

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

GABRIELLY LORRANY INOCÊNCIO

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE DUAS CEPAS DE ACIDOBACTERIAS EM
MEIO COM QUITINA**

PATOS DE MINAS
JULHO DE 2026

GABRIELLY LORRANY INOCÊNCIO

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE DUAS CEPAS DE ACIDOBACTERIA EM
MEIO COM QUITINA**

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

PATOS DE MINAS
JULHO DE 2026

GABRIELLY LORRANY INOCÊNCIO

**Título: AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE DUAS CEPAS DE ACIDOBACTERIAS
EM MEIO COM QUITINA**

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:

Nome – Profa. Dra. Cristine Chaves Barreto – Universidade Federal de Uberlândia
Presidente

Nome – Prof. Dr. Gilvan Caetano Duarte – Universidade Federal de Uberlândia
Membro

Nome – Prof. Dr. Carlos Emanuel Vieira Flores Soares – Universidade de Brasília, UnB
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.

RESUMO

A quitina é o segundo polissacarídeo, mais abundante nos ecossistemas terrestres, estando presentes no exoesqueleto de crustáceos e insetos e na parede celular de fungos. Além de participar de processos essenciais para o meio ambiente, a quitina e seus derivados possuem diversas aplicações industriais. As quitinases são enzimas que promovem a degradação de quitina, sendo encontradas em plantas e microrganismos. Dentre eles estão as Acidobacterias, um filo bacteriano abundante e amplamente distribuído em solos do mundo todo, porém são consideradas de difícil cultivo e de lento crescimento. Embora não existam muitos estudos sobre as quitinases em Acidobacterias, as cepas AB 23 e AB60 isoladas do Cerrado possuem em seus genomas envolvidos na degradação enzimática de quitina. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento de duas cepas de Acidobacterias no meio contendo quitina como única fonte de carbono. Os dados apresentados corroboraram a hipótese inicial, visto que ambas as linhagens demonstraram capacidade de crescimento no meio avaliado, embora o desenvolvimento da cepa AB23 tenha sido mais discreto quando comparado ao da AB60. Contudo, observou-se a ausência de halo de degradação ao redor das colônias, mesmo após a aplicação de diferentes abordagens metodológicas, como técnicas de coloração, variação nas fontes de carbono e raspagem do meio de cultura. Diante disso, supõe-se que as enzimas quitinases estejam localizadas no espaço periplasmático dessas bactérias Gram-negativas, o que justificaria a não visualização dos halos. Como perspectiva futura, aponta-se a necessidade de realizar ensaios de extração de proteínas periplasmáticas, como o choque osmótico ou a lise bioquímica com lisozima e EDTA, para a confirmação da atividade enzimática e validação do potencial quitinolítico das cepas.

Palavras-chave: AB23, Quitinases, AB60, Cerrado

ABSTRACT

*Chitin is the second most abundant polysaccharide in terrestrial ecosystems, found in the exoskeletons of crustaceans and insects and in fungal cell walls. Beyond its role in essential environmental processes, chitin and its derivatives have various industrial applications. Chitinases are enzymes that promote chitin degradation and are found in plants and microorganisms. Among these microorganisms are the Acidobacterias, a bacterial phylum that is abundant and widely distributed in soils worldwide, though they are considered difficult to cultivate and slow growing. Although few studies exist regarding chitinases in Acidobacterias, strains AB23 and AB60 isolated from the Cerrado possess genes in their genomes involved in the enzymatic degradation of chitin. This study aimed to evaluate the growth of two *Acidobacteria* strains in a medium containing chitin as the sole carbon source. The data supported the initial hypothesis, as both strains demonstrated the ability to grow in the tested medium, although strain AB23 showed less pronounced growth compared to AB60. However, no degradation halo was observed around the colonies, even after employing various methodological approaches, such as staining techniques, varying carbon sources, and scraping the culture medium. Consequently, it is hypothesized that the chitinase enzymes are in the periplasmic space of these Gram-negative bacteria, which would explain the absence of visible halos. Future work should involve periplasmic protein extraction assays such as osmotic shock or biochemical lysis using lysozyme and EDTA to confirm enzymatic activity and validate the chitinolytic potential of the strains. Keywords: AB 23. Chitinases, AB60, Cerrado.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Referencial teórico.....	8
1.1.1 Quitina.....	8
1.1.2 As quitinases.....	9
1.1.4 Acidobacteria AB23	11
1.2 Hipótese.....	12
2. OBJETIVO	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. Material e Métodos.....	13
3.1 Meio de cultura.....	13
3.2 Preparação de quitina coloidal.....	14
3.3. Preparação do inóculo das bactérias.....	14
3.4. Testes de coloração de quitina coloidal.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5. CONCLUSÃO.....	21
Referências	23

1.INTRODUÇÃO

A quitina é um dos polímeros naturais mais abundantes na Terra. A quitina representa uma importante fonte de carbono e nitrogênio em diversos ecossistemas naturais, tendo um papel crucial tanto no ambiente quanto em aplicações industriais. Aplicações biotecnológicas vastas são atribuídas a esses biopolímeros; contudo, o uso é limitado pelo fato sua extração não ser realizada de maneira reprodutível ou sob condições econômicas viáveis. (RINAUDO,2006). Esse polímero encontra-se amplamente distribuído no meio ambiente, estando presente em exoesqueletos de artrópodes, paredes celulares de fungos e em outros materiais orgânicos (ISLAM *et al.*,2016). A quitina também é utilizada por microrganismos decompositores, por meio dos quais ocorre a degradação do material e a consequente reciclagem de nutrientes, o que contribui para a fertilidade do solo. No âmbito industrial, sua aplicação estende-se a vários setores; no segmento alimentício, por exemplo, o composto é empregado como conservante natural de alimentos, devido às suas propriedades antimicrobianas (ISLAM *et al.*,2016). A medicina também utiliza quitina e seus derivados em curativos, suturas absorvíveis e veiculadores de medicamentos (ISLAM *et al.*,2017), assim como a celulose e a queratina, é um polímero estrutural. Polímeros estruturais são fabricados a partir de monômeros menores, ou monossacarídeos, responsáveis pela formação de fibras fortes. Quando essas fibras são secretadas de maneira organizada no meio intracelular ou extracelular, ligações fracas são formadas entre si, o que confere maior resistência a toda a estrutura (RINAUDO,2006.).

Por ser um polímero resistente, a sua degradação é feita principalmente pela ação enzimática de quitinases que podem ser encontradas em bactérias, fungos e plantas. As quitinases têm a capacidade de hidrolisar a quitina transformando-a em outros compostos (HAMID R., et al 2013). Essa enzima com seu grande desempenho em processos ecológicos, como a decomposição da matéria orgânica e a defesa de plantas contra patógenos, é utilizada em várias biotecnológicas (DAS, S. *et al.*2024).

As acidobactérias pertencem a um dos filos bacterianos mais abundantes e amplamente distribuídos em solos do mundo todo, incluindo solos do Cerrado (PROCÓPIO e BARRETO, 2021). Embora sejam bastante comuns, muitas dessas espécies ainda são pouco conhecidas, principalmente porque existem poucos exemplares em meios de cultura. Dessa forma, são consideradas bactérias de difícil cultivo. O nosso grupo de pesquisa possui algumas Acidobactérias em cultivo sendo caracterizadas pelo crescimento lento, levando de duas a quatro semanas para formarem colônias em placas. Dentre essas está a Acidobacteria AB23

que, assim como outras acidobacterias, produz carotenoides e possui em seus genomas, muitos genes de enzimas que atuam em polissacarídeos. (PINTO, 2017) A degradação de hemicelulose já foi demonstrada, e a capacidade de degradação de celulose já foi estudada anteriormente (RODRIGUES *et al*, 2020). No entanto, a degradação de quitina ainda não foi demonstrada, apesar da presença de genes de quitinase em seu genoma. Dessa forma, o presente trabalho irá avaliar o crescimento da Acidobacteria AB23 em quitina coloidal, abrindo caminho para estudo da atividade desses genes.

Este trabalho segue a 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.*

1.1 Referencial teórico

1.1.1 Quitina

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante no meio ambiente após a celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos, insetos e das paredes celulares de fungos. No ambiente a quitina é utilizada principalmente como fonte de carbono após a ação de enzimática de quitinases, que promovem a decomposição e reciclagem de exoesqueletos dos animais mortos, evitando o acúmulo dos materiais nos ecossistemas. Como a quitina é formada pela ligação entre unidades de N-acetil-glicosamina é rica em ligações de carbono-nitrogênio, sendo esse polissacarídeo também parte do ciclo do nitrogênio (Figura 1).

A quitina caracteriza-se como um biopolímero estrutural amplamente distribuído em diversas espécies de invertebrados e insetos. Além de sua função biológica no meio ambiente, seus derivados, como a quitosana, apresentam grande interesse para o setor industrial (MOURA, C.M. *et al.* 2006). O processo de obtenção desse composto envolve a extração da quitina a partir de matrizes residuais, como exoesqueletos de crustáceos, seguida por um tratamento químico que promove sua conversão em quitosana. Devido às suas propriedades químicas, essa molécula encontra aplicações em setores que abrangem desde a indústria cosmética até estações de tratamento de efluentes. Dessa forma, coprodutos da atividade pesqueira, cujo destino convencional seriam os aterros sanitários, são valorizados e reaproveitados. Comumente, resíduos de camarão, caranguejo e lagosta são empregados como

as principais fontes de matéria-prima para essa rota biotecnológica.

Outro ponto importante é que a quitina garante sustentação e proteção mecânica aos organismos em que está presente. Sua estrutura permite a formação de ligações com proteínas e minerais, garantindo resistência e flexibilidade a exoesqueletos e paredes celulares. Além de sua importância biológica, características como biodegradabilidade e baixa toxicidade tornam esse biopolímero um material promissor para diversas aplicações na área de biotecnologia. (AZEVEDO *et al.*, 2007; BOAVA *et al.* 2010).

1.1.2 As quitinases

As quitinases são enzimas que conseguem hidrolisar a quitina um polissacarídeo estrutural composto por unidades de N-acetilglicosamina. Possuem peso molecular variado de 20 a 90 kilodaltons (kDa) e são produzidas por diferentes organismos, incluindo bactérias, fungos, nematoides, insetos, plantas, peixes e humanos (GOHEL *et al.*, 2006; HAMID R. *et al.*, 2013; ALEXANDRE, 2018).

Nas quitinases bacterianas, o domínio de ligação à quitina pode estar localizado tanto na região amino-terminal quanto nos domínios carboxi-terminal da enzima. A maioria das quitinases bacterianas isoladas e sequenciadas até o momento está incluída na família 18 das glicosil hidrolases, com exceção de uma quitinase (C-1) isolada de *Streptomyces griseus* HUT 6037, a qual pertence à família 19. As quitinases fúngicas, analogamente às bacterianas, apresentam múltiplas funções, desempenhando um papel importante na nutrição, morfogênese e nos processos de desenvolvimento fúngico, visto que a quitina constitui um componente majoritário da parede celular desses organismos (HAMID R. *et al.*, 2013).

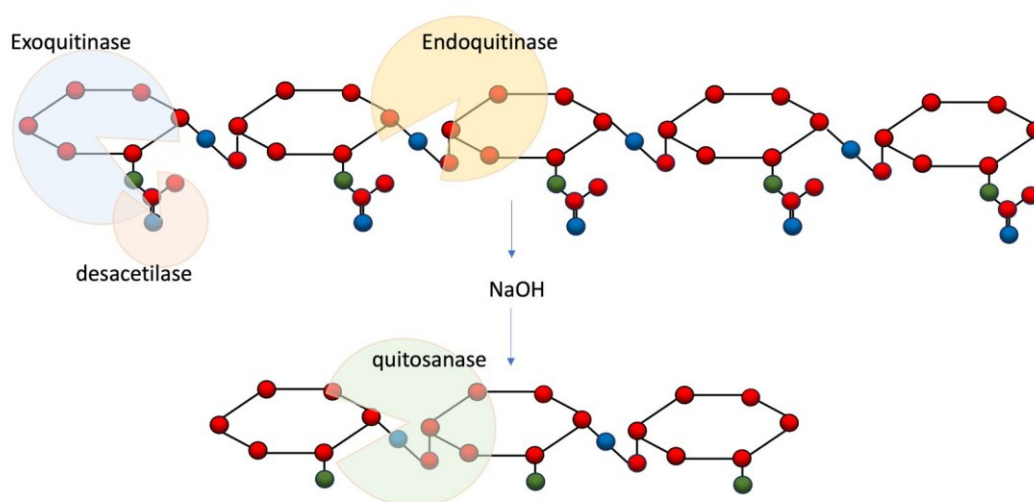
Nas plantas, as quitinases estão presentes de forma constitutiva em órgãos como caules, sementes, flores e tubérculos, apresentando regulação dependente do desenvolvimento e especificidade tecidual. Com base na análise de suas sequências de aminoácidos, essas enzimas vegetais são categorizadas em cinco ou seis classes. Em relação aos insetos, quitinases foram descritas em espécies como *Manduca sexta* e *Bombyx mori*, nas quais exercem funções essenciais como enzimas degradativas durante o processo de ecdise; nessa etapa, endoquitinases clivam aleatoriamente a cutícula em quitoooligossacarídeos, os quais são posteriormente hidrolisados por exoenzimas em N-acetilglicosamina (HAMID R. *et al.*, 2013).

Por fim, as quitinases em mamíferos podem ser divididas em proteínas semelhantes a quitinases (sem atividade enzimática) e verdadeiras quitinases enzimaticamente ativas (HAMID R. *et al.*, 2013).

Elas são divididas em dois grandes grupos endoquitinases que quebram a ligação no meio da cadeia de quitina e as exoquitinases que quebram a quitina nas extremidades da sua cadeia (Figura 1). Essas enzimas são encontradas em vários tipos de ecossistemas estando presentes em insetos, fungos, bactérias e plantas.

As endoquitinases quebram aleatoriamente as ligações β -1,4 da quitina liberando N-acetilglicosamina e outros oligômeros como quitobiose (ORNELA *et al.*, 2024). Já as exoquitinases (ALEXANDRE, 2018), são divididas em dois subgrupos: quitobiosidases, que clivam a quitina a partir da extremidade não redutora liberando diacetilquitobiose (dímero de N-acetilglicosamina); e 1-4- β -glicosaminidase, que clivam os oligômeros de quitina liberados pelas endoquitinases e quitobiosidases produzindo monômeros GlcNAc. Devido a essa capacidade de degradação, tais enzimas apresentam elevado potencial biotecnológico, com aplicações que vão desde o controle biológico de pragas agrícolas até o reaproveitamento de resíduos agroindustriais.

Figura 1. Esquema da ação enzimática de endoquitinases e quitosanases. Fonte: Cristina Barreto



1.1.3 Bactérias que degradam quitina

As bactérias quitinolíticas são bactérias que produzem a enzima quitinase, que é responsável por quebrar a quitina. Muitas dessas bactérias são encontradas em rios e mares, onde a quitina é o constituinte orgânico mais abundante no material esquelético de artrópodes, anelídeos e moluscos. Por isso as bactérias quitinolíticas são muito importantes nesse ecossistema promovendo a decomposição e reciclagem de carbono e nitrogênio, além de evitar

o acúmulo desse material orgânico nos ambientes aquáticos (SWIONTEK et al., 2014).

Sob essa perspectiva, o fluxo constante dessa degradação enzimática nos meios aquáticos não apenas sustenta o equilíbrio dos ecossistemas continentais e marinhos, como também evidencia a relevância taxonômica dessas linhagens na prospecção de biocatalisadores. Como a taxa de conversão do biopolímero impacta diretamente a disponibilidade de nutrientes primários para a microbiota local, o estudo de microrganismos com capacidade hidrolítica expressiva torna-se estratégico para a compreensão do processamento de resíduos quitinosos e para o desenvolvimento de rotas biotecnológicas sustentáveis (SWIONTEK et al., 2014).

No ambiente aquático, a dinâmica de degradação é conduzida predominantemente por populações bacterianas heterotróficas, apontadas como as principais mediadoras no fluxo de conversão da quitina (BEIER, S. et al, 2013). Essa prevalência é favorecida pela elevada disponibilidade do substrato nesses ecossistemas, decorrente da abundância de organismos que possuem quitina em suas estruturas corporais, como os crustáceos. Conforme destacam (BEIER, S. et al, 2013), tais microrganismos utilizam estratégias ecofisiológicas distintas, que variam desde a secreção de quitinases livres na coluna d'água até a colonização e formação de biofilmes sobre superfícies quitinosas insolúveis, garantindo a clivagem do polímero em oligômeros solúveis e monômeros assimiláveis. Esse processamento enzimático atua ativamente na manutenção dos ciclos biogeoquímicos marinhos e estuarinos, transformando a matéria orgânica recalcitrante em fontes energéticas diretamente acessíveis para toda a teia trófica local (BEIER, S. et al, 2013).

1.1.4 Acidobacteria

O primeiro isolado do filo Acidobacteria foi *Acidobacterium capsulatum*, obtido em 1987, mas foi com análises filogenéticas com o gene 16S rRNA que se descobriu que era o primeiro membro do filo Acidobacteria (KISHIMOTO, et al. 1991). Atualmente são reconhecidas 26 subdivisões com isolados obtidos de diferentes habitats (KIELAK et al., 2016).

Foram utilizadas as cepas de Acidobacteria AB23 e AB60, as quais foram isoladas de solo do Cerrado. A cepa AB23 foi inicialmente identificada como pertencente ao gênero *Occallatibacter* (PINTO et al., 2021), enquanto a AB60 foi sugerida como pertencente ao gênero *Telmatobacter* (RODRIGUES et al., 2020). Ambas as cepas tiveram seus genomas sequenciados (PINTO et al., 2021, RODRIGUES et al., 2020), o que revelou a presença de um gene de quitinase na cepa AB23, e dois genes de quitinase na cepa AB60.

Ambos os grupos bacterianos apresentam como obstáculo comum a baixa taxa de crescimento *in vitro*. Essa limitação no desenvolvimento celular também é observada em outros gêneros, como *Azospirillum*, verificando-se que tanto este quanto as acidobactérias compartilham o desafio da multiplicação lenta em meio de cultura, a qual é impulsionada por razões fisiológicas e metabólicas inteiramente distintas. A restrição na velocidade de divisão celular em *Azospirillum* encontra-se atrelada ao redirecionamento do fluxo energético, conforme detalhado por Giri *et al.* (2025). Por outro lado, o crescimento extremamente lento apresentado pelo filo Acidobacteria reflete a adaptação ao ecossistema edáfico como organismos oligotróficos estritos (estrategistas *K*). Desde a descrição de *Acidobacterium capsulatum* (KISHIMOTO *et al.*, 1991), é documentado que as 26 subdivisões do filo (KIELAK *et al.*, 2016) se adaptaram a ambientes caracterizados pela escassez de nutrientes de fácil assimilação.

Enquanto a multiplicação celular de *Azospirillum* é desacelerada para suportar o custo funcional da produção de *fitohormônios* e da fixação biológica de nitrogênio a partir de substratos simples, as *Acidobactérias* AB23 e AB60 exibem o crescimento lento como uma estratégia constitutiva. O rendimento energético gradativo proveniente da degradação de fontes complexas (como xilana e quitina) é priorizado por esses isolados para garantir a sobrevivência em solos ácidos e oligotróficos, desempenhando uma função indispensável na manutenção dos ecossistemas.

Nos últimos anos, pesquisas revelaram que as Acidobactérias desempenham papéis cruciais nos ecossistemas, principalmente na decomposição de matéria orgânica complexa, como celulose e quitina, contribuindo significativamente para os ciclos do carbono e do nitrogênio (KIELAK *et al.*, 2016).

1.2 Hipótese

As cepas de Acidobacteria AB23 e AB60 são capazes de crescer em meio de cultura utilizando quitina como única fonte de carbono

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o crescimento das cepas de Acidobacteria no meio contendo quitina como única fonte de carbono.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o crescimento das acidobacterias em diferentes concentrações de quitina coloidal (0,5% e 1% v:v) como única fonte de carbono.
- b) Avaliar o crescimento das acidobacterias com outros substratos de quitina
- c) Avaliar diferentes colorações de quitina para visualização de halos de degradação promovidos por quitinases.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meio de cultura

O meio cultura utilizado foi VL- 55 (SAIT. *et al*,2002) que é um meio quimicamente definido que inclui: uma fonte de carbono (xilana ou quitina coloidal), sais minerais e vitaminas essenciais para o crescimento de Acidobacteria. O meio VL-55 possuiu MES como tampão que manteve o pH 5,5 que é essencial para seu crescimento. A composição do meio VL-55 consistiu em uma solução de sais contendo 0,4 mM de $MgSO_4$; 0,4 mM de $(NH_4)_2HPO_4$ e 0,6 mM de $CaCl_2$. Adiciona-se à essa solução 3,9 g/L de MES, 2 mL de solução de vitaminas de Wolfe, 2 mL de solução de elementos-traço e 2 mL de solução de tungstato/selenito. A composição de cada uma dessas soluções foi detalhada em (Castro, 2012). O experimento controle foi obtido utilizando o meio VL-55 contendo 0,05% de xilana como fonte de carbono, visto que foi nessa fonte de carbono que a bactéria AB23 foi mantida.

O crescimento da cepa AB23 foi inicialmente avaliado em quitina coloidal 1% (m:v) e 0,5% (p:v) como única fonte de carbono, a seguir foram avaliadas e combinações com outras fontes de carbono: 0,05% de extrato de levedura(m:v) e 0,05% de N-acetil glicosamina (NAG) (m:v). O crescimento em quitosana, como única fonte de carbono nas concentrações de 1,25% e 0,125%.

As cepas AB23 e AB60 tiveram seu crescimento avaliado em meio VL-55 contendo quitina como fonte de carbono sendo utilizada quitina coloidal comparando-se as

concentrações de 1% (m:v) e 0,5% (m:v). Foram avaliadas também a quitina obtida de micélio de fungos (GLENTHAN LIFE SCIENCES) 0,5% (m:v), quitina azure (SIGMA) 0,5% (m:v) como única fonte de carbono. Em todos os casos, foram utilizados meios de cultura solidificados com 1,5% de ágar nobre. No estudo dessas duas cepas, a manutenção foi realizada em xilana como única fonte de carbono, polissacarídeo que se mostrou preferencial para o crescimento desses microrganismos.

3.2 Preparação de quitina coloidal

A quitina coloidal será preparada a partir de quitina de casca de camarão (SIGMA) de acordo com o método de (Skujins *et al.* 1965). O processo inicia-se adicionando 0,5 g de quitina comercial a 60 mL de ácido clorídrico (HCl), mantendo-se sob agitação constante por 2 horas em capela de exaustão, para garantir segurança. Após essa etapa procede-se a filtração em lã de vidro para remover resíduos sólidos. A quitina coloidal é precipitada pela adição de 200 mL de etanol a 50%. A seguir, realiza-se a neutralização do pH do filtrado por meio de lavagens com água destilada usando-se centrifugação a 5.000 x G por 20 min até o líquido atingir o pH 7,0, avaliado por papel indicador de pH. Ao final obtém-se a quitina coloidal em forma de um gel branco, sendo armazenada em geladeira a 4 °C.

3.3. Preparação do inóculo das bactérias

Para preparar os inóculos das bactérias utilizamos placas a partir de colônias de crescimento de quatro semanas em meio VL-55 contendo xilana como fonte de carbono. Essas placas foram incubadas com 1 mL de solução de sais e as bactérias foram dispersa com auxílio de uma alça de Drigalski. Essa suspensão bacteriana foi adicionada em um microtubo tipo Eppendorf de 1,5 mL e utilizada para o inóculo. O inóculo foi então dispersada em placas de Petri contendo quitina ou xilana (controle positivo) como fonte de carbono, o crescimento foi avaliado após 4 semanas de crescimento a 28 °C.

3.4. Testes de coloração de quitina coloidal

Para observar o halo de degradação em ensaios de atividade hidrolítica, utilizamos uma solução de *congo red* (Sigma) em 0,1%(m:v). Foram adicionados 1 mL da solução de *congo red* na superfície da placa de Petri já preparada com meio de cultura, por 20 minutos, depois foi realizada uma lavagem com uma solução salina NaCl 0,9% (m:v) e deixamos secar para observar melhor. Outros corantes que usamos foram o lugol 0,1%(m:v) e calcofluor

0,01%(m:v). O método utilizado para ambos os corantes foi semelhante ao desenvolvido para o *congo red*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi avaliado o crescimento da cepa AB23 em quitina coloidal 1%, quitosana 1,25% e o controle negativo, representado pelo um meio VL-55 sem a fonte de carbono. Porém, não foi observado crescimento nas condições proposta, a não ser no controle positivo contendo xilana 0,05% como única fonte de carbono. A placa de Petri com 1,25% de quitosana ficou naturalmente escurecida, e mesmo com concentração de quitosana reduzida, não houve um crescimento. Esse resultado pode ser explicado devido à ação antibactericida da quitosana mesmo na menor concentração conforme (AYALA V. G *et al.*, 2015). A atividade antibacteriana da quitosana é atribuída à interação estabelecida entre seus grupos amino carregados positivamente e a membrana celular bacteriana de carga negativa. Por meio dessa ligação, a permeabilidade da membrana é alterada, o que ocasiona o extravasamento do conteúdo intracelular e a inibição da síntese de macromoléculas, resultando na inviabilização do microorganismo mesmo em baixas concentrações do polímero (AYALA V. G *et al.*, 2015).

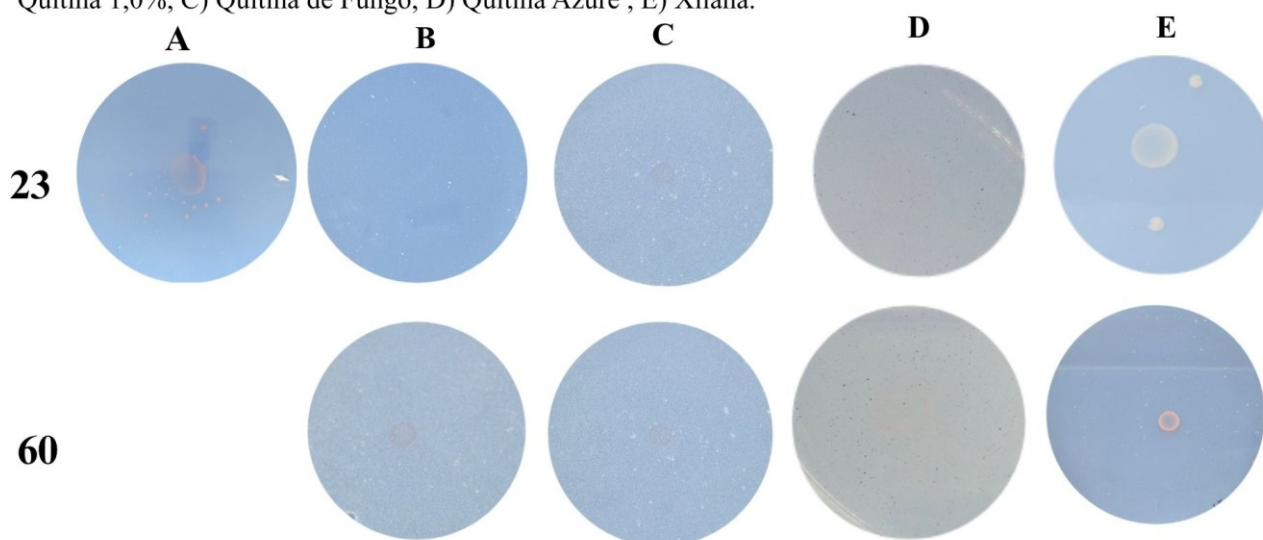
Diante da ausência de crescimento no experimento inicial, a concentração de quitina coloidal foi reduzida para 0,5% (m:v), visto que a referida cepa é mantida em meio de cultura com baixa concentração de carbono (CASTRO *et al.*, 2013). No trabalho citado, foram testadas concentrações crescentes dos polissacarídeos: carboximetilcelulose (CMC), xilana e quitina coloidal.

O experimento envolvendo a quitina foi iniciado com a concentração de 0,05%, sendo esta elevada gradualmente para 0,2% e, posteriormente, para 0,4%. Constatou-se que a linhagem AB23 teve seu crescimento diminuído na concentração de 0,4% (CASTRO *et al.*, 2013). No presente estudo, ao se reduzir a concentração para 0,5%, constatou-se crescimento da cepa AB23 sendo comparável ao resultado obtido pelo autor anterior (Figura 2 B). No estudo de Castro *et al.* (2013) a linhagem AB60 exibiu um aumento gradual de crescimento à medida que as concentrações do polímero eram elevadas. Em comparação com o presente estudo, comprovou-se que, com o aumento da concentração de quitina coloidal para 1,0 %, houve o crescimento da cepa AB60 (Figura 2B). Esse resultado está de acordo com ensaios genômicos anteriores que revelaram presença de um gene de quitinase para a cepa AB23 e dois genes para

a cepa AB60 (Cristine Barreto, comunicação pessoal).

A cepa AB23 apresentou crescimento fraco em meio contendo quitina na concentração de 0,5% de quitina coloidal como fonte de carbono, indicando potencial utilização deste polímero pelas bactérias (Figura 2 A e 2B). A redução da concentração de quitina para 0,05 % como se usa em meio VL-55 não foi avaliada, pois nesta concentração o meio de cultura perde a turbidez e não seria possível observar halos de degradação. A avaliação do efeito de outros substratos de quitina foi realizada nas duas cepas (AB23 e AB60) e demonstrou que as duas cepas foram capazes de crescer tanto em quitina originada de fungos quanto em quitina azure, porém não foi observado halo de degradação ao redor da colônia (Figura 2 C e 2D).

Figura 2. Crescimento de *Acidobacteria* em meio VL- 55 contendo diferentes substratos de quitina como unica fonte de carbono cepas em meio VL-55 utilizando distintas fontes de carbono. A) Quitina 0,5%, B) Quitina 1,0%, C) Quitina de Fungo, D) Quitina Azure , E) Xilana.



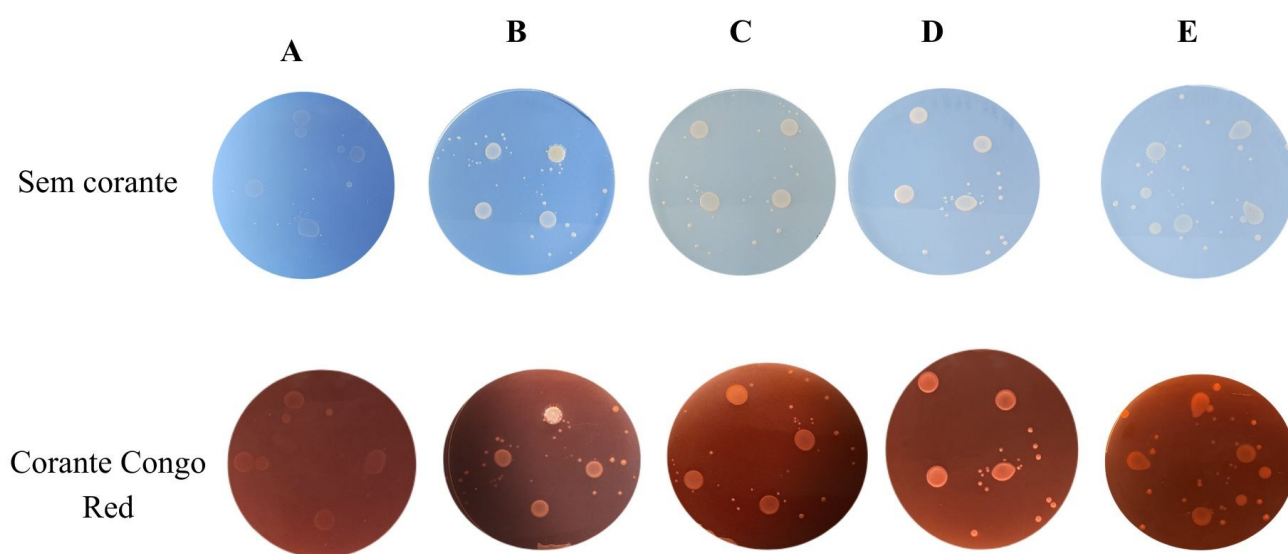
Como os genomas de AB23 (PINTO *et al.*, 2021) e AB60 (RODRIGUES *et al.*, 2020) já foram sequenciados, essa divergência na degradação de diferentes polissacarídeos sugere uma variação na regulação e secreção das quitinases. Os resultados sugerem que pode haver variação na secreção das enzimas quitinases entre os isolados e as duas cepas analisadas, mesmo quando submetidas a condições de cultivo semelhantes.

Alternativamente, essa diferença entre as cepas pode ter sido causada por variações na regulação da expressão gênica ou à presença predominante de classes específicas de enzimas quitinases. Portanto, os resultados observados no trabalho, em comparação a outros autores evidenciaram que a simples presença do gene não garante uma expressão fenotípica idêntica,

sendo a eficiência de secreção e a estabilidade extracelular da enzima, possíveis fatores limitantes do processo. Esse cenário dinâmico reforça a necessidade de se realizar uma caracterização molecular quantitativa, como a análise de expressão gênica por RT-qPCR.

A seguir foram avaliadas outras fontes de carbono combinadas com quitina, visando promover o crescimento e a observação de halos de degradação pelas cepas. Foi observado crescimento em todos os tratamentos (Figura 3), contudo, não foi detectado halo, mesmo quando se utilizou fonte adicional de carbono como NAG ou extrato de levedura (Figura 3). Em estudo anterior, (GONFA *et al.*, 2023) observou a formação de halos de degradação em 29 isolados bacterianos com atividade quitinolítica obtidos de amostras de solo das margens de um rio em Ambo, na Etiópia, dos quais nove apresentaram forte atividade enzimática. Comparando-se os resultados, o estudo referenciado exibiu halos amplos e nitidamente visíveis nas placas de cultivo.

Figura 3. Crescimento de AB23 em meio VL-55 com diferentes fontes de carbono, coradas com vermelho de Congo. A) Quitina 0,5%, B) Quitina 0,5% + Nag, C) Quitina 0,5% + Extrato de Levedura, D) N-acetilglicosamina (NAG) e E) Xilana.



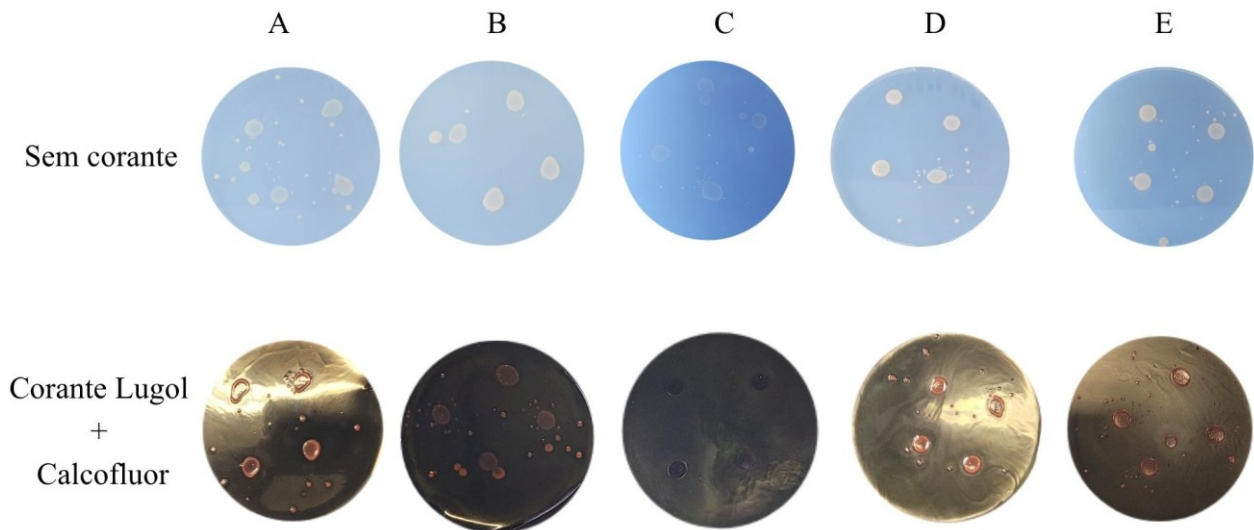
Nesses ensaios, a fonte de carbono utilizada foi idêntica a do presente trabalho, porém em uma concentração de 1% (m:v). Essa divergência evidencia uma disparidade significativa, visto que, apesar de os meios de cultura diferirem em sua composição geral, a fonte de carbono permaneceu a mesma e, ainda assim, não se obteve a formação de halo de degradação no presente ensaio.

Para evidenciar o halo de degradação nas placas foi inicialmente avaliado o corante vermelho Congo (*Congo Red*) na concentração de 0,1%(m:v) que permitiu melhor visualização

das regiões de crescimento microbiano (Figura 4), mesmo assim não foram observados halos de degradação. O trabalho de (KRITHIKA, S. et al, CHELLARAM, 2016) evidenciou, a aplicação do corante vermelho Congo para visualizar evidenciou a presença de halos de degradação. No referido estudo, foram utilizadas bactérias produtoras de quitinase isoladas de resíduos marinhos e de solos costeiros da região de Chennai (Índia). Após a revelação, o meio de cultura adquiriu coloração vermelha, enquanto os halos de degradação apresentaram um aspecto amarelado, confirmando a atividade enzimática. Em contrapartida, no presente trabalho, embora as placas tenham ficado completamente vermelhas após a coloração, não foi possível observar a formação de halos de degradação, o que tornou necessária a busca por outros métodos para a detecção dessa atividade em meio sólido.

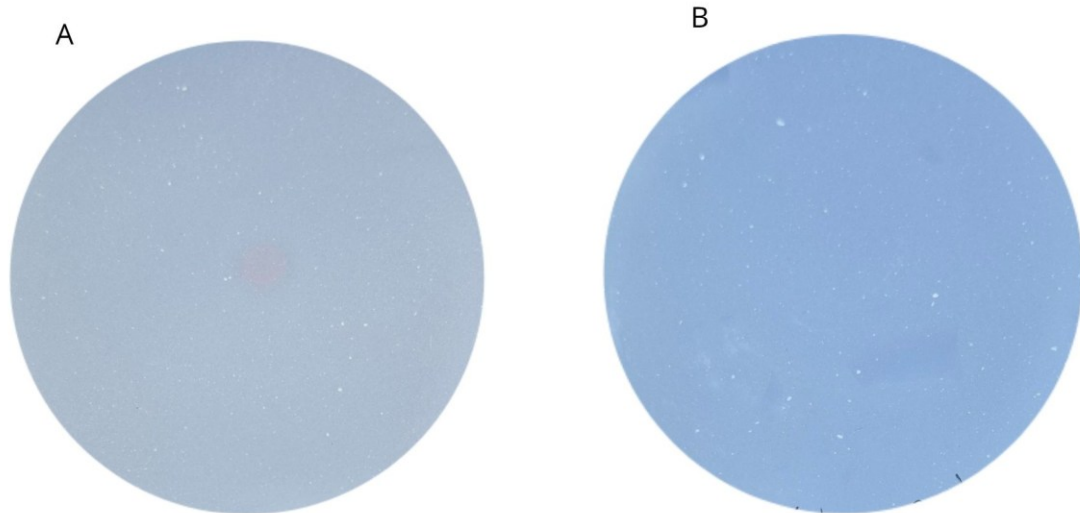
Dessa forma, outros corantes foram utilizados como o lugol e Calcofluor. O corante Calcofluor foi utilizado nos ensaios em placa devido à sua capacidade de ligação específica ao polímero de quitina, sem interagir com os outros componentes do meio de cultura, emitindo fluorescência quando exposto à luz ultravioleta (UV). A solução de Lugol atua tingindo quimicamente o meio de cultura, permitindo a visualização de contraste para os halos de degradação. Como não há ligações glicosídicas α nessas regiões específicas para gerar o complexo azul-escuro, a placa inteira absorve a cor natural do Lugol, exceto nas áreas de degradação, o que permite a visualização clara dos halos. Esse comportamento do Lugol no meio de cultura também foi observado no estudo de (KOTB. *et al*, 2023), no qual se demonstrou a eficiência do reagente para revelar as zonas de atividade enzimática. Esses corantes também não foram capazes de mostrar a presença de halo, e ao longo do tempo desse experimento as placas foram ficando pretas impedindo a observação das colônias (Figura 4)

Figura 4. Crescimento de AB23 em meio VL-55 com diferentes fontes de carbono, coradas com Lugol e calcofluor. A) Xilana B) Quitina 0,5% + Nag, C) Quitina 0,5% , D) N-acetilglicosamina (Nag) e E) Quitina 0,5% + Extrato de Levedura.



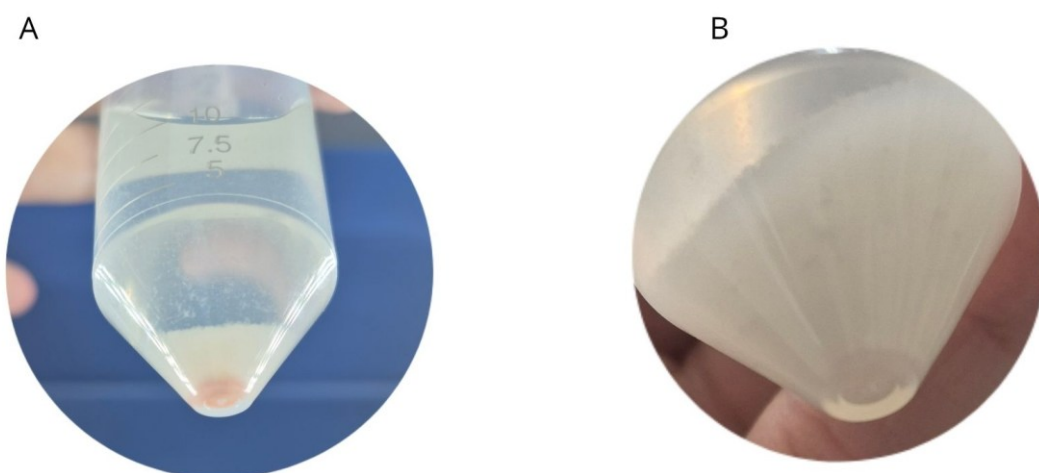
Apesar da utilização de diferentes métodos de coloração e da variação nas fontes de carbono, não foi possível observar visualmente a formação de halos de degradação. Embora os estudos prévios com as cepas AB23 (PINTO, 2017) e AB60 (RODRIGUES *et al*, 2020) comprovem o potencial genético para a produção de enzimas quitinases, tal atividade não foi evidenciada macroscopicamente no presente ensaio. No entanto, o crescimento bacteriano no meio de cultura contendo quitina sugere a ocorrência de consumo basal do polímero. É possível que as colônias absorvam uma quantidade mínima de substrato diretamente abaixo da biomassa, resultando em uma hidrólise de baixa intensidade. A ausência de halos visíveis persistiu mesmo após a raspagem das colônias para a análise da superfície do ágar subjacente, reforçando a hipótese de uma atividade catalítica estritamente localizada e de fraca magnitude. (Figura 5).

Figura 5. Cepa AB23 em meio de cultura VL55 fonte de carbono quitina coloidal. À esquerda (A), observa-se o crescimento colonial sobre o meio. À direita (B), a colônia foi removida por raspagem para a verificação do halo de degradação da quitina coloidal.



Por fim, realizou-se o cultivo das linhagens AB23 e AB60 em meio de cultura líquido VL55, utilizando a quitina coloidal como única fonte de carbono. Após a inoculação, os frascos foram mantidos sob condições de iluminação para o desenvolvimento bacteriano. Constatou-se um excelente crescimento da linhagem AB23 sob essas condições; a biomassa celular acumulou-se predominantemente no fundo do frasco e apresentou uma coloração avermelhada característica, induzida pela exposição à luz (Figura 6). No frasco contendo a linhagem AB60, também foi verificado crescimento; contudo, devido à insolubilidade natural do polímero de quitina, o meio de cultura líquido manteve um aspecto turvo.

Figura 6. Crescimento das cepas AB23 e AB60 em meio líquido com quitina como fonte de carbono e energia. (A) Linhagem AB23 (B) Linhagem AB60.



O crescimento satisfatório das linhagens AB23 e AB60 em meio líquido, contrastando com a ausência de halo de degradação visível no ensaio em placa demonstrar anteriormente para a linhagem AB23, pode ser atribuído à dinâmica do cultivo submerso. O estudo de (BALDONI, 2016) detalha a triagem de bactérias e fungos de solo por meio do cultivo em meio líquido suplementado com quitina coloidal, demonstrando a eficiência desse sistema para induzir a produção de enzimas. Esses dados reforçam que diversos microrganismos apresentam um desenvolvimento otimizado em sistemas líquidos. Portanto, o cultivo submerso consolida-se como uma metodologia amplamente utilizada para que isolados bacterianos expressem seu potencial metabólico e de crescimento, o que pôde ser confirmado no presente estudo, onde ambas as linhagens demonstraram alta afinidade por esse sistema de cultivo.

Considerando os resultados apresentados, supõe-se que as enzimas quitinases estejam localizadas no espaço periplasmático região situada entre a membrana plasmática interna e a membrana externa em bactérias Gram-negativas, o que justificaria a impossibilidade de observação dos halos nas placas.

Essa teoria já foi demonstrada por (CAMPOS, 2026) utilizando-se a cepa 23, a mesma linhagem bacteriana empregada como objeto de análise no presente estudo. Na referida pesquisa, utilizou-se a xilana como principal fonte de carbono para a indução e detecção das enzimas xilanases. A localização e a atividade enzimática foram devidamente evidenciadas e quantificadas por meio de ensaios experimentais específicos, consolidando-se a viabilidade e a eficiência dessa cepa no processo de degradação desse substrato.

Caso essa hipótese seja confirmada, ensaios adicionais deverão ser realizados para a extração dessas enzimas, com o objetivo de romper ou permeabilizar apenas a membrana externa, mantendo a membrana plasmática interna intacta. Como exemplo, cita-se o choque osmótico (Método de Neu e Heppel), que utiliza a diferença de pressão osmótica para o rompimento da membrana externa, ou o método de lise bioquímica com lisozima e EDTA, caracterizado como uma alternativa química controlada para a degradação da parede celular. A confirmação dessa localização celular não apenas esclarecerá a ausência de halos nas placas, mas também fornecerá subsídios essenciais para o direcionamento de futuros processos de purificação e caracterização biotecnológica das enzimas produzidas pelas cepas AB23 e AB60.

6. CONCLUSÃO

Diante dos dados apresentados, conclui-se que a hipótese inicial foi corroborada, visto que as cepas AB23 e AB60 demonstraram crescimento utilizando exclusivamente a quitina como fonte de carbono e energia. Embora o crescimento da cepa AB23 tenha sido mais discreto

quando comparado ao da cepa AB60, o principal desafio observado neste estudo foi a ausência de halo de degradação para detecção da atividade quitinolítica. Mesmo com a realização de diferentes abordagens metodológicas não foi possível a visualização do referido halo. Como essas bactérias são gram negativas, os resultados indicam que essas enzimas possam estar localizadas no espaço periplasmático e não sejam secretadas em condições de crescimento em placa. O crescimento em meio líquido apresenta então uma boa oportunidade para purificação e demonstração da atividade quitinolítica dessas duas cepas de *Acidobacteria*.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, A. R. S. Bioprospecção de bactérias quitinolíticas e caracterização da atividade da enzima quitinase. 2018. 48 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.

AYALA V. G *et al.* Efeito antimicrobiano do quitosano: uma revisão da literatura. **Scientia Agroalimentaria**, v. 2, 2015. Disponível em: <https://revistas.ut.edu.co/index.php/scientiaagro/article/view/743>.

AZEVEDO, V. V. C. *et al.* Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34. 2007.

BALDONI, D. B. **Prospection of chitinolytic fungi and chitinase production in solid state fermentation**. 2016. 84 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

BEIER, S. *et al.* Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 149, 2013. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00149>

BOAVA, L. P. *et al.* Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 168–172, abr. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052010000200012>

CAMPOS, G. B. **Avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono na produção de xilanase por acidobactérias**. 2026. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Campus Patos de Minas, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2026.

CASTRO, V. H *et al.* 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, nov. 2013. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0331>

CHELLARAM, S. K. C. Isolation, screening, and characterization of chitinase producing bacteria from marine wastes. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, p. Vol 8, Edição 5, 34-36, 15 mar. 2015.

DAS, S. *et al.* Chitinolytic microorganisms for biological control of plant pathogens: A Comprehensive review and meta-analysis. **Crop Protection (Guildford, Surrey)**, v. 185, n. 106888, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2024.106888>

GIRI, B. R *et al.* Unveiling the molecular mechanism of Azospirillum in plant growth promotion. **Bacteria**, v. 4, n. 3, p. 36, 2025. <https://doi.org/10.3390/bacteria4030036>

GOHEL, V. *et al.* Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. **African Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.54-72, 2006.

GONFA, T. G. *et al.* Isolation, screening, and identification of chitinase-producing bacterial strains from riverbank soils at Ambo, Western Ethiopia **Heliyon**, v. 9, n. 11, p. e21643, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21643>

HAMID, R. *et al.* Chitinases: An update. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 21–29, 2013. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.106559>

ISLAM, S. *et al.* Chitin and chitosan: Structure, properties and applications in biomedical engineering. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 25, n. 3, p. 854–866, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10924-016-0865-5>

KIELAK, A. M. *et al.* The Ecology of Acidobacteria: Moving beyond Genes and Genomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 744, 2016.

KISHIMOTO, N.; *et al.* *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: An acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment. **Current Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 1–7, 1991. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00744>

KOTB, E. *et al.* Screening for chitin degrading bacteria in the environment of Saudi Arabia and characterization of the most potent chitinase from *Streptomyces variabilis* Am1. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 11723, 2023.

MOURA, C. M. *et al.* Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. **VETOR - Revista de Ciências Exatas e Engenharias**, v. 16, n. 1, p. 37–45, 2007. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38876-2>

ORNELA, P. H.; *et al.* Purification, characterization and antifungal activity of the *Aspergillus niveus* chitinase produced using shrimp shells. **Applied Biosciences**, v. 3, n. 2, p. 220–232, 2024. <https://doi.org/10.3390/applbiosci3020015>

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, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01548-z>

PINTO, O. H. B. *et al.* Soil Acidobacteria strain AB23 resistance to oxidative stress through production of carotenoids. **Microbial Ecology**, v. 81, n., p.169-179, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01548-z>

PROCÓPIO, L.; B., C. *et al.* The soil microbiomes of the Brazilian Cerrado. *Journal of Soils and Sediments*, v. 21, n. 6, p. 2327–2342, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11368-021-02936-9>

RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>

RODRIGUES, G. R. *et al.* Unraveling the xylanolytic potential of Acidobacteria bacterium AB60 from Cerrado soils. **Carta de Microbiologia da FEMS**, v. 367, n. 18, 2020. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa149>

SAIT, M. *et al.* 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. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00352.x>

SKUJINS, J *et al.* Dissolution of fungal cell walls by a streptomycete chitinase and β -(1→3) glucanase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 111, n. 2, p. 358-364, 1965. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(65\)90197-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(65)90197-9)

SWIONTEK *et al.*, M. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. **Current Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 71-81, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0440-4>