

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

CATARINA RIBEIRO REZENDE DE FREITAS

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS À
BRIÓFITAS NA ANTÁRTICA

PATOS DE MINAS - MG
MARÇO DE 2026

CATARINA RIBEIRO REZENDE DE FREITAS

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS À
BRIÓFITAS NA ANTÁRTICA**

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

**Orientadora: Profa. Dra. Cristine Chaves
Barreto**

**PATOS DE MINAS
MARÇO 2026**

CATARINA RIBEIRO REZENDE DE FREITAS

Isolamento e caracterização de bactérias associadas à briófitas na antártica

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

Banca Examinadora,

Profa. Dra. Cristine Chaves Barreto – Instituto de Biotecnologia – UFU
Presidente

Prof. Dra. Paulo Eduardo Aguiar Saraiva Câmara – Departamento Botânica - UnB
Membro

Me. Kamila Barros Lima de Oliveira - UCB
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, MG, 11 de março de 2026

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de todos a minha mãe e meu irmão por sempre me apoiarem e acreditarem que um dia eu me tornaria cientista. Ao meu amigo Henrique, que manteve a minha sanidade (e de todo o laboratório) a base de bolo, que tolerou todos os meus atrasos para a academia, minhas reclamações constantes de tudo e todos e por ter controlado a minha vontade inesgotável de jogar tudo para o alto e xingar todo mundo. Agradeço à minha orientadora Cristine por acreditar que bioinformatas podem sim crescer bactérias, por ter comprado mais pizzas do que a minha dieta permite, e acima de tudo, me mostrar um caminho na ciência, que até então eu apenas imaginava que era possível. A Thais, por ter uma paciência infinita comigo mesmo que eu não mereça e por mostrar que a gente pode sim, odiar o planeta terra inteiro, e ainda ser uma pessoa altruísta. As técnicas de laboratório, Carla, Vanessa e Ester, por terem me ajudado até com as coisas mais básicas e a Marise, por ter realizado o sequenciamento das minhas amostras.

RESUMO

A Antártica, devido às suas condições ambientais, constitui um ambiente único para o estudo de organismos adaptados a condições extremas. Embora muitas bactérias já tenham sido obtidas de amostras do solo do continente, pouco se conhece sobre a microbiota associada à sua vegetação nativa. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo isolar bactérias de crescimento lento associadas à briófito *Sanionia uncinata*, com foco especial às pertencentes ao filo *Acidobacteriota*. As amostras foram coletadas na Ilha *King George* durante o verão austral de 2025, e os gametófitos congelados até chegar ao laboratório. Os gametófitos foram descongelados e submetidos a procedimentos de lavagem em vortex em solução salina para promover a liberação dos microrganismos associados. As suspensões resultantes foram inoculadas em meio seletivo VL-55, contendo xilana como fonte de carbono, desenvolvido para o cultivo de bactérias que têm afinidade para condições oligotróficas de cultivo. As amostras foram incubadas por até quatro meses sob condições controladas de temperatura e ausência de luz. A partir das culturas mistas, procedeu-se o isolamento pelo método de estriamento onde as culturas puras tiveram seu DNA extraído para identificação molecular utilizando-se a sequência do gene do RNAr 16S por meio de uma reação em cadeia da polimerase, utilizando os primers universais 27F e 1492R. A análise da sequência de seis isolados revelou similaridade com espécies pertencentes aos filos *Proteobacteria*, *Firmicutes* *Actinobacteriota*, não sendo encontrado representantes do filo *Acidobacteriota*. A análise de filogenia corroborou a classificação dos isolados, indicando similaridade com as espécies *Lysinimonas soli* (isolado 1b), *Sphingomonas sp. P5-21* (isolados 3a, 3ar) e *Paenibacillus baekrokdamisoli* (isolado 5a, 5b, 5c). Tanto a origem ambiental e fenótipos registrados para as espécies vizinhas se mostraram coerentes com aquelas dos isolados obtidos, apesar de não serem suficientes para discriminar os isolados de seus vizinhos, prejudicando identificação a nível de espécie.

Palavras-chave: Extremófilos. Oligotróficos. *Sanionia uncinata*

ABSTRACT

*Antarctica, due to its environmental conditions, constitutes a unique setting for the study of organisms adapted to extreme environments. Although numerous bacteria have been obtained from soil samples across the continent, limited information is available regarding the microbiota associated with its native vegetation. In this context, the present study aimed to isolate slow-growing bacteria associated with the bryophyte *Sanionia uncinata*, with special emphasis on members of the phylum Acidobacteriota. Samples were collected on King George Island during the austral summer of 2025, and the gametophytes were kept frozen until arrival at the laboratory. The gametophytes were subsequently thawed and subjected to vortex-assisted washing procedures in saline solution to promote the release of associated microorganisms. The resulting suspensions were inoculated onto selective VL-55 medium containing xylan as a carbon source, developed for the cultivation of bacteria adapted to oligotrophic growth conditions. The samples were incubated for up to four months under controlled temperature conditions and in the absence of light. From the mixed cultures, isolation was performed using the streak plate method, and pure cultures had their DNA extracted for molecular identification based on 16S rRNA gene sequencing, obtained through polymerase chain reaction using the universal primers 27F and 1492R. Sequence analysis of six isolates revealed similarity to species belonging to the phyla Proteobacteria, Firmicutes, and Actinobacteriota, with no representatives of the phylum Acidobacteriota being detected. Phylogenetic analysis confirmed that the isolates were closely related to *Lysinimonas soli* (isolate 1b), *Sphingomonas* sp. P5-21 (isolates 3a and 3ar), and *Paenibacillus baekrodamisoli* (isolates 5a, 5b, and 5c). Both the environmental origin and the phenotypic characteristics described for the closest related species were consistent with those observed for the isolates obtained in this study. However, these data were not sufficient to discriminate the isolates from their closest relatives, thereby limiting species-level identification.*

*Keywords: Extremophiles. Oligotrophic. *Sanionia uncinata*.*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Referencial Teórico	9
1.1.1 Características ambientais da Península da Antártica	9
1.1.2 Criptógamas e comunidades vegetais antárticas	10
1.1.3 Diversidade microbiana em briófitas da Antártica.....	11
1.1.4. Acidobacteriota	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivos Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Coleta de amostras	14
3.2 Meio de cultura.....	15
3.3 Isolamento das bactérias.....	15
3.4 Amplificação e sequenciamento do gene do RNAr 16S.....	16
3.5 Identificação e filogenia das bactérias	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 Isolamento de bactérias associadas à <i>S. uncinata</i>	17
4.2 Descrição morfológicas dos isolados bacterianos	19
4.3 Identificação dos isolados pelo uso do gene do RNAr 16S.....	21
4.4 Dendrograma dos isolados.....	24
4.4.1 Dendrograma do isolado 1b.....	24
4.4.2 Dendrograma dos isolados 3a e 3ar	27
4.4.3 Dendrograma dos isolados 5a, 5b e 5c.....	29
5 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A Antártica representa um dos ambientes mais extremos do planeta, caracterizado por temperaturas negativas durante a maior parte do ano, intensos ciclos de congelamento e descongelamento, elevada radiação ultravioleta durante os meses de verão e solos com escassa disponibilidade de nutrientes e água líquida (LO GIUDICE; FANI, 2015). Apesar dessas adversidades, diversas formas de vida conseguem não apenas persistir, mas também desempenhar papéis ecológicos essenciais. Essas condições inóspitas, associadas ao seu isolamento geográfico, tornam o continente antártico um verdadeiro laboratório natural para a investigação de adaptações fisiológicas e ecológicas de microrganismos que conseguem sobreviver em tais ambientes (MCLEAN; ROCK, 2016)

Uma das regiões mais estudadas da Antártica é a Ilha *King George*, localizada no arquipélago das *Shetland* do Sul (Figura 1). Essa ilha não apenas foi uma das primeiras terras descobertas na Antártica, como também é reconhecida como o local onde foram feitas as primeiras observações sobre a flora deste bioma (OCHYRA, 1998). Sua acessibilidade relativamente maior, facilitada pela baía do Almirantado, favoreceu o estabelecimento de diversas estações científicas, como a estação brasileira Comandante Ferraz, o que, por sua vez, impulsionou as pesquisas sobre sua biodiversidade microbiana e vegetal (DZIEMBOWSKI; BIALIK, 2022).

Figura 1. Mapa do arquipélago das *Shetland* do Sul. De vermelho a Ilha *King George*.



Fonte: Autor

A ilha abriga comunidades microbianas associadas à vegetação presente, que se distinguem daquelas encontradas em áreas desprovidas de cobertura vegetal (CÂMARA; CARVALHO-SILVA; STECH, 2021). Entre os diversos organismos que integram esse ecossistema particular, destacam-se as briófitas, como a espécie *Sanionia uncinata*, que desempenham um papel ecológico relevante ao formar comunidades vegetais resilientes (CÂMARA; CARVALHO-SILVA; STECH, 2021).

Essas briófitas estabelecem associações íntimas e complexas com diferentes organismos e embora estudos tenham descrito as comunidades microbianas utilizando-se métodos de *Barcoding* (CÂMARA *et al.*, 2021; BOTTOS *et al.*, 2013; CARY *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2013), poucos se dedicaram ao isolamento e estudos de ecofisiologia desses microrganismos. Dentre os filos mais abundantes em solos antárticos está o Acidobacteriota onde sua plasticidade adaptativa a confere a habilidade de colonizar ambientes de condições ambientais extremas, como pH baixo e baixa disponibilidades de nutrientes, dessa forma, são facilmente detectadas em diversos ambientes do planeta e já foram detectados em estudo de barcoding na microbiota de *S. uncinata* (CÂMARA *et al.*, 2021). Apesar disso, essas bactérias são consideradas de difícil cultivo em laboratório, e até o momento não foram isoladas linhagens a partir dessa região.

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo principal obter grupos bacterianos, em especial as do filo Acidobacteriota, associados à briófitas *Sanionia uncinata* na Antártica, concentrando-se no processo de isolamento e caracterização dessas bactérias sob condições de cultivo em laboratório. Essa abordagem se alinha com os objetivos de Desenvolvimento Sustentável 15, uma vez que a compreensão da diversidade microbiana associada a esses organismos se faz necessária para sua conservação. Além disso, o avanço do conhecimento sobre os limites da vida em ambientes extremos se alinha ao objetivo 13, de modo que, pode contribuir para a produção de ferramentas biotecnológicas que reforcem a capacidade de adaptação às mudanças climáticas.

1.1 Referencial Teórico

1.1.1 Características ambientais da Península da Antártica

A Antártica, continente mais ao sul do planeta, abrange cerca de 14 milhões de quilômetros quadrados, com 98% de sua superfície permanentemente coberta por gelo (CÂMARA *et al.*, 2021). Dentre suas regiões, a Península da Antártica se localiza na porção

mais próxima à América do Sul e, portanto, apresenta condições ambientais relativamente menos severas, como temperaturas mais amenas e maior extensão de áreas livres de gelo.

Essa região é subdividida nas regiões biogeográficas Nordeste, Noroeste e Sul que apresentam gradientes ambientais e de biodiversidade distintos (TERAUDS *et al.*, 2012). A região Noroeste é constituída por uma área de 5.183 km², altitude média de 572 m e temperatura anual média de -6,9 °C. Distingue-se por suas condições relativamente mais amenas e maior extensão de áreas livres de gelo, fatores que se traduzem em elevada riqueza biológica e densa malha de infraestrutura científica. (TERAUDS; LEE, 2016). Adicionalmente, os solos da região apresentam grande heterogeneidade, mas compartilham características determinadas por processos de intemperismo físico, resultando predominantemente em texturas arenosas com baixa retenção de nutrientes (BOTTOS *et al.*, 2013). Na região da Ilha *King George*, são comuns solos ácidos sulfatados, com presença de minerais como jarosita e ferrihidrita, coloração amarelada e baixos teores de cálcio e magnésio trocáveis. A acidez é mais pronunciada em solos turfeiros (ricas em musgos), ornitogênicos (gerados pela presença de aves) ou sulfatados, enquanto solos desenvolvidos sobre rochas ígneas ou sedimentares tendem à alcalinidade (CARY *et al.*, 2010).

Assim, a Península Antártica configura-se como uma região de particular relevância no contexto ambiental do continente, reunindo condições geográficas e climáticas que favorecem a presença de biodiversidade e o estabelecimento de atividades científicas.

1.1.2 Criptógamas e comunidades vegetais antárticas

Na península da Antártica, a vegetação é dominada por briófitas que constituem o grupo vegetal dominante, se organizando frequentemente em associações musgo-líquen ou tapetes de musgos. Estas formam densos tapetes em solos úmidos, hidromórficos e relativamente estáveis, frequentemente alimentados pelo degelo. A distribuição dessas comunidades varia ao longo das costas norte e sul da ilha, refletindo diferenças edáficas, disponibilidade hídrica e influência da fauna, com a *Sanionia uncinata* sendo a espécie mais proeminente nesses ecossistemas (VICTORIA *et al.*, 2013). A costa sul apresenta maior cobertura vegetal, com musgos abundantes e ocorrência esparsa das plantas vasculares *Deschampsia antarctica* e *Colobanthus quitensis*, a costa norte é marcada pela predominância de líquens, especialmente em áreas de colônias de pinguins, onde os musgos são restritos a pequenas manchas periféricas (OCHYRA, 1998). No caso da Ilha do *King George*, os criptógamas predominantes apresentam distribuição ampla em ambientes costeiros, com

destaque para espécies como *Sanionia uncinata*, *Calliergon sarmentosum*, *Hypnum revolutum* e *Bartramia patens* (PEREIRA *et al.*, 2007).

Esses ecossistemas formam a base das cadeias tróficas locais e estão associadas à microbiota edáfica (ORTIZ-RIVERO *et al.*, 2023). Essas plantas possuem capacidade de adaptação a condições ambientais extremas e são fundamentais para as dinâmicas do ciclo de nutrientes, especialmente em áreas onde plantas vasculares são escassas, uma vez que sustentam as cadeias alimentares ao ofertar maior viabilidade de nutrientes e condições físicas mais favoráveis, influenciando diretamente a estrutura e diversidade das comunidades microbianas (YERGEAU *et al.*, 2007).

1.1.3 Diversidade microbiana em briófitas da Antártica

Apesar de as comunidades bacterianas associadas a criptógamas ainda não serem amplamente descritas na literatura, alguns estudos recentes têm contribuído para o entendimento de sua estrutura, Rousk *et al.* (2022) observa que musgos são frequentemente colonizados por uma diversidade de grupos bacterianos, incluindo os filos *Acidobacteriota*, *Verrucomicrobiota*, *Planctomycetota*, *Cyanobacteria* e *Pseudomonadota*. Adicionalmente, em uma revisão conduzida por Bottos *et al.*, (2013) descreve a composição microbiana de solos da região peninsular da Antártica, a partir do sequenciamento do gene do RNAr 16S (*metabarcoding*), onde foi demonstrado o predomínio de *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteriota* e *Gemmatimonadota*. Em outro estudo, realizado por Teixeira *et al.*, (2010), foi investigado os solos rizosféricos das duas únicas plantas com flores nativas da Antártica, *Deschampsia antarctica* e *Colobanthus quitensis*, na Ilha King George, onde foi demonstrado que esses solos sustentam comunidades bacterianas semelhantes entre si, porém distintas daquelas encontradas em solos não vegetados da mesma região. Nessas rizosferas, observou-se o predomínio de representantes dos filos *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*.

Em um estudo mais específico sobre musgos antárticos, Park *et al.*, (2013), investigaram a comunidade bacteriana endofítica, ou seja, que coloniza sistematicamente o interior de uma planta, associados à briófita *Sanionia uncinata*. Os resultados revelaram uma diversidade microbiana maior do que a esperada, sugerindo a existência de relações específicas entre os endófitos e o habitat do musgo hospedeiro, onde as bactérias do grupo *Alphaproteobacteria* foram as mais abundantes, mas também foram detectados representantes dos filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Gammaproteobacteria* e *Betaproteobacteria*, reforçando o papel potencial desses microrganismos na adaptação das briófitas às condições

ambientais severas da Antártica. É possível então, identificar um padrão na composição das comunidades microbianas associadas a plantas antárticas, sejam elas criptógamas, como musgos, ou angiospermas nativas, observam-se comunidades dominadas por filos bacterianos adaptados a ambientes oligotróficos e frios, como *Acidobacteriota*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e, em alguns casos, *Firmicutes* e *Planctomycetota*.

Adicionalmente, grande parte das linhagens pertencentes a esses filos apresentam crescimento lento por adotarem uma estratégia de colonização do tipo K, priorizando a eficiência metabólica e a resistência a condições ambientais adversas em detrimento de altas taxas de multiplicação celular (WU *et al.*, 2021). Como consequência, o cultivo dessas bactérias em laboratório requer períodos prolongados até que o crescimento de colônias seja visível, exigindo protocolos de incubação estendidos para o isolamento e caracterização adequada de seus representantes.

Apesar disso, avanços em técnicas de cultivo seletivo têm viabilizado a recuperação de linhagens oligotróficas. O principal meio utilizado para essa finalidade é o VL55, inicialmente descrito por Sait; Hugenholtz; Janssen, (2002), onde formulações de baixo teor nutricional, pH levemente ácido (pH 5,5) e xilana como fonte de carbono permitiram de linhagens pertencentes aos filos *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*, partir de amostras de solo, até então conhecida apenas por sequências clonadas do gene do 16S.

Desde então essa formulação vem sendo empregada para o isolamento de linhagens com poucos ou nenhum representantes cultivados, sendo usada, por exemplo, para isolar acidobactérias de diferentes regiões do mundo, como o Cerrado (DE CASTRO *et al.*, 2013; GONÇALVES; SANTANA, 2023), Amazônia (NAVARRETE *et al.*, 2013), savanas australianas (CHEN *et al.*, 2022), florestas subtropicais perenes chinesas (ZHANG *et al.*, 2022), solos aquecidos geotermicamente por vulcões havaianos (MYERS; KING, 2016) e tundras siberianas (OSHKIN *et al.*, 2019).

1.1.4. Acidobacteriota

O filo *Acidobacteriota* constitui um grupo altamente diverso de bactérias pertencente ao domínio *Bacteria*, atualmente existem 62 espécies distribuídas em 29 gêneros reconhecidos, refletindo uma ampla heterogeneidade fisiológica, metabólica e genética (QUI; CAO, 2025). São gram-negativas e apresentam morfologias variadas, como bastonetes curtos, formas cocóides e até filamentos delgados (KALAM *et al.*, 2020). Essa diversidade acompanha uma

notável heterogeneidade fisiológica e genética, refletida na ampla distribuição filogenética do grupo.

Quanto às suas características metabólicas, *Acidobacteriota* apresenta um repertório versátil. Um estudo metagenômico conduzido por Eichorst *et al.*, (2018) revelou que dentro do grupo há genes dedicados para utilizar hidrogênio atmosférico, diferentes fontes de nitrogênio, tanto orgânicas, como aminoácidos e compostos de alto peso molecular, quanto inorgânicas, como amônia, nitrato e nitrito, além da degradação de uma ampla gama de carboidratos. Muitas linhagens também apresentam capacidade de crescimento sob concentrações variáveis de oxigênio, o que sugere uma plasticidade metabólica relevante para adaptação a ambientes em constante mudança. Em termos fisiológicos, o pH ótimo de crescimento varia entre espécies, mas em geral é ácido, embora haja registros de crescimento em faixas de pH neutro em linhagens específicas (SAIT; HUGENHOLTZ; JANSSEN, 2002).

Essa diversidade metabólica pode ser explicada pela característica cosmopolita do filo, que se encontra amplamente distribuído em diversos ecossistemas terrestres, sendo particularmente abundante em ambientes oligotróficos, com baixos níveis de carbono disponível (KIELAK *et al.*, 2016), essa característica sendo o principal limitante para seu cultivo em laboratório. Isso porque, muitas linhagens apresentam crescimento lento e exigências específicas para cultivo, sendo necessários meios que simulem a os ambientes oligotróficos que são adaptadas, desse modo, meios quimicamente definidos com baixa concentração de nutrientes, pH ácido e, em alguns casos, enriquecimento com CO₂, são necessários para o crescimento de bactérias do filo (KALAM *et al.*, 2020). Como consequência, embora *Acidobacteriota* sejam frequentemente detectadas em altas abundâncias por métodos moleculares, permanecem sub-representadas em bancos de culturas, o que ainda limita o entendimento sobre seu papel funcional nos ecossistemas.

O Filo *Acidobacteriota* é encontrado predominante em solos e é frequentemente associado a ambientes naturais pouco perturbados e, ainda que existam poucos estudos focados especificamente em *Acidobacteriota* da Antártica, evidências indiretas sugerem suas características e importância em ecossistemas polares similares. Por exemplo, em solos da tundra ácida do norte da Finlândia, *Acidobacteriota*, especialmente da família *Acidobacteriotaceae* (*Subgroup 1*), dominam a comunidade bacteriana (RAWAT *et al.*, 2013). Em um estudo prévio, Rawat *et al.*, (2012) postularam que sua ubiquidade em ambientes frios esteja relacionada à sua tolerância a condições severas, como variações térmicas extremas e ciclos de congelamento e descongelamento. Além disso, essas bactérias desempenham papel

ativo na degradação de matéria orgânica e na ciclagem do carbono nesse ecossistema, indicando as suas possíveis funções ecológicas em ecossistemas similares.

Por fim, *Acidobacteriota* desperta um grande interesse biotecnológico por sua capacidade de produzir enzimas como celulases, quitinases e outras hidrolases, que são de grande interesse em processos industriais que demandam eficiência, como na indústria alimentícia, farmacêutica e no tratamento de resíduos orgânicos (GONÇALVES; SANTANA, 2023). Além disso, linhagens de *Acidobacteriota* adaptadas ao frio, podem apresentar características interessantes para bioprospecção, podendo apresentar genes relacionados à produção de enzimas psicroativas, mecanismos de proteção contra estresse oxidativo e manutenção da fluidez da membrana celular (RIZZO; GIUDICE, 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Geral

Isolar, cultivar e caracterizar acidobacterias associadas à briófito *Sanionia uncinata* coletada na Antártica.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter colônias puras de bactérias associadas à *S. uncinata*, em meio VL-55;
- Identificar bactérias, por meio da análise do gene do RNAr 16S
- Realizar comparação com táxons vizinhos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de amostras

As amostras de *S. uncinata* foram coletadas durante o verão austral de 2024/2025 (janeiro de 2025) em *King George Island, South Shetland Islands* (62° 13' 19,27962" S 59° 11' 54,60537" W) pelos membros da equipe Briotech (Universidade Católica de Brasília - UCB)

em parceria com o projeto BryoAntar liderado pelo professor doutor Paulo Câmara (Universidade de Brasília - UnB). Os gametófitos foram congelados em solução salina 0,9 % (p/v) na Universidade Católica de Brasília.

3.2 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para isolamento e manutenção das bactérias foi o VL-55, visto que este se demonstrou eficaz no cultivo de bactérias de lento crescimento como demonstrado inicialmente por Sait; Hugenholtz; Janssen, (2002). Dessa maneira, o meio preparado possui uma composição de 3,9 g/L de 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES), 0,4 mM/L de $MgSO_4$, 0,6 mM/L de $CaCl_2$, 0,4 mM/L de $(NH_4)_2HPO_4$, 2 mL/L de solução de tungstato/selenito, 2 mL/L de solução vitamínica Wolfe (Biotina, 2 mg/L; Ácido fólico 2 mg/L; Piridoxina-HCl 10 mg/L; Tiamina - HCl 5 mg/L; Riboflavina 5 mg/L; Ácido nicotínico 5 mg/L; Ácido pantotênico 5 mg/L; Cianocobalamina 0,1 mg/L e Ácido lipóico 5 mg/L), 2 mL/L de solução de elementos-traço modificada SL-10 (Ácido nitroacético, 1.5 g/L; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.556 g/L; $MgSO_4$, 0.5 g/L; $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g/L; Na_2MoO_4 , 0.24 g/L; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1 g/L; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1 g/L; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g/L; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.01 g/L; $AlK(SO_4)_2$, 0.01 g/L; H_3BO_3 , 0.01 g/L) (DE CASTRO *et al.*, 2013) e 0,05% (p/v) de xilana. Para o meio sólido foi adicionado 0,8% de gelana.

Inicialmente foi preparada a parte líquida com os sais $MgSO_4$, $CaCl_2$ e $(NH_4)_2HPO_4$ e xilana nas concentrações descritas acima, em seguida foi realizado o ajuste do pH para 5,5. Paralelamente, a gelana foi dissolvida em água ultrapura aquecida. As partes líquida e sólida são esterilizadas separadamente em autoclave a 121 °C por 20 minutos, combinadas após resfriamento a aproximadamente 50 °C em um banho maria, estas foram distribuídas em placas de Petri estéreis para solidificação à temperatura ambiente. As placas foram então, incubadas por 48 horas para controle de esterilidade antes do uso experimental. Com a finalidade de obter-se o DNA, foi preparado meio VL-55 líquido suplementado com 0,1% de extrato de levedura para promover aumento de biomassa bacteriana.

3.3 Isolamento das bactérias

Fragmentos do gametófito, foram submetidos à agitação por 10 minutos utilizando um agitador tipo vortex, com o objetivo de separar os microrganismos associados. O sobrenadante resultante foi utilizado para a preparação de diluições seriadas, em razão de 1:10. Alíquotas de

100 µL das diluições 10^{-3} e 10^{-4} foram inoculadas em placas contendo meio de cultivo VL-55, com o uso de uma alça de Drigalski. Adicionalmente, foram preparadas placas inoculadas diretamente com fragmentos do gametófito, de cerca de 1 cm. Após a inoculação, as placas foram mantidas em incubadora BOD, à temperatura de 25 °C, considerando que a temperatura observada nos ambientes associados a tapetes de musgos é geralmente mais amena, quando comparados aos observados externamente a estes (BLOCK; LEWIS; SMITH; KENNEDY, 2009). O período de incubação ocorreu por um período de dois meses. As placas foram mantidas no escuro durante todo o período de incubação, cobertas com papel alumínio para garantir a completa ausência de luz.

Para a execução deste projeto, foram preparadas quarenta placas de cultivo, das quais trinta e cinco foram inoculadas a partir de diluições seriadas e cinco diretamente a partir do gametófito. As colônias com fenótipos diferentes dentro de uma mesma placa, foram identificadas com o número da placa em que foram obtidas seguidas de letras como a, b e c, por exemplo, se em uma placa numerada de 1, foram observadas duas colônias, uma será chamada de 1a e outra de 1b. Para as colônias com apenas um fenótipo observado, foram realizadas réplicas, de modo a garantir que havia apenas uma colônia. As réplicas tiveram o sufixo -r adicionado ao final da nomenclatura.

Após a obtenção das culturas mistas, efetuou-se o isolamento das bactérias pelo método de estriamento por esgotamento, com o objetivo de obtenção de culturas puras. As placas foram incubadas por um período de quatro semanas. A partir das colônias isoladas, foram inoculados meios líquidos de VL-55, e cultivadas as mesmas condições mencionadas previamente, porém, por um período de uma semana, de modo a se obter uma taxa de crescimento maior.

3.4 Amplificação e sequenciamento do gene do RNAr 16S

Após uma semana de incubação em meio líquido, o DNA genômico foi extraído utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* da Promega, as células foram obtidas a partir de centrifugação a 13000 G por 2 minutos, as restantes das etapas seguiram o protocolo descrito pelo fabricante.

Uma reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional foi conduzida utilizando os primers universais 27F e 1492R, para amplificação do gene do RNAr 16S do DNA extraído. Esse procedimento foi realizado em duplicata, de modo, se obter um volume suficiente para as demais etapas. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1%, e sua

purificação foi realizada a partir do kit *ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System* da Promega, seguindo o protocolo do fabricante. Para a quantificação do DNA obtido, foi utilizado o kit *Quant-iT™ dsDNA* da Promega em um Qubit 2.0 da Invitrogen, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

O sequenciamento de DNA foi realizado no sequenciador ABI 3130xl da *Applied Biosystems*, do Laboratório de Sequenciamento de DNA/Genômica do Departamento de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília. Foi utilizado os primers 27F, 1492R e 338F, a concentração de 3,2 pmol/reação. O processamento das sequências e a montagem do gene do gene do RNAr 16S foi realizado utilizando o Bioedit 5.0.9 (Apêndice A).

3.5 Identificação e filogenia das bactérias

A atribuição taxonômica foi realizada a partir da ferramenta SILVA ACT (<https://www.arb-silva.de/aligner>), comparadas ao banco de dados SILVA SSU. A classificação foi conduzida com a ferramenta *Search and classify* ativada, adotando-se um valor mínimo de 95% de identidade. As sequências filogeneticamente próximas recuperadas na análise foram selecionadas e alinhadas em conjunto com as sequências obtidas neste estudo por meio do método ClustalX2, no software MEGA (12.1.2). Posteriormente foi produzido um dendrograma pelo método *Neighbor-Joining*, empregando-se o modelo de substituição Kimura de dois parâmetros (K2P) e parcimônia máxima. A robustez dos agrupamentos foi avaliada por meio de análise de *bootstrap* com 1.000 réplicas. Demais visualizações foram realizadas a partir do Python (3.14).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de bactérias associadas à *S. uncinata*

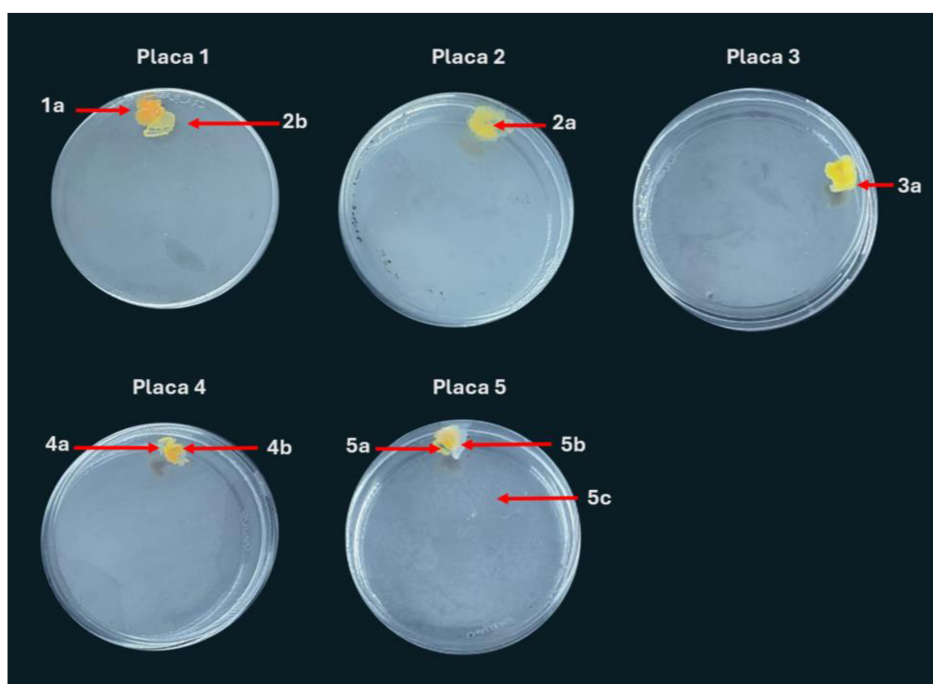
Dentre as 40 placas inoculadas, observou-se crescimento exclusivamente nas placas inoculadas diretamente com o gametófito, não sendo detectado desenvolvimento microbiano nas placas provenientes das diluições (Figura 2). Esse resultado não representa a diversidade já observada em estudos moleculares, por exemplo, em um estudo realizado por Câmara *et al.*,

(2021) que buscou caracterizar o microbioma associado a um transplante de *Sanionia uncinata*, foi encontrado um total de 20.111 sequências, distribuídas em 189 taxa putativos (ou *Amplicon Sequence Variants*), sendo essa uma quantidade expressiva o suficiente para se inferir maior diversidade. Em um outro estudo Cui *et al.*, (2023) buscou analisar a diversidade de solos da península da Antártica e Ilhas *Shetland* do Sul, mais especificamente na ilha *Deception* e Ilha do *King George*, a partir técnicas de metabarcoding e técnicas dependentes de cultivo. O estudo concluiu que tanto a riqueza quanto a diversidade das comunidades bacterianas da ilha do *King George* foram superiores à observada nas outras amostras, com 519 taxa putativos associadas ao solo dessa região. Adicionalmente, nesse estudo foram isoladas 30 linhagens retiradas da região, confirmando observações anteriores de que o número de taxa em cultivo é sempre inferior ao número de taxa observado por *metabarcoding*, considerando-se as condições de cultivo selecionadas e recalcitrância de algumas bactérias de se multiplicar em laboratório (EKKERS *et al.*, 2011).

Ao observar a metodologia utilizada por Cui *et al.*, (2023), todas as amostras coletadas foram obtidas a temperatura de 4 °C, dessas 58% foram classificadas como psicrófilas, com temperatura ótima de crescimento menor do que 20 °C. Comparativamente, no presente estudo foi utilizado temperatura ambiente de 25 °C para o cultivo, pois, evidências sugerem que próximo aos tapetes de musgos, comumente formados por *S. uncinata*, a temperatura observada é frequentemente maior do que a temperatura no ar (BLOCK; LEWIS SMITH; KENNEDY, 2009), levando a sugerir que a temperatura do microambiente associado a essas briófitas também seria maior. Porém, é possível que esta não seja a temperatura apropriada para o cultivo desses microrganismos em laboratório, levando a uma possível sub-representação da diversidade presente. Dessa forma, seria importante utilizar-se diferentes temperaturas de incubação para aumentar as chances de se obter mais espécies bacterianas a partir da amostra de gametófito.

Um outro aspecto importante a ser considerado é a escolha do meio VL-55 é um meio quimicamente definido com apenas uma fonte de carbono, xilana. Outros meios utilizados por Cui, *et al.*, 2013, por exemplo, como o R2A são meios complexos e apresentam mais fontes macro e micronutrientes necessários para o crescimento de diferentes espécies. A escolha do meio VL-55, porém justifica-se por ser o meio mais utilizado para obtenção de bactérias de crescimento lento e aquelas que adotam estratégias do tipo K de crescimento, como as acidobactérias (SAIT; HUGENHOLTZ; JANSSEN, 2002).

Figura 2. Crescimento microbiano observado em cinco placas de Petri contendo meio VL-55 após inoculação direta do gametófito. As setas indicam colônias fenotipicamente distintas identificadas em cada placa.



Fonte: Autor

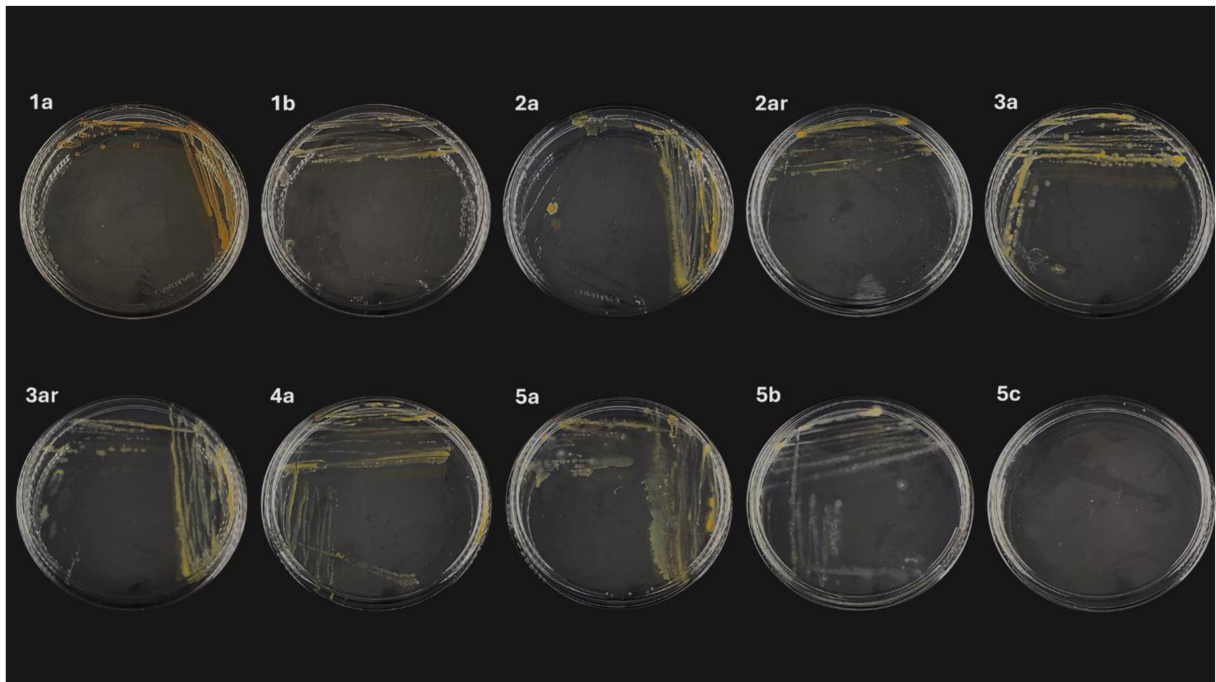
4.2 Descrição morfológicas dos isolados bacterianos

A partir das placas contendo o gametófito de *S. uncinata*, foi realizada uma passagem por estriamento sendo obtidas de onze colônias presumivelmente puras (Figura 3). Na Placa 1, foram observadas duas colônias distintas: a colônia 1a, com pigmentação amarelo-intensa, aspecto opaco, elevação convexa e bordas irregulares; e a colônia 1b, com tonalidade mais alaranjada, também opaca, porém com morfotipo irregular e superfície aparentemente mais rugosa. Nas Placas 2 e 3, foi identificado apenas um morfotipo denominado respectivamente como 2a e 3a, em ambas, se observa pigmentação amarela, crescimento elevado e margens irregulares. A Placa 4 apresentou crescimento nas regiões 4a e 4b, com discretas variações de tonalidade e textura entre as colônias, onde a 4a apresentou uma pigmentação laranja e a 4b

uma pigmentação amarelada. Já na Placa 5, observou-se maior diversidade aparente, com três morfotipos distintos: a colônia 5a apresentou pigmentação amarela e a 5b uma pigmentação branca. Já a colônia 5c, não apresentou pigmentação, tendendo a um aspecto translúcido e com padrão de crescimento rizóide.

De modo geral, os morfotipos observados nas placas estriadas mantiveram correspondência com aqueles descritos nas respectivas placas de origem (Figura 2 e Figura 3), preservando as características fenotípicas individuais previamente registradas quanto à pigmentação, textura superficial, elevação e padrão de crescimento. Entretanto, todas as estrias derivadas da Placa 5 apresentaram padrões morfológicos variados, nos quais, além de colônias circulares com pigmentações compatíveis com as amostras originais 5a e 5b, também foi observada a presença de morfologia translúcida com padrão rizóide, semelhante à descrita para a amostra 5c na placa primária. Sugerindo então, uma possível contaminação cruzada do morfotipo 5c nas placas consideradas puras de 5a e 5b. Adicionalmente, foram realizadas réplicas das amostras provenientes das Placas 2 e 3, que inicialmente apresentaram apenas um fenótipo detectável, com o objetivo de garantir que a amostragem contemplasse adequadamente toda a possível diversidade microbiana presente na amostra original e minimizar a probabilidade de subestimação de morfotipos minoritários, em ambas as réplicas foi observado um padrão fenotípico similar entre si, demonstrando possivelmente que havia de fato apenas uma colônia nas placas iniciais.

Figura 3. Crescimento microbiano observado após passagem por estriamento a partir dos morfotipos isolados das placas primárias.



Fonte: Autor

4.3 Identificação dos isolados pelo uso do gene do RNAr 16S

Com o intuito de identificar taxonomicamente os isolados em nível de gênero bacterianos, o DNA genômico foi extraído e submetido à amplificação do gene do 16S rRNA. A análise por eletroforese em gel de agarose evidenciou a presença de bandas únicas e bem definidas em aproximadamente 1.500 pb para a maioria das amostras, tamanho esperado para a amplificação quase completa do gene 16S rRNA, dos onze isolados apenas as amostras 1a, 4a e 4b não apresentaram quantidade suficiente de DNA para o sequenciamento.

Após o sequenciamento utilizando os primers universais 27F e 1492R, observou-se que apenas seis sequências apresentaram qualidade adequada para prosseguimento nas etapas subsequentes de análise. As sequências correspondentes às amostras 1a, 2a e 2ar exibiram valores médios de *base calling* abaixo do *threshold* estabelecido para confiabilidade, além da presença de múltiplos picos concomitantes com intensidades semelhantes ao longo do cromatograma, padrão sugestivo de mistura de moldes ou contaminação durante a amplificação

ou preparo da amostra. Esse perfil comprometeu a interpretação da sequência consenso, inviabilizando sua utilização nas análises filogenéticas e de similaridade taxonômica.

A análise de alinhamento e comparação entre sequências revelou elevada similaridade entre as réplicas técnicas, onde as amostras 3a e 3ar apresentaram 97% de identidade nucleotídica. Porém, as amostras 5a, 5b e 5c exibiram similaridade de 98% entre si, um resultado não esperado visto que essas apresentavam morfotipos variados, esses resultados sugerem que os isolados derivados da Placa 5 podem corresponder ao mesmo táxon bacteriano, apesar das diferenças fenotípicas observadas em cultivo, corroborando para a hipótese de contaminação. Além disso, essa elevada similaridade pode estar associada ao fato de ter sido realizada apenas uma única passagem por estriamento, aliada à observação de mais de um fenótipo nas placas correspondentes, indicando que, nesse caso específico, uma única etapa de purificação pode não ter sido suficiente para assegurar a completa obtenção de culturas puras.

A análise das sequências do gene 16S rRNA permitiu classificar todos os isolados como pertencentes ao domínio *Bacteria* (Tabela 1, Apêndice B), com resolução taxonômica consistente até o nível de gênero para a maioria das amostras, com exceção do isolado 1b, cuja identificação permaneceu restrita ao nível de família, sendo afiliado à *Microbacteriaceae*, dentro do filo *Actinobacteriota*. O parente mais próximo no banco de dados para essa amostra foi *Lysinimonas soli* (acesso JN378395), apresentando 86,9% de similaridade do 16S rRNA.

Tabela 1. Identificação taxonômica e caracterização fenotípica dos isolados bacterianos com base no gene 16S rRNA.

Isolado	Afiliação filogenética	Parente mais próximo no banco de dados	% Identidade
1b	<i>Microbacteriaceae</i>	JN378395	86,9
3a	<i>Sphingomonas</i>	AB288314	90,0
3ar	<i>Sphingomonas</i>	HQ767706	87,6
5a	<i>Paenibacillus</i>	LC082229	87,3
5b	<i>Paenibacillus</i>	LC082229	87,7
5c	<i>Paenibacillus</i>	LC082229	87,4

Fonte: Autor

No caso das amostras 3a e 3ar foram atribuídas ao gênero *Sphingomonas*, pertencente ao filo *Proteobacteria*, apresentando como parentes mais próximos *Sphingomonas* sp. P5-21

(acesso AB288314) e um organismo não cultivado *uncultured organism* (acesso HQ767706), com similaridades de 90% e 87,6%, respectivamente. Aqui é interessante notar, que apesar de evidências que indicavam que essas amostras eram réplicas, estas apresentaram similaridades com vizinhos diferentes, o que pode indicar variações de linhagem, ou de que as três espécies são relativamente parecidas entre si.

Os isolados 5a, 5b e 5c foram identificados como pertencentes ao gênero *Paenibacillus*, do filo *Firmicutes*, apresentando como parente mais próximo *Paenibacillus baekrokdamisoli* (acesso LC082229), com valores de similaridade variando entre 87,3% e 87,7%. Apesar das diferenças fenotípicas observadas entre esses isolados, incluindo variação de pigmentação (laranja, branco e incolor) e padrões distintos de crescimento, os dados moleculares indicaram forte proximidade filogenética, indicando inconsistência entre os fenótipos observados e os dados moleculares, o que pode ser resultado de uma contaminação posterior ao procedimento de isolamento. Os táxons identificados, *Actinobacteriota* (*Microbacteriaceae*), *Proteobacteria* (*Sphingomonas*) e *Firmicutes* (*Paenibacillus*), são amplamente descritos como componentes frequentes da microbiota de solos e de musgos em ambientes terrestres, estando de acordo com o perfil microbiano esperado para o ecossistema estudado (CÂMARA *et al.*, 2021; CARY *et al.*, 2010; CUI *et al.*, 2023; PARK *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2010). Por exemplo, em um estudo realizado por Câmara *et al.*, (2021) foi demonstrado que dentro dos filos mais presentes no microambiente associados a tapetes de *S. uncinata*, são *Actinobacteriota* (25%) e *Proteobacteria* (20%), sendo dois dos isolados encontrados aqui pertencentes a esses filos, adicionalmente, *Firmicutes* teve uma abundância relativa de menos que 5%, indicando que, apesar de não ter sido possível encontrar Acidobacterias, a metodologia empregada foi capaz de isolar microrganismos de abundância relativamente baixa.

De maneira geral, embora o foco do estudo incluísse a prospecção de representantes do filo *Acidobacteriota*, nenhum isolado pertencente a esse grupo foi recuperado nas condições de cultivo empregadas, mesmo após otimização dos parâmetros experimentais. Uma possível explicação para esse resultado é de que ainda que o filo *Acidobacteriota* esteja presente nas amostras ambientais, sua abundância relativa pode ser suficientemente baixa para comprometer o sucesso do isolamento, especialmente em um contexto no qual o número total de colônias recuperadas já foi reduzido, limitando a probabilidade de recuperação de linhagens com baixa representatividade e menor carga inicial de DNA. Adicionalmente, é conhecido que acidobacterias necessitam de um isolamento a partir de diluição, de modo que a redução da carga de material biológico inicial de espécies mais abundantes, permita que haja o desenvolvimento de colônias pertencentes ao filo (DE CASTRO *et al.*, 2013). Dessa forma,

como não foi encontrado colônias dentro das diluições, dificilmente seria possível isolá-las a partir do gametófito, ainda sim, mesmo nas condições de cultivo empregadas, existe a possibilidade do isolamento, caso houvesse um maior número de placas inoculadas, de modo a aumentar a probabilidade de algum organismo pertencente ao filo fosse capaz de colonizar a placa.

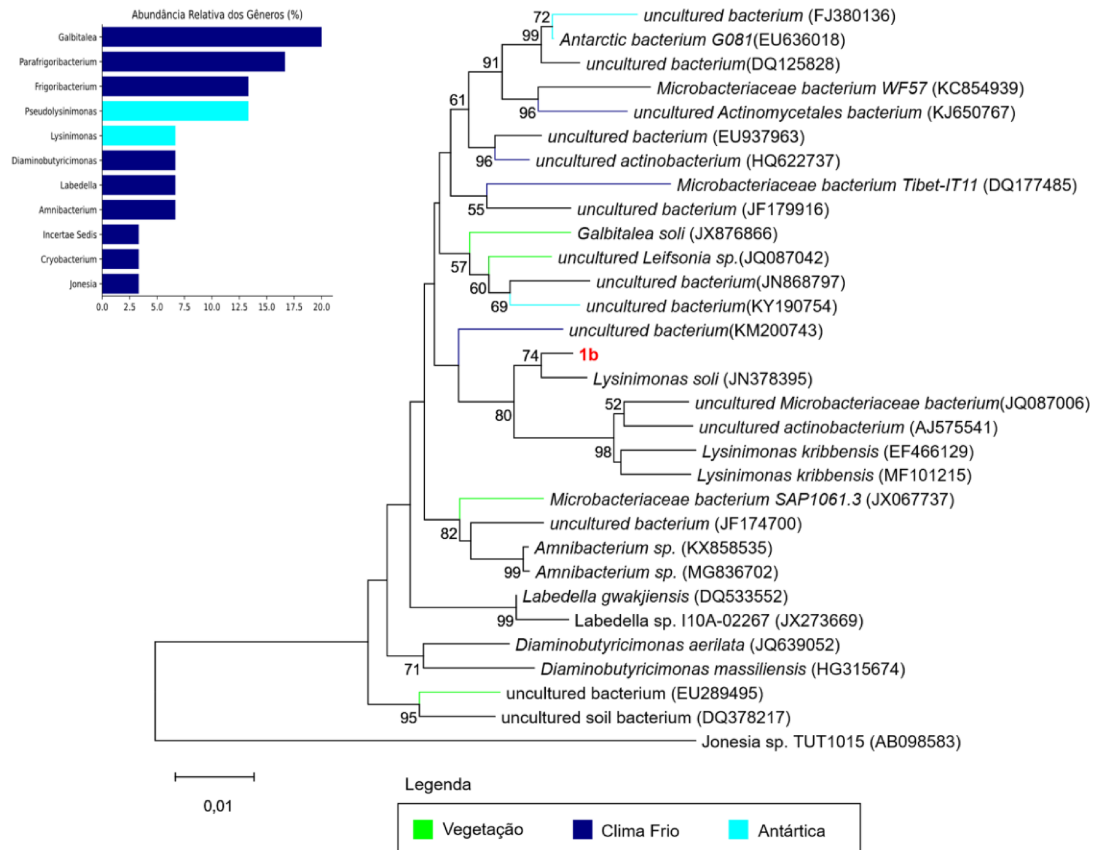
Outra hipótese que pode explicar esse resultado, é de que é possível que as linhagens de *Acidobacteria* descritas em solos antárticos não correspondam necessariamente a grupos acidófilos clássicos, o que implica que meios tradicionalmente empregados para seu isolamento, como o VL55, podem não ser adequados para essas cepas específicas. Isso porque, evidências apresentadas por Eichorst et al., (2018) indicam que, embora estratégias de cultivo para esse grupo, frequentemente enfatizem meios com limitação nutricional, alguns isolados demonstram capacidade de crescimento em concentrações mais elevadas de carbono, sugerindo que a oligotrofia não é uma característica universal do filo. Desse modo, considerando que nenhum isolado desse filo foi obtido a partir de solos e criptogramas da antártica, é possível que as adaptações necessárias para a sobrevivência nesse ambiente, gerou condições de cultivo suficientemente diferentes, para que o VL-55 não seja tão eficaz quanto para outras cepas encontradas em outros habitats.

4.4 Dendrograma dos isolados

4.4.1 Dendrograma do isolado 1b

O dendrograma construído para o isolado 1b (Figura 4) demonstrou maior dispersão topológica em comparação aos demais isolados analisados, resultado compatível com a resolução taxonômica limitada ao nível de família (*Microbacteriaceae*). Para essa análise, foram incluídos 30 táxons filogeneticamente próximos, dos quais aproximadamente 20% pertenciam ao gênero *Galbitalea*, 17% ao gênero *Parafrigoribacterium*, cerca de 13% aos gêneros *Frigoribacterium* e *Pseudolysinimonas*, 7% para os gêneros *Lysinimonas*, *Diaminobutyricimonas*, *Labeledella*, *Amnibacterium* e 3% para *Incertae Sedis*, *Cryobacterium* e *Jonesia*.

Figura 4. O dendrograma baseada no gene 16S rRNA do isolados bacterianos 1b obtidos a partir do gametófito. Os números nos nós dos ramos são valores de *bootstrap*, expressos como porcentagens em 1000 réplicas. A esquerda um gráfico de barras que mostra a prevalência dos gêneros presentes, onde de azul claro se destaca os gêneros mais próximos ao isolado.



Fonte: Autor

O táxon com maior similaridade ao isolado 1b foi *Lysinimonas soli*, seguido por sequências depositadas como *uncultured Microbacteriaceae bacterium* (relacionada a *Pseudolysinimonas*), *uncultured actinobacterium* (associada a *Galbitalea*) e *Lysinimonas kribbensis* (*Pseudolysinimonas*) (Tabela 2). A espécie *Lysinimonas soli* foi descrita por Jang et al., (2013) a partir de solo de arrozal na República da Coreia, sendo caracterizada como uma bactéria Gram-positiva, não formadora de esporos e não motil. Em meio R2A, apresenta colônias circulares, convexas e de coloração marrom-clara e seu crescimento ocorre em ampla faixa de temperatura (10 a 37 °C) e pH (5,0 a 9,0), configurando-a como espécie-tipo do gênero *Lysinimonas*. Nesse mesmo estudo a espécie *Lysinimonas kribbensis*, foi definida como a espécie mais próxima da *L. soli*, isolada a partir de uma amostra de solo retirada da ilha de Bigeumdo, também na Coreia, apresenta coloração amarela, é Gram-positiva, não móvel, com colônias circulares, pequenas, opacas e de margem inteira em R2A, com crescimento a temperaturas entre 20 e 37 °C e faixa de pH entre 6 e 11, eventualmente foi demonstrado uma

divergência entre ambas espécies levando a uma reclassificação da *Lysinimonas kribbensis* para o gênero *Pseudolysinimonas*, configurando sua espécie tipo (HEO *et al.*, 2019).

Além disso, ambas as amostras *uncultured Microbacteriaceae bacterium* e *uncultured actinobacterium*, originadas de amostras de aquíferos na Alemanha, são resultados de análises metagenômicas e não se tem informações relacionadas ao cultivo e morfologia. Apesar disso, *uncultured Microbacteriaceae bacterium* pertence ao gênero *Pseudolysinimonas*, e se supõe que apresente características semelhantes a *L. kribbensis* por ser a espécie tipo do gênero. Por fim, *uncultured actinobacterium*, pertence ao gênero *Galbitalea*, que ao ser comparada com a sua espécie tipo apresenta motilidade, crescimento ocorre a temperaturas variando de 10 a 37 C° e pH de 4 a 9, também apresentando coloração amarela (KIM *et al.*, 2014).

Tabela 2. Propriedades fisiológicas da amostra 1b e dos vizinhos mais próximos.

Característica	1	2	3	4
Cor da colônia	Amarelo	Marrom-claro	Amarelo	Amarelo
Motilidade	-	-	-	+
Temperatura ótima (°C)	25 *	28	28	28-30
pH ótimo	5.5 *	7	8	7
Origem das amostras	Rizosfera	<i>S. Solo</i>	Solo	Solo
	<i>uncinata</i>			

* representa condições de cultivo empregadas e não determinação da temperatura ou pH ótimos. 1; 1b; 2: *Lysinimonas soli* sp.; 3: *Lysinimonas kribbensis* sp.; 4: *Galbitalea soli* sp.; +, positivo; -, negativo;

Fonte: Autor

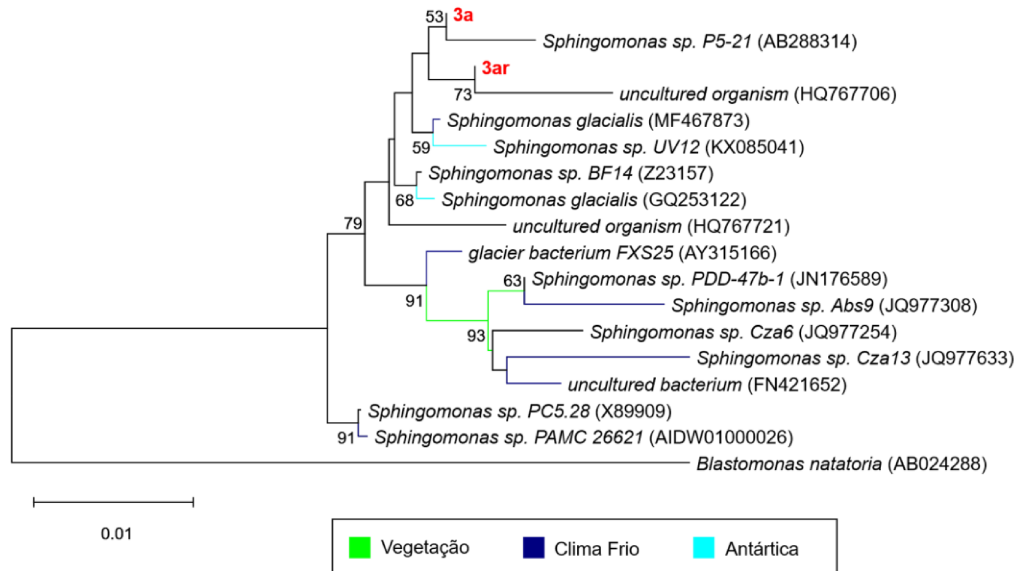
Apesar da baixa resolução dentre para a definição taxonômica da amostra, os três gêneros que tiveram maior similaridade com a amostra são gêneros bastante próximos entre si, onde *L. kribbensis* e *L. soli*, pertenciam ao mesmo gênero sendo agora classificadas como espécie tipo dos seus respectivos gêneros, onde no caso do *Lysinimonas* é a única espécie isolada com taxonomia confirmada até o presente momento. Paralelamente, o gênero *Galbitalea* é relativamente próximo tanto de *Lysinimonas* quanto de *Pseudolysinimonas*, e também apresenta apenas a espécie tipo *G. Soli* atualmente isolada. Dessa forma, a pouca representatividade de isolados dentro desses gêneros e sua proximidade, pode ser o principal indicativo do porquê não foi possível alcançar maior resolução para essas amostras. Adicionalmente, as diferenças fenotípicas entre os gêneros não são expressivas, levando com que a identificação de espécie para os isolados obtidos, não seja possível, visto que, as principais diferenças entre os gêneros está presente em seus componentes bioquímicos.

Quanto à origem ambiental das sequências mais próximas, observou-se que três delas eram provenientes da Antártica, incluindo registros anotados como *uncultured bacterium* (acesso FJ380136), *uncultured bacterium* (acesso KY190754) e *Antarctic bacterium G081*, originalmente encontrados, respectivamente em solo ornitogênico da região do Mar de Ross, Rizosfera de *Deschampsia antarctica* na geleira Collins e de solo poluído por hidrocarbonetos na Ilha *King George*. Outras quatro sequências estavam associadas a ambientes frios ou de condições ambientais extremas, como geleiras (Austre Lovénbreen), permafrost do planalto Qinghai-Tibet, turfeiras na Rússia e rejeitos de mineração em regiões da África e Europa, incluindo Botsuana, Alemanha e Suécia. Além disso, quatro sequências relacionadas apresentavam origem associada à vegetação, como *Galbitalea soli*, *uncultured Leifsonia sp.* e *Microbacteriaceae bacterium* SAP1061.3. Desse modo, os vizinhos presentes na árvore refletem de forma condizente com a origem ambiental desse estudo.

4.4.2 Dendrograma dos isolados 3a e 3ar

O dendrograma construída para os isolados 3a e 3ar (Figura 5) foi produzida a partir dos 15 vizinhos mais próximos das amostras. Em geral, a maioria das sequências tiveram origem ambiental em regiões frias sendo elas, *Sphingomonas glacialis*; *glacier bacterium* FXS25; *Sphingomonas sp. Abs9*; *Sphingomonas sp. Cza13*; *uncultured bacterium*; *Sphingomonas sp. PAMC 26621*. Além disso, as sequências *Sphingomonas sp. UV12* e *Sphingomonas glacialis* foram coletadas a partir do solo antártico e *Sphingomonas sp. Abs9*, *Sphingomonas sp. Cza6*, *Sphingomonas sp. Cza13*, *uncultured bacterium* coletadas a partir de vegetação. Essa presença frequente de gêneros associados a plantas e solos sugere possível envolvimento em processos como ciclagem de nutrientes, degradação de matéria orgânica e interação com o hospedeiro vegetal.

Figura 5. O dendrograma baseada no gene 16S rRNA do isolados bacterianos 3a e 3ar obtidos a partir do gametófito. Os ramos foram coloridos de acordo com a origem ambiental das sequências, e os isolados em vermelho. Os números nos nós dos ramos são valores de *bootstrap*, expressos como porcentagens em 1000 réplicas.



Fonte: Autor

A espécie *Sphingomonas sp. P5-21* é uma célula gram-negativa, sem motilidade, de coloração amarela, isolada a partir de drenagens ácidas de uma mina de carvão abandonada (KIM; KASAHARA; WHANG, 2001). Já a espécie *uncultured organism* foi isolada a partir de tecidos gastrointestinais, com o *Homo sapiens* como hospedeiro, porém, não foi cultivada em laboratório e não há informações sobre seu fenótipo. Além disso, as espécies *Sphingomonas glacialis* e *Sphingomonas sp. UV12* também apresentaram similaridade com as amostras. Onde a *Sphingomonas sp. UV12*, isolada a partir de uma geleira localizada na ilha do *King George*, demonstrou resistência a irradiação por luz ultravioleta (MARIZCURRENA ET AL., 2017). Quanto a *Sphingomonas glacialis* esta foi isolada a partir de crioconitas, uma combinação de rochas, fuligem e microrganismos, da geleira Hamtah, Himalaia (ZHANG ET AL., 2022).

Novamente, quando se compara o fenótipo encontrado para essas espécies, é possível identificar, uma semelhança muito grande entre todos os parâmetros avaliados (Tabela 3), onde a temperatura de cultivo 25 °C e o pH de 5.5, encaixa dentro das sequências mais próximas. Desse modo, novamente as informações coletadas no presente estudo não seriam suficientes para diferenciar ou afirmar o pertencimento dos isolados a espécies já descritas, ou indicar uma nova espécie.

Tabela 3. Propriedades fisiológicas da amostra 3a, 3ar e dos vizinhos mais próximos.

Característica	1	2	3	4
Cor da colônia	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo/Laranja
Motilidade	-	-	-	-
Temperatura ótima (°C)	25*	25*	25*	1–25
pH ótimo	5.5*	5.5*	7*	7–8
Origem das amostras	Rizosfera <i>s. uncinata</i>	Rizosfera <i>s. uncinata</i>	Drenagem ácida	Crioconitas

* representa condições de cultivo empregadas e não estudo de temperatura ou pH ótimos. 1: 3a; 2: 3ar; 3: *Sphingomonas sp. P5-21*; 4: *Sphingomonas glacialis*; +, positivo; -, negativo;

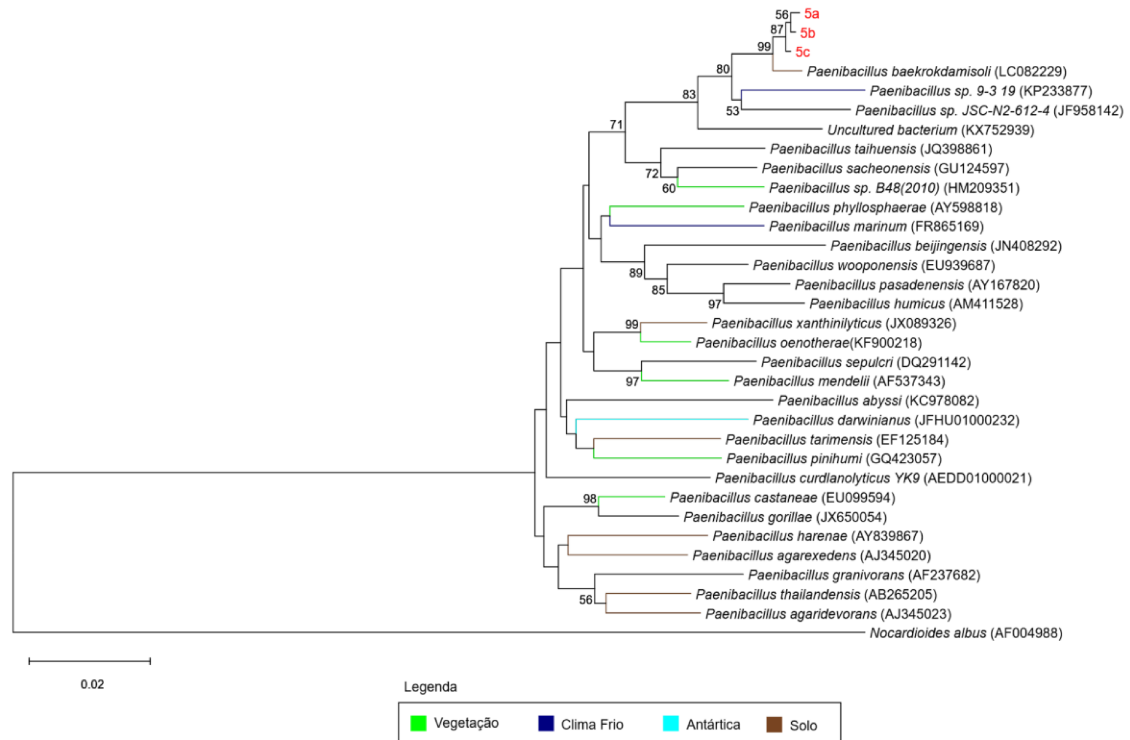
Fonte: Autor

4.4.3 Dendrograma dos isolados 5a, 5b e 5c

O dendrograma construída para os isolados 5a, 5b e 5c (Figura 6) foi produzida com base nos 33 vizinhos mais próximos recuperados por similaridade do gene 16S rRNA. O táxon mais próximo para as três amostras foram *Paenibacillus baekrodamisoli* (acesso LC082229), originalmente descrito a partir de solo de lago de cratera, seguido por *Paenibacillus sp. 9-3 19* (acesso KP233877), isolado de solo ártico, e *Paenibacillus sp. JSC-N2-612-4 (JF958142)*.

Entre os vizinhos incluídos na análise, observou-se predominância de espécies associadas a ambientes edáficos. Foram identificadas dez espécies provenientes de solos não polares, incluindo *Paenibacillus xanthinilyticus* (solo agrícola), *Paenibacillus tarimensis* (areia em Xinjiang, China), *Paenibacillus harenae* (areia de deserto), *Paenibacillus thailandensis* (solos da Tailândia), *Paenibacillus agarexedens* e *Paenibacillus agaridevorans* (ambas isoladas de solo na Alemanha), além de *Paenibacillus humicus* (composto orgânico derivado de resíduos), *Paenibacillus granivorans* (associado à degradação de amido), *Paenibacillus abyssi* (sedimento do Oceano Índico) e *Paenibacillus darwinianus* (solo antártico). Entre esses, destaca-se um representante proveniente especificamente de solo da Antártica, *P. darwinianus*. Essa prevalência de vizinhos isolados a partir de solos, indica proximidade dos isolados 5a, 5b e 5c com linhagens adaptadas a esse ambiente.

Figura 6. O dendrograma baseada no gene 16S rRNA do isolados bacterianos 5a, 5b e 5c obtidos a partir do gametófito. Os ramos foram coloridos de acordo com a origem ambiental das sequências, e os isolados em vermelho. Os números nos nós dos ramos são valores de *bootstrap*, expressos como porcentagens em 1000 réplicas.



Fonte: Autor

Foram também identificadas duas espécies associadas a ambientes frios ou condições extremas, incluindo *P. sp.* 9-3 19 (solo ártico) e *Paenibacillus marimum* (fonte termal no norte da Tunísia). Adicionalmente, cinco espécies estavam relacionadas a associações com plantas, incluindo *Paenibacillus phyllosphaerae* (filosfera de *Phoenix dactylifera*), *Paenibacillus oenotherae* (raízes de plantas herbáceas), *Paenibacillus mendelii* (sementes esterilizadas de *Pisum sativum*), *Paenibacillus pinihumi* (rizosfera de *Pinus densiflora*) e *Paenibacillus castaneae* (filosfera de *Castanea sativa*). Indicando que os isolados têm uma maior semelhança com espécies do solo do que aquelas isoladas de biomas frios, apesar disso, seus vizinhos frequentemente são associados a plantas, o que indica que tanto a associação a *S. uncinata* como o microambiente do solo, foram fatores de diferenciação mais importantes para esses isolados do que o bioma presente.

A caracterização fenotípica das amostras 5a, 5b e 5c (Tabela 4) revela distinções relevantes quando comparadas com as espécies filogeneticamente mais próximas, onde para as

amostras 5a e 5b foi observada colônias de coloração amarela e branca, respectivamente, ambas não apresentam motilidade, enquanto a amostra 5c forma colônias transparentes e apresenta motilidade positiva. Em contraste, *P. baekrokdamisoli* e *P. taihuensis* exibem colônias brancas e motilidade positiva. A ausência de motilidade nas amostras 5a e 5b constitui uma diferença fenotípica importante em relação às espécies de referência, ao passo que a motilidade observada em 5c aproxima esta amostra do perfil descrito para os vizinhos mais próximos.

Tabela 4. Propriedades fisiológicas da amostra 3a, 3ar e dos vizinhos mais próximos.

Característica	1	2	3	4	5
Cor da colônia	Amarelo	Branca	Transparente	Branca	Branca
Motilidade	-	-	+	+	+
Temperatura ótima (°C)	25*	25*	25*	25	30 – 37
pH ótima	5.5*	5.5*	5.5*	7	6 – 7
Origem das amostras	Rizosfera <i>s. uncinata</i>	Rizosfera <i>s. uncinata</i>	Rizosfera <i>s. uncinata</i>	solo	Lago Eutrofizado

* representa condições de cultivo empregadas e não resultado de temperatura ou pH ótimos. 1: 5a; 2: 5b; 3: 5c; 4: *Paenibacillus baekrokdamisoli*; 5: *Paenibacillus taihuensis*; +, positivo; -, negativo;

Fonte: Autor

Em termos fisiológicos, *P. baekrokdamisoli* apresenta temperatura de crescimento entre 10 e 30 °C e pH entre 6 e 9, enquanto *P. taihuensis* cresce entre 20 e 40 °C e pH 5 e 9 (LEE ET AL., 2016; ZHANG ET AL., 2011). Para as amostras 5a, 5ar e 5c, não foram determinados, até o momento, apresenta crescimento nos intervalos de temperatura e pH, o que limita comparações com seus vizinhos, assim como a determinação da espécie.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que, embora tenha sido possível isolar e cultivar bactérias associadas ao gametófito de *Sanionia uncinata* proveniente da Antártica, não foram recuperados representantes do filo *Acidobacteriota* nas condições experimentais empregadas. O crescimento restrito às placas inoculadas diretamente com o gametófito, aliado à ausência de

desenvolvimento de colônias nas diluições seriadas, sugere que a estratégia de isolamento pode não ter sido adequada para recuperar esses microrganismos. A utilização do meio VL-55 e incubação a 25 °C, embora fundamentada em evidências de microambientes mais quentes próximos aos tapetes de musgo, possivelmente favoreceu o crescimento de bactérias mais competitivas e metabolicamente versáteis, em detrimento de grupos oligotróficos ou psicrofílos estritos.

Apesar disso, as análises filogenéticas evidenciaram que os isolados apresentam maior proximidade com linhagens associadas a solos, ambientes frios e nichos vegetais, incluindo registros provenientes da própria Antártica, geleiras e solos polares, reforçando a coerência ecológica dos resultados e indicando que, apesar da não recuperação de *Acidobacteriota*, os microrganismos isolados são compatíveis com a microbiota previamente descrita para tapetes de musgos antárticos.

Dentre esses isolados, é possível inferir que estes pertencem a linhagens pouco representadas dentro dos bancos de dados, como *Lysinimonas* e *Pseudolysinimonas* que tiveram proximidade com o isolado 1b, representando uma possível nova espécie que pode contribuir para a compreensão desses gêneros. Além disso, os isolados derivados da placa 3 não tiveram proximidade molecular grande com a maioria das sequências representadas, possivelmente indicando que pertencem a uma espécie nova.

Contudo, como o gene 16S rRNA é insuficiente para delimitação precisa de espécie, especialmente em grupos próximos filogeneticamente; a confirmação taxonômica requer uma abordagem polifásica que inclua análises que vão além daqueles fenotípicos, a fim de obter uma caracterização mais completa dos isolados aqui descritos.

REFERÊNCIAS

- BLOCK, W.; LEWIS SMITH, R. I.; KENNEDY, A. D. Strategies of survival and resource exploitation in the Antarctic fellfield ecosystem. **Biological Reviews**, v. 84, n.3, p. 449-484, jul. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00084.x>
- BOTTOS, E. M.; SCARROW, J. W.; ARCHER, S. D. J.; MCDONALD, I. R.; CARY, S. C. Bacterial community structures of antarctic soils. In: **Antarctic Terrestrial Microbiology: Physical and Biological Properties of Antarctic Soils**. Berlin: *Springer*, 2014. cap. 2, p 9-33. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-45213-0_2
- CÂMARA, P. E. A. S.; CARVALHO-SILVA, M.; STECH, M. Antarctic bryophyte research—current state and future directions. **Bryophyte Diversity and Evolution**, v. 43, n. 1, p. 221–233, 2021. DOI: <https://doi.org/10.11646/bde.43.1.16>
- CÂMARA, P. E. A. S.; CONVEY, P.; RANGEL, S. B.; KONRATH, M.; BARRETO, C. C.; PINTO, O. H. B.; SILVA, M. C.; HENRIQUES, D. K.; DE OLIVEIRA, H. C.; ROSA, L. H. The largest moss carpet transplant in Antarctica and its bryosphere cryptic biodiversity. **Extremophiles**, v. 25, n. 4, p. 369–384, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00792-021-01235-y>
- CARY, S. C.; MCDONALD, I. R.; BARRETT, J. E.; COWAN, D. A. On the rocks: The microbiology of Antarctic Dry Valley soils. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, n. 1, p. 129-138, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2281>
- CHEN, Y. *et al.* The production of diverse brGDGTs by an Acidobacterium providing a physiological basis for paleoclimate proxies. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 337, p. 155-165, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gca.2022.08.033>
- CUI, S.; DU, J.; ZHU, L.; XIN, D.; XIN, Y.; ZHANG, J. Analysis of Microbial Diversity in South Shetland Islands and Antarctic Peninsula Soils Based on Illumina High-Throughput Sequencing and Cultivation-Dependent Techniques. **Microorganisms**, v. 11, n. 10, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102517>
- DE CASTRO, V. H. L.; SCHROEDER, L. F.; QUIRINO, B. F.; KRUGER, R. H.; BARRETO, C. C. Acidobacteria from oligotrophic soil from the Cerrado can grow in a wide range of carbon source concentrations. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 746-753, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0331>

DZIEMBOWSKI, M.; BIALIK, R. J. The Remotely and Directly Obtained Results of Glaciological Studies on King George Island: A Review. **Remote Sensing**, v. 14, n. 12, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/rs14122736>

EICHORST, S. A.; TROJAN, D.; ROUX, S.; HERBOLD, C.; RATTEI, T.; WOEBKEN, D. Genomic insights into the Acidobacteria reveal strategies for their success in terrestrial environments. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 1041-1063, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14043>

EKKERS, D.M.; CRETOIU, M.S.; KIELAK, A.M; ELSAS J. D. V. The great screen anomaly—a new frontier in product discovery through functional metagenomics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1005–1020, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3804-3>

GONÇALVES, O. S.; SANTANA, M. F. Uncovering the Secrets of Slow-Growing Bacteria in Tropical Savanna Soil Through Isolation and Genomic Analysis. **Microbial Ecology**, v. 86, n. 4, p. 2687–2702, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02275-x>

HEO, J.; CHO, H.; KIM, M. A.; HAMADA, M.; TAMURA, T.; SAITOU, S.; KIM, S. J.; KWON, S. W. *Protaetiibacter intestinalis* gen. nov., of the family microbacteriaceae, isolated from gut of *protaetia brevitarsis seulensis*, reclassification of *lysinimonas kribbensis* jang et al. 2013 as *pseudolysinimonas kribbensis* gen. nov., comb. nov. and emended description of the genus *lysinimonas* jang et al. 2013. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 2101-2107, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003444>

JANG, Y. H.; KIM, S. J.; TAMURA, T.; HAMADA, M.; WEON, H. Y.; SUZUKI, K. I.; KWON, S. W.; KIM, W. G. *Lysinimonas soli* gen. nov., sp. nov., isolated from soil, and reclassification of *Leifsonia kribbensis* Dastager et al. 2009 as *Lysinimonas kribbensis* sp. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt_4, p. 1403-1410, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijms.0.042945-0>

KALAM, S.; BASU, A.; AHMAD, I.; SAYYED, R. Z.; EL-ENSHASY, H. A.; DAILIN, D. J.; SURIANI, N. L. Recent Understanding of Soil Acidobacteria and Their Ecological Significance: A Critical Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 580024, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580024>

KIELAK, A. M.; BARRETO, C. C.; KOWALCHUK, G. A.; VAN VEEN, J. A.; KURAMAE, E. E. The ecology of Acidobacteria: Moving beyond genes and genomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00744>

KIM, I. G.; KASAHARA, Y.; WHANG, K. S. Phylogenetic Analysis of Bacterial Populations Found in Groundwater and an Acidic Stream Draining from an Abandoned Coal Mine. **Microbes and Environments**, v. 16, n. 3, p. 169-176, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1264/jsme2.2001.169>

KIM, S. J.; LIM, J. M.; AHN, J. H.; WEON, H. Y.; HAMADA, M.; SUZUKI, K. I.; AHN, T. Y.; KWON, S. W. Description of *Galbitalea soli* gen. nov., sp. nov., and *Frondihabitans suicola* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. Pt_2, p. 572-578, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.058339-0>

LEE, K. C.; KIM, K. K.; KIM, J. S.; KIM, D. S.; KO, S. H.; YANG, S. H.; LEE, J. S. *Paenibacillus baekrokdamisoli* sp. Nov., isolated from soil of crater lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1937-1942, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000968>

LO GIUDICE, A.; FANI, R. Cold-adapted bacteria from a coastal area of the Ross Sea (Terra Nova Bay, Antarctica): linking microbial ecology to biotechnology. **Hydrobiologia**, v. 761, p. 417–441, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2497-5>

MARIZCURRENA, J. J.; MOREL, M. A.; BRAÑA, V.; MORALES, D.; MARTINEZ-LÓPEZ, W.; CASTRO-SOWINSKI, S. Searching for novel photolyases in UVC-resistant Antarctic bacteria. **Extremophiles**, v. 21, n. 2, p. 409–418, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0914-y>

MCLEAN, L.; ROCK, J. The importance of Antarctica: assessing the values ascribed to Antarctica by its researchers to aid effective climate change communication. **Polar Journal**, v. 6, n. 2, p. 291-306, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/2154896X.2016.1241488>

MYERS, M. R.; KING, G. M. Isolation and characterization of *Acidobacterium ailaui* sp. Nov., a novel member of Acidobacteria subdivision 1, from a geothermally heated Hawaiian microbial mat. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5328-5335, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001516>

NAVARRETE, A. A.; BARRETO, C. C.; ARNALDO, M.; TSAI, S. M. Molecular detection on culture medium of Acidobacteria from Amazon soils. **Microbiology Discovery**, v. 1, p. 1, 2013. DOI: <https://doi.org/10.7243/2052-6180-1-1>

OCHYRA, R. **THE MOSS FLORA OF KING GEORGE ISLAND ANTARCTICA**. Cracovia, Polônia: Polish Academy of Sciences, 1998. ISBN 83-85444-60-2.

ORTIZ-RIVERO, J.; GARRIDO-BENAVENT, I.; HEIÐMARSSON, S.; DE LOS RÍOS, A. Moss and Liverwort Covers Structure Soil Bacterial and Fungal Communities Differently in the Icelandic Highlands. **Microbial Ecology**, v. 86, n. 3, p. 1893–1908, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02194-x>

OSHKIN, I. Y.; KULICHEVSKAYA, I. S.; RIJPSTRA, W. I. C.; DAMSTE, J. S. S.; RAKITIN, A. L.; RAVIN, N. V.; DEDYSH, S. N. *Granulicella sibirica* sp. Nov., a psychrotolerant acidobacterium isolated from an organic soil layer in forested tundra, West Siberia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1195–1201, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003290>

PARK, M.; LEE, H.; HONG, S. G.; KIM, O. S. Endophytic bacterial diversity of an Antarctic moss, *Sanionia uncinata*. **Antarctic Science**, v. 25, n. 1, p. 51–54, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0954102012000806>

PEREIRA, A. B.; SPIELMANN, A. A.; MARTINS, M. F. N.; FRANCELINO, M. R. Plant Communities From Ice-Free Areas Of Keller Peninsula, King George Island, Antarctica. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 1, p. 14–22, 2007. DOI: <https://doi.org/10.4257/oeco.2007.1101.02>

QIU, L.; CAO, L. Description of *Silvibacterium acidisoli* sp. nov. and *Edaphobacter albus* sp. nov. and a Proposal for Taxonomic Rearrangements Within the Family Acidobacteriaceae Based on Comparative Genome Analysis. **Taxonomy**, v. 5, n. 3, p. 40, 2025. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/taxonomy5030040>

RAWAT, S. R.; MÄNNISTÖ, M. K.; BROMBERG, Y.; HÄGGBLÖM, M. M. Comparative genomic and physiological analysis provides insights into the role of Acidobacteria in organic carbon utilization in Arctic tundra soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, n. 2, p. 341–355, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01381.x>

RAWAT, S. R.; MÄNNISTÖ, M. K.; STAROVOYTOV, V.; GOODWIN, L.; NOLAN, M.; HAUSER, L.; LAND, M.; DAVENPORT, K. W.; WOYKE, T.; HÄGGBLÖM, M. M. Complete genome sequence of *Granulicella tundricola* type strain MP5ACTX9T, an Acidobacteria from tundra soil. **Standards in Genomic Sciences**, v. 9, n. 3, 2013. DOI: <https://doi.org/10.4056/sigs.4648353>

RIZZO, C.; GIUDICE, A. Lo. The variety and inscrutability of polar environments as a resource of biotechnologically relevant molecules. **Microorganisms**, v.8, n. 1422, p. 449–461, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091422>

ROUSK, K. Biotic and abiotic controls of nitrogen fixation in cyanobacteria–moss associations. **New Phytologist**, v. 235, n. 4, p. 1330-1335, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.18264>

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**, v. 4, n. 11, p. 654-666, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00352.x>

TEIXEIRA, L. C. R. S.; PEIXOTO, R. S.; CURY, J. C.; SUL, W. J.; PELLIZARI, V. H.; TIEDJE, J.; ROSADO, A. S. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. **ISME Journal**, v. 4, n. 8, p. 989–1001, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.35>

TERAUDS, A.; CHOWN, S. L.; MORGAN, F.; PEAT, H. J.; WATTS, D. J.; KEYS, H.; CONVEY, P.; BERGSTROM, D. M. Conservation biogeography of the Antarctic. **Diversity and Distributions**, v. 18, n. 7, p. 726-741, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2012.00925.x>

TERAUDS, A.; LEE, J. R. Antarctic biogeography revisited: updating the Antarctic Conservation Biogeographic Regions. **Diversity and Distributions**, v. 22, n. 8, p. 836-840, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/ddi.12453>

VICTORIA, F. de C.; DE ALBUQUERQUE, M. P.; PEREIRA, A. B.; SIMAS, F. N. B.; SPIELMANN, A. A.; SCHAEFER, C. E. G. R. Characterization and mapping of plant communities at Hennequin Point, King George Island, Antarctica. **Polar Research**, v. 32, n. SUPPL., 2013. DOI: <https://doi.org/10.3402/polar.v32i0.19261>

WU, X.; LIU, P.; WEGNER, C. E.; LUO, Y.; XIAO, K. Q.; CUI, Z.; ZHANG, F.; LIESACK, W.; PENG, J. Deciphering microbial mechanisms underlying soil organic carbon storage in a wheat-maize rotation system. **Science of the Total Environment**, v. 788, p. 147798, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147798>

YERGEAU, E.; NEWSHAM, K. K.; PEARCE, D. A.; KOWALCHUK, G. A. Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 2670-2682, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01379.x>

ZHANG, D. C.; BUSSE, H. J.; LIU, H. C.; ZHOU, Y. G.; SCHINNER, F.; MARGESIN, R. *Sphingomonas glacialis* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from alpine glacier cryoconite. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 587-591, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.023135-0>

ZHANG, Q. M.; FU, J. C.; CHEN, Z. Q.; QIU, L. H. *Paracidobacterium acidisoli* gen. nov., sp. nov. and *Alloacidobacterium dinghuense* gen. nov., sp. nov., two acidobacteria isolated from forest soil, and reclassification of *Acidobacterium ailaui* and *Acidipila dinghuensis* as *Pseudacidobacterium ailaui* gen. nov., comb. nov. and *Silvibacterium dinghuense* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 72, n. 6, 2022.
DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005415>

APÊNDICE A

Sequências do gene do RNAr 16S dos isolados

>1b

GCCCGTGGACTCTGGGATAAGCGTTGGAAACGACGTCTAATACCGGATATGCGAC
GCGAAGGCATCTTCAGCGTCGGGAAAGAACTTCGGTCCAGGATCATCTCGCGGCC
TATCAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCCCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCC
TGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGC
GTGAGGGACGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAA
AGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGC
GGTTTGTCTCGCTCTGCTGTGAAAACCTGGAGGCTCAACCTCCAGCCTGCAGTGGGT
ACGGGCAAACCTAGAGTGCCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGG
AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTA
ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGNATACCCTGGT
AGTCCATGCCGTAAACGTTGGGAACTAGATGTGGGGGCCATTCCACGGCTTCCGT
GTCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTC
GATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCTGAAAAGGCTGGAA
ACAGTCTCCCCGCAAGGCAGGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTNGTTCTATGTTGCC
AGCGCGTTATGGCGGGAACCTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGG
TGGGGNTGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGTNTTGGGCTTCACGCNTGCTAC
AATGGCCGGTACAAAGGGCTGCAATACCGTAAGGTGGNGCGAATCCCCAAAAGC
CGGTCTCAGTTNGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTA
GTAATCGTGGATCAGCAACGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAN

>3a

ATCTACCCTTAGGTTTCGGAATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATGATG
ACGTAAGTCCAAAGATTTATCGCCTAGGGATGAGCCCGCGTAGGATTAGCTAGTT
GGTGTGGTAAAGGCGCACCAAGGCGACNATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGAT
CAGCCACACTGGGACTGAGACACGNCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
NAATATTGGACAATGGGCNAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAA

GGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCCGGGATGATAATGACAGTACCGGGAGA
ATAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGAGCTAGC
GTTATTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCTTTGTAAAGTAAGAGG
TGAAAGCCTGGTGCTCAACACCAGAACTGCCTTTTAGACTGCATCGCTTGAATCC
AGGAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAA
GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCCTCACTGGACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGA
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
GATAACTAGCTGTCGGGGCTCTTCGAGCTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGT
TATCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGGTTATAAACTTCAAATGAATTGACGGG
GGCCTGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGCAGAACCTT
ACCAGCGTTTGACATGTCCGGACGATTTCCGGGAGACCGATCTCTTCCCTTCGGGG
ACTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTTACCATCATTCAAGTTGGGGA
CTCTAAAGGAACCGCCGGTGATAAGCCGGAAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT
CCTCATGGCCCTTACGCGCTGGGCTACACACGTGCTACCAATGGCGGTGACAGTG
GGCAGCAATCCTGCAAGGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTG
TTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC
ATGCCGCGGTGAATACGTTCCCAGGCCTTGTACACACCGCCCGT

>3ar

GGAATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATGATGACGTAAGTCCAAAGA
TTTATCGCCTAGGGATGAGCCCGCGTAGGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAAGGCG
CACCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGG
GCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAA
AGCTCTTTTACCCGGGATGATAATGACAGTACCGGGAGAATAAGCTCCGGCTAAC
TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGAGCTAGCGTTATTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCTTTGTAAAGTAAGAGGTGAAAGCCTGGTGCTC
AACACCAGAACTGCCTTTTAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGA
ATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAA
GGCGGCTCACTGGACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCGGGG
CTCTTCGAGCTTCGGTGGCGCACCTAACGCATTAAGTTATCCGCCTGGGGAGTAC
GGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCTGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCGTTTGACATGTCCG

GACGATTTTCGGGAGACCGATCTCTTCCCTTCGGGGACTGGAACACAGGTGCTGCA
 TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
 ACCCTCGCCTTTAGTTACCATCATTCAAGTTGGGGACTCTAAAGGAACCGCCGGTG
 ATAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTTCATGGCCCTTACGCGCTG
 GGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGCAGCAATCCTGCAAGGGTG
 AGCTAATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCAT
 GAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
 CAGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA

>5a

TAACACGTAGGCAACCTGCCTACAAGATCGGGATAACATTCGGAAACGAATGCT
 AATACCGGATACACAACCTTGGCTGCATGGCCGAGTTGGGAAAGGCGGAGCAATC
 TGCCGCTTGTAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
 CCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGA
 CGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAA
 GCTCTGTTGCCAGGGAAGAACAGCGAGGAGAGTAACTGCTCCTCGTGTGACGGT
 ACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
 GGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCCTTGT
 AAGTCTAGTGTTTAATCTCGGAGCTCAACTCCGATTTCGCATTGGAAACTGCAAAG
 CTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTAAGTACGCTG
 AGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
 TAAACGATGAATGCTAGGTGGTTAGGGGTTTCAATACCCTTGGTGCCAAAGTTAA
 CACATTTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGA
 ATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC
 GAAGAACCTTACCAGCTCTTGACATCCCAATGAAAGTATTAGAGATAGTACCCCT
 CTTCGGAGCATTGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGA
 TGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCAGGTT
 AAGCTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
 ACGTCAAATCATCATGCCCTAATGAGCTGGGCTACACACGTACTACAATGGCCG
 GTACAACGGGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTCTCA
 GTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGC
 GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCAC

>5b

GTAACACGTAGGCAACCTGCCTACAAGATCGGGATAACATTTCGGAAACGNATGC
 TAATACCGGATACACAANTTGGCTGCATGGCNGAGTTGGGAAAGGCGGAGCAAT
 CTGCCGCTTGTAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC
 ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
 GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG
 ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTNTCGGATCGTAA
 AGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACAGCGAGGAGAGTAACTGCTCCTCGTGTGACGG
 TACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
 GGGGGCAAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCCTTG
 TAAGTCTAGTGTTTAATCTCGGAGCTCAACTCCGATTTCGCATTGGAACTGCAAA
 GCTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
 AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTAAGTACGCT
 AAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAATAATACCCTGGTAGTCCACGC
 CGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCAATACCCTTGGTGCCAAAGTTA
 ACACATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAACTCAAAGGA
 ATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC
 GAAGAACCTTACCAGCTCTTGACATCCCAATGAAAGTATTAGAGATAGTACCCCT
 CTTCCGAGCATTGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA
 TGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCAGGTT
 AAGCTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
 ACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGAGCTGGGCTACACACGTACTACAATGGCC
 GGTACAACGGGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTCTC
 AGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCG
 CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCA
 CACC

>5c

GTAACACGTAGGCAACCTGCCTACAAGATCGGGATAACATTTCGGAAACGNATGC
 TAATACCGGATACACAANTTGGCTGCATGGCNGAGTTGGGAAAGGCGGAGCAAT
 CTGCCGCTTGTAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC
 ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
 GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG
 ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTNTCGGATCGTAA
 AGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACAGCGAGGAGAGTAACTGCTCCTCGTGTGACGG
 TACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA

GGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCCTTG
TAAGTCTAGTGTTTAATCTCGGAGCTCAACTCCGATTCGCATTGGAAACTGCAAA
GCTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAA
AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTAACTGACGCT
GAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCAATANCCCTTGGTGCCGAAGTT
AACACATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGG
AATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTGGAAGCAACG
CGAAGAACCTTACCAGCTCTTGACATCCCAATGAAAGTATTAGAGATAGTACCCC
TCTTCGGAGCATTGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAG
ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCAGGT
TAAGCTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCCTTAATGAGCTGGGCTACACACGTACTACAATGG
CCGGTACAACGGGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTC
TCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAAT
CGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGT
C

APÊNDICE B
Taxonomia dos isolados

% semelhança 16S rRNA	86,9	90	87,6	87,3	87,7	87,4
Número de acesso do parente mais próximo	JN37 8395	AB2 8831 4	HQ7 6770 6	LC0 8222 9	LC0 8222 9	LC0 8222 9
Gênero	Lysi nimo nas*	Sphi ngo mon as	Sphi ngo mon as	Paen ibaci llus	Paen ibaci llus	Paen ibaci llus
Família	Micr obact eriac eae	Sphi ngo mon adac eae	Sphi ngo mon adac eae	Paen ibaci llace ae	Paen ibaci llace ae	Paen ibaci llace ae
Ordem	Micr ococ cales	Sphi ngo mon adale s	Sphi ngo mon adale s	Paen ibaci llales	Paen ibaci llales	Paen ibaci llales
Classe	Acti noba cteri a	Alph aprot eoba cteri a	Alph aprot eoba cteri a	Bacil li	Bacil li	Bacil li
Filo	Acti nom yceto ta	Pseu dom onad ota	Pseu dom onad ota	Bacil lota	Bacil lota	Bacil lota
Domínio	Bact eria	Bact eria	Bact eria	Bact eria	Bact eria	Bact eria
Isolado	1b	3a	3ar	5a	5b	5c