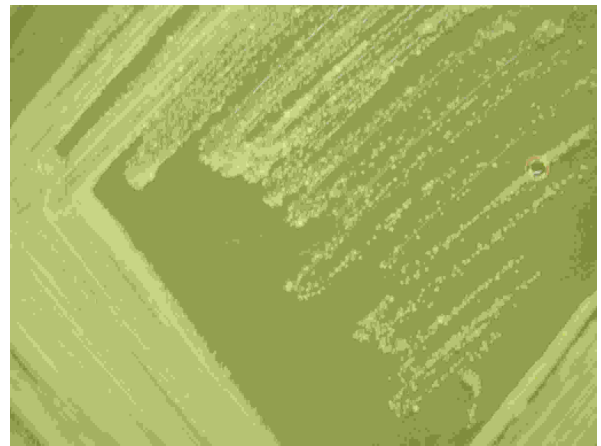


Observação microscópica

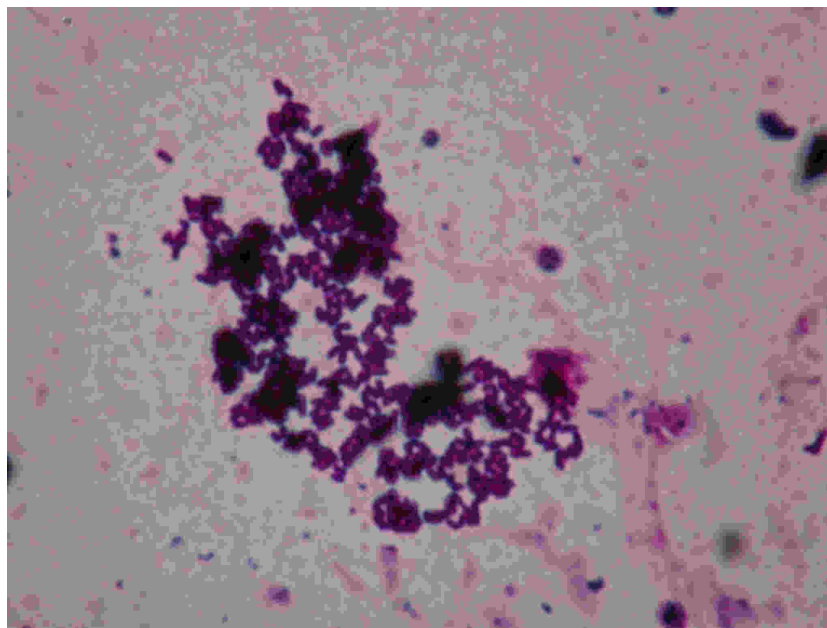
Figura 3 B. Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3299 (*Brevibacterium sp.*).



Colônias vistas no ágar BHI

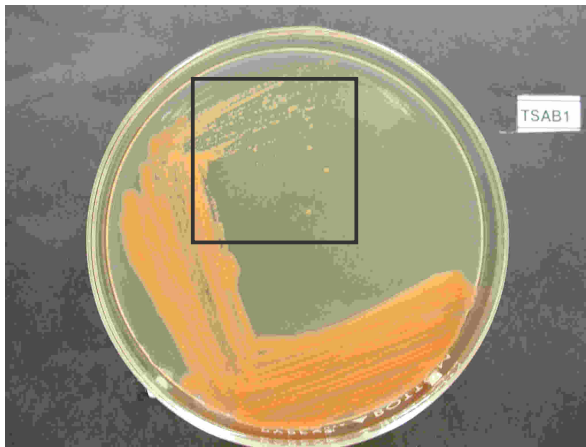


Detalhe aproximado das colônias

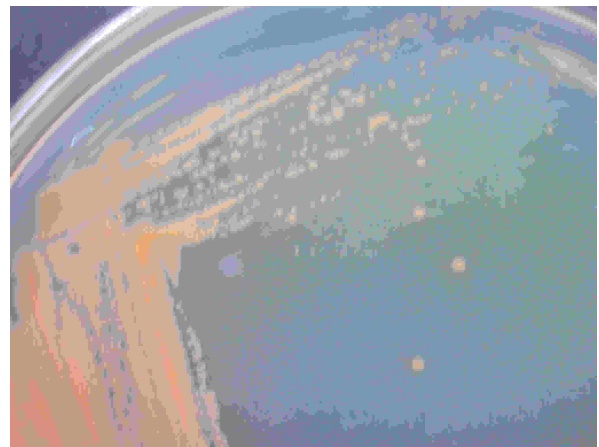


Observação microscópica

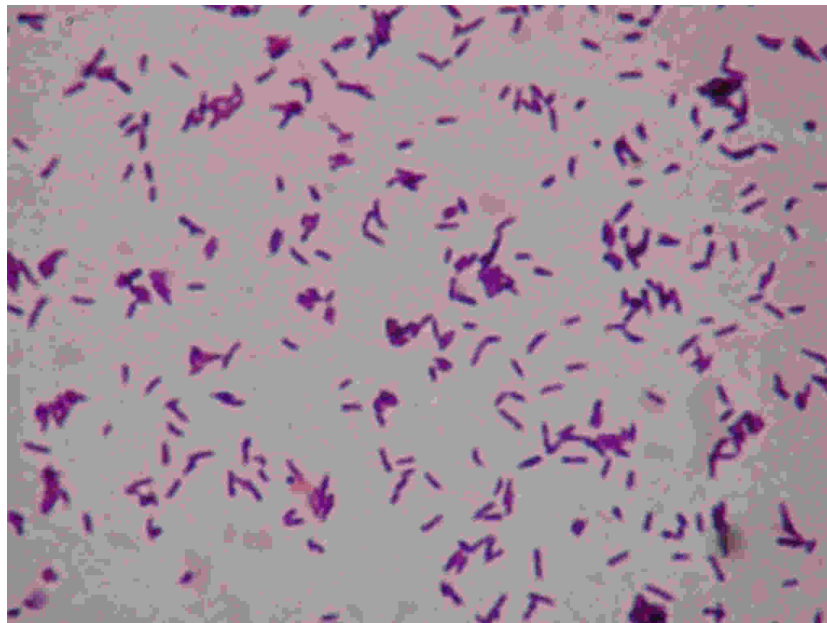
Figura 3 C. Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3020 (*Corynebacterium sp.*).



Colônias vistas no ágar BHI

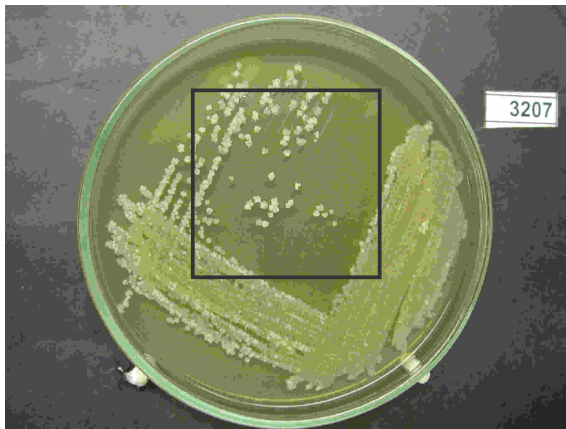


Detalhe aproximado das colônias

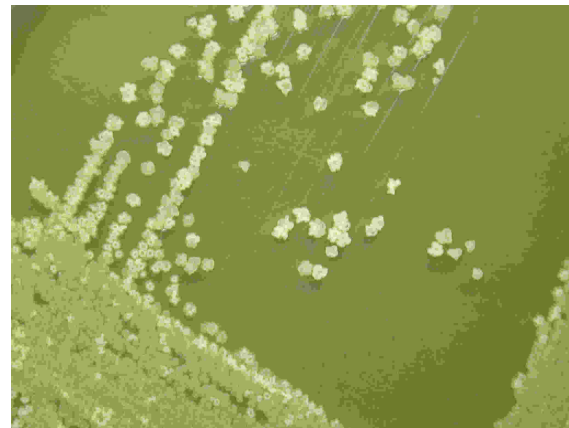


Observação microscópica

Figura 3 D. Características morfológicas coloniais e celulares do isolado TSAB1 (*Rhodococcus sp.*).



Colônias vistas no ágar BHI

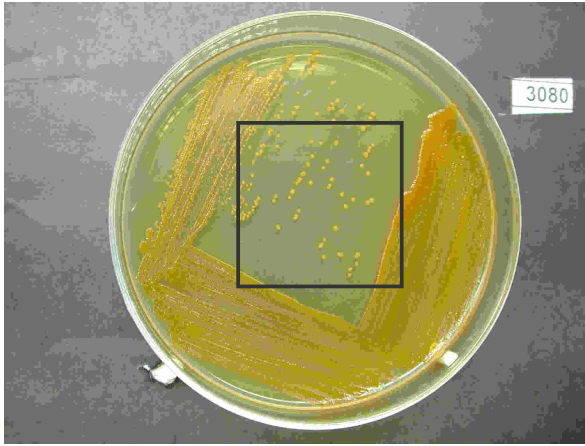


Detalhe aproximado das colônias

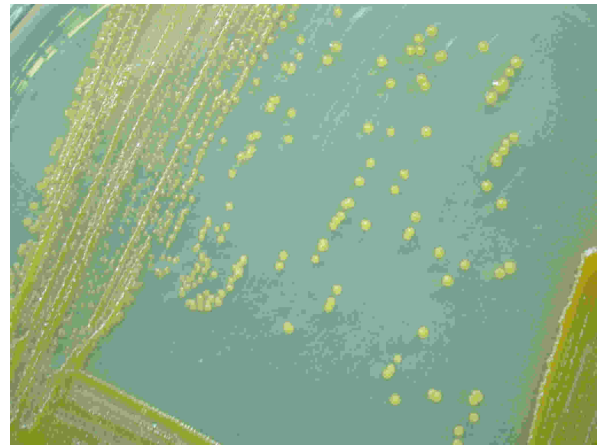


Observação microscópica

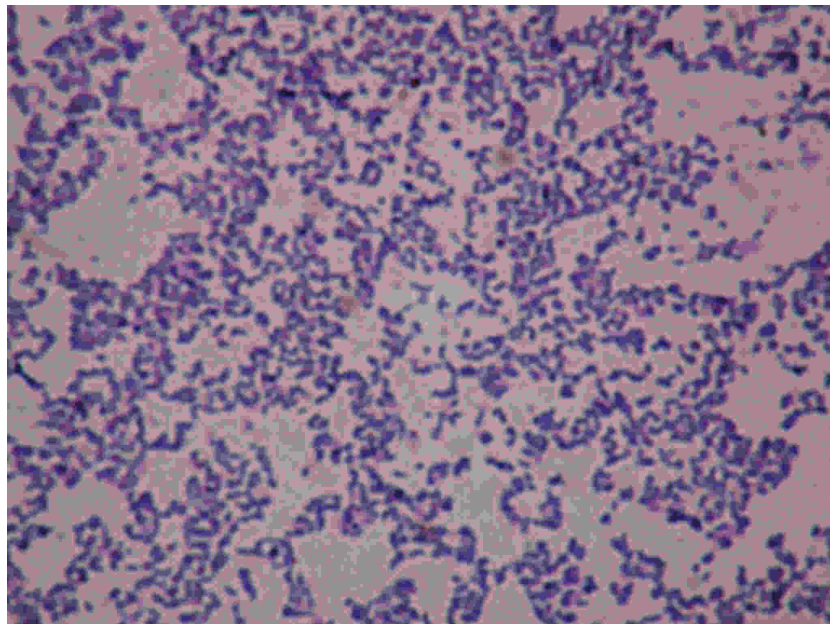
Figura 3 E. Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3207 (*Streptomyces sp.*).



Colônias vistas no ágar BHI

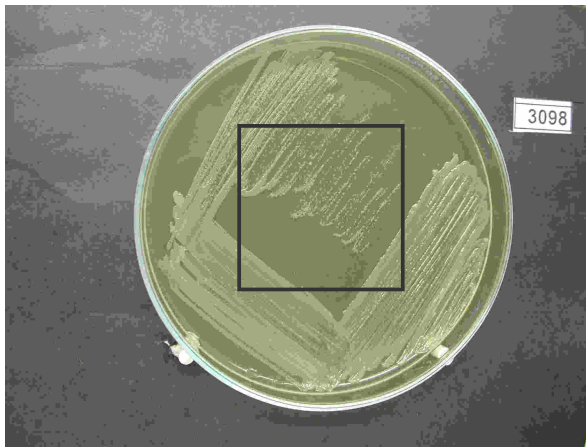


Detalhe aproximado das colônias

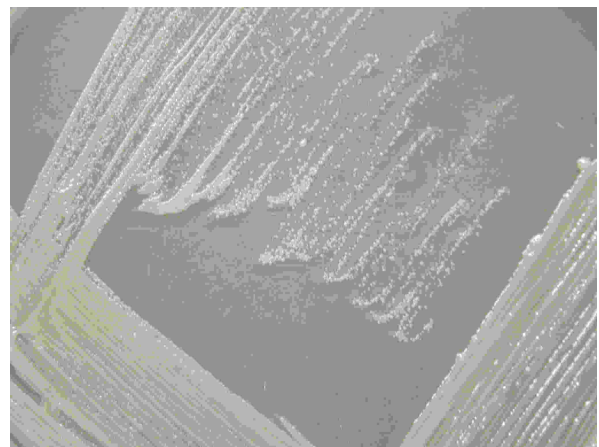


Observação microscópica

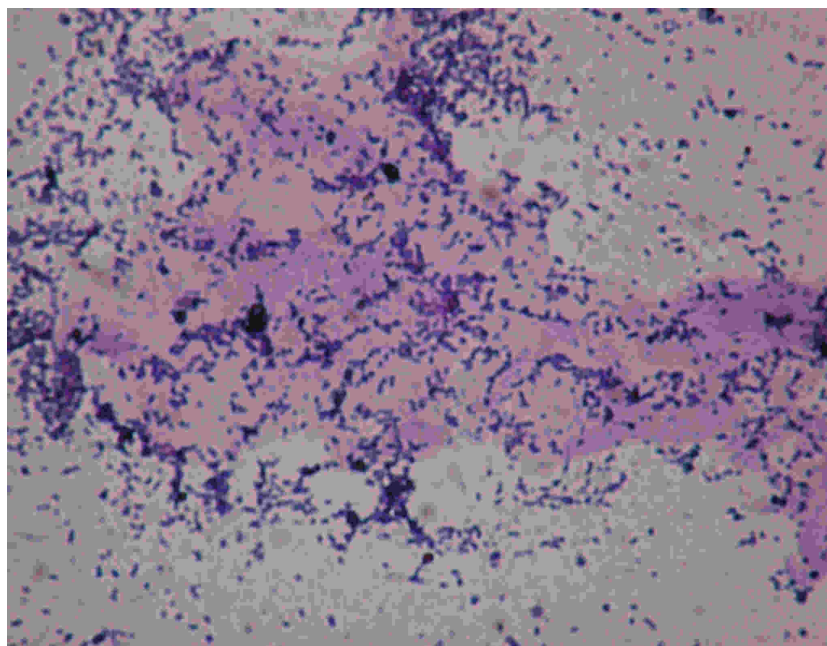
Figura 3 F. Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3080 (*Microbacterium sp.*).



Colônias vistas no ágar BHI

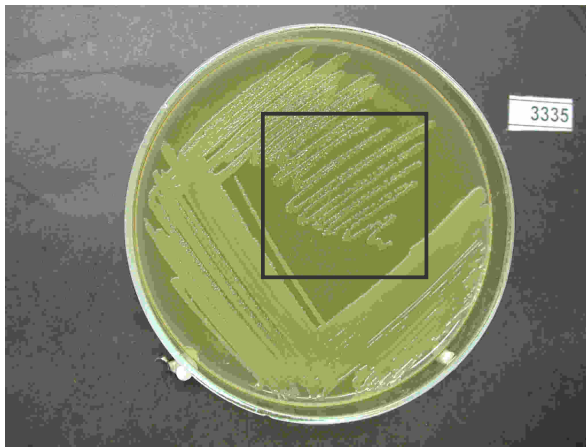


Detalhe aproximado das colônias

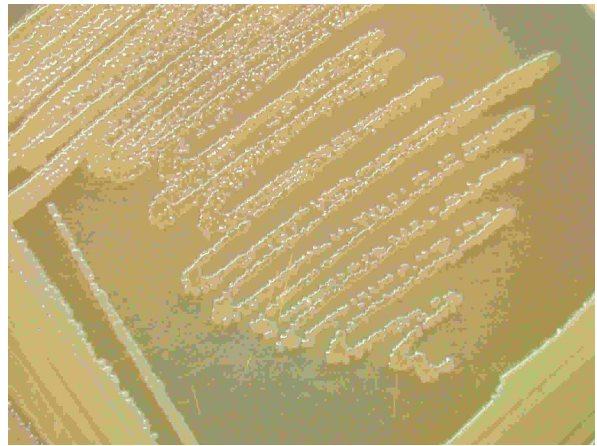


Observação microscópica

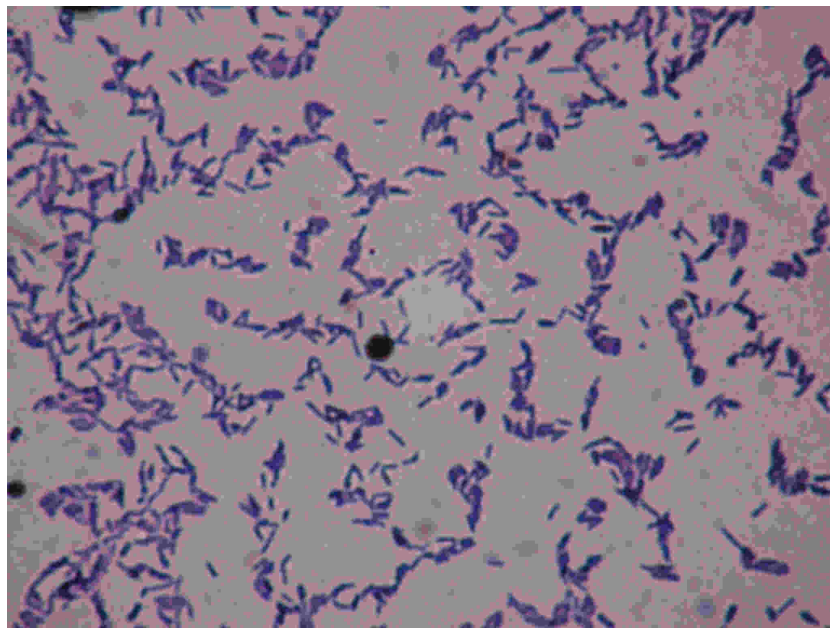
Figura 3 G. Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3098 (*Agromyces sp.*).



Colônias vistas no ágar BHI

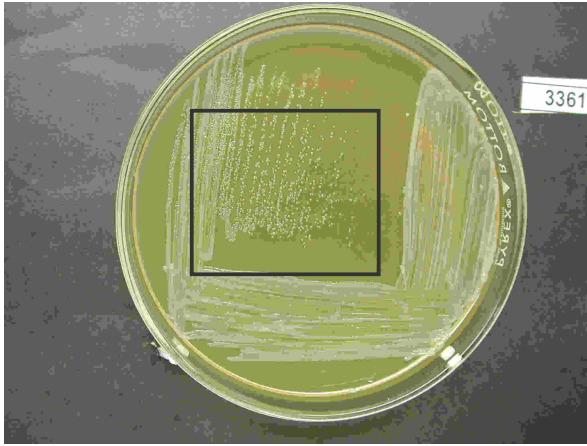


Detalhe aproximado das colônias

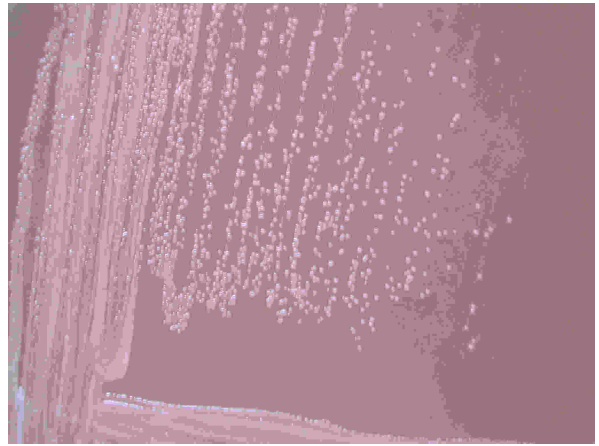


Observação microscópica

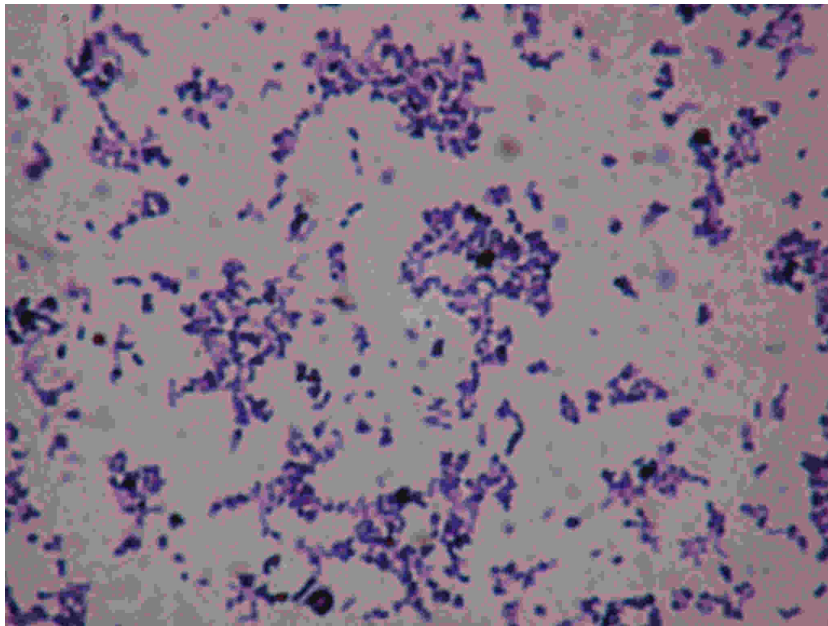
Figura 3 H. Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3335 (*Cellulomonas* sp.).



Colônias vistas no ágar BHI

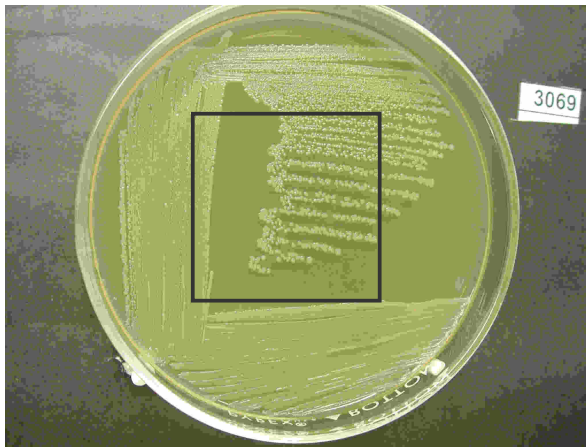


Detalhe aproximado das colônias



Observação microscópica

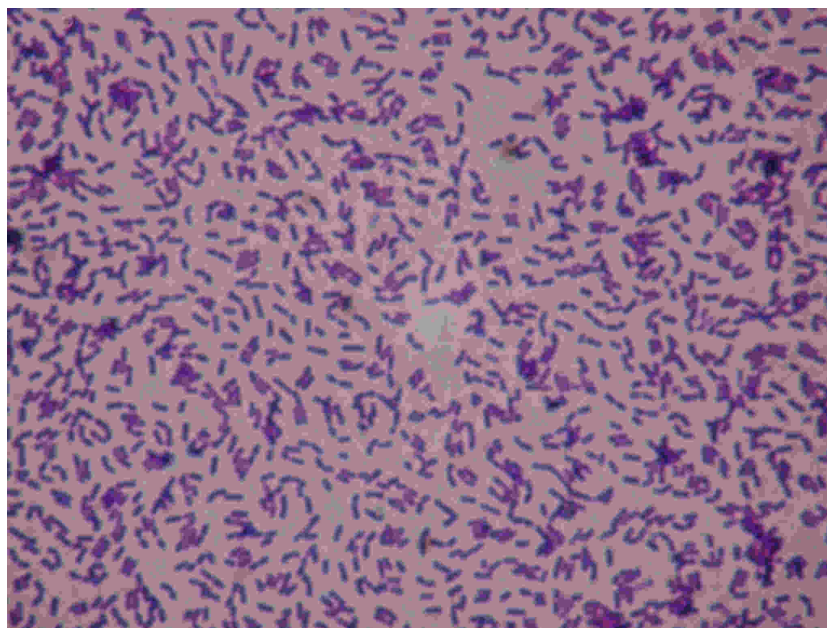
Figura 1 I. Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3361 (*Dermabacter hominis*).



Colônias vistas no ágar BHI

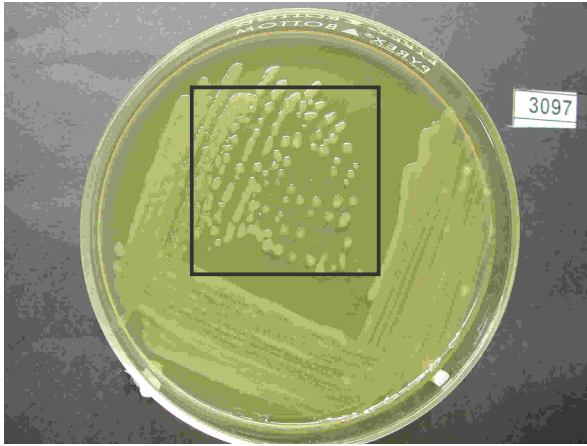


Detalhe aproximado das colônias

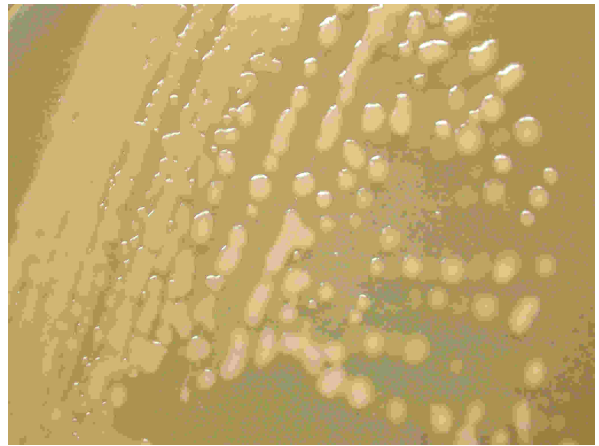


Observação microscópica

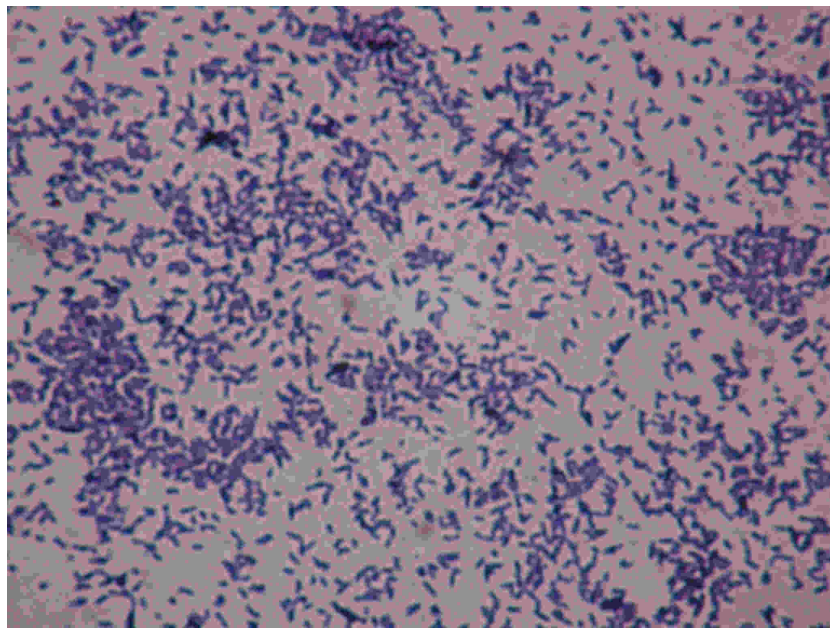
Figura 3 J. Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3069 (*Exiguobacterium* sp.).



Colônias vistas no ágar BHI

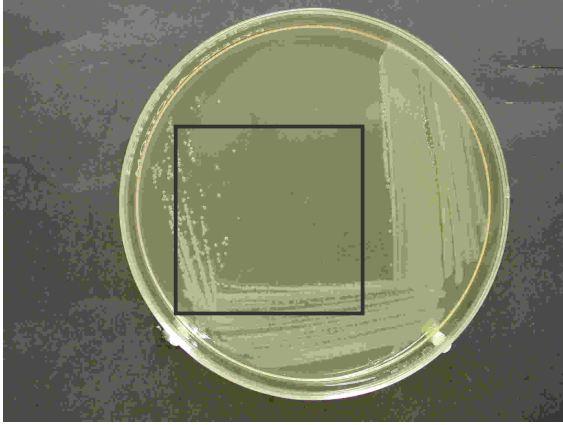


Detalhe aproximado das colônias

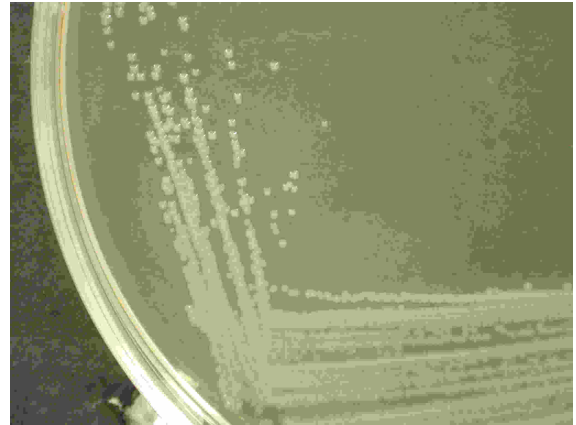


Observação microscópica

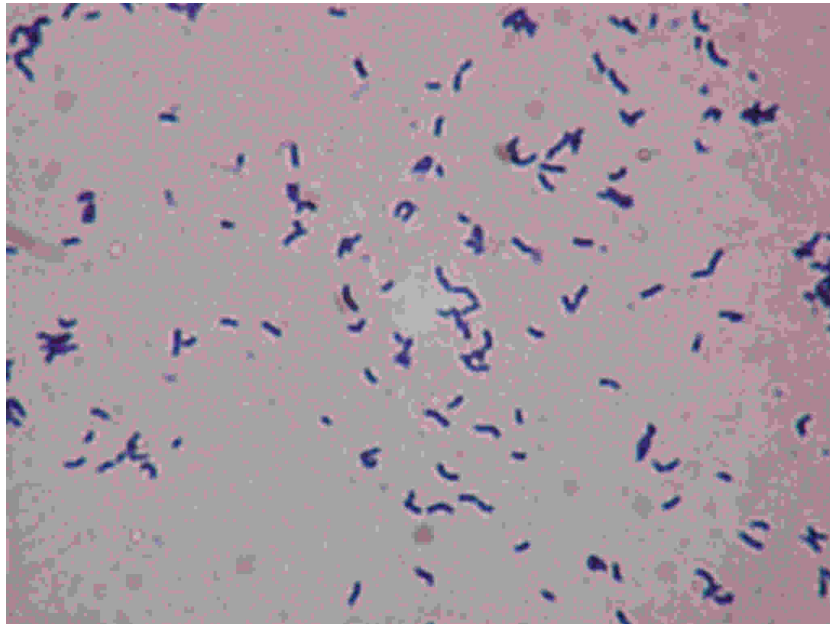
Figura 3 K. Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3097 (*Curtobacterium sp.*).



Colônias vistas no ágar BHI

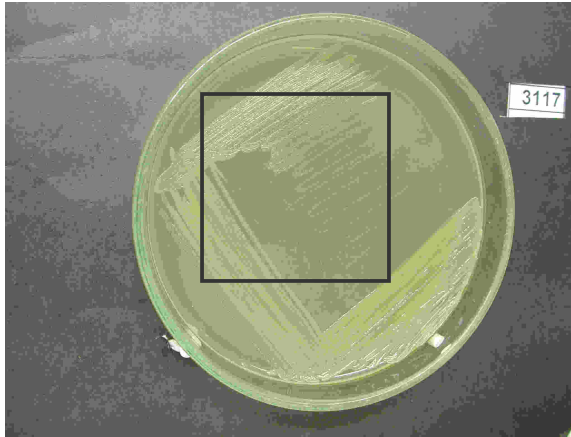


Detalhe aproximado das colônias

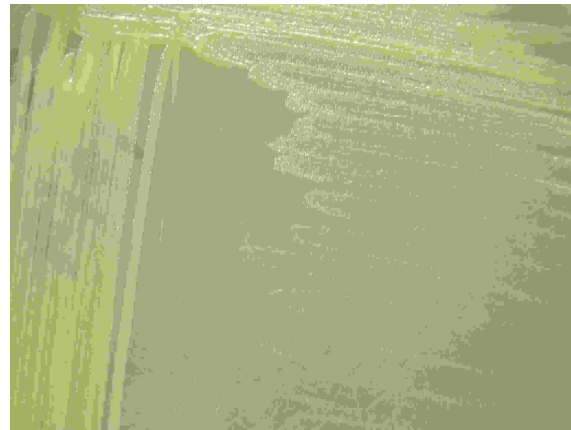


Observação microscópica

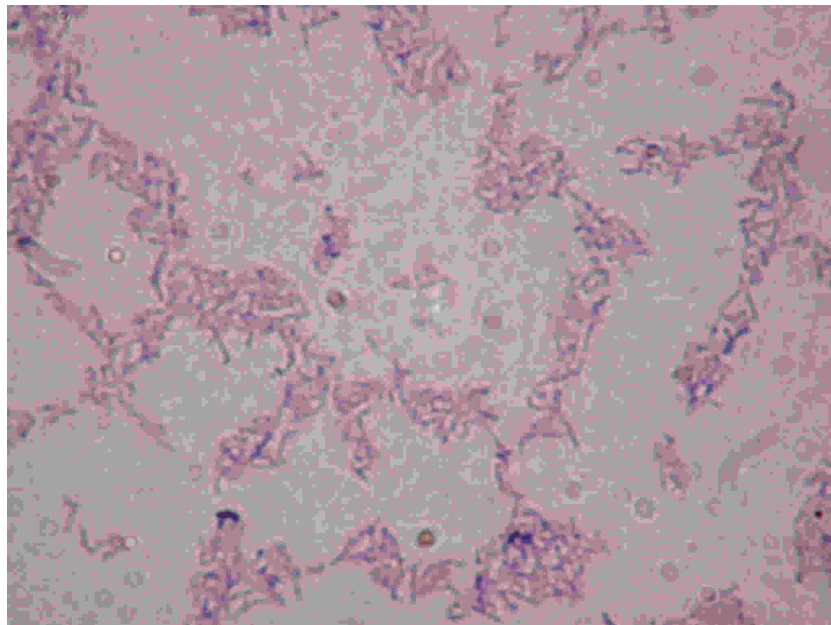
Figura 3 L. Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3401 (*Arthrobacter sp.*).



Colônias vistas no ágar BHI

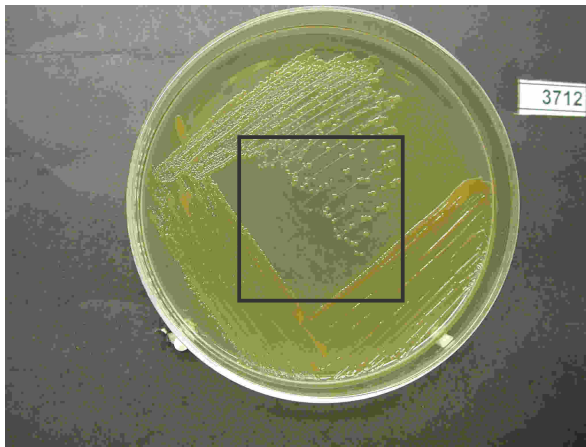


Detalhe aproximado das colônias

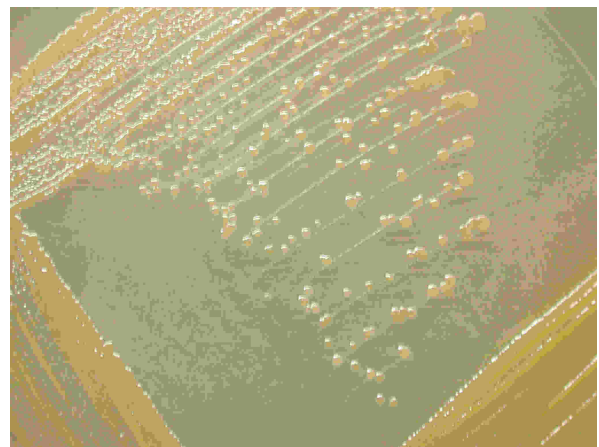


Observação microscópica

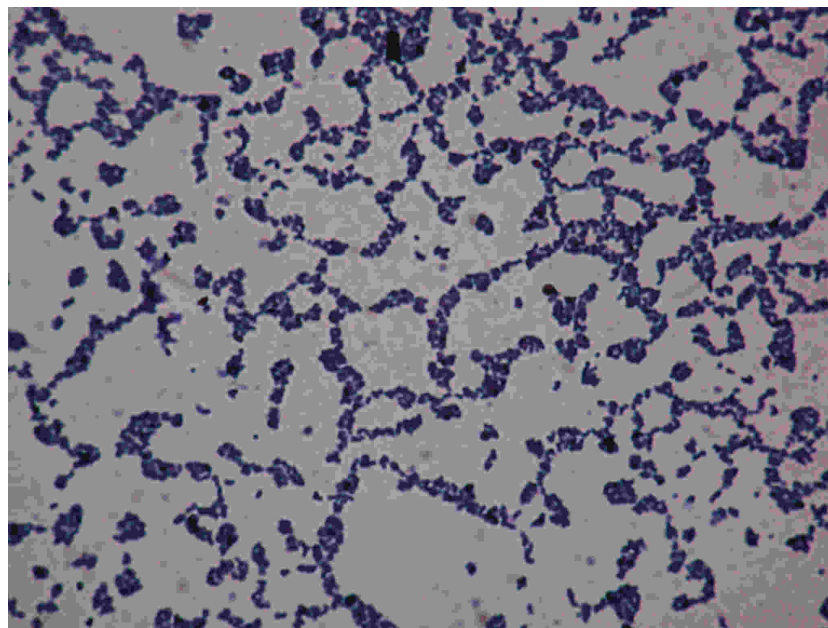
Figura 3 M. Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3117 (*Nocardioideaceae*).



Colônias vistas no ágar BHI



Detalhe aproximado das colônias



Observação microscópica

Figura 3 N. Características morfológicas coloniais e celulares do isolado 3712.

Tabela 3. Resultados das provas bioquímicas dos isolados estudados

TESTES BIOQUÍMICOS ^a

<i>Microbacterium sp.</i>																											
Nº DA AMOSTRA	ARG.	GLI	SAC	TRE.	XIL	MALT	MANO	MANI	FRU	RAF	LAC	GAL	ESC	URE	GEL	AMI	NIT	MOB	VM	CAS	DNase	VP	0	F	OXI	COR	
3080	-	b	-	F ^c	F	-	+ ^d	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	Laranja
3016	-	-	F	-	-	F	F	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	Amarela
3019	-	-	-	-	-	+	F	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Amarela
3248	-	D	F	F	-	+	+	+	+	-	-	F	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Laranja
3211a	-	+	+	+	-	+	+	F	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	F	+	+	-	-	Amarela
3227	-	D	+	-	F	D ^e	F	-	+	+	F	-	+	-	-	+	+	-	-	F	+	-	-	D	-	-	Amarela
3223	-	D	+	-	F	F	F	F	+	+	F	-	+	-	-	+	+	-	-	F	+	-	-	D	-	-	Amarela
3188	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	Amarela
3407b	-	F	+	D	D	+	+	D	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	F	+	-	-	D	-	-	Amarela
3408b	-	-	+	-	+	F	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Amarela
3249	-	+	+	D	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	F	+	+	-	-	Amarela
3155	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	D	-	-	Amarela
<i>Cellulomonas sp.</i>																											
3089	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	Amarela
3335	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	Amarela
<i>Exiguobacterium sp.</i>																											
3069	-	+	+	+	-	+	+	F	+	+	-	-	+	-	F	+	-	+	-	-	+	-	-	D	+	-	Laranja
3225	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	D	-	-	Laranja
<i>Corynebacterium sp.</i>																											
3020	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	D	-	-	Amarela
3316	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	F	-	-	-	+	+	-	-	Amarela
3345	-	F	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Creme
<i>Rhodococcus sp.</i>																											
TSAB1	-	-	-	-	+	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Salmão
3032b	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Lar.forte
3165	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Salmão

Nº DA AMOSTRA	ARG.	GLI	SAC	TRE.	XIL	MALT	MANO	MANI	FRU	RAF	LAC	GAL	ESC	URE	GEL	AMI	NIT	MOB	VM	CAS	DNase	VP	O	F	OXI	COR	
<i>Gordonia sp.</i>																											
3369a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	Salmão claro
3369b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	Salmão escuro
<i>Brevibacterium sp.</i>																											
3299	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Creme
<i>Curtobacterium sp.</i>																											
3097	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	F	+	-	+	-	+	-	-	F	F	-	-	Amarela
<i>Arthrobacter sp.</i>																											
3401	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	Creme
<i>Agromyces sp.</i>																											
3098	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Creme
<i>Dermabacter sp.</i>																											
3361	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Creme
<i>Nocardioideaceae</i>																											
3117	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Creme
Não identificado																											
3712	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Laranja

^a ARG - descarboxilação da arginina, GLI - utilização da glicose, SAC - fermentação da sacarose, TER - fermentação da trealose, XIL - fermentação da xilose, MALT - fermentação da maltose, MANO - fermentação da manose, MANI - fermentação do manitol, FRU - fermentação da frutose, RAF - fermentação da rafinose, LAC - fermentação da lactose, fermentação da galactose, ESC - hidrólise da esculina, URE - hidrólise da uréia, GEL - hidrólise da gelatina, AMI - hidrólise do amido, NIT - redução do nitrato, MOB - mobilidade, VM - prova do vermelho de metila, CAS - hidrólise da caseína, DNase - produção de DNase, VP - prova de Voges-Proskauer, O - oxidação da glicose, F - fermentação da glicose, OXI - teste da oxidase, COR - cor da colônia após crescimento de 48h em ágar sangue.

^b Negativo.

^c Fraco positivo.

^d positivo.

^e resultado duvidoso.

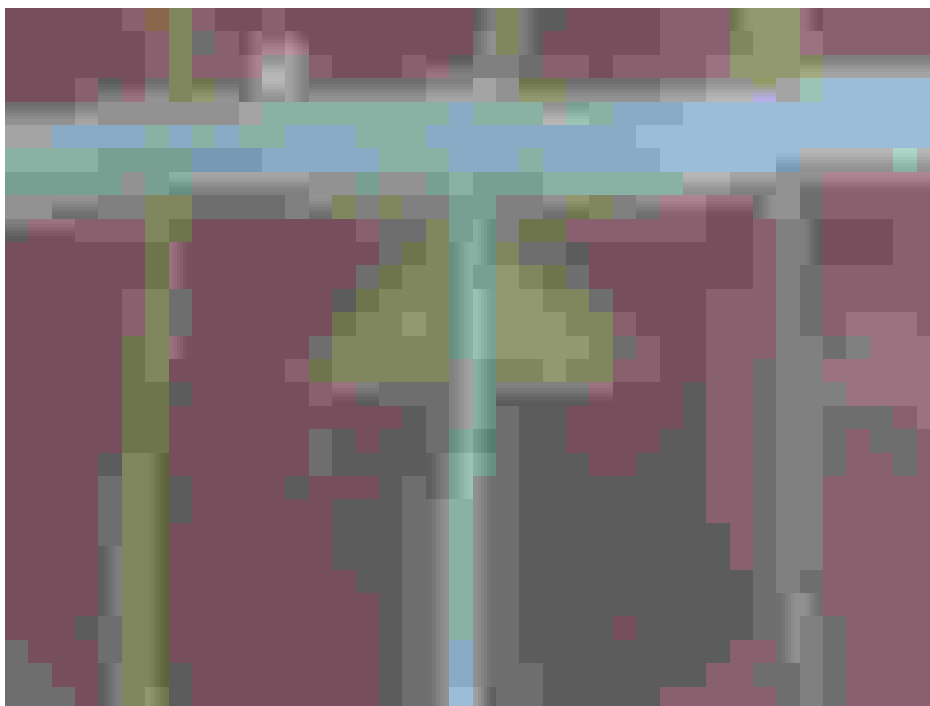
Tabela 4. Resultados dos testes bioquímicos dos isolados filamentosos *Streptomyces* sp.

TESTES BIOQUÍMICOS ^a													
Nº DA AMOSTRA	GLI	ESC	URE	GEL	AMI	NIT	CAS	DNase	O	F	OXI	COR	
3182	+	^b	+	+	-	^c	-	+	+	+	+	-	Creme
3207	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	Branca
3212	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	Branca
3268	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	Branca
3341	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	Branca

^a GLI - utilização da glicose, ESC - hidrólise da esculina, URE - hidrólise da uréia, GEL - hidrólise da gelatina, AMI - hidrólise do amido, NIT - redução do nitrato, CAS - hidrólise da caseína, DNase - produção de DNase, O - oxidação da glicose, F - fermentação da glicose, OXI - teste da oxidase. COR - cor da colônia após crescimento de 48h em ágar sangue.

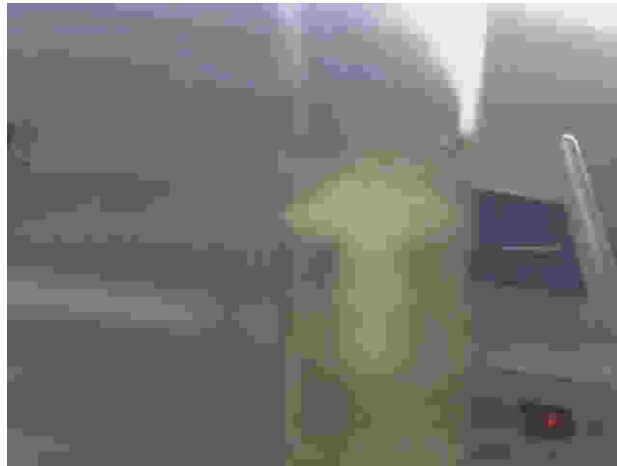
^b Positivo

^c Negativo



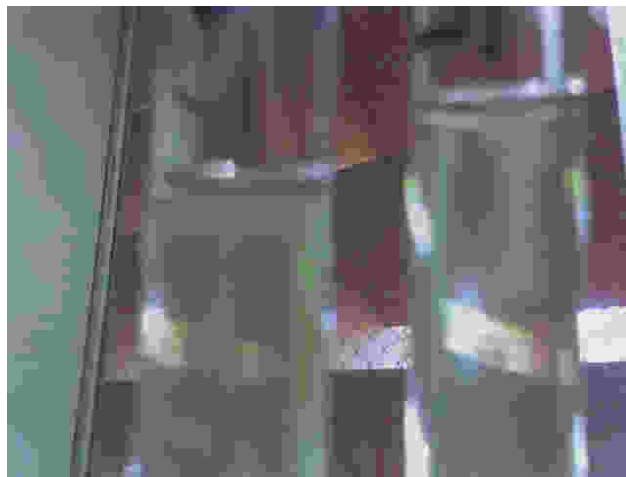
Formação de “cabeça de flecha”, devido à combinação sinérgica de beta hemólise produzida pelo isolado 3316 e *S. aureus*.

Figura 4. Reação de CAMP positiva do isolado 3316 (*Corynebacterium sp.*).



Motilidade em forma de “cogumelo”

Figura 5A. Mobilidade dos isolados 3089 e 3097 em meio SIM.



Motilidade em forma de “guarda chuva ”e“ prato de circo”.

Figura 5B. Isolado 3069 e 3098 nos meios ágar nitrato mobilidade e SIM

4.1.2 Testes Bioquímicos realizados em Sistema Semi-Automatizado

Os resultados da caracterização fenotípica realizada com o sistema semi-automatizado API CORYNE (BioMerieux) estão apresentados na Tabela 5. Os isolados 3182, 3207, 3212, 3268 e 3341 (filamentosos) não foram submetidos a esse sistema por limitação do mesmo. Esse sistema sugeriu duas opções de gênero para os seguintes isolados: 3098, 3097, 3712, 3080, 3019, 3248, 3227, 3223 (*Microbacterium/Leifsonia aquatica*); 3089, 3335, 3069, 3225, 3249, 3211a, 3188, 3408b, 3407b e 3155 (*Cellulomonas/Microbacterium*); 3299 (*Rhodococcus/Brevibacterium*), 3117 (*Brevibacterium/Arthrobacter*). Para esses isolados foram realizados testes complementares sugeridos pelo sistema API CORYNE (Tabela 6) e os resultados dos testes hidrólise da caseína, mobilidade e cor da colônia se encontram na Tabela 3. Nenhum desses isolados apresentou odor característico de queijo e o isolado 3227 cresceu em caldo nutriente com NaCl a 6%.

Utilizando o sistema API CORYNE incubando por 24 horas conforme instruções do fabricante e quando comparados com o seqüenciamento do gene 16S rRNA, foram identificados ao nível de gênero apenas sete (22,58 %) dos trinta e um isolados. Dez isolados (32,26%) apresentaram identificação equivocada. Para quatorze isolados (45,16%) este sistema sugeriu dois gêneros prováveis, onde um destes foi identificado após a análise da seqüência do gene 16S rRNA (Tabela 5 e Figura 6). A leitura dos testes realizada após 24 horas possibilitou a identificação correta de dois isolados. O isolado 3361, identificado no API CORYNE como *Propionibacterium avidum* (98 %), apresentou leitura positiva para a lactose após 36 h, resultado também confirmado pelos testes convencionais, mudando o gênero para *Dermabacter hominis* (99,5%). O isolado 3299 indicou inicialmente dois gêneros *Rhodococcus* (55,1%) e *Brevibacterium* (43%), entretanto, após 48h o teste da hidrólise da gelatina foi positivo, resultando na identificação correta do gênero. Estes resultados foram confirmados pela análise das seqüências do gene 16S rRNA. A performance do sistema melhora apresentando 29,03% de identificações corretas. (Tabela 5 e Figura 6).

Tabela 5. Resultados da comparação da seqüência do gene 16S rRNA e da identificação fenotípica realizada pelo sistema API CORYNE.

Nº	Identidade (16S RNA)	% ^a	API CORYNE	% ^b	Observação gerada pelo programa API
3098	<i>Agromyces sp.</i>	97	<i>Microbacterium/Leifsonia aquatica</i>	98,9	Boa identificação
3401	<i>Arthrobacter sp.</i>	98	<i>Arthrobacter sp</i>	98,3	Perfil duvidoso
3299	<i>Brevibacterium sp.</i>	99	<i>Rhodococcus ou Brevibacterium</i>	55,1/ 43,8	Fraca discriminação
3089	<i>Cellulomonas sp</i>	99	<i>Cellulomonas/Microbacterium</i>	99,96	Excelente identificação
3335	<i>Cellulomonas sp.</i>	98	<i>Cellulomonas/Microbacterium</i>	99,98	Excelente identificação
3020	<i>Corynebacterium sp.</i>	99	<i>Corynebacterium striatum/amycolatatum/ C. jeikeium/ C. argenteratense</i>	80,3/ 14,08/ 2,2	Boa identificação do gênero
3316	<i>Corynebacterium sp.</i>	100	<i>Corynebacterium group G/ C. striatum/amycolatatum/ C. jeikeium</i>	86,9/ 10,7/ 2,2	Excelente identificação do gênero
3345	<i>Corynebacterium sp.</i>	99	<i>Corynebacterium group G/ C. striatum/amycolatatum/ C. jeikeium</i>	75,7/ 20,72/ 2,3	Boa identificação do gênero
3097	<i>Curtobacterium sp</i>	99	<i>Microbacterium/Leifsonia aquatica</i>	98,9	Boa identificação
3361	<i>Dermabacter sp.</i>	99	<i>Propionibacterium avidum</i>	98	Perfil duvidoso
3069	<i>Exiguobacterium sp</i>	99	<i>Cellulomonas/Microbacterium</i>	99,9	Muito boa identificação do Gênero
3225	<i>Exiguobacterium sp</i>	99	<i>Cellulomonas/Microbacterium</i>	99,9	Muito boa identificação
3369a	<i>Gordonia sp</i>	100	<i>Rhodococcus sp</i>	99,3	Muito boa identificação
3369b	<i>Gordonia sp</i>	100	<i>Rhodococcus sp</i>	99,3	Fraca discriminação
3712	-	-	<i>Microbacterium/Leifsonia aquatica</i>	70,8	Fraca discriminação
3016	<i>Microbacterium sp.</i>	100	<i>Rhodococcus.</i>	97,9	Boa identificação
3080	<i>Microbacterium sp.</i>	99	<i>Microbacterium/Leifsonia aquatica</i>	86,2	Fraca discriminação
3019	<i>Microbacterium sp</i>	100	<i>Microbacterium/Leifsonia aquatica</i>	98,9	Boa identificação
3248	<i>Microbacterium sp</i>	98	<i>Microbacterium/Leifsonia aquatica</i>	84,5	Perfil Aceitável
3249	<i>Microbacterium sp</i>	99	<i>Cellulomonas/Microbacterium</i>	99,9	Excelente identificação
3211a	<i>Microbacterium sp.</i>	99	<i>Cellulomonas/Microbacterium</i>	93,2	Fraca discriminação/colônia amarelo ouro
3227	<i>Microbacterium sp</i>	98	<i>Microbacterium/Leifsonia aquatica</i>	76,2	Fraca discriminação
3223	<i>Microbacterium sp</i>	98	<i>Microbacterium/Leifsonia aquatica</i>	76,2	Fraca discriminação
3188	<i>Microbacterium sp</i>	100	<i>Cellulomonas/Microbacterium</i>	99,9	Excelente identificação
3408b	<i>Microbacterium sp</i>	97	<i>Cellulomonas/Microbacterium</i>	99	Excelente identificação
3407b	<i>Microbacterium sp</i>	99	<i>Cellulomonas/Microbacterium</i>	99,9	Muito boa identificação
3155	<i>Microbacterium sp</i>	99	<i>Cellulomonas/Microbacterium</i>	99,9	Excelente identificação
3117	<i>Nocardiodiaceae</i>	96	<i>Brevibacterium ou Arthrobacter</i>	78,4/ 21,4	Fraca discriminação
TSAB1	<i>Rhodococcus sp.</i>	100	<i>Rhodococcus sp.</i>	84,9	Identificação aceitável
3032b	<i>Rhodococcus sp.</i>	99	<i>Rhodococcus sp.</i>	94,7	Fraca discriminação
3165	<i>Rhodococcus sp.</i>	99	<i>Rhodococcus sp.</i>	84,9	Perfil aceitável
3268	<i>Streptomyces sp</i>	99	NÃO REALIZADO	-	-
3207	<i>Streptomyces sp</i>	99	NÃO REALIZADO	-	-
3212	<i>Streptomyces sp</i>	99	NÃO REALIZADO	-	-
3182	<i>Streptomyces sp</i>	99	NÃO REALIZADO	-	-
3341	<i>Streptomyces sp</i>	97	NÃO REALIZADO	-	-

^a porcentagem de similaridade ^b porcentagem de identificação pelo sistema API CORYNE (24 h de incubação)

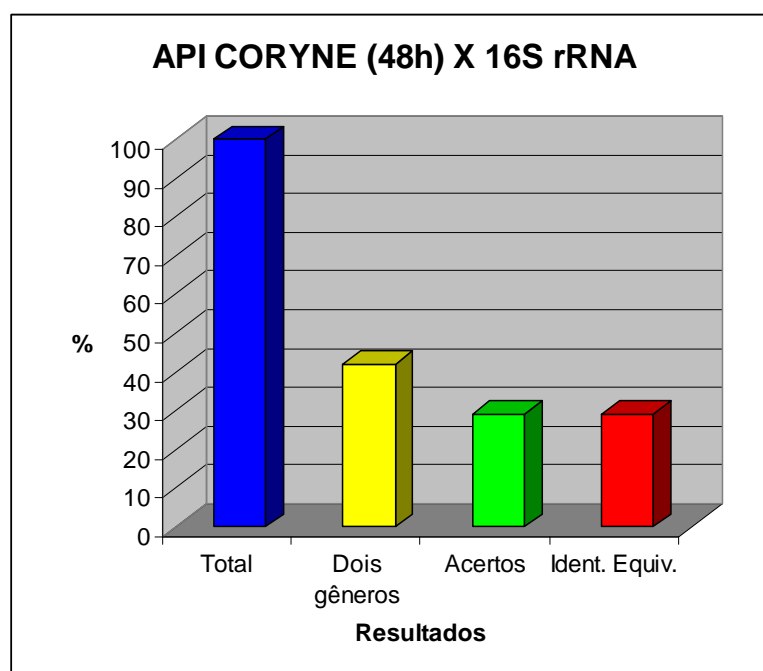
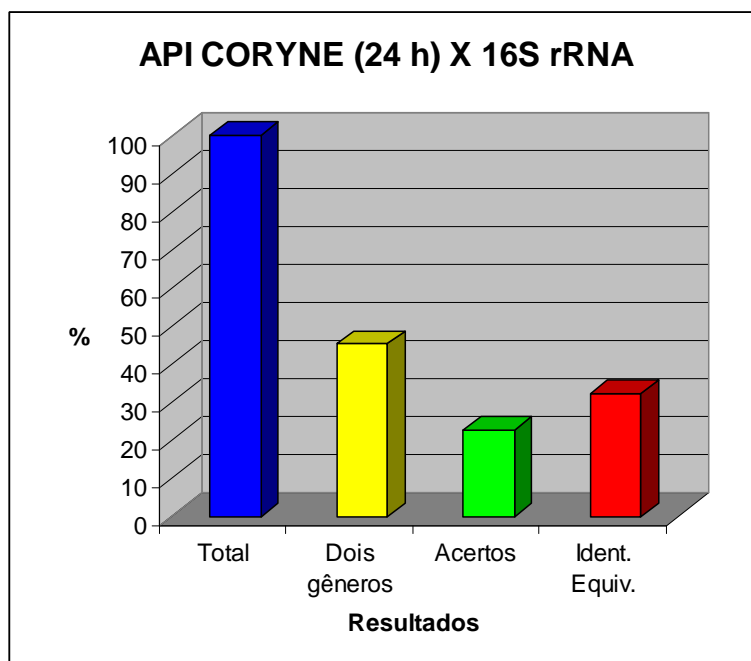


Figura 6. Comparação dos resultados de identificação obtidos pelo API CORYNE em 24 horas e 48 horas de acordo com os resultados da análise das seqüências do gene 16S rRNA

Tabela 6. Testes complementares sugeridos pelo API CORYNE na discriminação de alguns gêneros bacterianos

Microrganismo	OF/F	Caseína	Colônia > 1 mm	Cresc. a 42°C	Cor Rosa	Micélio	Camp	NaCl 6%	Odor de queijo	Mobilidade		
<i>Microbacterium sp.</i>	+	^a	+	(-) ^b	+	(-)	NT ^c	-	^d	NT	V	^e
<i>Cellulomonas sp.</i>	+	-	-	-	+							
<i>Leifsonia aquatica</i>	-	-	+	(-)	-	(+)		V	NT	+	(-)	
<i>Brevibacterium sp.</i>	-	+					-	-	-	+		-
<i>Arthrobacter sp.</i>		NT	NT							NT		
<i>Rhodococcus sp.</i>		-					+	-	-			

^a positivo ^b negativo ^c Não testado ^d negativo ^e variável

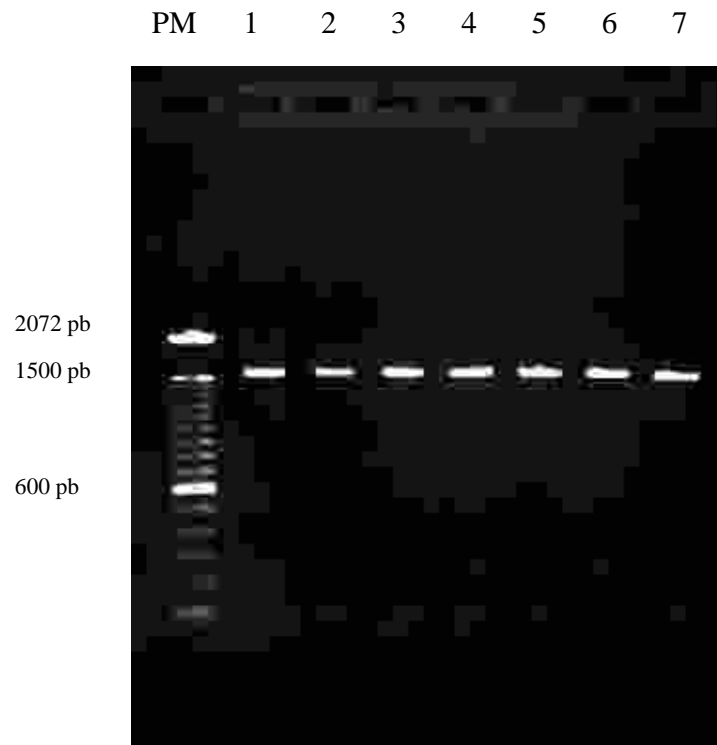
4.2 Caracterização do Gene Ribossomal 16S

Utilizando a técnica de PCR, amplificamos o gene 16S rRNA dos 36 isolados estudados. Foram obtidos amplicons do gene 16S rRNA de aproximadamente 1500 pb (Figura 7). A seqüência do gene 16S rRNA determinadas variaram de 1180 pb a 1446 pb e corresponde a 81,38% a 99,72% respectivamente do tamanho da seqüência do gene 16S rRNA da *E. coli* ATCC 11775T, número de acesso X 80765 (Tabela 7).

As seqüências do gene 16S rRNA editadas foram submetidas ao NCBI/BLAST (NCBI-blast, 2007) e ao Ribosomal Database Project II (RIBOSOMAL...,2007) para determinação do relacionamento destas com as seqüências depositadas. O relacionamento das seqüências está listado na Tabela 7. Foi possível determinar os seguintes gêneros bacterianos: *Agromyces*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Dermabacter*, *Exiguobacterium*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Rhodococcus* e *Streptomyces*. Para os isolados 3117 e 3712 não foi possível determinar o gênero.

O alinhamento das seqüências do gene 16S rRNA para os isolados dos gêneros *Corynebacterium*, *Exiguobacterium*, *Microbacterium*, *Rhodococcus* e *Streptomyces*, mostrou a diversidade dos isolados estudados para cada gênero analisado (Figuras 8a, 8b, 8c, 8d e 8e).

A seqüência obtida para o isolado 3098 do gene estudado mostrou similaridade com o gênero *Agromyces*. Com a cepa tipo (*Agromyces ramosus* - 1482 pb), apresentou similaridade de 96,56%. Para as cepas *A. ulmi* (T), *Agromyces sp.* CM01 e *Agromyces sp.* CNJ 745PL04 mostrou similaridade maior que 97% (Tabela 7).



Linhas: **PM**, marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen); **1**, isolado 3069; **2**, isolado 3361; **3**, isolado 3212; **4**, isolado 3225; **5**, isolado 3248; **6**, isolado 3117; **7**, isolado 3020.

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose (2%) de amplicons do gene 16S rRNA de aproximadamente 1500 pb.

Na análise realizada, a seqüência do gene 16S rRNA obtida para o isolado 3401 apresentou maior similaridade com o gênero *Arthrobacter* com a cepa tipo do gênero (*Arthrobacter globiformis* - 1464 pb), foi observado o valor de 97,62% de identidade. Com outras cepas mostrou similaridade maior que 98% com *A. chlorophenolicus* (T), *A. dextranolyticus* e *Arthrobacter sp.* (cepas ELLIN110, BS20 e PHE-3) (Tabela 7).

A seqüência do gene 16S rRNA do isolado 3299 apresentou similaridade com a espécie tipo *Brevibacterium linens* (1474 pb) de 96,91%. Foi observada similaridade maior que 99% com *B. casei* (T), *B. casei* (cepas DSM 20657 e 3S (a)) e *Brevibacterium sp.* H15 e de 98,87% com a cepa *B. casei* FMIA (Tabela 7).

As duas seqüências do gene 16S rRNA obtidas para os isolados 3335 e 3089 apresentaram similaridades de 96,86 a 97,25% respectivamente com a cepa tipo de *Cellulomonas flavigena*, espécie tipo do gênero. A seqüência do isolado 3335 apresentou similaridade maior que 97% com as cepas *C. gélida* (T), *C. chitinilytica* XBU-B, *C. terrae* DBS e 98,35% de identidade com *Cellulomonas sp.* TR7-6. A seqüência do isolado 3089 apresentou similaridade maior que 99% com *C. hominis* (T) e *C. parahominis* (cepas W7387, W7336, W7385 e W7386) (Tabela 7).

Para os três isolados 3020, 3345 e 3316, foram observadas similaridades de 94,6 a 94,76% para as seqüências do gene analisado com a cepa tipo de *Corynebacterium diphtheriae*, espécie tipo do gênero. As seqüências dos isolados 3020 e 3316 demonstraram similaridade maior que 99% com cepas das espécies *C. xerosis* e *C. simulans* respectivamente. A seqüência do 3345 mostrou similaridade maior que 96% para as cepas *C. sundsvallense* (T), *C. riegelii* (T), *C. mucifaciens* e *Corynebacterium sp.* (cepas 47081 e 96447), entretanto, apresentou similaridade de 99,68% com a cepa tipo de *C. glaucum* (Tabela 7).

A seqüência do gene 16S rRNA obtida para o isolado 3097 mostrou maior similaridade com o gênero *Curtobacterium*, com a cepa tipo do gênero (*Curtobacterium citreum* - 1472 pb) apresentou 99,33% de identidade. Com outras cepas deste gênero tais como: *C. luteum* (T), *C. flaccumfaciens* (T), *C. flaccumfaciens* SAFR 001, e *Curtobacterium sp.* (cepas 1594 e 3430) mostrou similaridade maior que 99% (Tabela 7).

Um valor de similaridade de 99,14% foi observado com a espécie tipo do gênero *Dermabacter hominis* quando a seqüência do gene 16S rRNA do isolado 3361 foi analisada. Esta seqüência também apresentou similaridade maior que 99% com outras cepas de *Dermabacter hominis* (cepas AY853712 e AF343728) (Tabela 7).

A análise realizada com as seqüências do gene 16S rRNA dos isolados 3069 e 3225 mostrou que estas apresentam similaridades de 97,02 e 99,01% respectivamente com a cepa tipo de *Exiguobacterium aurantiacum*, espécie tipo do gênero. Estas seqüências apresentaram similaridade maior que 99% com cepas de diferentes espécies de *Exiguobacterium*, além de seqüências de isolados ambientais (Tabela 7).

Os dois isolados 3369a e 3369b proporcionaram seqüências do gene 16S rRNA que apresentaram similaridades de 98,21 e 98,20% respectivamente com a cepa tipo de *Gordonia bronchialis*, espécie tipo do gênero. Com a espécie tipo *G. terrae* apresentaram similaridade maior que 99% e identidade de 100% com cepas de *G. terrae* do solo de Taiwan e *Gordonia sp.* DEOB200 (Tabela 7).

Para o isolado 3712, foi observada uma similaridade de 100% com uma cepa depositada como Actinobacterium SM48 quando a seqüência do gene 16S rRNA foi comparada com as seqüências depositadas nos bancos de dados. Esta seqüência também apresentou similaridade maior que 94% com as cepas *Microbacterium phosphovorius* (T), *Microbacterium phosphovorius* DSM 10555T e uma seqüência depositada como Propionibacterinae bacterium GSOIL 954 (Tabela 7).

Um grupo de 12 isolados, 3016, 3019, 3155, 3227, 3407b, 3408b, 3223, 3188, 3211a, 3080, 3248 e 3249 apresentou similaridades nas seqüências do gene 16S rRNA de 96,33 a 99,06% com a cepa tipo de *Microbacterium lacticum*, espécie tipo do gênero. Para os isolados 3016 e 3019, obtivemos seqüências com similaridade maior que 99% com as cepas tipo de *M. liquefaciens* e *M. oxydans* e apresentaram maior identidade (100%) com isolados ambientais da espécie *M. oxydans*. Para os isolados 3407b e 3223, obtivemos seqüências com similaridade maior que 98% com as cepas tipo *M. flavescens* e *M. resistens* e com a cepa não tipo *M. takaoensis*. A seqüência do isolado 3407b apresentou similaridade de 99,18% com isolado ambiental *Microbacterium sp* ASD e 98,95% para *Microbacterium*

sp. JS-3. A seqüência do isolado 3223 apresentou também similaridades acima de 98% para *Microbacterium sp* (cepas JS-3 e ASD). Para os isolados 3211a e 3249, obtivemos seqüências com similaridade maior que 99% com a cepa não tipo *M. aurum* DSM 8600. A seqüência do isolado 3211a apresentou similaridades maiores de 98% para as cepas tipo *M. lacticum* e *M. aurum* e *M. terregens* e similaridades maiores de 99% para seqüência de isolados ambientais de *Microbacterium sp.*. A seqüência do isolado 3249 apresentou similaridade de 99,06% com a cepa tipo *M. lacticum* e identidades maiores de 98% para as cepas tipo *M. aurum* e *M. schleiferi* e similaridades maiores de 99% para cepa não tipo *Microbacterium sp.*. A seqüência do isolado 3155 apresentou similaridade de 98,81% com a cepa tipo *M. flavescens* e para as seqüências das cepas não tipo *M. laevaniformans*, *Microbacterium sp* S15-C e as depositadas como *Microbacteriaceae bacterium*, similaridades maiores que 99%. A seqüência do isolado 3227 apresentou similaridades maiores de 98% com as cepas *M. flavescens* (T), *M. takaoensis* 451, *M. thalassium* ASD e *Microbacterium sp.* A seqüência do isolado 3408b obteve similaridade maior de 97% com as cepas tipo *M. thalassium* e *M imperiale* e não tipo *M. arborescens* KR10, *M. imperiale* e *M. thalassium*. A seqüência do isolado 3188 obteve similaridade de 100% para *Microbacterium sp.* (S15-C) e similaridades maiores de 99% com as cepas *M. flavescens* (T), *Microbacterium sp.* (C24KA) e a seqüência depositada como *Microbacteriaceae bacterium* KVD unk- 65. A seqüência do isolado 3248 obteve similaridade maior que 98% com as cepas *M. resistens* (T), *M. testaceum* (T), *M. oxidans* e *Microbacterium sp.* 44574 e 99,50% para *Microbacterium sp.* SKJH (Tabela 7). A seqüência do isolado 3080 obteve similaridade maior que 99% com as cepas *M. oleivorans* (T) e *M. oleivorans* J02 e similaridade maior que 98,1% com *M. paraoxydans* (T) e *M. phyllosphaerae* (Tabela 7).

A análise realizada com a seqüência do gene 16S rRNA do isolado 3117 revelou 94,28% de identidade com a espécie tipo do gênero *Nocardioides*, *Nocardioides albus* e similaridade maior que 96% com cepas de *N. alkalitolerans* (KSL-1, KSL-9 e KSL-10). Uma cepa proveniente de água vulcânica do Hawai-EUA, depositada como *Actinobacterium* N23 apresentou similaridade de 99,47% com esta seqüência (Tabela 7).

As seqüências do gene estudado dos isolados 3165, TSAB1 e 3032b apresentaram similaridades de 95,79 a 96,38% com a cepa tipo de *Rhodococcus rhodochrous*, espécie tipo do gênero. Suas seqüências mostraram similaridades maiores que 99% com seqüências

de cepas de *R. corynebacterioides* e *Rhodococcus sp.* e cepas depositadas como *Nocardia corynebacterioides* (Tabela 7).

Outro grupo composto de 5 isolados (3212, 3268, 3341, 3207 e 3182) apresentou similaridades de 92,54 a 97,89% com a cepa tipo de *Streptomyces albus*, espécie tipo do gênero quando as seqüências do gene 16S rRNA foi analisado. A seqüência do isolado 3212 apresentou similaridade maior que 99% com cepas não tipo *S. kunmingensis* NBRC 14463, *Streptomyces sp.* TA01513 e uma cepa denominada *Streptomycetacea* SR 70. apresentou similaridade de 98,40% para a cepa tipo *S. chartreusis*. As seqüências dos isolados 3268 e 3207 apresentaram similaridade maior que 99% com cepas de diferentes espécies do gênero *Streptomyces*. A seqüência do isolado 3341 apresentou similaridade de 97,27% com a cepa não tipo *Streptomyces sp.* LZ 531 e similaridades acima de 96% para *S. glomeroaurantiacus* e *Streptomyces sp.* KN1220 e 96,74% de similaridade para a cepa tipo *S. tauricus*. A seqüência do isolado 3182 apresentou similaridade de 99,47% para as cepas não tipo *S. albiaxis* NBRC 101002, 98,72% para *S. paraguayensis* NBRC 13463 e similaridades maiores que 97% para *S. sclerotialus* (T) e *S. rimosus* (T) e *S. panacagri* GSOIL 519 (Tabela 7).

Tabela 7. Similaridade entre seqüências obtidas para os isolados estudados com as depositadas em bancos de dados e origem

Isolado	Tamanho (pb)	Cepas	Tamanho (pb)	Nº de pb comparados/% de similaridade			Origem	
				Identities	%	Gaps		
3098	1276	<i>Agromyces ramosus</i> (T)	1482	1234	1278	96,56%	2/1278	Ambiental - China Sedimento marinho tropical - USA
		<i>Agromyces ulmi</i> (T)	1519	1240	1276	97,18%	0/1276	
		<i>Agromyces</i> sp. CM01	1454	1240	1276	97,18%	0/1276	
		<i>Agromyces</i> sp. CNJ745 PL04	1492	1252	1278	97,97%	2/1278	
3401	1342	<i>Arthrobacter globiformis</i> (T)	1464	1311	1343	97,62%	1/1343	Solo - Austrália Ambiental - China Fonte não informada - Japão Solo - China
		<i>A. chlorophenolicus</i> (T)	1446	1312	1337	98,13%	3/1337	
		<i>Arthrobacter</i> sp. ELLIN110	1437	1328	1342	98,96%	1/1342	
		<i>Arthrobacter</i> sp. BS20	1446	1327	1342	98,88%	1/1342	
		<i>A. dextranolyticus</i> T6	1414	1326	1344	98,66%	2/1344	
		<i>Arthrobacter</i> sp. PHE-3	1432	1327	1342	98,88%	1/1342	
3299	1326	<i>Brevibacterium linens</i> (T)	1474	1286	1327	96,91%	4/1327	Fonte não informada - Alemanha Amostra clínica - EUA Amostra clínica - Japão Amostra clínica -EUA
		<i>B. casei</i> (T)	1450	1314	1326	99,10%	1/1326	
		<i>B. casei</i> DSM 20657	1423	1321	1327	99,55%	1/1327	
		<i>B. casei</i> 3S(a)	1490	1318	1326	99,40%	0/1326	
		<i>Brevibacterium</i> sp. H15	1517	1316	1326	99,25%	0/1326	
		<i>B. casei</i> FMIA.	1494	1311	1326	98,87%	0/1326	
3335	1274	<i>Cellulomonas flavigena</i> (T)	1484	1240	1275	97,25%	1/1275	Mat. Orgânico de fazendade gado - Coréia Solo - Coréia Amostra ambiental - Coréia
		<i>C. gelida</i> (T)	1500	1242	1274	97,49%	1/1274	
		<i>C. chitinilytica</i> X-BU-B	1460	1241	1274	97,41%	0/1274	
		<i>C. terrae</i> DBS	1475	1238	1274	97,17%	0/1274	
		<i>Cellulomonas</i> sp. TR7-6	1453	1253	1274	98,35%	2/1274	
3089	1306	<i>Cellulomonas flavigena</i> (T)	1484	1264	1305	96,86%	0/1305	CDC - EUA CDC -EUA CDC - EUA CDC - EUA
		<i>C. hominis</i> (T)	1406	1297	1307	99,23%	1/1307	
		<i>C. parahominis</i> W7387	1444	1297	1307	99,23%	1/1307	
		<i>C. parahominis</i> W7336	1443	1297	1306	99,31%	0/1306	
		<i>C. parahominis</i> W7385	1429	1298	1306	99,39%	0/1306	
		<i>C. parahominis</i> W7386	1443	1298	1306	99,39%	0/1306	
3316	1331	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (T)	1485	1266	1336	94,76%	8/1336	Fonte não informada - Bélgica Fonte não informada - Bélgica Fonte não informada - Bélgica
		<i>C. simulans</i> (T)	1469	1331	1331	100,00%	0/1331	
		<i>C. simulans</i> UCL557	1468	1330	1331	99,92%	1/1331	
		<i>C. simulans</i> UCL557	1468	1330	1331	99,92%	1/1331	
		<i>C. simulans</i> UCL301	1468	1328	1331	99,77%	1/1331	

Tabela 7 . Continuação

Isolado	Tamanho (pb)	Cepas	Tamanho (pb)	Nº de pb comparados/% de similaridade			Origem	
				Identities	%	Gaps		
3020	1311	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (T)	1485	1200	1268	94,64%	6/1268	Fonte não informada Amostra clínica e ambiental - França Amostra clínica - Bélgica Amostra veterinária - Espanha
		<i>C. xerosis</i> ATCC 373T (T)	1317	1236	1239	99,76%	0/1239	
		<i>C. xerosis</i> DSM 20743	1488	1306	1310	99,69%	0/1310	
		<i>C. xerosis</i> 71376	1479	1307	1310	99,77%	0/1310	
		<i>C. xerosis</i> K132	1444	1307	1310	99,77%	0/1310	
		<i>C. xerosis</i> AMZ 33487	1374	1307	1310	99,77%	0/1310	
3345	1256	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (T)	1485	1192	1260	94,60%	0/1260	Amostra clínica e ambiental - França Amostra clínica e ambiental - França Amostra clínica - Canadá
		<i>C. glaucum</i> (T)	1466	1252	1256	99,68%	0/1256	
		<i>C. sundsvallense</i> (T)	1468	1218	1261	96,59%	6/1261	
		<i>C. riegelii</i> (T)	1383	1213	1256	96,58%	1/1256	
		<i>Corynebacterium</i> sp. 47081	1465	1216	1264	96,20%	10/1264	
		<i>Corynebacterium</i> sp. 96447	1401	1212	1262	96,04%	6/1262	
		<i>C. mucifaciens</i> 97-0160	1468	1220	1266	96,37%	10/1266	
3097	1193	<i>Curtobacterium citreum</i> (T)	1472	1185	1193	99,33%	1/1193	Nave espacial - EUA Amostra clínica - Alemanha Amostra clínica - Alemanha
		<i>C. luteum</i> (T)	1472	1186	1193	99,41%	1/1193	
		<i>C. flaccumfaciens</i> (T)	1514	1183	1193	99,16%	1/1193	
		<i>C. flaccumfaciens</i> SAFR 001	1328	1188	1195	99,41%	3/1195	
		<i>Curtobacterium</i> sp 1594	1474	1187	1193	99,50%	1/1193	
		<i>Curtobacterium</i> sp. 3430	1474	1187	1193	99,50%	1/1193	
3361	1392	<i>Dermabacter hominis</i> (T)	1481	1380	1392	99,14%	3/1392	Amostra clínica - Alemanha Amostra clínica - Noruega Fonte não informada - Ucrânia
		<i>Dermabacter hominis</i> DSM 7083	1511	1373	1391	98,71%	2/1391	
		<i>D. hominis</i> AY853712	1479	1364	1372	99,42%	2/1372	
		<i>D. hominis</i> AF343728	1468	1378	1385	99,49%	2/1385	
		<i>Dermabacter</i> sp. CDC group 3 427	1468	1368	1384	98,84%	2/1384	
3069	1446	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> (T)	1527	1402	1445	97,02%	7/1445	Amostra marinha - França Fonte não informada - China Amostra marinha - Coreia Sedimento marinho - EUA Amostra marinha - Reino Unido
		<i>E. lactigenes</i> 10C	1510	1438	1446	99,45%	5/1446	
		<i>Exiguobacterium</i> sp. BTAHI	1479	1440	1445	99,65%	2/1445	
		<i>E. aestuarii</i> TF-16	1517	1434	1445	99,24%	2/1445	
		<i>Exiguobacterium</i> sp. CNJ771 PL04	1526	1436	1445	99,38%	2/1445	
		<i>Exiguobacterium</i> sp. BOLB	1386	1382	1387	99,64%	1/1387	

Tabela 7. continuação

Isolado	Tamanho (pb)	Cepas	Tamanho (pb)	Nº de pb comparados/% de similaridade			Origem	
				Identities	%	Gaps		
3225	1309	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> (T)	1527	1296	1309	99,01%	2/1309	
		<i>E. homiense</i> HI-R8	1484	1305	1311	99,54%	3/1311	Areia do mar - Coréia
		<i>Exiguobacterium</i> sp. NI5	1520	1307	1312	99,62%	4/1312	Sedimento marinho - China
		<i>Exiguobacterium</i> sp. EP03	1524	1307	1311	99,69%	3/1311	Sedimento marinho - China
		<i>Exiguobacterium</i> sp. CM1	1414	1306	1311	99,62%	3/1311	Fonte não informada - China
3369a	1338	<i>Gordonia bronchialis</i> (T)	1472	1314	1338	98,21%	0/1338	
		<i>G. terrae</i> (T)	1319	1248	1251	99,76%	0/1338	
		<i>Gordonia</i> sp. DEOB200	1522	1338	1338	100,00%	0/1338	Fonte não informada - Coréia
		<i>G. terrae</i> CCWC4-2	1486	1338	1338	100,00%	0/1338	solo - Taiwan
		<i>G. terrae</i> CCS2a	1474	1338	1338	100,00%	0/1338	solo - Taiwan
		<i>G. terrae</i> CCS5-1	1481	1338	1338	100,00%	0/1338	solo - Taiwan
3369b	1333	<i>Gordonia bronchialis</i> (T)	1472	1309	1333	98,20%	0/1333	
		<i>G. terrae</i> (T)	1481	1332	1333	99,92%	0/1333	
		<i>Gordonia</i> sp. DEOB200	1522	1333	1333	100,00%	0/1333	Fonte não informada - Coréia
		<i>G. terrae</i> CCWC4-2	1486	1333	1333	100,00%	0/1333	solo - Taiwan
		<i>G. terrae</i> CCS2a	1474	1333	1333	100,00%	0/1333	solo - Taiwan
		<i>G. terrae</i> CCS5-1	1481	1333	1333	100,00%	0/1333	solo - Taiwan
3712	1342	<i>Micrococcus phosphovorans</i> (T)	1444	1263	1340	94,25%	7/1340	
		<i>Micrococcus phosphovorans</i> DSM 10555T	1468	1264	1337	94,54%	3/1337	Arenito - Antártico
		<i>Propionibacteriaceae bacterium</i> GSOIL 954	1454	1268	1341	94,56%	4/1341	Solo - Coréia
		<i>Actinobacterium</i> SM48	1349	1338	1338	100,00%	0/1338	Sedimento marinho - China
3016	1325	<i>Microbacterium lacticum</i> (T)	1474	1296	1325	97,81%	0/1325	
		<i>Microbacterium liquefaciens</i> (T)	1474	1321	1325	99,70%	0/1325	
		<i>M. oxydans</i> (T) ^a	1466	1324	1325	99,92%	0/1325	
		<i>M. oxydans</i> SW366-KB-3	1396	1325	1325	100,00%	0/1325	Depósito de resíduos radioativos - Rússia
		<i>M. oxydans</i> NJ6	1387	1325	1325	100,00%	0/1325	Fonte não informada - China
		<i>M. oxydans</i> OUCZ46	1441	1325	1325	100,00%	0/1325	bactéria degradadora de PCB - EUA
		<i>Microbacterium</i> sp. EP32	1486	1324	1325	99,92%	0/1325	Sedimento marinho - China

Tabela 7. continuação

Isolado	Tamanho (pb)	Cepas	Tamanho (pb)	Nº de pb comparados/% de similaridade			Origem	
				Identicidades	%	Gaps		
3019	1328	<i>Microbacterium lacticum</i> (T)	1474	1298	1328	97,74%	0/1328	
		<i>M. oxydans</i> (T) ^a	1466	1326	1328	99,85%	0/1328	
		<i>M. liquefaciens</i> (T)	1474	1323	1328	99,62%	0/1328	
		<i>M. oxydans</i> S15-M2 -	1488	1327	1328	99,92%	0/1328	Água de poço - Russia
		<i>Microbacterium</i> sp. M63-2 -	1256	1256	1256	100,00%	0/1256	Fonte não informada - China
		<i>M. oxydans</i> AC44 -	1510	1327	1328	99,92%	0/1328	Ambiente alcalino não salino - Portugal
		<i>M. oxydans</i> OUCZ46	1441	1327	1328	99,92%	0/1328	Bactéria degradadora de PCB - EUA
3155	1339	<i>Microbacterium lacticum</i> (T)	1474	1308	1339	97,68%	1/1339	
		<i>M. flavescens</i> (T)	1467	1323	1339	98,81%	1/1339	
		<i>Microbacteriaceae bacterium</i> KVD-unk-67	1486	1336	1339	99,78%	0/1339	Depósito vulcânico-Hawalian - EUA
		<i>Microbacteriaceae bacterium</i> KVD-1790-01	1486	1337	1339	99,85%	0/1339	Depósito vulcânico-Hawalian - EUA
		<i>M. laevaniformans</i>	1423	1332	1339	99,48%	0/1339	Fonte não informada - Alemanha
		<i>Microbacterium</i> sp. S15-C	1437	1334	1339	99,63%	0/1339	Depósito radioativo - Russia
3227	1321	<i>Microbacterium lacticum</i> (T)	1474	1281	1322	96,90%	3/1322	
		<i>M. flavescens</i> (T)	1471	1300	1322	98,34%	2/1322	
		<i>Microbacterium</i> sp. ORS1417	1456	1297	1322	98,11%	2/1322	Alimento - Tunísia
		<i>Microbacterium</i> sp. JS-3	1412	1300	1322	98,34%	3/1322	Tratamento de Água - China
		<i>M. takaoensis</i> 451	1435	1300	1322	98,34%	3/1322	Fonte não informada - Japão
		<i>M. thalassium</i> ASD	1368	1301	1322	98,41%	2/1322	Fonte não informada - Alemanha
3407b	1338	<i>Microbacterium lacticum</i> (T)	1474	1286	1335	96,33%	1/1335	
		<i>M. flavescens</i> (T)	1471	1310	1332	98,35%	0/1332	
		<i>M. resistens</i> (T)	1461	1314	1335	98,43%	1/1335	
		<i>M. takaoensis</i> 451	1435	1321	1335	98,95%	1/1335	Fonte não informada - Japão
		<i>Microbacterium</i> sp JS-3	1412	1321	1335	98,95%	1/1335	Tratamento de Água - China
		<i>Microbacterium</i> sp, ASD	1378	1324	1335	99,18%	0/1335	Solo europeu
3408b	1404	<i>Microbacterium lacticum</i> (T)	1474	1275	1307	97,55%	4/1307	
		<i>M. thalassium</i> (T)	1533	1160	1191	97,40%	6/1191	
		<i>M. imperiale</i> (T)	1229	1353	1390	97,34%	7/1390	
		<i>M. imperiale</i>	1470	1352	1391	97,20%	7/1391	Fonte não informada - Japão
		<i>M. arborescens</i> KR10	1456	1191	1223	97,38%	5/1223	Fonte não informada - Suíça
		<i>M. thalassium</i>	1513	1158	1187	97,56%	2/1187	Fonte não informada - Alemanha

Tabela 7. continuação

Isolado	Tamanho (pb)	Cepas	Tamanho (pb)	Nº de pb comparados/% de similaridade			Origem	
				Identicidades	%	Gaps		
3223	1338	<i>Microbacterium lacticum</i> (T)	1474	1302	1338	97,31%	1/1338	
		<i>M. flavescens</i> (T)	1471	1318	1335	98,73%	0/1335	
		<i>M. resistens</i> (T)	1461	1316	1338	98,36%	1/1338	
		<i>Microbacterium</i> sp ASD	1378	1323	1338	98,88%	0/1338	Solo europeu
		<i>M. takaoensis</i> 451	1435	1321	1338	98,73%	1/1338	Fonte não informada - Japão
		<i>Microbacterium</i> sp. JS-3	1412	1321	1338	98,73%	1/1338	Tratamento de Água - China
3188	1337	<i>Microbacterium lacticum</i> (T)	1474	1307	1337	97,76%	1/1337	
		<i>M. flavescens</i> (T)	1467	1324	1337	99,03%	1/1337	
		<i>Microbacterium</i> sp. C24KA	1474	1336	1337	99,93%	0/1337	Amostra clínica - EUA
		<i>Microbacterium</i> sp.S15-C	1402	1337	1337	100,00%	0/1337	Ambiental - Russia
		<i>Microbacteriaceae bacterium</i> KVD unk- 65	1486	1334	1337	99,78%	0/1337	Depósito vulcânico Havai - EUA
3211A	1273	<i>Microbacterium lacticum</i> (T)	1474	1254	1273	98,51%	0/1273	
		<i>M. terregens</i> (T)	1437	1257	1275	98,59%	4/1275	
		<i>M. aurum</i> (T)	1341	1170	1192	98,15%	2/1192	
		<i>M. aurum</i> DSM 8600	1472	1269	1273	99,69%	0/1273	Fonte não informada - Alemanha
		<i>Microbacterium</i> sp. KV 492	1443	1264	1273	99,29%	0/1273	Fonte não informada - Japão
		<i>Microbacterium</i> sp. KV 490	1421	1261	1273	99,06%	0/1273	Fonte não informada - Japão
		<i>Microbacterium</i> sp. DI-15	1361	1266	1273	99,45%	0/1273	Biofiltro marinho - Alemanha
3080	1315	<i>Microbacterium lacticum</i> (T)	1474	1288	1315	97,95%	1/1315	
		<i>M. paraoxydans</i> (T)	1490	1298	1315	98,71%	0/1315	
		<i>M. phyllosphaerae</i> (T)	1478	1295	1315	98,48%	0/1315	
		<i>M. oleivorans</i> (T)	1490	1313	1315	99,85%	0/1315	
		<i>M. oleivorans</i> J02	1477	1312	1315	99,77%	0/1315	Planta - China
3248	1410	<i>Microbacterium lacticum</i> (T)	1474	1364	1404	97,15%	2/1404	
		<i>M. resistens</i> (T)	1461	1380	1401	98,50%	2/1401	
		<i>M. testaceum</i> (T)	1469	1384	1400	98,86%	1/1400	
		<i>M. oxidans</i> B5	1517	1388	1411	98,37%	1/1411	Fonte não informada - China
		<i>Microbacterium</i> sp. 44574	1233	1214	1233	98,46%	0/1233	Amostra clínica - China
		<i>Microbacterium</i> sp. SKJH	1513	1403	1410	99,50%	0/1410	Amostra clínica - Coreia

Tabela 7. continuação

Isolado	Tamanho (pb)	Cepas	Tamanho (pb)	Nº de pb comparados/% de similaridade			Origem	
				Identicidades	%	Gaps		
3249	1281	<i>Microbacterium lacticum</i> (T)	1474	1267	1279	99,06%	0/1279	
		<i>M. aurum</i> (T)	1341	1216	1237	98,30%	2/1237	
		<i>M. schleiferi</i> (T)	1464	1259	1280	98,36%	2/1280	
		<i>Microbacterium</i> sp. DI-15	1361	1267	1272	99,61%	0/1272	Biofiltro marinho - Alemanha
		<i>M. aurum</i> DSM 8600	1472	1276	1279	99,77%	0/1279	Fonte não informada - Alemanha
		<i>Microbacterium</i> sp. KV-492	1443	1272	1279	99,45%	0/1279	Fonte não informada - Japão
3117	1328	<i>Nocardioides albus</i> (T)	1470	1253	1329	94,28%	12/1329	
		<i>N. alkalitolerans</i> KSL-1	1473	1280	1328	96,39%	8/1328	Solo - Coreia
		<i>N. alkalitolerans</i> KSL-9	1473	1280	1328	96,39%	8/1328	Solo - Coreia
		<i>N. alkalitolerans</i> KSL-10	1473	1280	1328	96,39%	8/1328	Solo - Coreia
		<i>Actinobacterium</i> NZ3	1375	1321	1328	99,47%	0/1328	Água vulcânica - Nova Zelândia
TSAB1	1331	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> (T)	1474	1279	1327	96,38%	1/1327	
		<i>R. corynebacterioides</i> (T)	1477	1321	1327	99,55%	0/1327	
		<i>Nocardia corynebacterioides</i> DSM 20151	1494	1325	1327	99,85%	0/1327	Fonte não informada - Alemanha
		<i>Rhodococcus</i> sp JL-538	1477	1331	1331	100,00%	0/1331	Amostra marinha - China
		<i>Rhodococcus</i> sp P27-27	1478	1324	1331	99,47%	0/1331	Amostra marinha - China
3165	1332	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> (T)	1474	1274	1330	95,79%	6/1330	
		<i>R. corynebacterioides</i> (T)	1477	1316	1330	98,95%	5/1330	
		<i>Nocardia corynebacterioides</i> DSM 20151	1494	1320	1330	99,25%	5/1330	Fonte não informada - Alemanha
		<i>R. corynebacterioides</i> CCUG49711	1477	1321	1331	99,25%	5/1331	Amostra ambiental - Suécia
		<i>Rhodococcus</i> sp. JL-538	1477	1323	1331	99,40%	5/1331	Amostra ambiental - China
3032b	1180	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> (T)	1474	1133	1180	96,02%	1/1180	
		<i>R. corynebacterioides</i> (T)	1477	1171	1180	99,24%	0/1180	
		<i>R. corynebacterioides</i> CCUG 49711	1477	1175	1180	99,58%	0/1180	Amostra ambiental - Suécia
		<i>Nocardia corynebacterioides</i> DSM 20151	1494	1175	1180	99,58%	0/1180	Fonte não informada - Alemanha
		<i>Nocardia corynebacterioides</i> NRRL21057	1495	1171	1180	99,24%	0/1180	Fonte não informada - EUA
		<i>Rhodococcus</i> sp. JL-538	1477	1177	1180	99,75%	0/1180	Fonte não informada - China

Tabela 7. continuação

Isolado	Tamanho (pb)	Cepas	Tamanho (pb)	Nº de pb comparados/% de similaridade			Origem	
				Identities	%	Gaps		
3212	1316	<i>Streptomyces albus</i> (T)	1499	1298	1326	97,89%	6/1326	
		<i>S. chartreusis</i> (T)	1448	1295	1316	98,40%	0/1316	
		<i>S. kunmingensis</i> NBRC 14463 (T)	1454	1308	1316	99,39%	0/1316	Fonte não informada - Japão
		<i>Streptomyces</i> sp. 1A01513	1487	1313	1316	99,77%	0/1316	Solo - China
		<i>Streptomycetacea</i> SR 70	1497	1309	1316	99,47%	0/1316	Fonte não informada - Austrália
3268	1318	<i>Streptomyces albus</i> (T)	1499	1264	1320	95,76%	2/1320	
		<i>S. virginiae</i> IFO12827 (T)	1514	1309	1318	99,32%	0/1318	
		<i>S. subbrutillus</i> (T)	1516	1313	1318	99,62%	1/1318	
		<i>S. virginiae</i> IFO3729	1514	1309	1318	99,32%	0/1318	Fonte não informada - Japão
		<i>S. colombiensis</i> NRR/B1990	1528	1315	1318	99,77%	0/1318	Fonte não informada - EUA
		<i>S. sakaiensis</i> NBRC 3405	1454	1315	1318	99,77%	0/1318	Fonte não informada - Japão
		<i>S. citricolor</i> NBRC 13005	1471	1314	1318	99,70%	0/1318	Fonte não informada - Japão
		<i>S. lavendulae</i> NBRC 12341	1475	1315	1318	99,77%	0/1318	Fonte não informada - Japão
3341	1351	<i>Streptomyces albus</i> (T)	1499	1253	1354	92,54%	9/1354	
		<i>S. tauricus</i> (T)	1492	1307	1351	96,74%	6/1351	
		<i>S. glomeroaurantiacus</i> NBRC 15418	1456	1310	1353	96,82%	9/1353	Fonte não informada - Japão
		<i>Streptomyces</i> sp. LZ 531	1450	1319	1356	97,27%	6/1356	Fonte não informada -China
		<i>Streptomyces</i> sp. KN1220	1505	1307	1351	96,74%	6/1351	Fonte não informada -China
3207	1297	<i>Streptomyces albus</i> (T)	1499	1238	1299	95,30%	6/1299	
		<i>S. cavarescabies</i> (T)	1523	1292	1297	99,61%	4/1297	
		<i>S. setonii</i> (T)	1532	1292	1297	99,61%	4/1297	
		<i>S. parvus</i> NBRC 3388	1478	1293	1297	99,69%	4/1297	Fonte não informada - Japão
		<i>S. parvus</i> NBRC I	1458	1293	1297	99,69%	4/1297	Fonte não informada - Japão
		<i>S. albovinaceus</i> JCM 4343	1441	1293	1297	99,69%	4/1297	Fonte não informada - EUA
		<i>S. badius</i> NRRLB 2567	1496	1293	1297	99,69%	4/1297	Fonte não informada - EUA
3182	1333	<i>Streptomyces albus</i> (T)	1499	1282	1327	96,61%	1/1327	
		<i>S. sclerotialis</i> (T)	1498	1299	1326	97,96%	0/1326	
		<i>S. rimosus</i> (T)	1485	1298	1326	97,89%	0/1326	
		<i>S. albiacialis</i> NBRC 101002	1472	1319	1326	99,47%	0/1326	Fonte não informada - Japão
		<i>S. panacagri</i> GSOIL 519	1492	1291	1328	97,21%	4/1328	Solo - Coréia
		<i>S. paraguayensis</i> NBRC 13463	1468	1316	1333	98,72%	0/1333	Fonte não informada - Japão

^a a seqüência depositada referente à cepa tipo possui um nucleotídeo não definido (N)

Figura 8a. Alinhamento das seqüências parciais do gene 16S rRNA dos isolados do gênero *Corynebacterium*

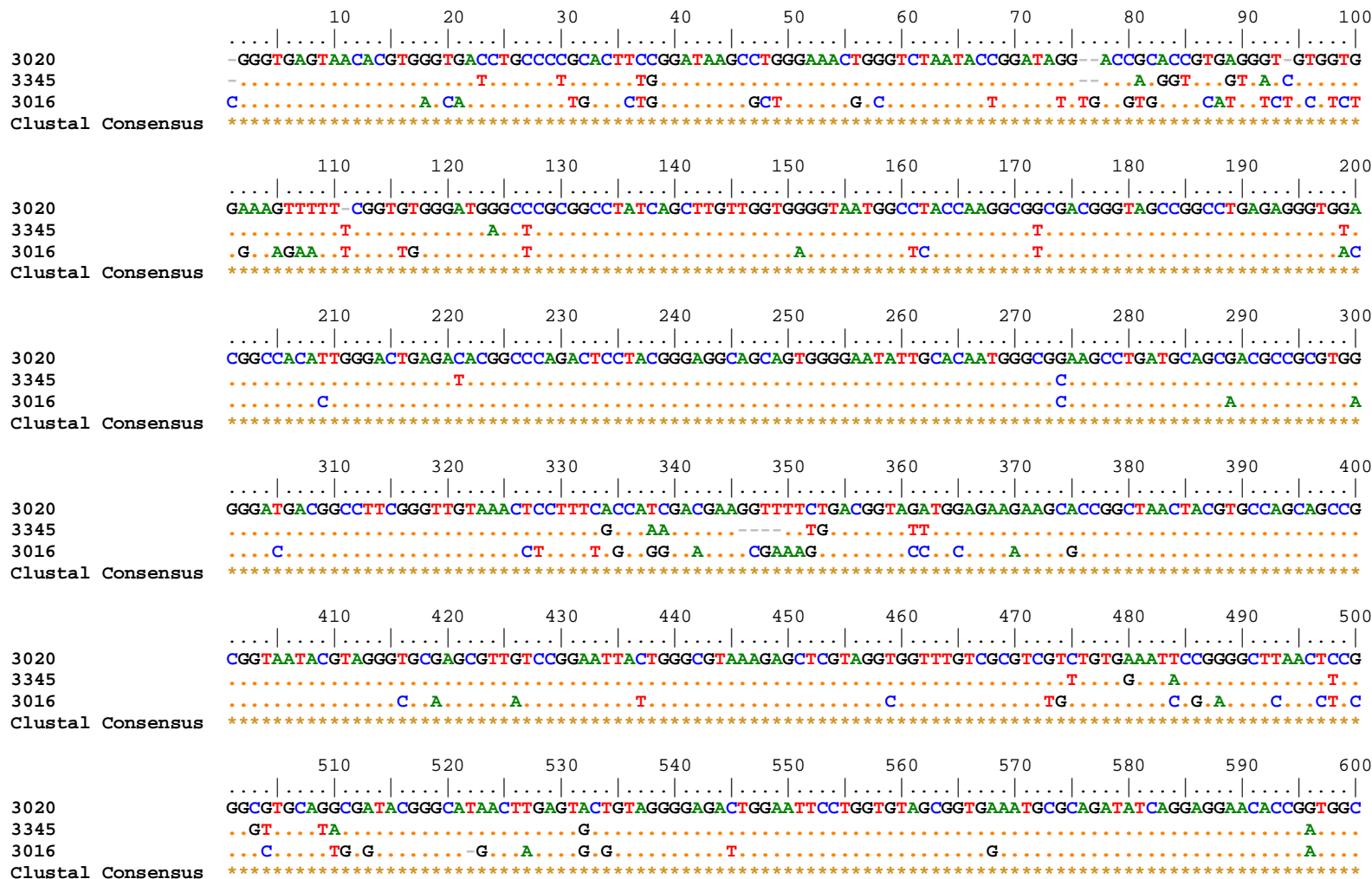


Figura 8a - continuação

```

        610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
3020      GAAGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGGTGGGCGC
3345      .....A.....G.....
3016      .....A.A.....C.....GG.....G.....A.....C.....CC.....T.....AA.
Clustal Consensus *****

        710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
3020      TAGGTGTAGGGGTC-TTCCACGACTTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGAC
3345      .....GA.TCC.....GGG.TC.....
3016      .....T.....G.....TC.A.....GA.....C.....A.....C.....TT.....
Clustal Consensus *****

        810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
3020      GGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGCTTGACATATACGGGACCGGGCCAGAGATGGTCCCT
3345      .....C.....CA.....T.....CCG.....TGGT.....
3016      .....A.....C.....AA.....A.....A.....A.....AA.....
Clustal Consensus *****

        910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
3020      TCCCTTGTG-GCTCGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTATGT
3345      .....T.G..G.....
3016      .....CT.T.....GACA.....A.....C.....TC.....
Clustal Consensus *****

        1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090     1100
3020      TGCCAGCAGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAAACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCT
3345      .....T..TG.....A.....G.....T.....
3016      .....A.....A.....G.....T.....TT.....
Clustal Consensus *****

        1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190     1200
3020      TCACACATGCTACAAATGGTCCGTACAGTGGG-TTCCGATGCCGTGAGGTGGAGCTAATCCCTGAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGCTGCAACTCG
3345      .....AC.C.C.....GC.T.....GT.....G.....G.....T.....GT.....T.....
3016      .....G.....C.....AA.....C.....A.....A.....C.....G.....AA.....C.....T.A.....
Clustal Consensus *****

        1210     1220     1230     1240     1250     1260     1270
3020      ACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
3345      .....A.....C.....
3016      .....T.A.....T.....
Clustal Consensus *****

```

Figura 8b. Alinhamento das seqüências parciais do gene 16S rRNA dos isolados do gênero *Exiguobacterium*

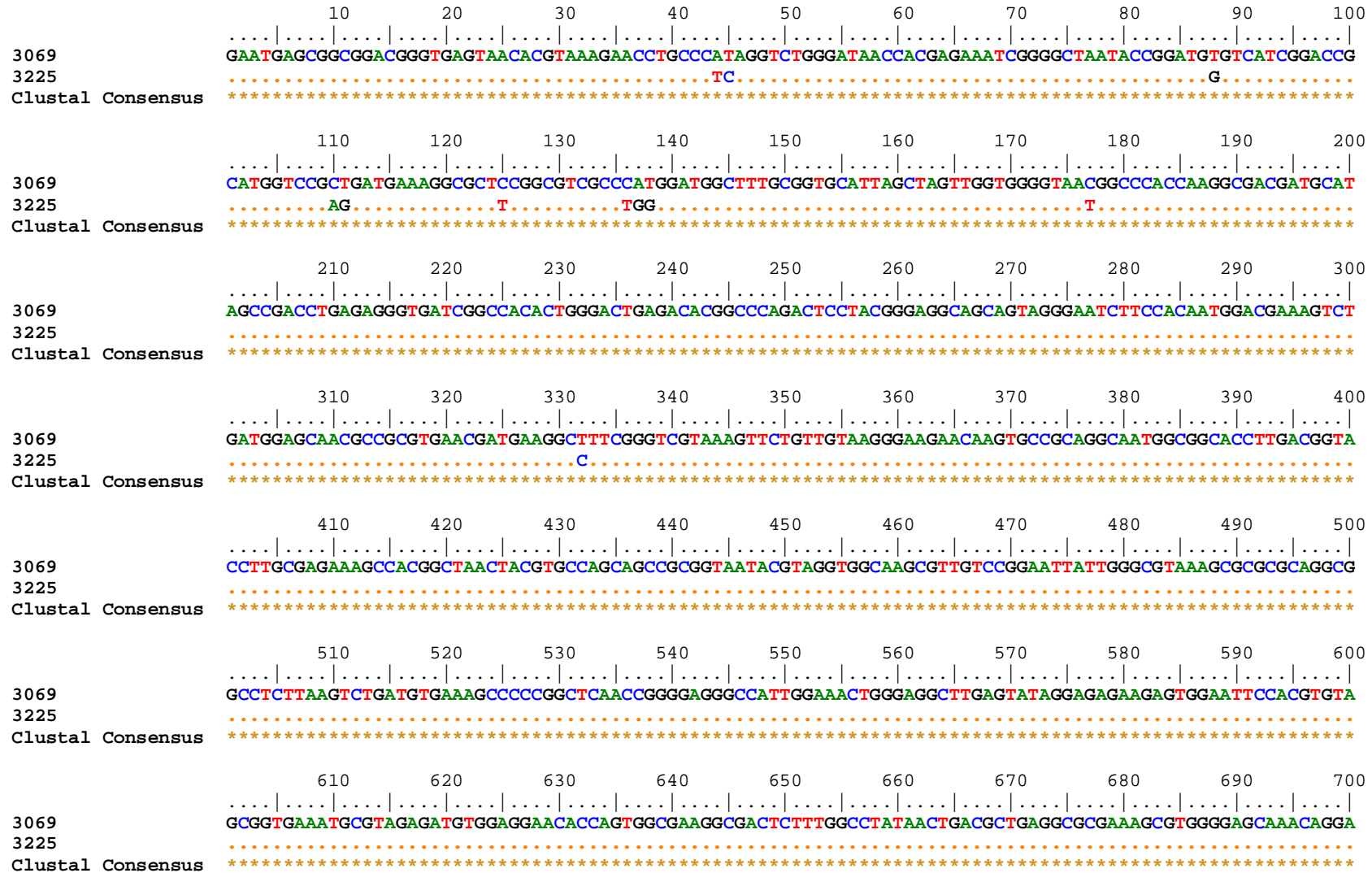


Figura 8c. Alinhamento das seqüências parciais do gene 16S rRNA dos isolados do gênero *Microbacterium*.

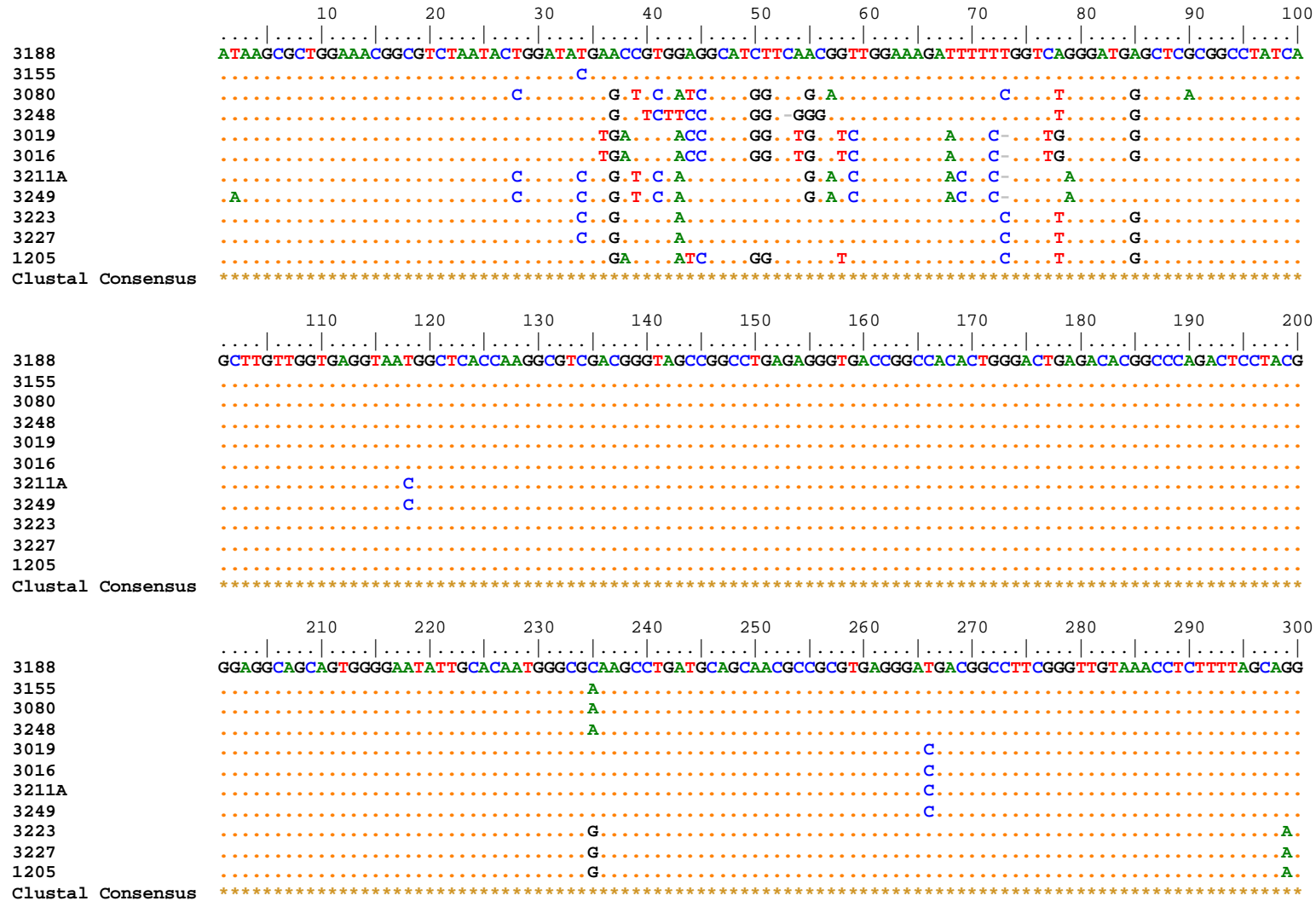


Figura 8c. continuação

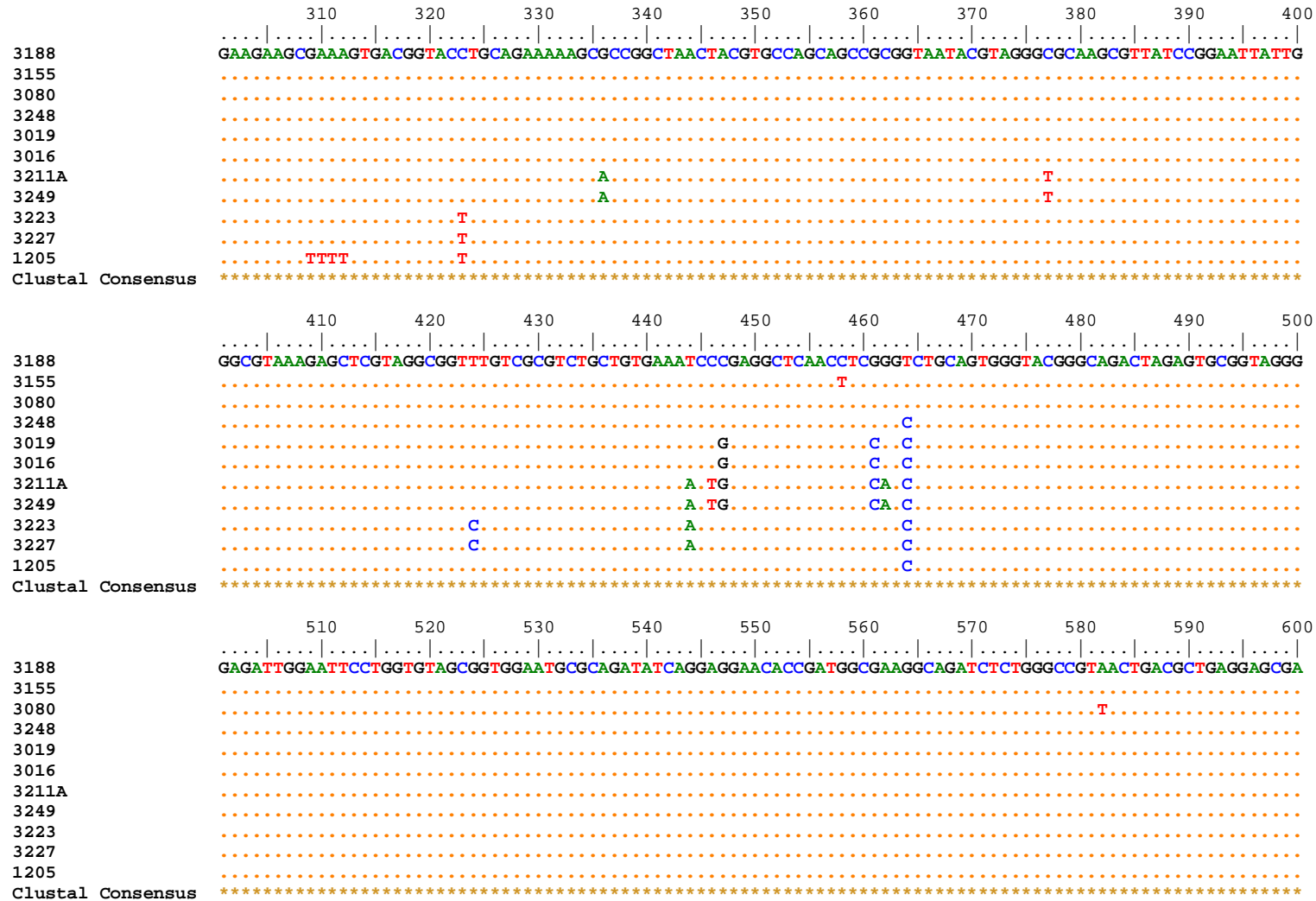


Figura 8c. continuação

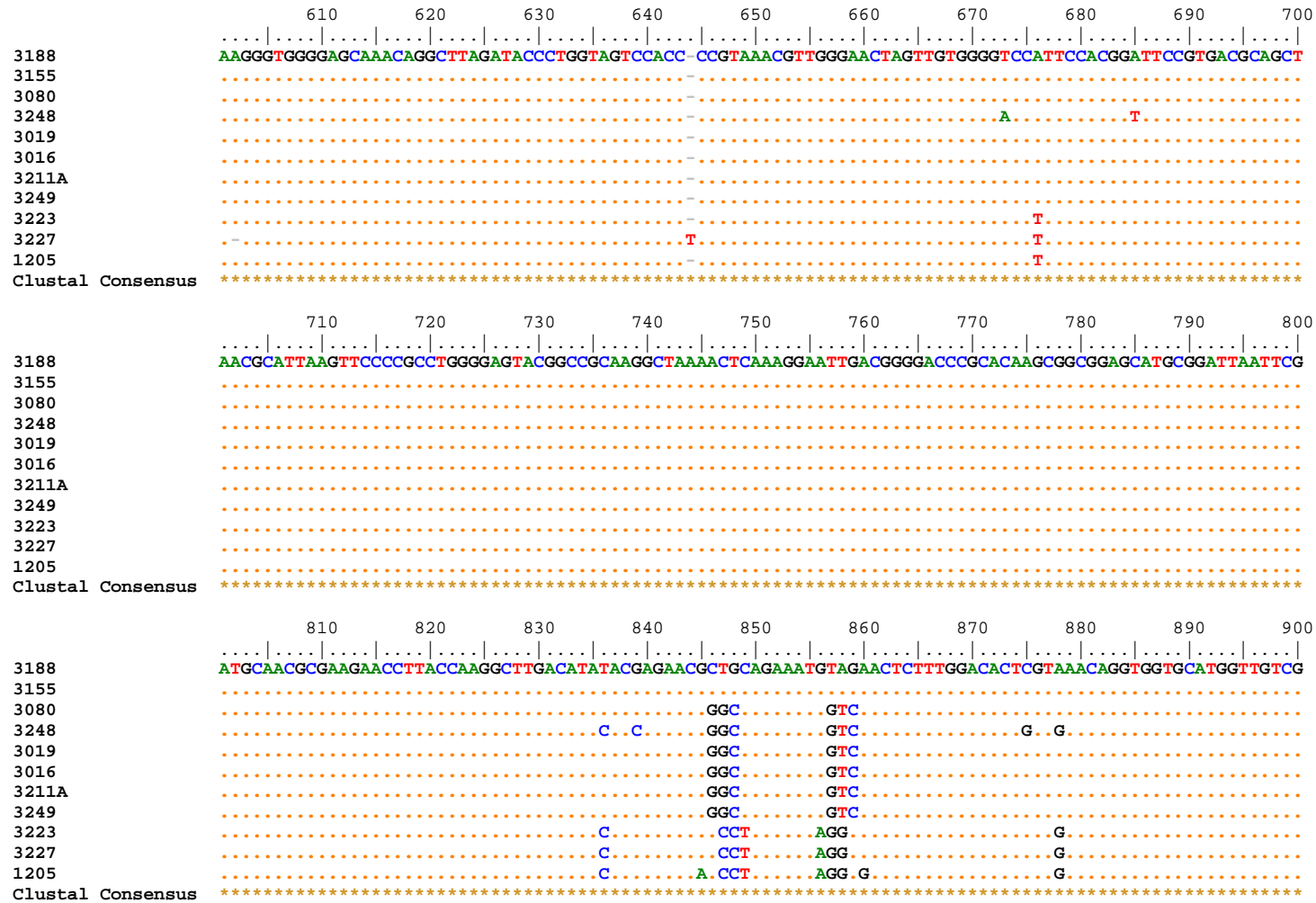


Figura 8c. continuação



Figura 8c. continuação

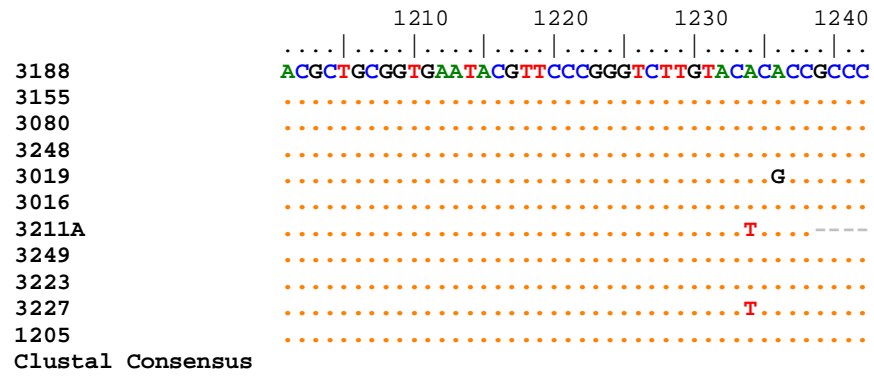


Figura 8d. Alinhamento das seqüências parciais do gene 16S rRNA dos isolados do gênero *Rhodococcus*



Figura 8d. continuação

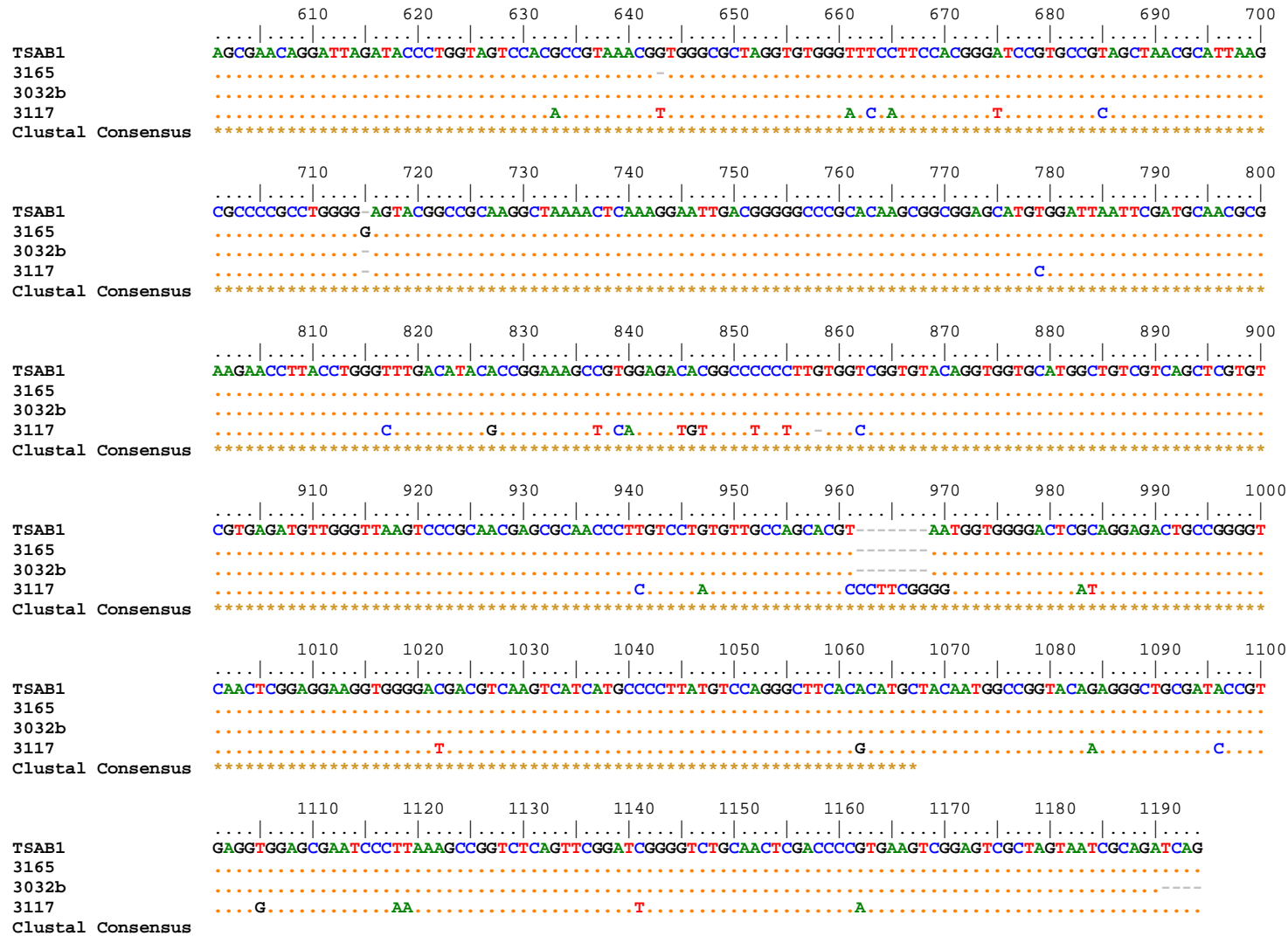


Figura 8e. Alinhamento das seqüências parciais do gene 16S rRNA dos isolados do gênero *Streptomyces*

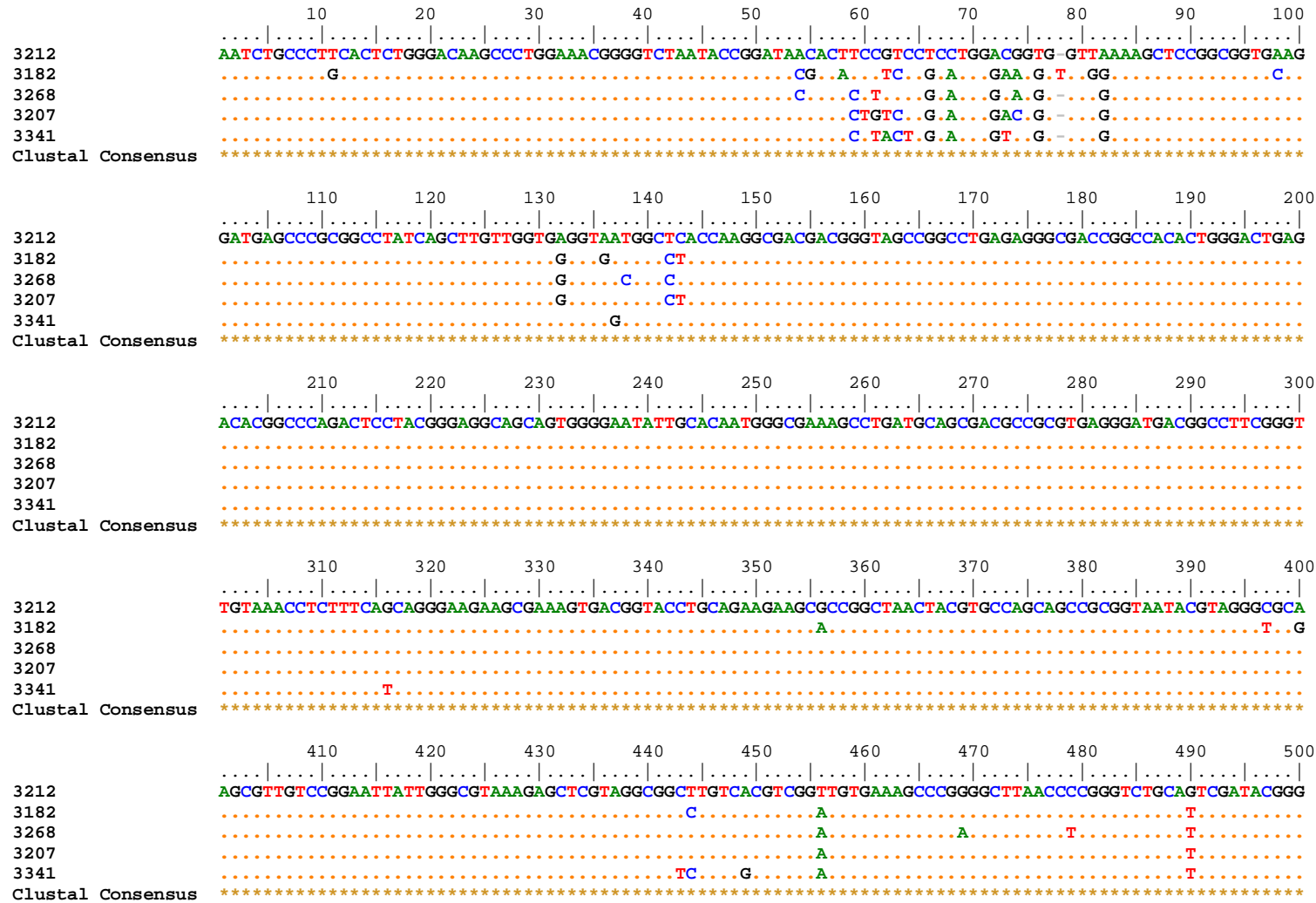


Figura 8e. continuação

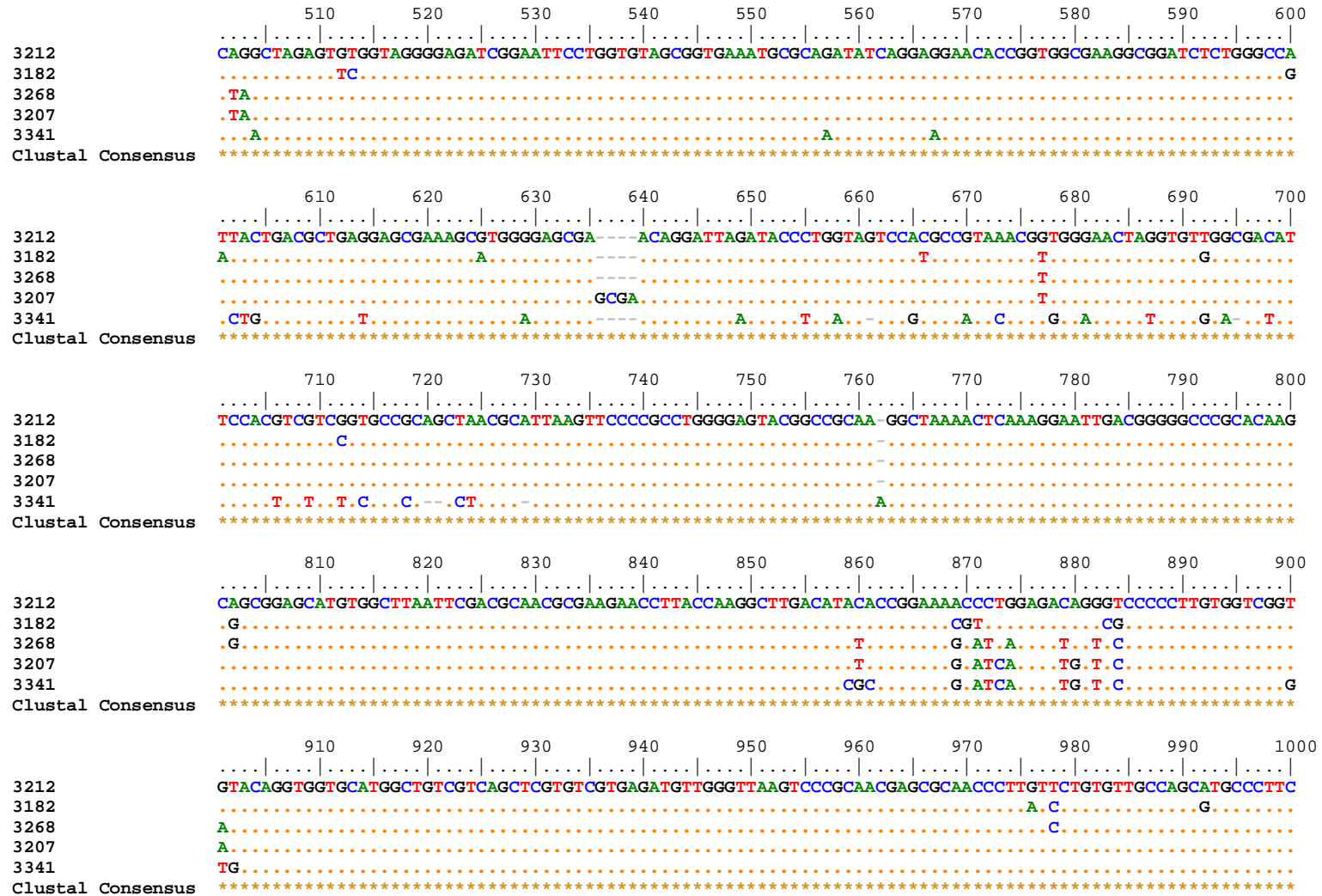
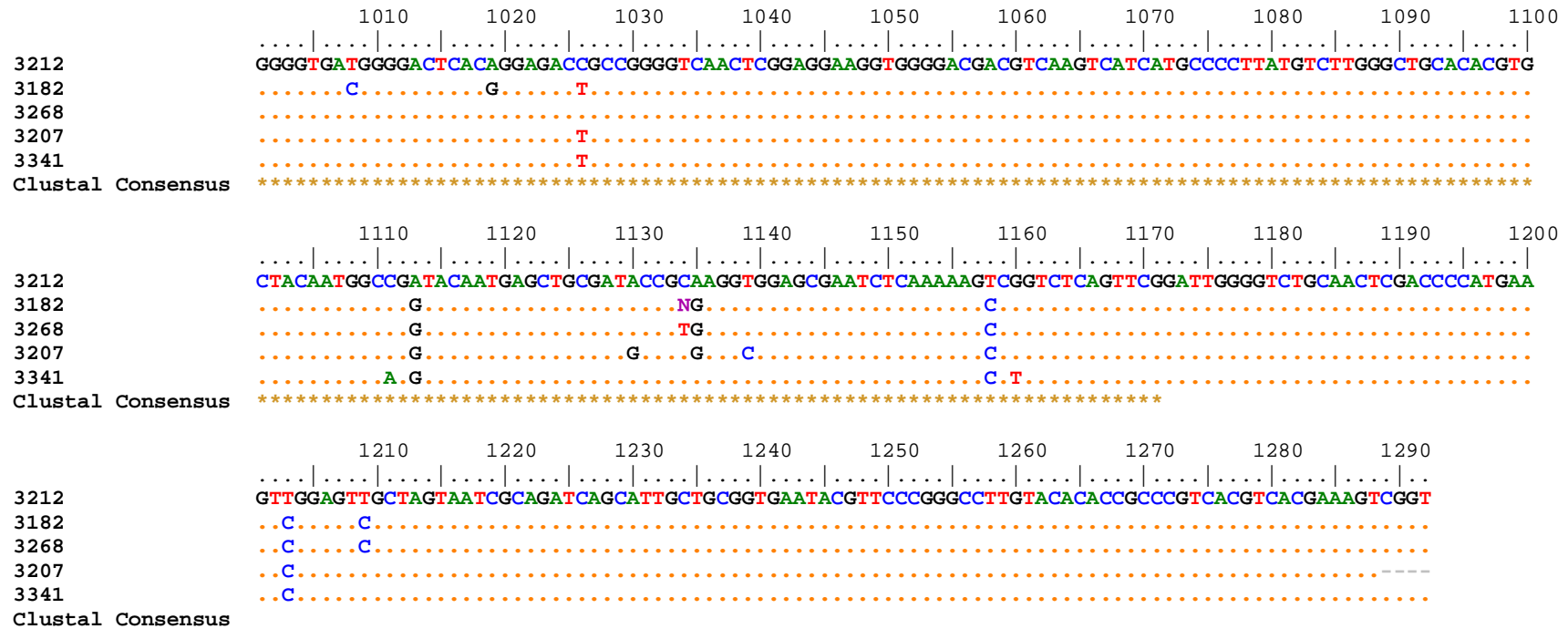


Figura 8e. continuação



5. DISCUSSÃO

A caracterização fenotípica convencional realizada nesse trabalho não foi capaz de concluir a identificação dos isolados estudados, após consulta de esquemas propostos na literatura (FUNKE *et al.*, 1997; FUNKE; BERNARD, 2003; KRIEG; HOLT, 1984; KONEMAN *et al.*, 2001). Os esquemas utilizados por diversos autores foram baseados em isolados de origem clínica e pouco se sabe sobre caracterização fenotípica de isolados ambientais.

O sistema de identificação comercial API CORYNE utilizado neste estudo é padronizado para identificação de bactérias corineformes, em 24 horas e segundo o fabricante, o banco de dados do programa APIWEB possibilita identificar os seguintes gêneros: *Actinomyces*, *Arcanobacterium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Leifsonia*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Dermabacter*, *Dietzia*, *Erysipelothrix*, *Gardnerella*, *Gordonia*, *Listeria*, *Oerskovia*, *Propionibacterium*, *Rhodococcus*, *Rothia* e *Turicella*, num total de 80 taxons (uma espécie, um biótipo, ou seja, dentro de uma espécie, um subconjunto de estirpes com o mesmo comportamento bioquímico ou um grupo de espécies que não é possível separar com os testes da galeria) (BioMerieux, 2007). Esse sistema apresenta limitações e informa que a sua base de dados é essencialmente para bactérias corineformes mais freqüentemente isoladas em amostras clínicas. Sendo assim, não são contemplados neste banco de dados os gêneros *Curtobacterium*, *Exiguobacterium*, *Agromyces* presentes neste estudo, entre outras bactérias denominadas corineformes de origem ambiental.

Outra limitação do sistema API CORYNE é a recomendação da realização de testes complementares quando não for possível diferenciar gêneros ou espécies. Gavin e colaboradores (GAVIN *et al.*, 1992) e Funke e colaboradores (FUNKE *et al.*, 1997), avaliaram esse sistema utilizando um grande número de bactérias corineformes de origem clínica. Ambos os autores observaram um aumento da porcentagem de acerto quando usaram testes complementares passando de 84,2% para 88,1% e de 35,4 para 90,5%. No nosso estudo quando foi necessário realizar testes complementares recomendados, não foi possível diferenciar os gêneros sugeridos. Isso pode ser justificado talvez devido ao fato destes testes distinguirem amostras clínicas desses gêneros. Para demonstrar tal particularidade, o sistema indica que a prova de Oxidação/Fermentação seja positiva para o gênero *Microbacterium*, entretanto, apenas quatro dos doze isolados de *Microbacterium sp.*

(seqüenciados) que são de origem ambiental apresentaram essa prova positiva (Tabela 3 e 6). Para o isolado 3299 (*Brevibacterium sp*) foram recomendados os testes hidrólise da caseína e cor da colônia para diferenciação dos gêneros *Rhodococcus* e *Brevibacterium*, porém, diferente do proposto pelo API CORYNE observamos resultado negativo para a hidrólise da caseína. Além disso, para os isolados 3098, 3712, 3117, 3069, 3225 e 3097 (Tabela 5), os gêneros sugeridos foram equivocados conforme resultados da análise do seqüenciamento do gene 16S rRNA. Alguns autores (FRENEY *et al.*, 1991 e FUNKE *et al.*, 1997) também relataram que a leitura dos testes realizada após 48 horas de incubação melhora o desempenho dos resultados do API CORYNE. Neste estudo observamos que os isolados 3299 e 3361 foram corretamente identificados por esse sistema após incubação por mais de 48 horas (Tabela 5 e Figura 6).

Os isolados 3369a e 3369b foram identificados como *Rhodococcus sp.* pelo API CORYNE enquanto a análise das seqüências do gene 16S rRNA revelou que estes pertencem ao gênero *Gordonia sp.* (Tabela 5). Algumas espécies do gênero *Gordonia* são provenientes de reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Rhodococcus* (exemplo: *Rhodococcus bronchialis*, *Rhodococcus rubropertinctus*, *Rhodococcus sputi* e *Rhodococcus terrae*) (STACKEBRANDT, SMIDA; COLLINS, 1988) Alguns autores relatam a dificuldade de identificar espécies de *Gordonia* por métodos tradicionais e a impossibilidade de distingui-las do gênero *Rhodococcus* devido ao estreito relacionamento entre esses gêneros (FUNKE; BERNARD, 2003; MCNEIL; BROWN, 1994).

Vários estudos utilizaram a análise do seqüenciamento do gene 16S rRNA para identificação ao nível de gênero e/ou espécies, inclusive quando observaram falhas na identificação por métodos convencionais e sistemas comerciais automatizados e mostraram a eficácia desta metodologia aplicada a isolados de origem clínica (BOSSHARD *et al.*, 2003, 2004; DRANCOURT *et al.*, 2000, 2004; FONTANA *et al.*, 2005; PETTI; POLAGE; SCHRECKENBERGER, 2005; TANG *et al.*, 2000; WOO *et al.*, 2003). Atualmente existem inúmeros estudos que utilizam esta metodologia para avaliar as proporções das espécies nas populações das bactérias ambientais publicados em revistas especializadas como a “Applied and Environmental Microbiology”. Drancourt e colaboradores (DRANCOURT *et al.*, 2000) observaram que 10,2 % dos isolados estudados não puderam ser identificados por essa análise e que estes eram provenientes principalmente de fontes

ambientais. No nosso estudo 2,77% (um isolado - 3712) dos isolados não pode ser identificado por esta metodologia e 2,77% (um isolado - 3117) foi classificado apenas ao nível de família. Isolados não identificados pela análise da sequência do gene 16S rRNA provavelmente podem representar novos gêneros ou espécies. Esta metodologia pode sugerir a localização filogenética destes isolados, entretanto é necessária a realização de caracterizações adicionais para descrição destes (DRANCOURT *et al.*, 2000; STACKEBRANDT *et al.*, 2002).

Uma limitação desta metodologia é a ausência de um consenso universal sobre a similaridade requerida para designar uma sequência a um gênero ou espécie. Vários autores têm sugerido valores acima de 97% para definir gênero e acima de 99% para definir espécie (BOSSHARD *et al.*, 2003; CLARRIDGE *et al.*, 2004; DRANCOURT *et al.*, 2000; MIGNARD; FLANDROIS, 2006). É interessante ressaltar que os trabalhos que avaliam esta metodologia para identificação utilizam diferentes seguimentos deste gene empregando os critérios acima para definição de gênero e espécies. O Kit MicroSeq 500 16S ribossomal DNA (Applied Biosystems), que sequência e analisa um fragmento dos primeiros 527 pb do gene 16S rRNA tem sido utilizado para identificação de espécies de bactérias patogênicas para o homem, entretanto este sistema ainda não foi avaliado para isolados ambientais (FONTANA *et al.*, 2005; PETTI; POLAGE; SCHRECKENBERGER, 2005; TANG *et al.*, 2000; WOO *et al.*, 2003). Wang e colaboradores (WANG *et al.*, 2004) realizaram uma avaliação da eficácia da determinação da categoria taxonômica de sequências do gene 16S rRNA com diferentes tamanhos (pares de bases) utilizando sequências depositadas no banco de dados Ribosomal Database Project II (RIBOSOMAL..., 2007). Este estudo mostrou que com o sequenciamento completo do gene é possível obter acertos de 94,3% dos gêneros, 97,1% das famílias, 99,3% das ordens, 99,9% das classes e filos enquanto o sequenciamento parcial do gene (400 pb) acertos de 92,4% dos gêneros, 96,5% das famílias, 99,5% das ordens, 99,7% das classes e filos (Figura 9).

Para resumir não é possível dar um valor definitivo de similaridade para definir gênero e/ou espécies utilizando a análise das sequências do gene 16S rRNA. Isto é justificado em parte porque os valores percentuais podem variar se forem calculados usando somente os primeiros 500 pb ou todos os 1.500 pb (CLARRIDGE, 2004). É

provável que um único valor para definição do gênero ou espécie com base na sequência do gene 16S rRNA não seja apropriado para todos os gêneros, uma vez que estes podem sofrer processos evolucionários distintos (CLARRIDGE, 2004; OREN, 2004).

A definição de espécie bacteriana tem sido amplamente discutida por taxonomistas (GEVERS *et al.*, 2005; OREN, 2004; STALEY, 2006), entretanto, para que uma espécie seja definida, o Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana do “International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology” (IJSEM) (STACKEBRANDT *et al.*, 2002) reafirma a necessidade da realização da metodologia de reassociação do DNA-DNA e a determinação da divergência (ΔT_m) e sugere que toda descrição de espécie deve incluir uma sequência de 16S rRNA quase completa (>1300 nucleotídeos, <0,5% de ambigüidade). Estes autores encorajam estudos que possam avaliar a utilização de novas metodologias moleculares tais como a análise das seqüências de genes “housekeeping” para delinear espécies.

Nesse estudo a análise da sequência do gene 16S rRNA revelou uma grande variedade de microrganismos pertencentes principalmente à ordem dos *Actinomycetales* com exceção dos isolados 3069 e 3225, pertencentes à ordem *Bacillales*. Um total de 12 gêneros pertencentes a 11 famílias foi identificado com destaque para as famílias *Microbacteriaceae* e *Streptomycetaceae*. Não foi observada a correlação entre o gênero bacteriano identificado e a localização na área de trabalho onde é realizado o Ensaio de Esterilidade, o que indica que estes fazem parte da microbiota das áreas estudadas. Os relacionamentos desses gêneros podem ser mostrados na Figura 10.

A análise da sequência do gene 16S rRNA do isolado 3098 mostrou que este pertence ao gênero *Agromyces*. Quase todas as espécies deste gênero apresentam pelo menos uma sequência do gene 16S rRNA depositadas no GenBank, entretanto a sequência da espécie mais similar à obtida para esse isolado foi *Agromyces ulmi* (T) (97,18%) (Tabela 7).

Atualmente o gênero *Agromyces* possui dezessete espécies encontradas principalmente em solo (EUZÉBY, 2007) e foi proposto por Gledhill e Casida em 1969

para actinomicetos, microaerófilos, aeróbios, filamentosos, ramificados, fragmentados, catalase negativa que apresentavam reação de oxidase negativa. Mais tarde foram descritas espécies desses gêneros com características fenotípicas distintas tais como: aeróbio estrito, catalase e oxidase positiva e não filamentosos (DOROFEEVA *et al.*, 2003).

O isolado 3401 foi identificado como pertencente ao gênero *Arthrobacter*. Atualmente esse gênero possui 51 espécies descritas que são amplamente distribuídas no ambiente, especialmente no solo (EUZÉBY, 2007), mas tem sido encontrado também causando infecção humana (BERNASCONI *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2005). Para muitas espécies de *Arthrobacter* existe apenas uma única cepa descrita, a cepa tipo (FUNKE *et al.*, 1997).

É provável que o isolado 3299 pertença a *Brevibacterium casei* devido a sua elevada similaridade com as cepas desta espécie inclusive a cepa tipo (acima de 99% de um fragmento de 91,45% da seqüência da cepa tipo de *B. casei*) (Tabela 7). Atualmente o gênero possui vinte e duas espécies descritas (EUZÉBY, 2007). Espécies deste gênero são encontradas na pele humana e de outros animais e principalmente em produtos lácteos (FUNKE *et al.*, 1997). Infecções clínicas causadas por espécies de *Brevibacterium* são raras e alguns relatos foram descritos principalmente em pacientes imunocomprometidos (CANNON *et al.*, 2005; ULRICH *et al.*, 2006).

Podemos afirmar que o isolado 3361 pertence à espécie *Dermabacter hominis* de acordo com os resultados obtidos pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA e devido a este gênero possuir apenas esta espécie (Tabela 7). Além disso, este isolado foi também identificado pelo API CORYNE em 48 horas, como pertencente a essa espécie. Jones e Collins (1988) descreveram esta espécie em isolados de pele humana. Casos de infecções clínicas tais como abscessos cerebrais, Bacteremia e osteomielites foram descritos, entretanto esta espécie é um raro patógeno oportunista (GÓMEZ-GARCÉS *et al.*, 2001; BOSTERHAUT *et al.*, 2002).

Os isolados 3069 e 3335 pertencem ao gênero *Cellulomonas*. O isolado 3089 provavelmente pertence à espécie *C. hominis*, pois compartilhou similaridade maior que 99% com a cepa tipo desta espécie e cepas depositadas no GeneBank equivocadamente

como *C. parahominis*. O trabalho que originou estas seqüências (AY655732, AY655731, AY655730, AY655729, AY655728) refere que estas pertencem à espécie *C. hominis*, entretanto foram depositadas como *C. parahominis* (BROWN *et al.*, 2005). A nomenclatura *C. parahominis* nunca foi descrita como espécie (EUZÉBY, 2007). A espécie *C. hominis* foi descrita por Funke e colaboradores (FUNKE *et al.*, 1995). O solo é o habitat da maioria das espécies do gênero, entretanto algumas espécies têm sido descritas como causadoras de infecções humanas (FUNKE *et al.*, 1997; BROWN *et al.*, 2005). A seqüência do gene 16S rRNA do isolado 3335 apresentou maior similaridade com a seqüência um isolado de origem ambiental (Tabela 7). Atualmente já foram descritas quatorze espécies do gênero (EUZÉBY, 2007).

Para o grupo de bactérias constituído pelos isolados 3316, 3020 e 3345, a análise realizada identificou os mesmos como pertencentes ao gênero *Corynebacterium* e provavelmente sejam *Corynebacterium simulans*, *Corynebacterium xerosis* e *Corynebacterium glaucum* respectivamente devido ao alto grau de similaridade das seqüências obtidas com as depositadas nos bancos de dados consultados (Tabela 7). O gênero possui atualmente sessenta e quatro espécies e encontram-se amplamente distribuídos na natureza, encontrados em solos e na pele e mucosa de humanos e outros animais (EUZÉBY, 2007; KONEMAN *et al.*, 2001). Há relatos de infecções humanas causadas pelas espécies *C. simulans* e *C. xerosis* (PESSANHA *et al.*, 2003; WATTIAU, JANSSENS; WAUTERS, 2000). A espécie *C. glaucum* foi descrita para um único isolado proveniente de corante de cosmético, utilizando apenas caracterização fenotípica e comparação da seqüência do gene 16S rRNA com o banco de dados (YASSIN; KROPPESTEDT; LUDWIG, 2003). Até o momento, o isolado 3345 revelou ser o único encontrado após a descrição desta espécie. Esse achado fornece maior credibilidade na existência desta espécie bacteriana. Christensen e colaboradores (CHRISTENSEN *et al.*, 2001) propuseram que a descrição de novas espécies fosse implementada pelo Comitê Internacional de Sistemática de Procariotos quando o estudo realizado tivesse obrigatoriamente mais de uma amostra.

O isolado 3097 pertence ao gênero *Curtobacterium*, pois está relacionado a três espécies deste gênero apresentando similaridade maior que 99% quando a seqüência do gene 16S rRNA foi analisada. O gênero possui até o momento seis espécies descritas com

pelo menos uma seqüência do gene 16S rRNA depositada no GenBank (EUZÉBY, 2007), e são geralmente encontradas em plantas. A espécie *C. flaccumfaciens* é um patógeno bem estabelecido para plantas (KOMAGTA; SUZUKI, 1986). Recentemente, Funke e colaboradores (FUNKE *et al.*, 2005) descreveram pela primeira vez infecção humana causada por *Curtobacterium*. Os membros do gênero *Curtobacterium* são muito confundidos com os gêneros *Cellulomonas* e *Microbacterium* (KOMAGTA; SUZUKI, 1986).

As seqüências do gene 16S rRNA para os isolados 3069 e 3225 mostraram alta similaridade (acima de 99%) com seqüências de isolados de amostras ambientais, principalmente de sedimentos marinhos depositadas como pertencentes ao gênero *Exiguobacterium*. O gênero possui doze espécies descritas até o momento (EUZÉBY, 2007). Algumas seqüências deste gênero depositadas no GenBank apresentam o nome da espécie equivocado. *E. lactigenes* isolado 10C foi recentemente caracterizado e descrito como a nova espécie *E. profundum* (CRAPART *et al.*, 2007). A seqüência com o número de acesso DQ351341 no GeneBank foi depositada como *E. homiense* HI-R8, entretanto, esta espécie não foi ainda descrita na literatura (EUZÉBY, 2007). Têm sido relatadas numerosas cepas de várias fontes clínicas (pele, ferimentos, fluído cerebrospinal), mas não existem casos relatados (FUNKE *et al.*, 1997).

É provável que os isolados 3369a e 3369b sejam representativos da espécie *Gordonia terrae* por ter apresentado identidade quase total (99,76 a 100%) com a cepa tipo e não tipo da espécie (Tabela 7). Apesar de estes isolados apresentarem diferente pigmentação da colônia, as seqüências obtidas para o gene 16S rRNA tiveram identidade de 100% (dados não mostrados). O gênero possui 25 espécies descritas (EUZÉBY, 2007). Stackebrandt e colaboradores (STACKEBRANDT *et al.*, 1988) reintroduziram microrganismos anteriormente considerados *Rhodococcus* ao gênero *Gordonia* com base em análises comparativas de 16S rRNA. Os membros do gênero são amplamente distribuídos na natureza, têm sido isolados de lama ativada em tanques de aeração e plantas de tratamento biológico de rede de esgotos (MCNEIL; BROWN, 1994). A identificação de espécies de *Gordonia*, assim como a diferenciação destas para o gênero relacionado *Rhodococcus* não é possível com base nas características bioquímicas (FUNK; BERNARD, 2003; MCNEIL; BROWN, 1994). *Gordonia terrae* tem sido relatada raramente como causa

de bacteremias, porém casos de infecções por esta espécie podem ser subestimados devido à dificuldade na diferenciação com o gênero *Rhodococcus*, a identificação definitiva deve ser realizada pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA (GIL-SANDE *et al.*, 2006).

Doze isolados (3016, 3019, 3155, 3227, 3407b, 3408b, 3223, 3188, 3211a, 3080, 3248, e 3249) foram identificados como pertencentes ao gênero *Microbacterium*. Neste estudo, este gênero foi o mais encontrado. Atualmente quarenta e quatro espécies desse gênero foram descritas (EUZÉBY, 2007). As seqüências do gene 16S rRNA obtidas para estes isolados apresentaram maior similaridade com amostras ambientais (Tabela 7). Schumann e colaboradores (SCHUMANN *et al.*, 1999) demonstraram que para o gênero *Microbacterium*, que altos valores de similaridade entre seqüências do gene 16S rRNA (>99%) nem sempre indicam que seus membros são da mesma espécie como, por exemplo, a análise deste gene mostrou que *M. oxidans* apresenta altos valores de similaridade com as espécies *M. luteolum* DMS 2143 (T) (99,9%), *M. liquefaciens* DMS 20638 (T) (99,7%) e *M. saperdae* DMS 20168 (T) (99,6%). Este gênero é encontrado com freqüência no meio ambiente e existem alguns relatos de infecções humanas (FUNKE; BERNARD, 2003; GIOVANNI *et al.*, 2006; LAFFINEUR *et al.*, 2003;).

É bem provável que os isolados TSAB1, 3165 e 3032b pertençam à espécie *Rhodococcus corynebacterioides* devido aos valores de similaridade entre as seqüências do gene 16S rRNA com a cepa tipo desta espécie. A espécie *R. corinebacterioides* sofreu alteração taxonômica, pois pertencia ao gênero *Nocardia* e algumas seqüências do gene 16S rRNA foram depositadas no GeneBank como *Nocardia corynebacterioides* (YASSIN; SCHAAL, 2005). O gênero possui trinta espécies descritas (EUZÉBY, 2007). O potencial patogênico de membros do novo gênero *Rhodococcus* e em particular *R. equi* pode ser subestimado porque a detecção destes microrganismos em espécimes clínicos pode ser considerada contaminação ambiental ou colonização da pele (MCNEIL; BROWN, 1994). Têm sido encontradas na literatura relatos de infecções causadas por *Rhodococcus* (GARTHWAITE *et al.*, 2007; MARCHIORI *et al.*, 2006; MISTRY *et al.*, 2006).

A análise molecular realizada mostrou que os isolados 3212, 3268, 3341, 3207 e 3182 pertencem ao gênero *Streptomyces*. As espécies mais similares aos isolados 3212 e

3182 foram *Streptomyces kunmingensis* além de dois outros isolados ambientais e *Streptomyces albiacialis* NBRC 101002 respectivamente (Tabela 7). Observamos que as seqüências do gene 16S rRNA dos isolados 3268 e 3207 mostraram similaridade maior que 99% para diversas espécies apontando a dificuldade da diferenciação das espécies do gênero. Até o momento, o gênero possui mais de 520 espécies (EUZÉBY, 2007). As espécies deste gênero são microrganismos ambientais, encontrados em solos, e têm grande importância em diversas áreas industriais, incluindo a farmacêutica e poucas espécies produzem infecções humanas (EKKELENKAMP *et al.*, 2004; KONEMAN *at al.*, 2001; NICHOLS *et al.*, 2005;). A taxonomia do gênero *Streptomyces* continua muito confusa apesar das revisões realizadas aplicando várias metodologias fenotípicas e moleculares. Não existem critérios para definição das espécies devido à grande variedade morfológica, cultural e as características fisiológicas e bioquímicas observadas inter e intra-espécie. Entretanto, existem espécies a serem descritas e a identificação ao nível de espécie permanece difícil e impossível usando somente métodos fenotípicos (ANDERSON & WELLINGTON, 2001; MCNEIL & BROWN, 1994).

A comparação da seqüência do gene 16S rRNA do isolado 3117 com as seqüências depositadas nos bancos de dados consultados mostrou similaridade de 96,39% com o gênero *Nocardioides*, não existindo no banco de dados (GeneBank) seqüências de gêneros mais relacionadas geneticamente com este isolado. Esse valor de similaridade nos permite constatar que o isolado pertence à família *Nocardioideaceae* (RIBOSOMAL..., 2007; STACKEBRANDT *et al.*, 2002). Uma seqüência de um isolado de água vulcânica (Nova Zelândia) depositada como *Actinobacterium* N23 (no. acesso AF 356018) mostrou similaridade de 99,47% (Tabela 7), esse resultado sugere a possibilidade destes isolados pertencerem a uma nova espécie e gênero.

A seqüência do gene 16S rRNA para o isolado 3712 compartilhou somente 94,25% de similaridade com a seqüência da cepa tipo da única espécie do gênero *Microthricus*, o *Microthricus phosphovorius* (no. acesso D 26169) (NAKAMURA *et al.*, 1995) e 94,56 % de similaridade com a cepa tipo da espécie *Friedmanniella antarctica* depositada no GeneBank como *Microthricus phosphovorius* DSM 10555 (no. acesso Z 78207) (SCHUMANN *et al.*, 1997) (Tabela 7). Estes resultados mostram que este isolado está

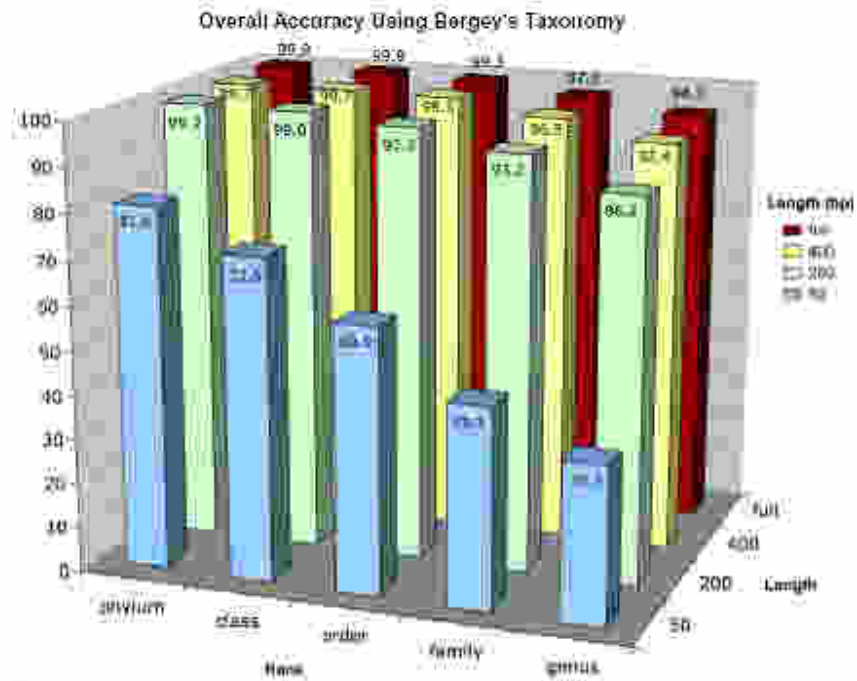
relacionado a dois gêneros que pertencem a diferentes famílias, o *Microthricetus* pertence à família *Propionibacteriaceae* e o gênero *Friedmanniella* à família *Nocardioideaceae* (EUZÉBY, 2007). Interessante observar que a seqüência do isolado 3712 apresentou identidade de 100% com seqüência de uma cepa depositada no GeneBank como *Actinobacterium* SM48 (no. acesso DQ 195859) proveniente de sedimento marinho na China, o que fortalece a sugestão destes pertencerem a uma nova espécie e gênero.

Alguns estudos mostram a necessidade de metodologias moleculares para a identificação de alguns grupos bacterianos provenientes do controle ambiental e de produtos farmacêuticos (SUTTON & CUNDELL, 2004; CUNDELL, 2006). Cundell (2006) realizou uma revisão sobre estratégias de identificação e caracterização microbiana em produtos farmacêuticos e em programas de monitoramento microbiano e considera necessária a utilização de metodologias moleculares para análise mais efetiva das investigações sobre os contaminantes de produtos e ambientes farmacêuticos, com objetivo de identificar a origem e determinar ações preventivas na indústria. Apesar da necessidade e da preocupação das indústrias farmacêuticas com a identificação, são raros os relatos sobre a incidência das espécies bacterianas encontradas nestas áreas. No único relato encontrado, os principais gêneros bacterianos presentes nas áreas limpas estudadas foram *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium* que foram identificados com o sistema automatizado VITEK utilizando os cartões GNI ("Gram negative identification") e GPI ("Gram positive identification") (ABREU *et al.*, 2003). Entretanto, este sistema não é capaz de identificar bactérias Corineformes e Nocardioformes uma vez que não existem para estas o perfil metabólico no banco de dados destes sistemas e/ou conjunto de substratos capaz de discriminar as espécies em questão. O cartão GPI pode identificar apenas algumas espécies clínicas do gênero *Corynebacterium* (BIOMERIEUX, 2003). Algumas identificações podem ter sido equivocadas devido ao uso deste sistema. Além disto, na identificação do gênero *Bacillus* há necessidade de verificar a presença de esporos, entretanto não há descrição da realização da detecção destas estruturas no estudo (ABREU *et al.*, 2003) e bastonetes Gram positivos irregulares podem ter sido identificados como pertencente ao gênero *Bacillus*.

A identificação molecular baseada na análise do gene 16S rRNA é bastante útil principalmente quando a identificação mediante outro tipo de técnica é impossível, difícil

ou requer muito tempo como ocorre com as bactérias de crescimento lento, fastidiosas, onde as condições de crescimento são difíceis de mimetizar em laboratórios (CLARRIDGE, 2004). Nesse estudo, observamos que os isolados bacterianos provenientes do controle ambiental foram identificados apenas por essa metodologia mostrando a necessidade da implantação desta ferramenta para proporcionar resultados mais confiáveis.

Accuracy of Results



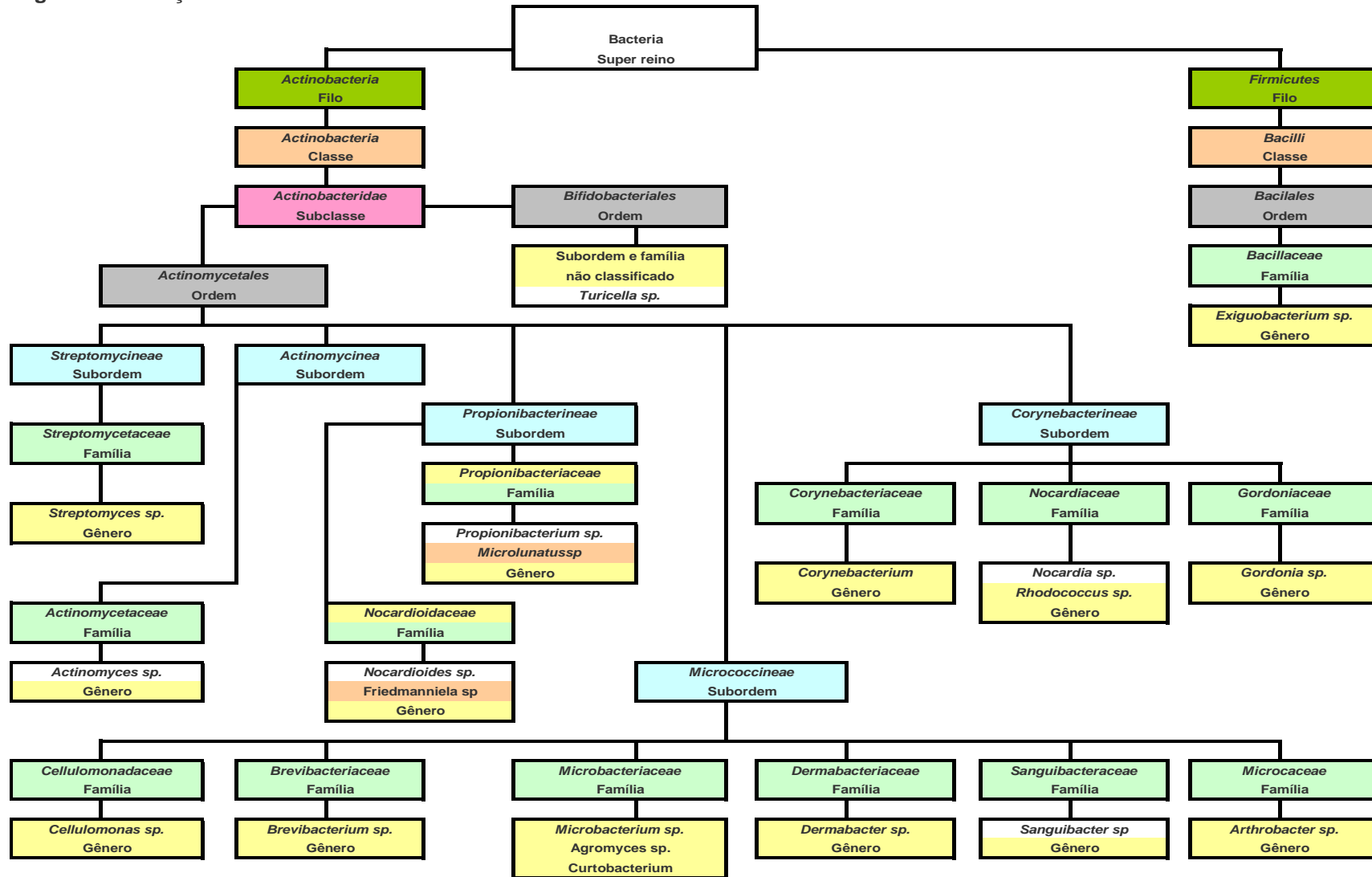
Vetted sequences:

length	phylum (%)	class (%)	order (%)	family (%)	genus (%)
full	99.9	99.8	99.8	97.1	84.3
400	99.7	99.7	99.6	96.3	82.4
200	99.2	99	97.7	93.3	80.2
50	82.8	72.5	48	38.3	26.3

Table 1. Classifier accuracy at different taxonomic ranks for varying query lengths.

Figura 9. Dados extraídos de Wang e colaboradores (2004).

Figura 10. Posição taxonômica das bactérias "Corineformes" e "Nocardioformes"



Baseado no Euzéby (<http://www.bacterio.cict.fr> - 2007)

6. CONCLUSÕES

A caracterização fenotípica utilizando testes bioquímicos tradicionais, não permitiu a identificação dos isolados estudados.

Verificamos neste estudo que a identificação realizada pelo sistema semi-automatizado API CORYNE, identificou apenas 22,58% dos isolados corretamente ao nível de gênero.

Os iniciadores universais utilizados permitiram a amplificação do gene 16S rRNA da grande maioria (97,23%) dos isolados estudados e podem ser utilizados na implantação desta metodologia no setor de identificação bacteriana.

A análise da seqüência do gene 16S rRNA identificou 94,46% dos isolados ao nível de gênero. Um total de 12 gêneros pertencentes a 11 famílias foram identificados com especial destaque para as famílias *Microbacteriaceae* e *Streptomycetaceae*. Um isolado (2,77%) foi identificado ao nível de família e outro isolado (2,77%) não foi identificado por essa metodologia.

Os isolados 3712 e 3117 possivelmente pertencem a um gênero e espécie ainda não descritos.

O isolado 3345 possivelmente pertence à espécie *Corynebacterium glaucum* que foi descrita com um único isolado.

Este estudo mostra a importância da implantação da metodologia da análise da seqüência do gene 16S rRNA para identificação de bactérias corineformes e nocardioformes no setor de identificação bacteriana.

7. BIBLIOGRAFIA

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

ABREU, C. S; PINTO, T. J. A. E; OLIVEIRA, D. C. Incidência de microrganismos em salas limpas. **Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, v. 13, p.14-17, 2003.

BERNARD, K. A; MUNRO, D; ONGSANSOY, E. Characteristics of rare or recently described *Corynebacterium* species recovered from human clinical material in Canada. **Journal Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4375-4381, 2002.

BERNASCONI, E. *et al.* *Arthrobacter woluwensis* Sub acute Infective Endocarditis: Case Report and Review of the Literature. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 27–31, 2004.

BIOMERIEUX Biochemical Information for Identification Software. Ref. 41207. Version B. Rev. 10/2000. BioMerieux, inc. 2000.

BIOMERIEUX Technical Bulletin Manual Industrial. 510722-4. Rev.1002. BioMerieux, Inc.2002. Disponível em: <<http://www.biomerieux.com>>. Acesso em: 30 jan. 2007.

BIOMERIEUX Vitek. Manual de referência de microbiologia. 2003. 510759-1PT-A Ver. 08. BioMerieux, Inc, 2003.

BIOMERIEUX. APIWEB - Disponível em: <<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>>. Acesso em: 10 jan. 2007.

BOSSHARD, P. P. *et al.* Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic Gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). **Journal Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4134-4140, 2003.

BOSSHARD, P. P. *et al.* ABELS, S; ALTWEGG, M; BOTTGER, E. C; ZBINDEN, R. Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase negative Gram positive cocci in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 2065-2073, 2004.

BOSTERHAUT, V. B. *et al.* Chronic osteomyelitis due to *Actinomyces neuii* subspecies *neuii* and *Dermabacter hominis*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 486-7, 2002.

BRASIL. RESOLUÇÃO – RDC 210, de 04 de agosto de 2003. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no regulamento técnico das boas práticas para a fabricação de medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 agosto 2003. Seção 1. p. 25-50.

BUSCH, U, NITSCHKO, H. Methods for the differentiation of microorganisms. **Journal of Chromatography B. Science Applications**, v. 722, n.1-2, p. 263-78, 1999.

BROWN, J. M. *et al.* Phenotypic and Genetic Characterization of Clinical Isolates of CDC Coryneform Group A-3: Proposal of a New Species of *Cellulomonas*, *Cellulomonas denverensis* sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1732–1737, 2005.

CAMELLO, T. C. F. *et al.* Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from Clinical specimens of patients in a University hospital, Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 323-26, 2003.

CANNON, J. P. *et al.* Pericardial infection caused by *Brevibacterium casei*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 2, p. 164, 2005.

CRAPART, S. *et al.* *Exiguobacterium profundum* sp. nov., a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.57, p. 287-292, 2007.

CLARRIDGE III, J. E. Impact of 16S r RNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 840-862, 2004.

CLOUD, J. L. *et al.* Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of *Nocardia* species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 578-584, 2004.

CHRISTENSEN, H. *et al.* Is characterization of a single isolate sufficient for valid publication of a new genus or species? Proposal to modify Recommendation 30b of the Bacterial Code (1990 Revision). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2221-2225, 2001.

COYLE, M. B; LIPSKY, B. A. Coryneform Bacteria in Infectious Diseases: clinical and laboratory aspects. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 3, p.227-46, 1990.

CUNDELL, A. M. Microbial Identification Strategies in the Pharmaceutical Industry. **Technology Application**, v. 60, n. 2, p. 111-123, 2006.

DAVID, S. A Spontaneous Joint Infection with *Corynebacterium striatum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 656-658, 2007.

DOROFEEVA, L. V. *et al.* *Agromyces albus* sp. nov, isolated from a plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1435–1438, 2003.

DRANCOURT, M. *et al.* 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3623–3630, 2000.

DRANCOURT, M; BERGER, P; RAOULT, D. Systematic 16S rRNA Gene Sequencing of Atypical Clinical Isolates Identified 27 New Bacterial Species Associated with Humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2197-2202, 2004.

EIGNER, U. *et al.* Analysis of the Comparative Workflow and Performance Characteristics of the VITEK 2 and Phoenix Systems. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3829-3834, 2005.

EKKELENKAMP, M. B. *et al.* *Streptomyces thermovulgaris* bacteremia in Crohn's disease patient. **Emerging Infectious diseases**, v. 10, n.10, p. 1883-5, 2004.

EUZÉBY, J. P. List of Bacterial names with standing in nomenclature (LBSN). Disponível em: <<http://www.bactereo.net>>. Acesso em: 15 fev. 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Métodos Biológicos 4^a. ed. São Paulo: Atheneu, part. 1, p.v. 5.1.1, 1988.

FRENEY, J. *et al.* Evaluation of API Coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 38-41, 1991.

GEVERS, D. *et al.* Re-evaluating prokaryotic species. **Focus on Horizontal Gene transfer- Perspectives**, v. 3, n. 9, p. 733-739, 2005.

GIAMMANCO, G. M. *et al.* Interstitial pulmonary inflammation due to *Microbacterium* sp. after heart transplantation. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 335-339, 2006,

GIL-SANDE, E. *et al.* Etiological Misidentification by Routine Biochemical Tests of Bacteremia Caused by *Gordonia terrae* Infection in the Course of an Episode of Acute Cholecystitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2645–2647, 2006.

GÓMEZ-GARCÉS J. L. *et al.* Bacteremia by *Dermabacter hominis*, a Rare Pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2356–2357, 2001.

GROVE, D. I; DER-HAROUTIAN, V; RATCLIFF, R. M. *Aureobacterium* masquerading as '*Corynebacterium aquaticum*' infection: case report and review of the literature. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n. 10, p. 965-70, 1999.

HALL, L. *et al.* Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. **Journal Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1447-1453, 2003.

HOLLIS, D. G, WEAVER, R. E. Gram positive organisms: a guide to identification. Special Bacteriology Section, Centers for Disease Control, Atlanta, Ga. 1981.

HUANG, Y. *et al.* *Arthrobacter scleromae* sp. nov. Isolated from Human Clinical Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1451–1455, 2005.

HUXLEY, J. N; HELPS, C. R; BRADLEY A.J. Identification of *Corynebacterium bovis* by Endonuclease Restriction Analysis of the 16S r RNA Gene Sequence. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 1, p. 38-45, 2004.

ISO 14644-1, International Standardization Organization. Classification of air Cleanliness. 2000. disponível em: <http://www.particle.com/whitepapers_met/cleanroom%20standards.htm#Summary_of_standards>. Acesso em: 30 jan. 2007.

JONES, D; COLLINS, M. D. Taxonomic studies on some human cutaneous coryneform bacteria: description of *Dermabacter hominis* gen. nov., sp. nov. **FEMS Microbiology Letters**, v. 51, p. 51-56, 1988.

KAKIS, A. *et al.* Cluster of invasive infections, including endocarditis, caused by nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*. **Southern Medical Journal**, v. 99, n.10, p. 1144-5, 2006.

KATTAR, M. M. *et al.* Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 789-794, 2001.

KAWATA, K. *et al.* Simple and rapid PCR method for identification of streptococcal species relevant to animal infections based on 23S rDNA sequence. **FEMS Microbiology Letters**, v. 64, p. 237: 57, 2004.

KHAMIS, A; RAOULT, D; SCOLA, B. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 3925-3931, 2004.

KHARSEEVA, G. G. *et al.* Pathogenicity of *Corynebacterium diphtheriae* circulating in Rostov-on-Don City and Rostov region during interepidemic period. **Zh Mikrobiology Epidemiology Immunobiology**, v. 6, p. 6-9, 2006.

KRIEG, N. R; HOLT, J. G; SNEATH, P. H. A; MAIR, N. S; SHARPE, M. E. (Ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore Willians&Wilkins, 1984.

KONEMAN, E. W; ALLEN, S. D; JANDA, W. M; WASHINGTON, C. W. Diagnóstico Microbiológico. Editora Médica e Científica 5a. edição. Rio de Janeiro. 2001.

KOMAGTA, K., K. I. SUZUKI. Genus *Curtobacterium*, In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Williams & Wilkins Co., v. 2, p. 1313-1317, 1986.

LAFFINEUR, K. *et al.* Bacteremia Due to a Novel *Microbacterium* Species in a Patient with Leukemia and Description of *Microbacterium paraoxydans* sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 2242–2246, 2003.

LAU, S. K. P. *et al.* Catheter- related *Microbacterium* bacteremia identified by 16S rRNA gene sequencing. **Journal Clinical. Microbiology**, v.. 40, n. 7, p. 2681-2685, 2002.

MARCHIORI, E. *et al.* *Rhodococcus equi* infection in acquired immunodeficiency syndrome. Computed tomography aspects - Department of Radiology, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p.405-9, 2006.

MCNEIL, M. M; BROWN, J. M. The Medically Important Aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 3, p. 357-417, 1994.

MIGNARD, S; FLANDROIS, J. P. 16S rRNA Sequencing in Routine Bacterial Identification: A 30-month experiment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, n. 3, p. 574–581, 2006.

MISTRY, N. F. *et al.* Rhodococcus and Mycobacterium Tuberculosis: masquerade or mixed infection. **The International Journal of Tuberculosis Lung Disease**, v. 10, n. 3, p. 351-3, 2006.

MOTA, F. F. *et al.* Use of *rpoB* gene analysis for identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species as an alternative to the 16S r RNA gene. **Letters in Applied Microbial**, v. 39, n. 1, p. 34-40, 2004.

NAKAMURA, K. *et al.* *Microtholunatus phosphovorius* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, n. 1, p. 17-22, 1995.

NCBI-blast...Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acesso em: 31 jan. 2007.

NICHOLS, W. G. *et al.* Fatal Pulmonary Infection Associated with a Novel Organism, “*Parastreptomyces abscessus*”. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 5376–5379, 2005.

PICARD, F. J. *et al.* Use of *tuf* sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 Streptococcal species. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3686-3695, 2004.

OREN, A. Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. **The Royal Society**, v. 359, n. 1444, p. 623-638, 2004.

PESSANHA, B. *et al.* Infectious endocarditis due to *Corynebacterium xerosis*. **Cardiovascular Pathology**, v. 12, n. 2, p.:98-101, 2003.

PETTI, C; A, POLAGE, C. R; SCHRECKENBERGER, P. The Role of 16S rRNA Gene Sequencing in Identification of Microorganisms Misidentified by Conventional Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 6123–6125, 2005.

PINTO, T. J. A. Controle de Produtos Estéreis. In: Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2^a. Edição. 2002 a.

PINTO, T. J. A. Teste de Esterilidade. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2^a. Edição. 2002 b.

REINMULLER, B; LJUNGQVIST, B. Modern Cleanroom Clothing Systems: People as a Contamination Source. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 114-125, 2003.

RIBOSOMAL Database Project II. Disponível em: <<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>>. Acesso em: 31 jan. 2007.

RINGUET, H. *et al.* *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing Mycobacteria. **Journal Clinical. Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 852-857, 1999.

RIVAS, R. *et al.* Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukaryotes. **Journal Microbiology Methods**, v. 56, n. 3, p. 413-426, 2004.

ROCHA, C. L. Análise das Identificações realizadas no Setor de Identificação Bacteriana do DM/INCQS/FIOCRUZ no período de 1997 a 2004. **Monografia**. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, 2006.

SACCHI, C. T. *et al.* Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 10 p.:1117-1123, 2002 a.

SACCHI, C. T. *et al.* Sequence diversity of *Neisseria meningitidis* 16S rRNA genes and use of 16S rRNA gene sequencing as a molecular subtyping tool. **Journal. Clinical. Microbiology**, v. 40, n. 12, p. 4520-4527, 2002 b.

SCHUMANN, P. *et al.* *Friedmanniella antarctica* gen. nov., sp. nov., an LL-Diaminopimelic Acid-Containing Actinomycete from Antarctic Sandstone. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 278–283, 1997.

SCHUMANN, P. *et al.* Reclassification of *Brevibacterium oxydans* (Chatelain and Second 1966) as *Microbacterium oxydans* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 175–177, 1999.

STACKEBRANDT, E; SMIDA, J; COLLINS, M. D. Evidence of phylogenetic heterogeneity within the genus *Rhodococcus*: revival of the genus *Gordona* (Tsukamura). **The Journal of General Applied Microbiology**, v. 34, p. 341-348, 1988.

STACKEBRANDT, E. *et al.* Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology**, v.. 52, p. 1043-1047, 2002.

STALEY, J. T. The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 361, p. 1899-1909, 2006.

SUTTON, S. V. W; CUNDELL, A. M. Microbial Identification in the Pharmaceutical Industry. **Pharmacopeial Forum**, v. 30, n. 5, p. 1884-1894, 2004.

TANG, Y. W. *et al.* Identification of coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence analysis. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1676-8, 2000.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. Sterility Tests. In; 27.ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Conversion, Inc, p. 2559-2556, 2004.

THOMPSON, D. *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876–4882, 1997.

TORTORA, G; J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. Microbiologia. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.

ULRICH, S. *et al.* Central Venous Catheter Infection with *Brevibacterium* sp. In an immunocompetent Woman, Case Report and Review of the Literature. **Infection Journal**, v. 34, n. 2, p. 103-6, 2006.

VAN BOSTERHAUT, B. *et al.* Chronic osteomyelitis due to *Actinomyces neuii* subspecies *neuii* and *Dermabacter hominis*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 486-7, 2002.

VANEECHOUTTE, M. *et al.* Evaluation of applicability of amplified rDNA-restriction analysis to identification of species of the genus *Corynebacterium*. **Research. Microbiology**, v. 146, p. 633-641, 1995.

VAN BOSTERHAUT, B. *et al.* Chronic. Osteomyelitis due to *Actinomyces neuii* subspecies *neuii* and *Dermabacter hominis*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 486-7, 2002.

WANG, Q. *et al.* The RPD – II (Ribosomal Database Project): The RPD sequence classifier. Disponível em: <http://rdp.cme.msu.edu/download/posters/asm_2004.pdf> . Acesso em Jan. 2006.

WATTS, J. L. *et al.* Identification of *Corynebacterium bovis* and other Coryneforms isolated from bovine mammary glands. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 10, p. 2372-2379, 2000.

WATTIAU, P; JANSSENS, M; WAUTERS, G. *Corynebacterium simulans* sp. nov., a non-lipophilic, fermentative *Corynebacterium*. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1:347-53, 2000.

WHITE, W; NIVEN, L. Airborne bacteria sampling: the effects of the dehydration and sampling time. **Journal of Parenteral Science Technology**, v. 43, p. 208-213, 1989.

WHYTE, W. Cleanroom Technology Fundamentals of Design, Testing and Operation. Published by John Wiley & Sons Ltda, England, 2001.

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

WOO, P. C. Y. *et al.* Usefulness of the MicroSeq 500 16S Ribosomal DNA-Based Bacterial Identification System for Identification of Clinically Significant Bacterial Isolates with Ambiguous Biochemical Profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 1996-2001, 2003.

YAMADA, K; KOMAGATA, K. Taxonomic studies on coryneform bacteria. V. Classification of coryneform bacteria. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 18, p. 417-431, 1972.

YASSIN, A. F; KROPPESTED, T R. M; LUDWIG, W. *Corynebacterium glaucum* sp. nov. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 53, p.705-709, 2003.

YASSIN, A. F; SCHAAL, K. P. Reclassification of *Nocardia corynebacterioides* Serrano *et al.* 1972 (Approved Lists 1980) as *Rhodococcus corynebacterioides* comb. nov. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1345-1348, 2005.

YOO, S. J. *et al.* *Rhodococcus equi* pneumonia in a heart transplant recipient in Korea, with emphasis on microbial diagnosis. **Clinical Microbiology Infectious**, v. 9, n. 3, p. 230-3, 2003.

YOON, J. H. *et al.* *Nocardioides aquiterrae* sp. nov., isolated from groundwater in Korea. **Korea International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.71-75, 2004.

ZUCOL, F. *et al.* Real-Time Quantitative Broad-Range PCR Assay for Detection of the 16S rRNA Gene Followed by Sequencing for Species Identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2750-2759, 2006.