

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LAURA CARVALHO ALVES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE ACIDOBACTERIAS DO CERRADO EM
DIFERENTES POLISSACARÍDEOS**

PATOS DE MINAS - MG

2023

LAURA CARVALHO ALVES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE ACIDOBACTERIAS DO CERRADO EM
DIFERENTES POLISSACARÍDEOS**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia

Prof: Dra. Cristine Chaves Barreto

PATOS DE MINAS - MG

2023

LAURA CARVALHO ALVES DE OLIVEIRA

Avaliação do crescimento de acidobacterias do cerrado em diferentes polissacarídeos

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Banca Examinadora:

Dra. Cristine Chaves Barreto
Universidade Federal de Uberlândia
Presidente

Dra. Rosiane Andrade da Costa
Universidade Católica de Brasília
Membro

Dr. Gilvan Caetano Duarte
Universidade Federal de Uberlândia
Membro

“Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.”

Patos de Minas, 13 de janeiro de 2023

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

A uma das pessoas mais importantes da minha vida, mãe, você é o meu modelo de ser humano a ser seguido e espero continuar te orgulhando durante minha trajetória nesse mundo. Sua coragem e bondade me inspiram, você escolheu enfrentar todos os desafios para me criar e ainda sim sempre me deu o seu melhor. Você não é só minha mãe, mas também minha melhor amiga e maior apoiadora em todas minhas decisões, que acredita em mim mesmo quando eu não consigo.

As minhas irmãs, Maria Clara e Beatriz, que me inspiram a tentar ser minha melhor versão e que fazem parte do que eu mais amo.

A você Roberto, que não precisou de um título para ser meu pai, obrigada por tudo.

A minha prima Jullyane, vulgo, minha irmã de vida, que me segue em todas as situações, até mesmo nas minhas ideias mais malucas, e que sempre me encoraja a ir atrás do que eu quero.

A toda minha gigante e barulhenta família que ajudou a me criar e me deu todo amor que eu precisava, assim como transmitiu os valores que carrego comigo.

A amigos preciosos que foram entrando na minha vida em diferentes períodos da minha jornada e que quero que sempre façam parte dela. André, Thais, Vitória, Pedro, Ana e Samantha, vocês me ajudaram em todos os momentos difíceis e acompanharam o meu desenvolvimento pessoal até a pessoa que eu me permiti ser, além de terem tornado meus dias mais interessantes e divertidos.

Agradeço a minha orientadora Cristine, que me acolheu quando precisei, foi paciente comigo, me auxiliou e ensinou tanto.

A Rosália, em Brasília, que me acompanhou no laboratório durante meus experimentos, me auxiliando e ensinando e que se tornou uma grande amiga.

Aos docentes da UFU que me forneceram conhecimento e ensinamentos que levarei para fora da universidade.

A UCB que proporcionou o espaço para realização dos meus experimentos.

RESUMO

Organismos do filo Acidobacteria podem ser encontrados em uma parcela expressiva colonizando o solo do bioma Cerrado, que é caracterizado por sua acidez e ser potencialmente tóxico para algumas espécies. Na literatura tem se apontado o potencial das acidobacterias na degradação de diferentes polissacarídeos e possíveis atividades enzimáticas, com base em estudos metagenômicos e em bibliotecas genômicas disponíveis. No presente trabalho foi avaliada a degradação dos polissacarídeos xilana, quitina e celulose, por sete cepas de acidobacterias de solo de Cerrado: AB20, AB23, AB39, AB60, AB158, AB46 e AB 29. As cepas foram isoladas anteriormente e armazenadas em ultrafreezer desde 2013. Foi avaliado também o crescimento de *Acidobacterium capsulatum* obtida de uma coleção de cultura alemã (DSMZ). Todas as cepas cresceram durante o processo de recuperação demonstrando que elas suportaram o processo de armazenamento. Os resultados do cultivo em diferentes fontes de carbono foram avaliados após quatro semanas. O crescimento em quitina foi baixo e para AB39 ausente, enquanto o crescimento em xilana foi comparável aos controles positivos, exceto para *A. capsulatum*. O crescimento em celulose surpreendeu tendo em vista a dificuldade reportada na literatura, somente as cepas AB39 e AB158 não cresceram no meio. No presente trabalho, foi demonstrado que algumas das cepas tem potencial para produção de enzimas hidrolíticas que podem ser aplicadas biotecnologicamente.

Palavras-chave: Acidobacterias. Celulose. Polissacarídeos. Quitina. Xilana.

ABSTRACT

Organisms of the Acidobacteria phylum can be found commonly colonizing the soil of the Cerrado biome, which has the following characteristics: high acidity and potential toxicity to some species. The literature has pointed to the potential of acidobacteria in the degradation of different polysaccharides and possible enzymatic activities based on metagenomic studies and available genomic libraries. In the present work, the degradation of polysaccharides: xylan, chitin, and cellulose were evaluated by seven strains of acidobacteria from Cerrado soil: AB20, AB23, AB39, AB60, AB158, AB46 and AB 29. The strains were previously isolated and stored in an ultrafreezer since 2013. The growth of *Acidobacterium capsulatum* obtained from a german culture collection was also evaluated (DSMZ). All strains grew during the recovery process demonstrating that they support the storage process. The results of cultivation on different carbon sources were evaluated after four weeks. Growth on chitin was generally low and absent for AB39, whereas the growth on xylan was comparable to the positive controls, except for *A. capsulatum*. The growth on cellulose was surprising, considering previous reports of the difficulty to grow acidobacteria on this polysaccharide. Only strains AB39 and AB158 did not grow in the medium. The present work showed that some acidobacteria from the Cerrado may produce hydrolytic enzymes with biotechnological potential.

Keywords: Acidobacteria. Cellulose. Chitin. Polysaccharides. Xylan.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Referencial teórico	9
Acidobacterias e o Cerrado	9
Degradação de polímeros por acidobacterias	10
1.2 Hipótese	11
1.3 Relevância científica.....	11
2 OBJETIVOS	12
Objetivo geral.....	12
Objetivos específicos.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Bactérias utilizadas.....	12
3.2 Meios de cultura	13
3.3 Recuperação das bactérias	13
3.4 Obtenção de cultura pura	13
3.5 Avaliação do crescimento em diferentes fontes de carbono	14
3.6 Identificação molecular.....	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 Recuperação e obtenção de culturas puras.....	15
4.2 Crescimento em diferentes meios	17
4.3 Amplificação do gene do RNAr 16S a partir de colônias	20
5 CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS.....	23
ANEXOS	27
APÊNDICE A.....	29

1 INTRODUÇÃO

Bactérias de solo são bastante estudadas dado seu papel nos ciclos biogeoquímicos de ambientes terrestres e sua importância na agricultura. Apesar do extenso conhecimento sobre esses microrganismos, as bactérias do filo Acidobacteria só foram descobertas no final do séc. XX. Muitas acidobacterias ao serem submetidas ao cultivo sob condições laboratoriais não crescem bem, o que dificulta a construção de conhecimento acerca do filo, como interações realizadas, atividades enzimáticas apresentadas e papéis biológicos desempenhados, implicando na dificuldade de possíveis utilizações.

Assim, ainda pouco se conhece sobre suas funções nos ciclos biogeoquímicos que ocorrem no solo, em especial nos solos ácidos do Cerrado. Atualmente, acredita-se de que elas tenham uma participação importante no ciclo do carbono, pois muitas espécies apresentam enzimas que degradam polissacarídeos provenientes de vegetais e fungos, sendo essa uma característica comumente encontrada em micro-organismos decompositores.

Em 2009, as primeiras Acidobacterias de solo do Cerrado foram isoladas e um estudo inicial demonstrou que elas apresentavam crescimento em xilana como fonte de carbono (DE CASTRO *et al.*, 2013). O crescimento em celulose e quitina foi observado, mas apenas em meio sólido, gerando dúvidas sobre a utilização desse polissacarídeo, pois a bactéria poderia estar usando reservas de carbono ou removendo carbono do agente solidificante do meio de cultura (DE CASTRO *et al.*, 2013). Outras acidobacterias foram isoladas pelo mesmo grupo, mas seu crescimento nesses polissacarídeos não foi avaliado (NASCIMENTO, 2013).

Com o objetivo de compreender o papel das Acidobacterias em solos de Cerrado e avaliar se suas enzimas hidrolíticas podem ser usadas em processos biotecnológicos, sete cepas do Cerrado foram recuperadas do estoque em ultrafreezer onde se encontravam desde 2013. Como ainda não há estudos sistemáticos sobre a preservação de Acidobacterias, algumas cepas poderiam ter perdido parte da viabilidade celular e não havia garantia quanto a identidade das cepas, logo, a necessidade da obtenção de culturas puras durante a etapa de recuperação e sequenciamento do gene do RNAr 16S foram necessários.

1.1 Referencial teórico

Acidobacterias e o Cerrado

Acidobacteria é um filo do domínio *Bacteria* que foi reconhecido mais recentemente, em comparação a outros filios clássicos como Proteobacteria ou Actinobacteria (KIELAK *et al.*, 2016). O nome remete a uma característica comum entre os primeiros membros isolados desse filo que é o crescimento sob condições de baixo pH. Um ponto chave para entender melhor esses organismos foi o estudo filogenético do gene 16S RNAr que permitiu a divisão do filo em 26 subfamílias. Atualmente, as Acidobacterias podem ser separadas quanto às mais variadas características morfológicas e fisiológicas (DEDYSH & YILMAZ, 2018).

As acidobacterias estão distribuídas por diferentes ecossistemas ao longo do planeta e estão cercadas de mistérios em razão do difícil cultivo sob condições laboratoriais e falta de informações quanto a membros de algumas classes do filo que ainda não foram obtidas em cultivo (SIKORSKI *et al.* 2022, KIELAK *et al.*, 2016). Elas podem ser encontradas desde ambientes em associação com líquens em tundras e pântanos na Rússia (PANKRATOV, 2012), até no solo de biomas brasileiros como a Mata atlântica e o Cerrado (CATÃO *et al.* 2014).

O Cerrado compreende diferentes tipos de fitofisionomias, das quais podem ser citadas: Cerradão, Campo Sujo, Veredas, Cerrado *stricto sensu* e outras. É caracterizado por apresentar o solo com pH mais ácido, rico em cálcio, magnésio e alumínio, o que o torna tóxico para plantas cuja adaptação não forneça ferramentas para a sobrevivência sob tais condições (HARIDASAN, 2008). Alguns estudos já demonstraram que Acidobacterias são abundantes em solos desse bioma, mas estes, em geral, envolvem análise do metagenoma (ARAUJO *et al.*, 2012, CATÃO *et al.* 2014).

O Cerrado é conhecido por sua rica biodiversidade e amplo potencial a ser explorado, principalmente em áreas como a biotecnologia, que se utiliza das mais variadas informações obtidas, sejam relacionadas a plantas, animais ou microrganismos encontrados no bioma. Novos produtos bioprospectados podem ter aplicação biotecnológica a exemplo da síntese de biofármacos (PROCÓPIO, 2021) ou novas enzimas, como uma lipase que foi encontrada em uma biblioteca metagenômica de Acidobacterias isoladas na Mata atlântica (FAORO *et al.*, 2012).

Degradação de polímeros por acidobacterias

A disponibilização de informações acerca dos primeiros sequenciamentos de genomas de microrganismos do filo em 2009 forneceu algumas hipóteses sobre atividades biológicas desempenhadas e outras características. Porém ainda há lacunas a serem preenchidas, o que exige um amplo estudo para tentar relacionar as informações obtidas pelo sequenciamento com resultados encontrados em estudos clássicos de cultivo bacteriano (KIELAK *et al.* 2016).

A abundância das acidobacterias em solos está atrelada a diferentes fatores, entre eles pode se estabelecer relação com a capacidade de usar diferentes fontes de carbono, o que auxilia na competição com outros microrganismos (WARD *et al.*, 2009). Isso é possível devido a presença de transferases e glicosil hidrolases que permitem a utilização de uma variedade de recursos no ambiente (PINTO *et al.*, 2021). Essas bactérias possuem um genoma flexível com amplo conjunto de genes que modulam enzimas responsáveis pela metabolização de carbono de polímeros diversos, o que pode conferir uma ferramenta de resistência à seca (KALAM *et al.*, 2020) e um provável papel na ciclagem de matéria orgânica provinda de plantas, animais e fungos (DEDYSH & DAMSTÉ, 2018). Além do uso de celulose, o uso de xilana, que é uma hemicelulose, como fonte de carbono corrobora para o argumento de trabalhos que sugerem a competência desses microrganismos na degradação de parede celular de plantas (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Dessa forma, pesquisas envolvendo a degradação de polímeros, como quitina, xilana e celulose por acidobacterias tem permitido um o desenvolvimento de produtos biotecnológicos por meio de descobertas feitas pelo sequenciamento de genomas, construção de bibliotecas metagenômicas e cultivos laboratoriais (CATÃO *et al.*, 2014). Alguns exemplos de produtos e processos pertencentes ao nosso cotidiano que podem ser beneficiados pelo emprego do conhecimento obtido pelo estudo das acidobacterias: uso de xilanases em diferentes ramos industriais, desde tratar o bagaço da cana e assim reduzir o desperdício na produção de biocombustíveis (CHAKDAR *et al.*, 2016), clarificação de sucos na área alimentícia, até o branqueamento na indústria têxtil (BHARDWAJ, KUMAR & VERMA, 2019), exploração da atividade antifúngica por quitinases para tratar doenças, seja na produção de fármacos, como cremes tópicos e medicamentos de uso oral (DAHIYA, TEWARI & HOONDAL, 2006), celulases nas indústrias de papel (CHAKDAR *et al.*, 2016) e síntese de enzimas para escala industrial.

1.2 Hipótese

Todas as cepas de Acidobacterias isoladas do Cerrado são capazes de degradar os polissacarídeos: celulose, xilana e quitina, pois é uma característica de bactérias de solo decompositoras.

1.3 Relevância científica

A corrente transformação do Cerrado em solo agrícola ocasiona alterações na microbiota do Cerrado, e conseqüentemente a abundância de Acidobacteria é reduzida. Dessa forma, o presente projeto atende aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), definidos pela Agenda 2030 das Nações Unidas, especificamente ao objetivo 15 que trata da biodiversidade de ambientes terrestres.

"ODS 15. Vida terrestre - Proteger, recuperar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres, gerir de forma sustentável as florestas, combater a desertificação, deter e reverter a degradação da Terra e deter a perda da biodiversidade." (Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/15>).

Como já ressaltado ainda não se tem total conhecimento sobre as potencialidades das atividades desempenhadas por Acidobacterias. Apesar disto medidas de proteção ao Cerrado no sentido de conservação do filo são necessárias, visto que o desaparecimento de espécies deste pode implicar em desequilíbrios ecológicos. Tentar desvendar as lacunas de informações sobre esses microrganismos pode os tornar interessantes a setores da conservação e por consequência outras espécies que interagem com eles também podem se beneficiar das medidas de preservação aplicadas, o que é vantajoso para conservação da biodiversidade (ARORA, 2018).

Outro ponto é que o conhecimento gerado pelo trabalho pode futuramente contribuir para bioprospecção de produtos biotecnológicos que somados ao oferecimento de benefícios econômicos à sociedade possam estimular a construção de uma exploração com práticas sustentáveis (BEATTIE *et al.*, 2011). O que já é uma necessidade que têm se mostrado cada vez mais importante levando em consideração toda degradação causada pela exploração desenfreada de ecossistemas e que algumas indústrias e consumidores tem adotado e exigido.

Um exemplo que pode ser citado de como estudos envolvendo a degradação de polissacarídeos podem fornecer novas ferramentas na luta contra a degradação dos ambientes terrestres é a utilização de enzimas encontradas que são responsáveis pela degradação dos

polissacarídeos para reaproveitar ou tratar resíduos gerados em processos industriais (CHAKDAR et al., 2016). Estes quando descartados de forma irregular podem causar grandes desastres ecológicos, o que culmina na perda da biodiversidade do ecossistema.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o crescimento de bactérias do Cerrado, pertencentes ao filo Acidobacteria na presença de diferentes polissacarídeos.

Objetivos específicos

- a) Recuperar cepas armazenadas em glicerol a -80 °C desde 2013;
- b) Obter culturas puras;
- c) Confirmar a identidade correta das cepas por meio da realização de PCR e sequenciamento do gene 16S;
- d) Comparar a degradação de diferentes polissacarídeos entre as cepas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Bactérias utilizadas

No presente trabalho foram utilizadas cepas do filo Acidobacteria, isoladas de solo do Cerrado e armazenadas previamente em glicerol a -80°C. As cepas escolhidas para o estudo foram: *A. capsulatum* (DSM 11244), AB20, AB23, AB39, AB60, AB158 (DE CASTRO *et al.*, 2013), AB29 e AB46 (NASCIMENTO, 2013). Optou-se pelas cepas AB60 e AB23 como controles de crescimento, tendo em vista que outros experimentos foram realizados a partir destas cepas, o que possibilita a obtenção de mais dados na literatura para comparações (RODRIGUES *et al.*, 2020, PINTO *et al.*, 2021)

3.2 Meios de cultura

O meio de cultura utilizado foi o VL-55 sólido (SAIT; HUGENHOLTZ; JANSSEN, 2002). Para 1 L foram pesados: 3,9 g de ácido 2-[N-morfolino] etanossulfônico (MES), 15 g de agar nobre e 0,5 g da fonte de carbono escolhida. A seguir foram adicionadas as seguintes soluções: 0,4 mM de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) Sigma-Aldrich, 0,4 mM de fosfato dibásico Sigma-Aldrich ($(NH_4)_2HPO_4$), 0,6 mM de $CaCl_2$, 2 mL de solução de tungstato/selenito (Anexo A), 2 mL de elementos traço (Anexo A) e 2 mL de vitaminas de Wolfe's (Anexo A), como descrito em SAIT *et al.*, 2002. O pH foi ajustado a 5,5 pelo acréscimo de NaOH.

As fontes de carbono utilizadas foram: xilana, celulose de baixa viscosidade (Carboximetilcelulose de sódio - CMC). Todos os reagentes foram obtidos de Sigma-Aldrich e quitina coloidal (NASCIMENTO, 2013). Para os controles positivos foram preparados meios contendo 0,05% de glicose ou lactose como fonte carbono, enquanto o controle negativo foi preparado sem adição de uma fonte de carbono.

3.3 Recuperação das bactérias

As bactérias foram recuperadas do estoque em glicerol de 2013, armazenados a $-80^\circ C$ de acordo com as diretrizes descritas pela ATCC (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2022). Os criotubos contendo as bactérias em glicerol foram retirados do armazenamento em ultrafreezer e colocados em gelo dentro do fluxo, este devidamente limpo com lisofórmio e submetido a U.V. por 30 minutos antes da utilização. Os criotubos foram abertos e um volume de 0,4 mL de bactérias pipetado para tubos contendo 5 mL de meio líquido VL-55 com 0,05% de xilana como fonte de carbono.

3.4 Obtenção de cultura pura

Após 3 semanas de crescimento foi realizado o repique das cepas para o aumento de biomassa e manutenção dessas. Para verificar se as colônias se encontravam puras utilizou-se a técnica de semeadura por esgotamento, onde em uma placa com o auxílio de uma alça de platina, estrias foram feitas e a placa dividida em quadrantes. Para os repiques, foram utilizadas amostras que estavam em tubos e também de placas de meio VL-55 tendo xilana como fonte de carbono.

3.5 Avaliação do crescimento em diferentes fontes de carbono

Uma cultura em meio líquido VL-55 com xilana como fonte de carbono foi preparada a partir de placas contendo cultura pura de cada cepa. Essa cultura foi centrifugada a 5.000 G por 5 min. e o sobrenadante contendo o meio de cultura foi removido. Ao *pellet* contendo as células foram adicionados 0,5 mL de solução de lavagem que continha apenas os sais do meio VL-55 (ou seja, sem fonte de carbono, vitaminas ou elementos-traço). As células foram ressuspensas com auxílio do vórtex e a lavagem foi repetida. Por fim, as células foram ressuspensas em 1 mL de solução de lavagem e essa suspensão foi utilizada para inocular o meio sólido VL-55 contendo as diferentes fontes de carbono.

A inoculação foi realizada por meio da adição de 4 gotas de 10 µL em cada quadrante da placa de Petri. Para cada fonte de carbono foram inoculadas 3 placas. Estas foram cultivadas em uma sala de cultura a 20 °C. O crescimento foi acompanhado por 4 semanas e após esse período foi realizada a avaliação qualitativa, comparando-se o crescimento com os controles em glicose ou lactose.

3.6 Identificação molecular

Uma placa de cada cepa foi selecionada para a realização da técnica de PCR a partir da colônia, conhecida como "Colony-PCR" (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Esta consiste na transferência de uma colônia com o auxílio de um palito estéril para um tubo com 20 µL de água ultrapura estéril, 1 µL da suspensão foi usado como DNA molde da reação de PCR.

Para as reações foram utilizados: 0,2 µM de cada primer, 0,25 mM de dNTPs, 1U de Taq polimerase, tampão PCR buffer 1X, com concentração final de MgCl₂ a 1,5 mM. O volume final da reação foi de 20 µL. Os *primers* utilizados foram 27F e 1492R, que são iniciadores universais para amplificação do gene do RNAr 16S (LANE *et al.*, 1985). A amplificação se deu sob as seguintes condições: desnaturação por 3 min. a 95 °C, depois 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 seg. a 52 °C e 1:40 min. a 72 °C de anelamento e por fim extensão por 7 min. a 72 °C.

A purificação foi feita utilizando o kit "Realiprep clean up" (PROMEGA), para este processo utilizou-se 80 µL do produto de PCR (4 tubos de reação de PCR contendo 20 µL cada) de cada cepa. O uso do kit para cada cepa se deu da seguinte forma: foram adicionados à solução

contendo os produtos de PCR 40 μL de *membrane binding solution* e 120 μL de isopropanol. Depois de ser misturada, o volume total foi adicionado ao *Realiprep minicolumn* que foi centrifugado por 30 seg. a 13.000 G, em microcentrifuga. O líquido que passou pela coluna foi removido do tubo e 200 μL de *Column washing solution* foram adicionados à coluna que foi centrifugada por 15 seg. O líquido que passou pela coluna foi removido e foram adicionados 300 μL de *Buffer B*. Após centrifugação por 15 seg., o líquido foi removido, e esse procedimento foi repetido. O líquido removido do tubo de coleta e a coluna foi centrifugada por 1 min. para remoção de restos de solução e secar a coluna. Por fim, a coluna foi transferida para um novo tubo e o DNA foi eluído utilizando-se 15 μL de H_2O ultrapura autoclavada e centrifugação por 30 seg.

Os produtos de PCR purificados foram analisados em gel de agarose 1% corrido por 20 min. a 100 volts e quantificado por fluorometria no equipamento Qubit Invitrogen (Thermo-Fisher).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Recuperação e obtenção de culturas puras

O processo de recuperação das cepas que estavam armazenadas por um longo período, à $-80\text{ }^\circ\text{C}$, no ultrafreezer (de CASTRO, 2013) se deu sem grandes intercorrências. Todas obtiveram um bom crescimento inicial com exceção da cepa *A. capsulatum*, que levou um tempo maior para crescer. Essa informação tem relevância no sentido em que havia um receio quanto à viabilidade celular das bactérias, devido ao tempo de 9 anos armazenadas pelo método de criopreservação utilizando glicerol.

Este é um álcool polihídrico de grande permeabilidade que pode atuar como agente crioprotetor, ou seja, permite um congelamento seguro, entretanto alguns crioprotetores podem ser tóxicos para células em decorrência da concentração e tempo de exposição (AGUIAR *et al.*, 2012). Seu mecanismo de ação consiste na quebra de ligações de hidrogênio entre moléculas de água (KOH, 2013), evitando assim a formação de cristais de gelo nas amostras em preservação e como consequências: a ruptura da membrana plasmática da célula e apoptose, morte celular (HASAN, FAYTER & GIBSON, 2018).

Uma alternativa de preservação que pode ser explorada por outros trabalhos na área é a liofilização. A técnica consiste em aplicar o princípio do fenômeno físico de sublimação, em que a água vai do estado sólido para gasoso, sem passar pelo líquido. Para realização do método é necessária um pré congelamento da amostra que deve ser feito com cuidado, e depois duas etapas de secagem são feitas, o resultado é um produto sensível a umidade que pode ser reidratado (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2022).

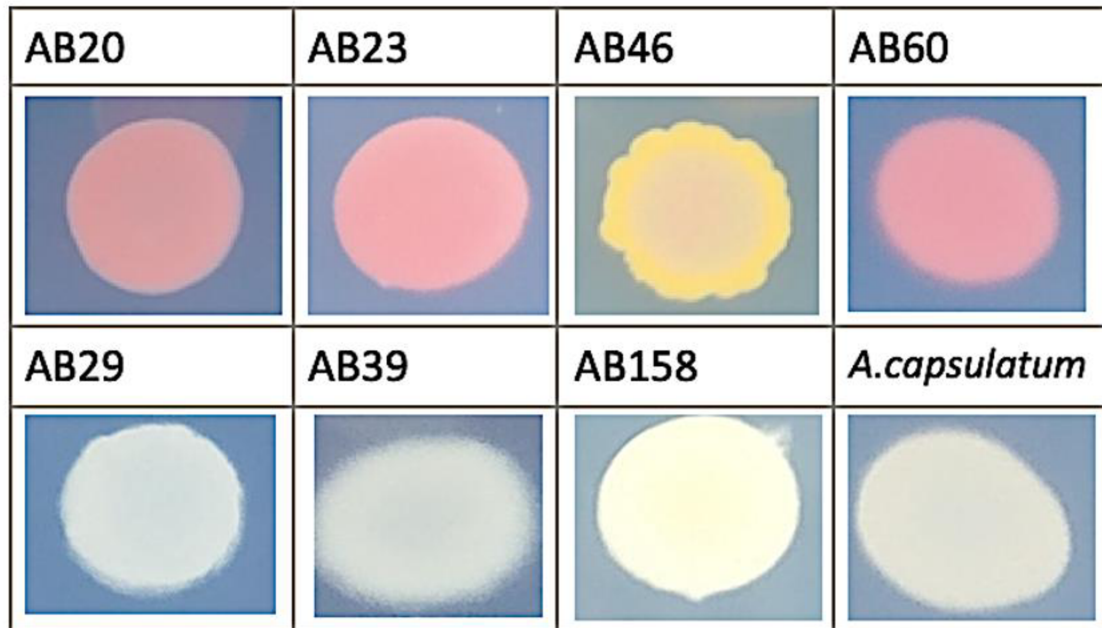
Ao longo do processo de cultivo, algumas placas apresentaram contaminações por fungos, porém o número foi baixo e não prejudicou o trabalho. Já levando em consideração o risco deste tipo de contaminação, todos cultivos nos meios preparados para o experimento foram realizados em triplicatas. Após duas semanas do cultivo, na maior parte das placas já era perceptível de forma clara o crescimento de colônias de bactérias e em um período de quatro semanas todas haviam crescido o suficiente para comparações entre as fontes de carbono utilizadas e observações quanto às diferenças ou similaridades apresentadas por cada cepa.

Após o crescimento foi possível notar diferentes aspectos morfológicos apresentados pelas cepas, como a identificação das produtoras de carotenoides devido ao estresse causado pela exposição luminosa. Estas possuíam colônias com variações da cor laranja, como foi o caso da AB20, AB23, AB46 e AB60 (Figura 1). A produção de carotenoides pela AB23 já foi reportada na literatura em trabalhos anteriores. Em um estudo foi demonstrado que a exposição à luz prejudica o crescimento da cepa, pois há produção de espécies reativas de oxigênio, logo, os carotenoides agem na proteção contra o estresse oxidativo e proporcionam assim uma vantagem competitiva em relação a outras bactérias (PINTO *et al.*, 2021).

Outra maneira encontrada na literatura de induzir a produção de carotenoides pela AB23 foi através da exposição de placas, com um mês de cultivo, à contaminação por fungos ao serem abertas no ambiente. Após um período de 15 dias, foi notado a produção de pigmentos (PINTO, 2017). Sendo que as mais próximas aos fungos apresentaram coloração mais intensa. O autor ressaltou que o mecanismo que permite que ocorra essa indução ainda é desconhecido (PINTO, 2017).

Embora a *A. capsulatum* não tenha apresentado um perfil que indique a produção de carotenoides (Figura 1), a descrição de quando foi isolada pela primeira vez indica a pigmentação alaranjada (KISHIMOTO, KOSAKO & TANO, 1991). A cepa AB29 chamou atenção pela produção de uma espécie de mucilagem que não pode ser constatada em outras cepas.

Figura 1. Colônias representativas de cada cepa, cultivadas em VL-55 contendo glicose como fonte de carbono.



Fonte: própria autora

O objetivo de obter-se culturas puras não foi alcançado para todas as cepas como é caso da AB158, em que se observou colônias não homogêneas no cultivo em lactose, sendo necessário experimentos adicionais utilizando a técnica de esgotamento. Somado a isso, um questionamento sobre a identidade da cepa *A. capsulatum* foi relatado, tendo em vista que nos resultados obtidos neste trabalho ocorreu um crescimento maior que em trabalhos anteriores realizados utilizando o mesmo tempo de cultivo (BARRETO, CC, comunicação pessoal). Outros aspectos relacionados a cepa também foram diferentes, como a coloração que foi esbranquiçada e não alaranjada (BARRETO, CC, comunicação pessoal). As cepas citadas podem ter sofrido contaminação cruzada em alguma etapa de armazenamento ou até mesmo durante os processos de recuperação e passagem para os meios preparados.

4.2 Crescimento em diferentes meios

Em uma análise qualitativa das colônias observou-se que todas as cepas cresceram bem quando glicose ou lactose foi usada como fonte de carbono, o que já era esperado considerando resultados anteriores (DE CASTRO *et al.*, 2013), sendo estes considerados como controle positivo. O crescimento não foi observado em meio sem fonte de carbono, no entanto a ausência

completa de crescimento só pode ser evidenciada após a segunda transferência das colônias (Tabela 1). Isso ocorreu provavelmente porque na primeira transferência as células ainda continham alguma reserva de carbono e apresentaram um baixo crescimento.

O crescimento em xilana foi comparável ao observado nos controles positivos, sendo que esse resultado já havia sido reportado anteriormente para as cepas AB20, AB23, AB 39 e AB60 por de Castro *et al.* (2013). Entretanto nesse estudo não ocorreu crescimento para a cepa AB158, fato este também observado em outras fontes de carbono utilizadas pelo autor (DE CASTRO, 2012), quitina e celulose. Os resultados para as cepas AB39 e AB46 são reportados pela primeira vez no presente trabalho (Tabela 1 e Apêndices).

Apenas a cepa AB39 não apresentou crescimento em meio contendo quitina ou celulose. O crescimento observado nas demais cepas são resultados da primeira transferência, mas é possível observar um melhor crescimento das bactérias em celulose em relação à quitina para as cepas AB20, AB23 e AB29 (Tabela 1).

O crescimento no meio utilizando celulose foi interessante e deve ser explorado em trabalhos futuros envolvendo acidobactérias, pois apesar de muitas delas possuírem no genoma genes relacionados a degradação deste polissacarídeo, o cultivo em laboratório não tem correspondido com o esperado (KIELAK *et al.* 2016). Somente poucas espécies mostraram resultados positivos, entre elas a cepa AB23 que em um trabalho anterior apresentou um crescimento lento utilizando essa fonte de carbono, sendo possível a visualização de colônias em um período de 2 meses (PINTO *et al.* 2021).

Essa falta de correspondência entre possuir genes, mas não apresentar a atividade relacionada pode ser atribuída a fatores diversos, desde algum fator que na natureza atue como estímulo para ativar o gene, até que ele seja apenas uma herança da evolução, ou seja, em algum momento do passado ele foi funcional.

Tabela 1. Crescimento de diferentes cepas de Acidobacteria em meio sólido VL-55 diferentes fontes de carbono, cultivo em sala de cultura a 20 °C por 4 semanas.

Cepa	Fonte de carbono					Sem fonte carbono
	Glicose	Quitina	Xilana	Celulose	Lactose	
AB20	+++	+	+++	++	+++	-
AB23	+++	+	+++	++	+++	-
AB29	+++	+	+++	++	+++	-
AB39	+++	-	+++	-	+++	-
AB46	+++	+	+++	+	+++	-
AB60	+++	+	+++	+	+++	-
AB158	+++	+	+++	-	+++	-
<i>A. capsulatum</i>	+++	+	++	+	++	-

Crescimento bom +++. Crescimento médio ++. Pouco crescimento +. Ausência de crescimento -

A diferença de crescimento entre a *A. capsulatum* e as outras cepas talvez tenha relação com o fato de que a cepa foi adquirida de outro país (DSMZ, coleção de cultura alemã), enquanto o restante foi isolado em uma região de Cerrado (DE CASTRO, 2012). *A. capsulatum* foi pela primeira vez descrita por Kishimoto, Kosako & Tano (1991), que a isolaram em uma drenagem ácida de mina, no Japão, e relataram o crescimento da mesma em pHs ácidos e a cor laranja pálida das colônias que cresceram em um período de 7 dias. Na época que o trabalho foi publicado, o filo Acidobacteria não existia (KISHIMOTO, KOSAKO & TANO, 1991). Em trabalhos anteriores, a cepa apresentou crescimento, sempre mais lento quando comparado com uma espécie do Cerrado, o que requer uma análise futura quanto a forma de preservação da cepa que pode não estar sendo adequada (BARRETO, CC, comunicação pessoal).

Todas as cepas utilizadas no trabalho pertencem à subdivisão 1 do filo, que até o momento possui um maior número de espécies identificadas (de CASTRO, 2012, NASCIMENTO, 2013 KIELAK *et al.* 2016). Em um estudo realizado com amostras colhidas no bioma tundra, que é ricamente colonizado por acidobacterias não cultivadas da subdivisão 1, foi constatado que estas continham um grande repertório de enzimas envolvidas na

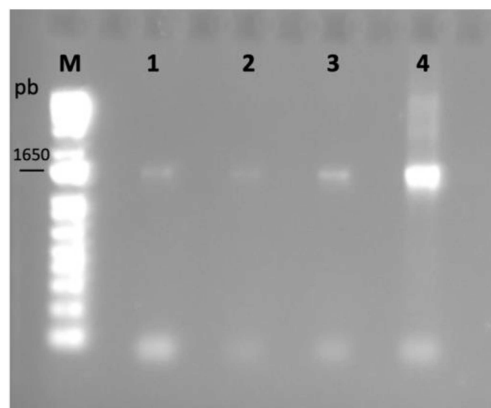
degradação de quitina, celulose e xilana (BELOVA *et al.* 2018). O cultivo das amostras em laboratório revelou um bom crescimento em quitina, principalmente com a adição de uma fonte de nitrogênio, porém o crescimento em celulose foi considerado fraco (BELOVA *et al.* 2018).

O crescimento em quitina da maior parte das cepas do presente trabalho foi baixo. Esse resultado não era esperado uma vez que outras acidobactérias foram reportadas como utilizadoras de quitina. Além disso, as bactérias AB29 e AB46 foram obtidas em meio VL-55 contendo quitina coloidal como fonte de carbono (NASCIMENTO, 2013), e as cepas AB20, AB23 e AB39 apresentaram anteriormente bom crescimento sob as mesmas condições e tempo de cultivo do presente trabalho (de CASTRO, 201). Provavelmente, o resultado se deve a qualidade da quitina coloidal utilizada, pois a mesma foi preparada em 2013 e estava armazenada na geladeira.

4.3 Amplificação do gene do RNAr 16S a partir de colônias

Durante a realização da etapa de PCR alguns problemas atrasaram o trabalho, levando a repetições do processo e impossibilitaram o término da amplificação do material genético de todas as cepas para realização do sequenciamento. Foi amplificado o material genético das cepas: AB20, AB23, AB29 e AB158 (Figura 2). Esses produtos de PCR foram purificados e enviados ao sequenciamento na Universidade Católica de Brasília, mas ainda os resultados ainda não foram entregues.

Figura 2. Análise dos fragmentos de DNA amplificados e purificados. M: 1 kb ladder, 1:AB20, 2: AB23, 3: AB29, 4: AB158.



Fonte: própria autora

Por outro lado, não foi possível obter amplificação das cepas: AB39, AB46, AB60 e *A. capsulatum*. As reações aplicadas no trabalho de PCR de colônias utilizam primers universais e fazem parte da rotina de laboratórios, portanto eram esperados resultados satisfatórios. Alguns erros de procedimento e imprevistos provavelmente causaram a falha na amplificação. A primeira tentativa de amplificação foi realizada com todas as cepas, devido a um erro no cálculo de concentrações dos reagentes na preparação da *master mix*, apenas a cepa AB158 amplificou.

A segunda tentativa contou com as cepas: AB20, AB23, AB29 e AB39. Neste experimento ocorreram como interferência picos de energia no laboratório enquanto o processo acontecia, porém, a única cepa que não amplificou foi a AB39. As demais cepas amplificaram com diferenças consideráveis na concentração de DNA que foram observadas na análise em gel de agarose e posteriormente confirmadas pela quantificação utilizando Qubit (Tabela 2).

As terceira e quarta tentativas contaram com uma diluição recém preparada de primers, mas essas reações não apresentaram amplificação dos DNA controles usados na reação e dímeros de primers foram observados na parte inferior do gel.

Tabela 2. Quantificação do DNA amplificado e purificado das cepas: AB20, AB23, AB29 e AB39 por meio do Qubit Invitrogen (Thermo-Fisher).

Cepa	(ug / mL)
AB20	7,64
AB23	2,13
AB29	4,79
AB158	17,4

Um erro que pode ser associado a uma reação de PCR de colônia é o excesso de DNA *template*, causado pela remoção excessiva de células da placa de Petri. O excesso de DNA inibe a reação de PCR pelo sequestro dos íons de cloreto de magnésio (WOODMAN *et al.*, 2016). No entanto, as últimas reações não apresentaram amplificação para os controles, como explicado anteriormente. Dessa forma, ainda não foi possível confirmar que as bactérias obtidas são as mesmas publicadas por de Castro *et al.* (2013) pela comparação das sequências do gene do RNAr 16S, sendo essa a principal dificuldade encontrada no desenvolvimento dessa pesquisa.

5 CONCLUSÃO

Embora nem todos os objetivos do trabalho tenham sido alcançados, os resultados foram importantes e levantaram pontos para explorações futuras na área. O crescimento na fonte de celulose foi algo muito positivo, pois na literatura é relatado de forma extensiva a dificuldade do cultivo utilizando esta fonte de carbono. Pode se dizer que o crescimento de todas as cepas nos meios foi outro ponto significado do trabalho tendo em vista a questão do tempo de armazenamento.

Estudos como esse à primeira vista parecem simples, porém fornecem um novo olhar a outros já realizados, além de fomentar um caminho para estudos futuros. Há uma importância em estabelecer uma conexão com informações encontradas por estudos genômicos com aquelas obtidas pelo cultivo laboratorial, ao mesmo tempo que respostas podem ser encontradas, novos questionamentos feitos, o que servirá para o estímulo de mais estudos e assim talvez produtos biotecnológicos de relevância a sociedade ou ao meio ambiente possam ser desenvolvidos.

Portanto, as acidobacterias conseguiram degradar os polissacarídeos testados, assim confirmando dados propostos por outros trabalhos, porém vale ressaltar que ainda é necessário e fundamental confirmar através do resultado do sequenciamento que todas as cepas foram recuperadas. Também é pertinente a realização de mais tentativas de repiques para que as cepas que não estão puras possam ser isoladas, além da manutenção das que foram recuperadas para que estas possam servir de material de estudo para outros trabalhos na área.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, T. D. F. *et al.* Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 80-93, 2012.

ARORA, N.K. Biodiversity conservation for sustainable future. **Environmental Sustainability**, [s. l.], v. 1, p. 109–111, 2018.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION - ATCC. **Bacterial Culture Guide**. [S. l.]: American Type Culture Collection, 2022.

ARAÚJO, J. F. *et al.* Characterization of soil Bacterial assemblies in Brazilian savanna-like vegetation reveals Acidobacteria dominance. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 760–770, 2012.

BEATTIE, A. J. *et al.* Ecology and bioprospecting. **Austral Ecol**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 341-356, 2011.

BELOVA, S. E. *et al.* Hydrolytic capabilities as a key to environmental success: Chitinolytic and cellulolytic acidobacteria from acidic sub-arctic soils and boreal peatlands. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. NOV, p. 2775, 2018.

BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; VERMA, P. **A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective**. [S. l.]: Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2019.

CATÃO, E. C. P. P. *et al.* Soil Acidobacterial 16S rRNA gene sequences reveal subgroup level differences between Savanna-Like Cerrado and Atlantic Forest Brazilian Biomes. **International Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 2014, p. 1–12, 2014. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2014/156341/>.

CHAKDAR, H. *et al.* **Bacterial xylanases: biology to biotechnology**. [S. l.]: Springer Verlag, 2016.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. S. **Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: A review**. [S. l.: s. n.], 2006.

DE CASTRO, V. H. L. *et al.* Acidobacteria from oligotrophic soil from the Cerrado can grow in a wide range of carbon source concentrations. **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 59, n. 11, p. 746–753, 2013. Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjm-2013-0331>.

DE CASTRO, V. H. L. **Identificação, isolamento e caracterização de bactérias de solo de cerrado pertencentes ao filo acidobactéria**. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas, Genética Molecular e de Populações, Biotecnologia Molecular) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 78 f., 2012.

DEDYSH, S. N.; SINNINGHE DAMSTÉ, J. S. Acidobacteria. *Em*: ELS. [S. l.]: Wiley, 2018. p. 1–10.

FAORO, H. *et al.* Characterization of a new Acidobacteria-derived moderately thermostable lipase from a Brazilian Atlantic Forest soil metagenome. **FEMS Microbiology Ecology**, [s. l.], v. 81, n. 2, p. 386–394, 2012.

HARIDASAN, M. **Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils****Braz. J. Plant Physiol.** [S. l.: s. n.], 2008.

HASAN, M.; FAYTER, A. E. R. & GIBSON, M. I. Ice Recrystallization Inhibiting Polymers Enable Glycerol-Free Cryopreservation of Microorganisms. **Biomacromolecules**, v. 19, p. 3371–3376, 2018.

KALAM, S. *et al.* Recent Understanding of Soil Acidobacteria And Their Ecological Significance: A Critical Review. **Front. Microbiol**, [s. l.], v. 11, n. 580024, 2020.

KIELAK, A. M. *et al.* The Ecology of Acidobacteria: Moving beyond Genes and Genomes. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. MAY, p. 744, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00744>.

KISHIMOTO, N.; KOSAKO, Y.; TANO, T. Acidobacterium capsulatum gen. nov., sp. Nov.: An acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment. **Current Microbiology**, [s. l.], v.22, n.1, p.1–7, 1991.

KISHIMOTO, N.; TANO, T. Acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic mine drainage, sewage, and soils. *The Journal of General and Applied Microbiology*, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 11–25, 1987.

KOH, C. M. Storage of bacteria and yeast. **Methods Enzymol**, [s. l.], v. 533, p. 15-21, 2013.

LANE, D. J. *et al.* Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 82, n. 20, p. 6955–6959, 1985.

NAÇÕES UNIDAS. Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil. **Nações Unidas Brasil**. Disponível em: < <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/15>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2023.

NASCIMENTO, P. F. **Obtenção de bactérias do filo Acidobacteria em meio de cultura contendo quitina como fonte de carbono** Relatório Final de Iniciação Científica, CNPq. [S. l.]: Universidade Católica de Brasília, 2013.

PANKRATOV, T. A. Acidobacteria in microbial communities of the bog and tundra lichens. **Microbiology**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 51–58, 2012.

PINTO, O. H. B. *et al.* Soil Acidobacteria strain AB23 resistance to oxidative stress through production of carotenoids. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 169–179, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s00248-020-01548-z>.

PINTO, O. H. B. **Caracterização taxonômica de *Occallatibacter savannae* AB23 e avaliação enzimática e pigmentos de acidobacteria: um enfoque biotecnológico**. Dissertação (Programa Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 94 f., 2017.

PROCÓPIO, L.; BARRETO, C. The soil microbiomes of the Brazilian Cerrado. **Journal of Soils and Sediments**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 2327–2342, 2021.

RODRIGUES, G. R. *et al.* Unraveling the xylanolytic potential of Acidobacteria bacterium AB60 from Cerrado soils. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 367, n. 18, p. fnaa149, 2020.

SAIT, M.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P. H. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 4, n. 11, p. 654–666, 2002. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1462-2920.2002.00352.x>.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. *E-book*. Disponível em:

https://trove.nla.gov.au/work/13615226?q&sort=holdings+desc&_id=1525209135860&versionId=45739910.

SOUZA, R.C. *et al.* Shifts in taxonomic and functional microbial diversity with agriculture: How fragile is the Brazilian Cerrado?. **BMC Microbiol**, v. 16, n.1, p.42, 2016.

SIKORSKI, J. *et al.* The Evolution of Ecological Diversity in Acidobacteria. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 13, 2022.

WARD, N. L. *et al.* Three genomes from the Phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 75, n. 7, p. 2046–2056, 2009.

WOODMAN, M. E. *et al.* Direct PCR of intact bacteria (colony PCR). **Current Protocols in Microbiology**, [s. l.], v. 2016, p. A.3D.1-A.3D.7, 2016.

ANEXOS

Anexo A: Soluções de Tungstato / Selenito, elementos traço e vitaminas (SAIT; HUGENHOLTZ; JANSSEN, 2002).

Solução de Tungstato / Selenito (1000 mL)

NaOH	0.500 g
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0.003 g
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0.004 g
Água destilada	1000.000 ml

Solução de elemento Traço SL-10 (1000 mL)

HCl (25%; 7.7 M)	10,00 ml
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1,50 g
ZnCl ₂	70,00 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	100,00 mg
H ₃ BO ₃	6,00 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190,00 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2,00 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24,00 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36,00 mg
Água destilada	990,00 ml

Dissolver FeCl₂ em HCl, então diluir em água, adicionar e dissolver os outros sais

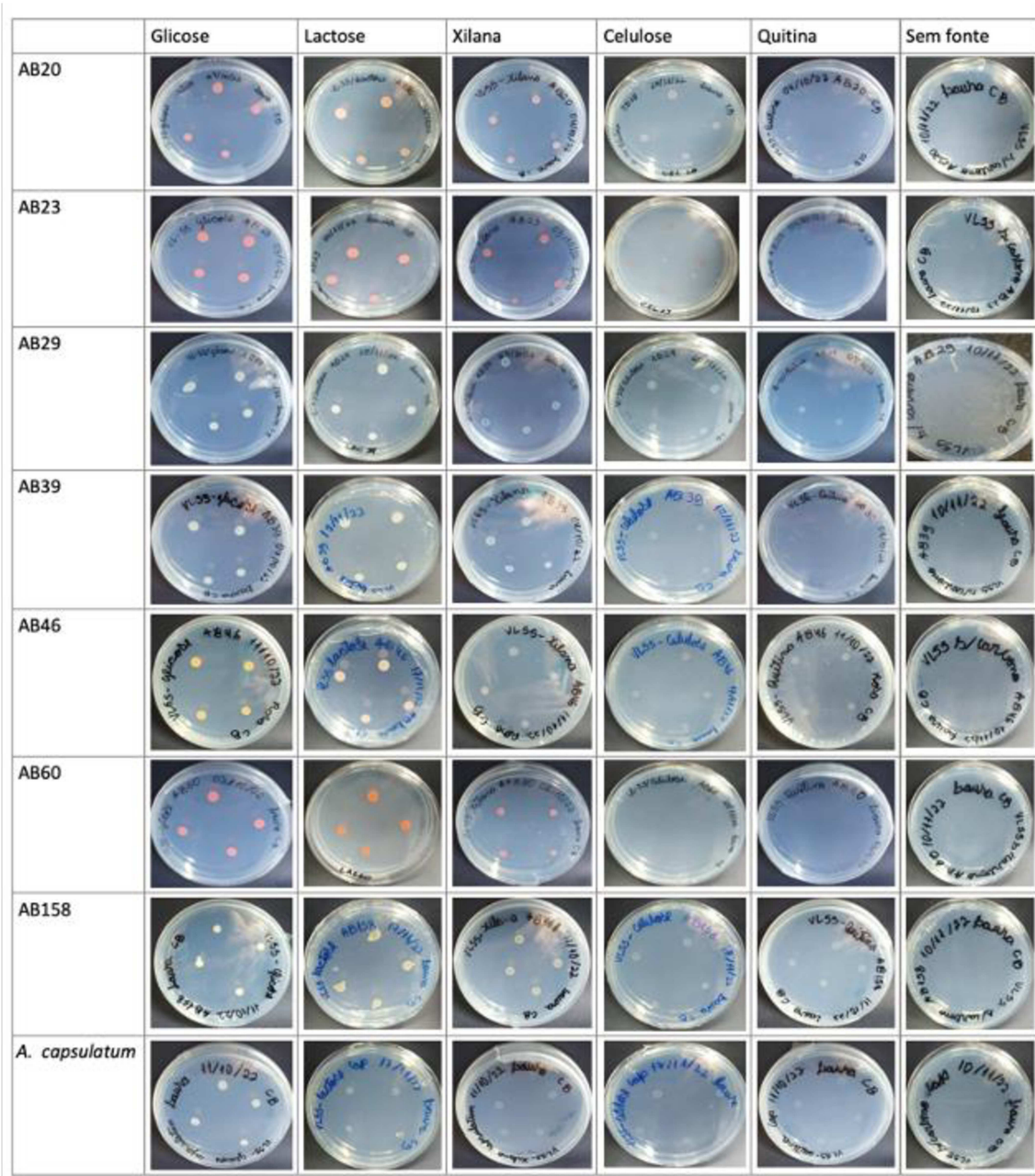
Solução de Vitaminas (1000 mL)

Vitamina B12	17,00 mg
4-aminobenzoato	13,00 mg
Biotina	3,00 mg
Ácido nicotínico	33,00 mg
Hemicálcio D-(+)- pantotenato	17,00 mg
Piridoxamina-HCl	50,00 mg
Tiamina-HCl x 2 H ₂ O	33,00 mg
D,L-6,8-ácido tióctico	10,00 mg
Riboflavina	10,00 mg
Ácido fólico	4,00 mg
Água destilada	1000,00 ml

Filtrar e esterilizar a solução.

APÊNDICE A

Crescimento das cepas de Acidobacteria em meio sólido VL-55 utilizando como fonte de carbono: glicose, xilana, quitina, lactose e celulose e meio sólido VL55 sem fonte de carbono. Cultivo de 4 semanas em uma sala de cultura a 20 °C.



Fonte: própria autora