

**Roberto Guardatti Gambine Moreira**

Isolamento e identificação microscópica e molecular de actinobactéria componente de consórcio microbiano termofílico quimiolitotrófico obtido do solo



**Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
DEZEMBRO / 2018**

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Alexandre Soares Rosado e coorientação de Yuri Pinheiro Alves de Souza**

## FICHA CATALOGRÁFICA

M827i      Moreira, Roberto Guardatti Gambine  
Isolamento e identificação microscópica e  
molecular de actinobactéria componente de consórcio  
microbiano termofílico quimiolitoautotrófico obtido  
do solo / Roberto Guardatti Gambine Moreira. -- Rio  
de Janeiro, 2018.  
74 f.

Orientador: Alexandre Soares Rosado.  
Coorientador: Yuri Pinheiro Alves de Souza.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2018.

1. Actinobactéria. 2. Isolamento. 3. Cultura  
Axênica. 4. Extremófilo. 5. Quimiolitoautotrófico. I.  
Rosado, Alexandre Soares, orient. II. Souza, Yuri  
Pinheiro Alves de , coorient. III. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ  
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO  
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E  
IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Roberto Guardatti Gambine Moreira**  
DRE: 115088080

BANCA EXAMINADORA: Profa. Selma Soares de Oliveira (Presidente)  
Dr. Rubens Nobumoto Akamine  
Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius  
Profa. Fernanda de Ávila Abreu (Suplente)

Título da Monografia: **"Isolamento e identificação microscópica e molecular de actinobactéria componente de consórcio microbiano termofílico quimiolitotrófico obtido do solo"**

Local: **Sala de Reunião do Departamento de Microbiologia Geral / Instituto de Microbiologia Paulo de Góes / CCS / UFRJ**

Data e hora de início: **6 de dezembro de 2018 às 15:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 6 de dezembro de 2018.

NOTA

10

10

10

\_\_\_\_\_

Banca Examinadora:

Selma Soares de Oliveira  
Profa. Selma Soares de Oliveira

Dr. Rubens Nobumoto Akamine  
Dr. Rubens Nobumoto Akamine

Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius  
Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius

\_\_\_\_\_  
Profa. Fernanda de Ávila Abreu

Aluno:

Roberto GG Moreira  
Roberto Guardatti Gambine Moreira

Orientador:

Prof. Alexandre Soares Rosado  
Prof. Alexandre Soares Rosado

Coorientador:

\_\_\_\_\_  
MSc. Yuri Pinheiro Alves de Souza

Coordenador  
de TCC

Prof. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho  
Prof. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

## Agradecimentos

Como expressar na pequenez das palavras a grandeza da gratidão que sinto? O que escrevo não será capaz de fazer justiça ao sentimento, mas, como tudo na vida, há de se tentar. E começo a tentativa agradecendo primeiramente aos meus pais, Roberto Antônio e Iris Mara, por todo amor e carinho dedicados à minha criação, pelos valores que me guiam como pessoa e acima de tudo pela fé inabalável em mim e qualquer fosse o caminho que desejasse tomar... Espero poder orgulhá-los da mesma forma que me orgulham todos os dias.

Agradeço a todos da minha família, tias, tios, primos, primas, avô e avós e minha Fada Madrinha, por todos os anos de amor e carinho propiciados, pelos almoços e jantares fartos e animados e, principalmente, pelos apoios e desejos de sucesso que me foram dados em todos os momentos, mesmo quando distantes. Reservo um espaço especial para minhas avós... Vó Blanca, pelo imensurável amor e pela implacável felicidade em viver, mantendo seu jeito animado e alegre até os dias de hoje. E Vó Mariazinha, uma das pessoas mais iluminadas e gentis que já conheci e que jamais conhecerei igual... Obrigado por tudo e que eu nunca esqueça de "lustrar minha estrelinha".

Continuo agora agradecendo a todos os mestres que cruzaram minha vida e que possibilitaram meu caminhar até aqui. A todos do magistério que contribuíram para minha formação, manifesto profunda admiração pela mais nobre das profissões e agradeço a partilha de seus conhecimentos. Agradeço em especial ao meu professor, mestre, guru espiritual e, acima de tudo, amigo Professor Leonardo Viana pela imensa contribuição nos ensinamentos de meditação, respiração e autocontrole, sem os quais o caminho seria muito mais árduo... Namastê, mestre!

Agradeço aos amigos sinceros que a vida me deu, que me acompanham até hoje e que eu levarei para sempre comigo: Carlinhos, Domingos, Gerla, Guarabyrângela, Igor Wu, Isabelle Rafalski, Julia Romero, Lucas Ribeiro, Lucas Giovannini, Pedrão, Paulo César, e Panza... Sem vocês nada disso nem existiria! Minha especial gratidão ao Domingos, pelos constantes apoios, fé e discussões esotéricas; Julia (Miga Juh), pelo laço inquebrável que formamos e pelos Miga Days (All for the Miga!); Gabriela Panza, e todos os seus pseudônimos e heterônimos, por ser minha gêmea cósmica astral que tem um futuro brilhante simplesmente por ser quem é. Eu amo todos vocês!

Não poderia deixar de agradecer à todos os meus colegas do curso de microbiologia e imunologia e ao presente que me foi entregue em forma de esquadrão: Julianna Camille, Thiago Freitas e Sarah Mederos... A mais profunda e sincera gratidão por ter vocês como companheiros de curso! Todos os momentos de sofrimento, ansiedade, "não tô pronto pra essa prova...", "não aguento mais esse trabalho", "não fiz isso ainda/eu também não", "pra quando é esse relatório?!" felicidade, risos, deboches e piadas foram muito melhores pois estávamos juntos... Que as mesas do bandeirão sirvam de testemunha para a forte amizade do nosso "Squad"! Obrigado por tornarem tudo mais leve e melhor.

Meus sinceros agradecimentos aos chefes do laboratório, Raquel Peixoto e Alexandre Rosado, pela imponderável oportunidade de fazer parte do LEMM e estar na vanguarda do conhecimento... Em especial ao Professor Alexandre, agradeço a orientação e às trocas de conhecimento, conversas e risadas. Que siga mandando brasa!

Dedico este parágrafo ao meu pai científico, Doktor Yuri! Minha mais profunda gratidão, meu mais sincero reconhecimento e minha mais verdadeira admiração, por tudo. Pelo acolhimento, pelo conhecimento, pela paciência, pelas risadas, pelas piadas, pela cobrança, pela tutela, pela solicitude e pela fé em mim. Você me ensinou tudo o que sei.

À minha família postiça do LEMM deixo meus calorosos agradecimentos! Edir Martins, Marcos de Bonis, Denise Araujo, as Caróis (Frere e Fazolato), Deborah Leite, Flávia Lima, Caren Vilela, Helena Villela, Dandara Leal, Myllena Pereira, Camila Messias, Phillippe Rosado, Erika Santoro, Julianna Assis, Fernanda Jamel e João Pedro Monlevad... Muito obrigado a todos pelas festas, pelas conversas, pelas risadas e pelas sessões de dança enquanto aguardávamos a autoclave!

Um parágrafo especial para meus dois amores, Deborah Leite e Caroline Frere Martiniuc de Oliveira. À primeira por ser aquela pessoa que raramente encontramos no mundo, cheia de luz e de paz e por ser minha mãe científica adotiva nos momentos de desespero... "Óh eu te amo! Óh eu te amo meu amor!". À segunda por uma amizade tão valiosa que não há como descrever. Obrigado pelo amor e pelo carinho, pela parceria, pelos momentos que só tu, pelas sessões de estudo e por ter me ensinado muito sobre mim, sobre a vida e sobre como as pessoas te pedem em casamento e te oferecem empregos aleatoriamente... Minha namorada postiça!

Agradeço profundamente à Professora Fernanda Abreu, pela solicitude em conseguir as microscopias e paciência com um aluno desesperado. Agradeço também a todos do LABMAX e UniMicro que se prontificaram em me ajudar e possibilitaram o término deste trabalho.

Agradeço à Universidade Federal do Rio de Janeiro, universidade pública, gratuita, de qualidade e socialmente referenciada, por ter sido a sólida fundação de minha formação e ter possibilitado esta conquista. Que essa casa resista aos tempos sombrios que se aproximam como resistiu aos tempos sombrios que já se foram. A todos os colegas pesquisadores e professores, seguimos de braços dados na resistência... UFRJ resiste!

Agradeço aos membros da banca por aceitarem avaliar esta monografia, pela solicitude e pelas contribuições para o meu desenvolvimento e a melhoria deste trabalho.

Agradeço às agências de fomento à pesquisa por alimentarem a caldeira da ciência de base brasileira e por tornarem este trabalho possível.

Por fim, agradeço à vida... Que é bonita e é bonita! Agradeço aos dias bons que passaram e aos melhores que virão! Obrigado a todos por tudo!

Jaz aqui todo meu amor e gratidão

Orgulho e admiração

Suor e dedicação.

É... São tudo que tenho.

*"A verdade é sempre revolucionária"*

- Vladimir Lênin

## RESUMO

Roberto Guardatti Gambine Moreira

Isolamento e identificação microscópica e molecular de actinobactéria componente de consórcio microbiano termofílico quimiolitotrófico obtido do solo

Orientador: Alexandre Soares Rosado

Microrganismos são capazes de colonizar os mais diversos ambientes e resistir às mais extremas condições. Centenas de milhões de anos de evolução fizeram com que estes seres se distribuíssem ubiquitariamente pelo planeta, habitando locais onde a vida macroscópica não seria possível. O fruto da adaptação às mais diversas e excepcionais circunstâncias é uma imensa diversidade metabólica com potencial biotecnológico industrialmente interessante, principalmente no caso de microrganismos extremófilos. No entanto, antes que se possa aplicá-los, é necessário encontrá-los e estudá-los. Ao redor desse aspecto consiste um dos principais desafios da microbiologia ambiental: a obtenção de uma cultura pura. Estudos de boa anotação genômica, manipulação genética e caracterização de novas espécies, só são possíveis através desta ação. O surgimento das técnicas moleculares possibilitou estudos que revelaram a porcentagem de microrganismos não-cultivados, sendo ela superior à 99%. Também, tais métodos permitem estudos independentes do cultivo, porém não são capazes de contornar todos os obstáculos da não-cultivabilidade. Portanto, a obtenção de culturas axênicas persiste como um desafio atual e novas técnicas e métodos são necessários para acessar a chamada "matéria negra microbiana". Pautado nessa questão, este trabalho é um desdobramento de trabalhos previamente realizados cujos resultados foram a obtenção de um consórcio microbiano termofílico quimiolitotrófico de uma amostra de solo destinado à queima de rejeitos vegetais. Seus objetivos consistiam em encontrar um sistema alternativo de fixação de nitrogênio aerotolerante, descrito como possível na literatura por Gadkari et al em 1997, porém sem descrições comprobatórias posteriores. A suposta nitrogenase seria pertencente à actinobactéria *Streptomyces thermoautotrophicus*, isolada também por Gadkari em 1992 e identificada como presente no consórcio deste trabalho por análises



metagenômicas. No entanto, tentativas anteriores de isolar o componente de interesse foram mal sucedidas e permaneceram como um empecilho cuja superação foi o objetivo deste trabalho. A utilização de meios de cultura diferenciados associado a antibióticos para eliminar contaminantes revelou-se uma estratégia bem sucedida, levando à obtenção de uma cultura axênica da actinobactéria ao final dos experimentos. Testes de quimiolitotrofia apontam uma possível capacidade de fixação de nitrogênio em tensões de oxigênio por parte da actinobactéria embora análises aprofundadas sejam necessárias. Análises taxonômicas associaram o isolado ao *Streptomyces thermoautotrophicus* mas não permitiram uma caracterização precisa, havendo associação com diversas bactérias não cultivadas, indicando que a cepa obtida pode ser pertencente a outro gênero ou família taxonômica.

Palavras-chave: Actinobactéria; Isolamento; Cultura axênica; Extremófilo; Quimiolitotrófico; Ecologia Microbiana

## ABSTRACT

Roberto Guardatti Gambine Moreira

Isolamento e identificação microscópica e molecular de actinobactéria componente de consórcio microbiano termofílico quimiolitotrófico obtido do solo

Orientador: Alexandre Soares Rosado

Microorganisms are able to colonize the most diverse environments and resist the most extreme conditions. Hundreds of millions of years of evolution have caused these beings to distribute themselves ubiquitously throughout the planet, inhabiting places where macroscopic life would not be possible. The fruit of adaptation in the most diverse and exceptional circumstances is an immense metabolic diversity with an industrially interesting biotechnological potential, especially in the case of extremophilic microorganisms. However, before you can apply them, you need to find and study them. Surrounding this aspect, lies one of the main challenges of environmental microbiology: obtaining a pure culture. Good genomic annotation, genetic manipulation and characterization of new species are only possible through this action. The emergence of molecular techniques enabled studies that revealed that the percentage of uncultivated microorganisms is higher than 99%. Also, such methods allow culture independent studies, but are not able to bypass all non-cultivability obstacles. Therefore, obtaining an axenic culture persists as a current challenge and new techniques and methods are needed to access so-called "microbial black matter". Based on this question this work is a branch of previously performed works whose results were the obtaining of a thermophilic chemolithoautotrophic microbial consortium of a soil sample destined to the burning of vegetable waste. The studies' objectives were to find an alternative aerotolerant nitrogen fixation system, described as possible in the literature by Gadkari et al in 1997, but without further supporting evidence. The supposed nitrogenase would belong to the actinobacteria *Streptomyces thermoautotrophicus*, also isolated by Gadkari in 1992 and identified as present in the consortium of this work by metagenomic analyzes. However, previous

attempts to isolate the component of interest were unsuccessful and remained as an obstacle that this experiments aimed to surpass. The use of differentiated culture media associated with antibiotics to eliminate contaminants proved to be a successful strategy, leading to an axenic culture of the actinobacteria in question at the end of the experiments. Tests of chemolithoautotrophy point out a possible ability of nitrogen fixation in presence of oxygen by the actinobacteria, although further in-depth analyzes are necessary. Taxonomic analysis associated the isolate to *Streptomyces thermoautotrophicus* but did not allow a precise characterization, being also associated with several uncultured bacteria, indicating that the obtained strain can belong to another genus or taxonomic family.

Key-words: Actinobacteria; Isolation; Axenic Culture; Extremophyle; Chemolithoautotrophic; Microbial ecology

- Figura 1: Árvore filogenética de Bacteria mostrando filios estabelecidos (em itálico) e filios candidatos, aqueles que não possuem representantes cultivados (em maiúsculas e acompanhadas por números). Feita com a base de dados ARB (<http://arb-home.de>) de Novembro de 2003 com 16,964 sequências maiores que 1,000 pares de base (pb). O ângulo do vértice de cada cunha indica a abundância relativa de sequências em cada filo; o comprimento de cada lado indica o intervalo de profundidade de ramificação encontrado nesse filo; a vermelhidão corresponde à proporção de sequências naquele filo obtido de representantes cultivados. Adaptado de Handelsman, 2004 ..... 4
- Figura 2: Comparação entre as capacidades operacionais de Biocatalisadores Clássicos e Extremozimas. Foram levados em consideração os parâmetros: temperatura, pH e porcentagem de solvente, todos relevantes quando consideradas condições industriais de produção. Dados aproximados com base em Elleuche et al, 2014..... 6
- Figura 3: Características genômicas de espécies em filios cultivados e não cultivados. (a) Percentual da anotação do genoma. Os pontos representam 57.741 genomas dos filios com grande representatividade de cultivados Proteobacteria (verde), Actinobacteria (laranja), Firmicutes (azul) e Bacteroidetes (vermelho); 1.167 genomas de candidatos não cultivados e filios desconhecidos (rosa); e 2.131 genomas dos 29 filios remanescentes (cinza escuro). (b) A porcentagem da anotação do genoma correlaciona-se negativamente com a representação de filios por espécies cultivadas. A taxonomia de 226.267 unidades taxonômicas operacionais de nível de espécie (OTUs), conforme definido pelo agrupamento de sequências 16S rRNA completas e de alta qualidade, foi obtida do banco de dados SILVA. As contagens de espécies cultivadas foram obtidas a partir do banco de dados atual da Nomenclatura Procariótica (<https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>) A correlação do ranque Spearman é significativa ( $P = 0,00065$ ,  $\rho = -0,58$ ). A área sombreada representa o intervalo de confiança de 95%. Adaptado de Overmann, Abt e Sikorski, 2017. .... 9
- Figura 4: Demonstração dos possíveis alvos de ação dos antibióticos correlacionados às diferenças morfológicas dos grupos de Gram. Adaptado de Walsh e Wencewicz, 2016. .... 10
- Figura 5: Árvore filogenética baseada em 97 sequências genômicas do filo Actinobacteria. O projeto de genomas de cepas tipo foi selecionado de acordo com Göker e Klenk, 2013, desde que houvesse o rendimento de no máximo 25 contigs. A reconstrução filogenética, incluindo a avaliação de suporte aos ramos, foi feita usando sequências de aminoácidos de acordo com os métodos descritos por Meier-Kolthoff et al, 2013. A árvore foi utilizada através do programa ITOL (Letunic e Bork, 2011). Adaptado de Barka et al, 2016..... 14
- Figura 6: Figura utilizada em Souza, C. T. C. C., 2015, reproduzida com autorização do autor. Visão geral da morfologia do consórcio quimiolitoautotrófico. Crescimento inicial a partir de amostras de solo. Em (A) colônias que crescem em meio mineral suplementado com NH<sub>4</sub>Cl, e em seguida transferidas para o mesmo meio solidificado com ágar (B). Após o primeiro enriquecimento, as colônias foram cultivadas em meio de N-FIX (C), isento de fontes de N. Imagem (D) de ampliação 11,210x) mostra as várias bactérias não filamentosas depositadas sobre as hifas de actinobactéria. Depois, o detalhe das estruturas dos esporos em microscopia de varredura eletrônica (E) ampliação de 51.000x) e microscopia eletrônica de transmissão (F) ampliação da 71.000x) mostrando vacúolos e parede de membrana celular bem delimitada..... 17
- Figura 7: Esquematização da placa de 24 poços utilizada para o experimento de concentração mínima inibitória. Controles positivos: poços sem antibiótico inoculados com bactéria. Controle negativo: poços contendo apenas meio adicionado de antibiótico. .... 22

- Figura 8: A - Placa com meio GYM apresentando crescimento de colônias amarronzadas. C - Imagem aproximada das colônias para visualização clara do morfotipo. B - Placa com meio R2A apresentando crescimento de dois morfotipos coloniais. Circulado em vermelho, colônias puntiformes brancas, características de actinomiceto. Circulado em **verde**, colônias translúcidas disformes. **D** - Imagem aproximada para visualização do morfotipo colonial da actinobactéria. .... 26
- Figura 9: Frasco contendo meio R2A em forma líquida. Identificam-se dois crescimentos distintos: colônias brancas flutuantes (circuladas em vermelho) e colônias em forma de grumos acinzentados depositadas ao fundo do frasco (circuladas em verde). .... 27
- Figura 10: Visualização de colorações de Gram das amostras: **A** - Colônia puntiforme branca obtida do meio R2A sólido. Observa-se um emaranhado de estruturas filamentosas. **B** - Colônias disformes obtidas no meio R2A sólido. Observam-se formas bacilares Gram positivas, algumas com endósporos em suas regiões terminais e endósporos livres. **C** - Colônias em forma de grumo observadas submersas em meio R2A líquido. Observam-se uma estrutura bacilar com um endósporo em sua extremidade (circulada em azul) assim como esporos livres (circulados em preto). Todas as imagens possuem o aumento de 1000 vezes. .... 28
- Figura 11: Placa de 24 poços utilizada para experimento de concentração mínima inibitória de *Geobacillus spp.* Poços 1 - 11 contendo concentrações de Tetraciclina. Poços de 11 - 20 contendo concentrações de Amoxicilina. Poços 19 e 20 apresentando turbidez levemente elevada quando comparados aos poços anteriores (11 - 18) e controle negativo de Amoxicilina (poço 24). .... 29
- Figura 12: Placas de meio OTTOW (fileira superior) e R2A (fileira inferior) contendo gradiente de concentrações de amoxicilina: 4µg/ml, 2µg/ml e 1µg/ml (da esquerda para a direita em ambas as fileiras). .... 30
- Figura 13: Placas de meio R2A contendo concentrações distintas de amoxicilina: 4µg/ml, 2µg/ml e 1µg/ml (da esquerda para a direita, respectivamente). .... 31
- Figura 14: Placas de meio R2A com crescimento de morfotipo único de actinobactéria. **A** - Repique em placa sem antibiótico após terceira passagem em placas contendo antibióticos. **B** - Segunda passagem em placa sem antibiótico sem presença de contaminação. .... 32
- Figura 15: Frascos de meio N-Fix apresentando crescimento da actinobactéria isolada. Crescimento em forma de massa esbranquiçada, semelhante ao crescimento do consórcio no mesmo meio. .... 32
- Figura 16: Crescimento dos isolados de actinobactéria em meio N-Fix sem traços de amônia: solidificado através da utilização de ágar ultrapuro (Agar Noble) contendo 0,03% de clinoptilolita (quelante de amônia). .... 33
- Figura 17: Imagens de microscopia ótica com contraste de fase diferencial (DIC) do isolado crescido em meio N-fix sem fontes de nitrogênio fixadas. **A**: Borda da colônia: massa de filamentos apresentando projeções. Apontado em preto, cadeia de esporos. **B**: Filamentos desprendidos da colônia principal. Apontado em preto, processo de formação de cadeia de esporos não finalizado. Apontado em branco, esporos livres. Aumento de 200 vezes. .... 34
- Figura 18: Imagens de MET. Observa-se a morfologia da célula de actinobactéria e sua parede celular Gram + (A e B). **C**: Observam-se dois citoplasmas de células distintas separadas por um septo de parede celular, assim como BMCs possivelmente identificáveis como carboxissomos (apontados em preto). **D**: Observa-se no mesmo citoplasma dois possíveis carboxissomos (apontados em preto) assim como BMC de estrutura e função não identificadas (apontado em branco). .... 35
- Figura 19: Imagens de MEV. **A e B**: Colônias sobre ágar visualizadas em baixo aumento. **C e D**: Maior aumento para visualização da borda inferior da colônia B, mostrando projeção dos filamentos e substância extracelular de revestimento. **E**: Maior aumento para visualização de superfície da colônia

A, observa-se pouco revestimento celular e ausência de esporos. **F:** Amostra de colônias crescidas em meio N-Fix líquido. Observa-se o brotamento hifas (aéreas ou não), célula lisada e seu extravazado e revestimento celular presente nos outros filamentos visíveis. .... 36

Figura 20: Imagens de MEV. **A:** Célula intumescida devido ao processo de esporulação (amostra de meio N-Fix líquido). **B:** Filamento septado apresentando diferentes graus de turgidez devido ao início da formação de cadeia de esporos. **C:** Esporos sobre colônia apresentando diferentes graus de maturação. **D:** Esporo maturado destacado de borda da colônia. Apresenta diâmetro aumentado quando comparado aos anteriormente visualizados e ornamentação em forma de pelos em sua superfície. .... 38

Figura 21: A história evolutiva foi inferida usando o método da máxima verossimilhança baseado no modelo de Tamura-Nei. A árvore com a maior probabilidade de log (-3615.24) é mostrada. A porcentagem de árvores nas quais o taxa associado agrupado é mostrada ao lado das ramificações. A (s) árvore (s) inicial (is) para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando algoritmos de Neighbor-Join e BioNJ em uma matriz de distâncias entre pares estimadas usando a abordagem MVI (Maximum Composite Likelihood) e selecionando a topologia com valor de probabilidade logarítmica superior. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramificações medidas no número de substituições por sítio. A análise envolveu 11 sequências nucleotídicas. Todas as posições contendo lacunas e dados perdidos foram eliminadas. Houve um total de 1339 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA7. .... 39

## Sumário

1 - Introdução.....	1
<b>1.1 - Microbiologia Ambiental e Ecologia Microbiana .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 - Visão Geral .....	1
1.1.2 - Complexidade.....	2
1.1.3 - Importância .....	5
1.2 - Técnicas.....	7
1.3 - Bioprospecção.....	11
1.4 - Actinobactérias .....	12
1.5 - Resultados Anteriores.....	15
2 - Justificativa.....	19
3 – Objetivos.....	20
4 - Materiais e Métodos.....	20
4.1 - Cultivo .....	20
4.2 - Estocagem e Cópia de Segurança .....	21
4.3 - Concentração Mínima Inibitória .....	21
4.4 Testes de Quimiolitoautotrofia do Isolado .....	23
4.5 Microscopia .....	24
4.6 Extração de DNA.....	24
4.7 Sequenciamento .....	25
4.8 Análise de Dados .....	25
5. Resultados.....	26
5.1 Cultivo .....	26
5.2 Concentração Mínima Inibitória .....	29
5.3 Testes de Quimiolitoautotrofia do Isolado .....	32
5.4 Análise de Microscopia .....	34
5.5 Análise de Dados .....	39
6. Discussão.....	40
7. Conclusões.....	45
8. Referências Bibliográficas .....	46
9. Caderno de Anexos .....	53

# 1 - Introdução

## 1.1 - *Microbiologia Ambiental e Ecologia Microbiana*

### 1.1.1 - *Visão Geral*

Bilhões de anos antes de qualquer forma de vida macroscópica, como plantas e animais, os microrganismos já existiam no planeta. Células denominadas *procarióticas* (aquelas desprovidas de estrutura nuclear) foram os primeiros seres vivos a existirem na Terra e formaram o arcabouço da evolução da vida na biosfera (Madsen, E. L; 2015). No entanto, na história da ciência, a descoberta destes organismos foi dependente da invenção do microscópio, ocorrida no final do séc. XVI. O matemático e historiador natural inglês Robert Hooke (1635–1703) é considerado o cientista descobridor da célula, porém o holandês Antonie Van Leeuwenhoek (1632–1723), foi o primeiro a visualizar células bacterianas (os menores microrganismos) em 1676 (apud Keller e Zengler, 2004).

Contudo, as limitações técnicas da época impossibilitavam uma compreensão aprofundada da natureza e da importância dos microrganismos, fazendo com que fosse necessário um século e meio até que progressos significativos fossem alcançados na área. Em meados do século XIX a refutação definitiva do conceito de *geração espontânea* (teoria da abiogênese) realizada pelo químico francês Louis Pasteur (1822 - 1895) volta a atenção da comunidade científica para a microbiologia e provoca a retomada do desenvolvimento deste campo. Porém, somente através dos experimentos do médico alemão Robert Koch (1843 - 1910), responsável por comprovar que alguns microrganismos são capazes de causar doenças e por estabelecer metodologias utilizadas até o presente para o isolamento de microrganismos, a microbiologia amadurece suficientemente no meio acadêmico para se desenvolver como um campo próprio das ciências biológicas (Madigan et al, 2016).

Como resultado dessa conjuntura, múltiplos estudos e avanços referentes a microrganismos isolados do ambiente foram realizados por diversos cientistas ao redor do globo, criando um complexo mosaico de contribuições para a área. Em função da natureza amplamente heterogênea e habitat-específica dessas contribuições, surgem as subdivisões deste grande campo da microbiologia: microbiologia do solo, microbiologia marinha e microbiologia de sedimentos são alguns exemplos (Macura, 1974; Madsen, 2008). Mesmo com uma gama tão variada de estudos, o foco inicial da microbiologia ambiental consistia na



procura de patógenos nos suprimentos de água, consequência do contexto de caráter clínico no qual tomou impulso a ciência microbiológica em geral (Pepper et al, 2014).

Com o aprofundamento da compreensão das relações ecológicas e das funções nelas desempenhadas pelos microrganismos, a magnitude da microbiologia ambiental é ampliada de tal forma que passa a abordar toda e qualquer concepção de ambiente, desde solos agrícolas até a profundidade dos oceanos (Mohapatra, 2008).

A aquisição deste maior entendimento gera dentro deste campo duas formas distintas de explorá-lo: o estudo de microrganismos em seus habitats e seu impacto na saúde e bem-estar humanos ou a interação entre estes microrganismos dentro de um dado ambiente. Estabelecem-se então duas disciplinas: *microbiologia ambiental*, de caráter aplicado, referente à primeira abordagem descrita e *ecologia microbiana*, de caráter descritivo, referente à segunda abordagem descrita. Embora as duas sejam distintas, estão intimamente associadas quando o objetivo é a procura por formas de beneficiar a sociedade e/ou o meio-ambiente (Pepper et al, 2014).

### 1.1.2 - Complexidade

Em 1934 Lourens G. M. Bass Becking, botânico e microbiologista holandês, formulou a frase que estabeleceria um pilar indisputável para os acadêmicos contemporâneos da área: "*Tudo está em todo lugar; mas o ambiente seleciona*". Embora hoje, com desenvolvimento das técnicas moleculares saibamos que parte dessa afirmação não corresponde aos fatos (O'malley, 2008), ela foi embasada por uma concepção correta e amplamente difundida na microbiologia: a *ubiquidade* dos microrganismos (Martiny et al, 2006).

Em suma, microrganismos estão presentes em todos os biomas do planeta, inclusive aqueles onde a vida macroscópica não é possível. A colonização de uma grande diversidade de ambientes implica um amplo leque de pressões seletivas e nichos a serem ocupados. Este fator, somado a 3.8 bilhões de anos de evolução e adaptação, resultou numa enorme e inestimável pluralidade molecular, metabólica e fisiológica abarcada por estes seres (Kyrpides et al, 2014)

No campo da microbiologia de solos (parte do enfoque deste trabalho), por exemplo, tamanha diversidade associada à natureza extremamente heterogênea e mutável deste microambiente geram uma intrincada e complexa rede de interações ecológicas e metabólicas. Traduzido em termos quantitativos: uma grama de solo contém até dez bilhões de

microrganismos de milhares de espécies diferentes. Assim, em função de sua enorme complexidade, ecossistemas do solo são de difícil exploração (Torsvik e Øvreås, 2002). Essa configuração se deve ao fato de que a grande maioria de seus componentes permanece não cultivada (Iverson et al, 2012) e para a caracterização da fisiologia de um microrganismo é indispensável seu isolamento em cultura pura (Wayne et al, 1984).

O fenômeno da não-cultivabilidade (Figura 1) é multifatorial. Em primeira instância está o desconhecimento ou dificuldade de reprodução das condições bioquímicas do meio extracelular de determinado microrganismo necessárias para o seu crescimento. A consequente falha em recriá-las em laboratório, resulta no impedimento da viabilidade do cultivo. Em segunda instância está o fato de que o crescimento de um microrganismo desconhecido pode ter sido negligenciado por não ter alcançado parâmetros visuais óbvios (turbidez ou formação de colônias, por exemplo) que conotassem crescimento, ou por ser indistinguível quanto a características fenotípicas (Leadbetter, 2003; Vartoukian, Palmer e Wade, 2010). Outras instâncias referem-se à dificuldade de detecção e recuperação de certos procariotos do ambiente devido à sua natureza simbiote, fazendo com que seu crescimento esteja obrigatoriamente vinculado a um ser eucariótico (Bull, Goodfellow e Slater, 1992). Além de diversos outros fatores associados à adesão, quimiotaxia, moléculas sinalizatórias e dormência (Overmann, Abt e Sikorski, 2017).

Além das dificuldades já expostas, a noção de que a coevolução pode levar a perda vantajosa de genes complica ainda mais o quadro. A "Hipótese da Rainha Negra" postula que a redução genômica é evolutivamente vantajosa se inserida num contexto onde a comunidade microbiana produza bens comuns que tornem certos genes dispensáveis a nível individual. Contudo, tal perda gênica tem como consequência a dependência do crescimento em conjunto com microrganismos que forneçam as funções metabólicas perdidas, gerando consórcios microbianos cujos membros são interdependentes (Morris, Lenski e Zinser, 2012), obstaculizando ainda mais a questão do cultivo de isolados puros portanto.

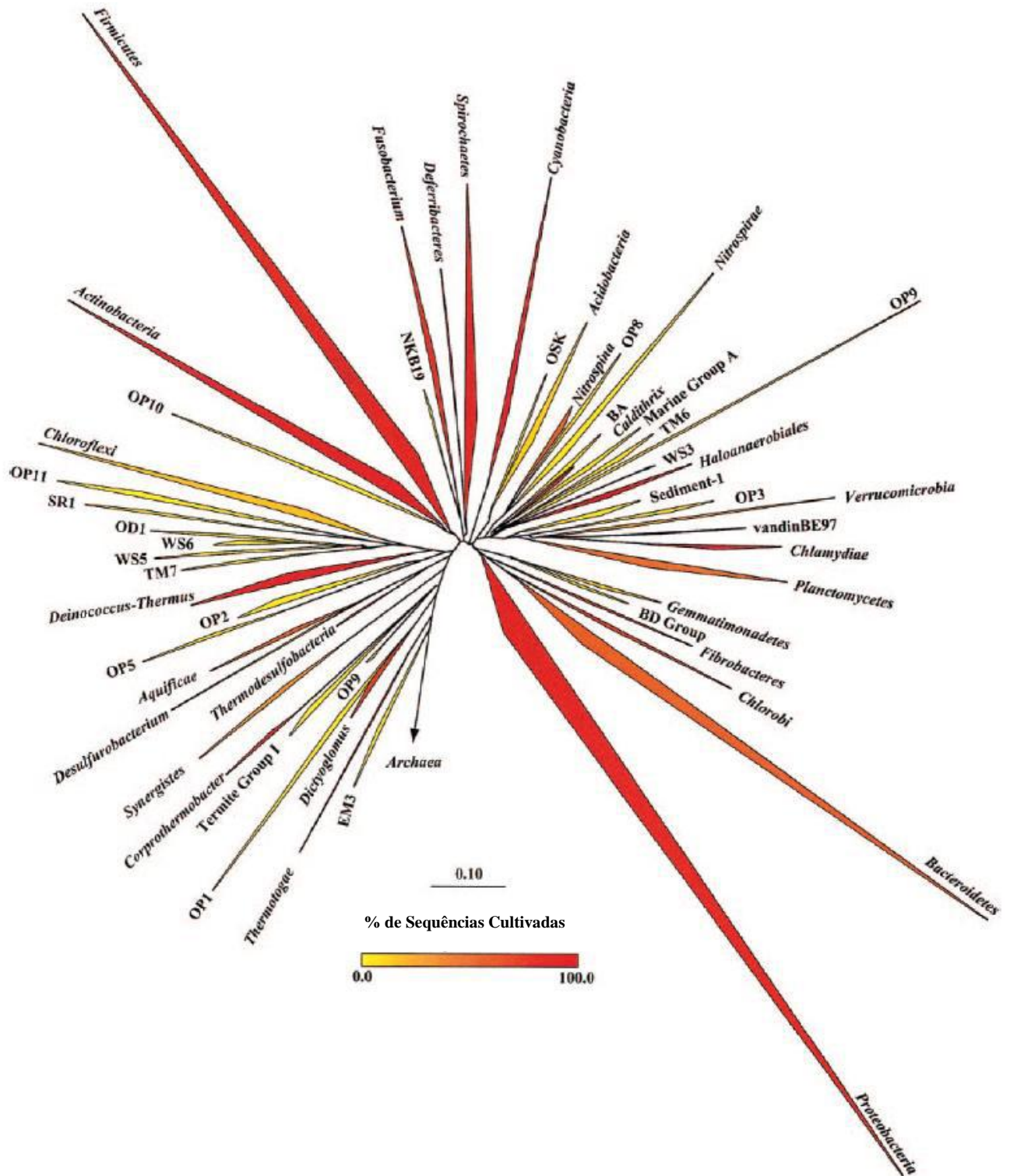


Figura 1: Árvore filogenética de Bacteria mostrando filios estabelecidos (em itálico) e filios candidatos, aqueles que não possuem representantes cultivados (em maiúsculas e acompanhadas por números). Feita com a base de dados ARB (<http://arb-home.de>) de Novembro de 2003 com 16,964 sequências maiores que 1,000 pares de base (pb). O ângulo do vértice de cada cunha indica a abundância relativa de sequências em cada filo; o comprimento de cada lado indica o intervalo de profundidade de ramificação encontrado nesse filo; a vermelhidão corresponde à proporção de sequências naquele filo obtido de representantes cultivados. Adaptado de Handelsman, 2004

### 1.1.3 - Importância

Ambos os campos em questão (ecologia microbiana e microbiologia ambiental) e seus estudos trouxeram esclarecimentos relevantes. Em relação à ciclagem dos elementos químicos cruciais para a manutenção e evolução da vida no planeta: a descoberta que os genes eucarióticos que possibilitam atividade fotossintética foram herdados de seres procarióticos (Margulis, 1993) e a crença unânime que o inicial aumento de oxigênio atmosférico, há 2,8 bilhões de anos, foi desempenhado por microrganismos (Kasting e Siefert, 2002) são exemplos. Fruto de sua imensa biodiversidade, os procariotos são a força motriz por trás dos ciclos biogeoquímicos, realizando reações catalíticas imprescindíveis e produzindo componentes significativos da atmosfera (Roselló-Mora e Amann, 2002; Torsvik, Øvreås e Thingstad, 2002). Ademais, é altamente provável que o posterior estudo e avanço deste viés da área ainda possa revelar minúcias inesperadas ou que nem se imaginam a respeito desses ciclos (DeLong, 2004).

Contudo, a importância da área se estende muito além da compreensão da natureza. Em realidade, o primeiro antibiótico descoberto em 1928 por Alexander Fleming (1881-1955) foi resultado de uma contaminação por um microrganismo de caráter ambiental (Bennet e Chung, 2001). Os produtos de origem microbiana são reconhecidos pela indústria farmacêutica por serem detentores de ampla diversidade estrutural e potencial farmacológico (Strohl, 2000). Dentro desta dinâmica e tendo em vista a já abordada imensa diversidade do mundo microbiano, é seguro afirmar que os microrganismos representam uma copiosa fonte de compostos naturais que poderiam ser utilizados para o avanço na confecção de novas e diversas drogas (Keller e Zengler, 2004).

No âmbito industrial, a microbiologia ambiental toma importância como uma forma de obter biocatalizadores (enzimas) que sejam capazes de suportar as condições de produção, acelerá-las e torná-las mais competitivas, enquanto atendem à crescente demanda moderna pelo desenvolvimento de formas sustentáveis de fabricação (Turner e Truppo, 2013). Neste domínio, tornam-se particularmente interessantes os microrganismos *extremófilos* cujas pressões seletivas extremas dos ambientes em que prosperam (elevadas temperaturas, extrema acidez ou alcalinidade e alta salinidade) levaram à evolução de enzimas capazes de suportar tais condições (Canganella e Wiegel, 2011). Dessa forma, as chamadas *extremozimas*, sintetizadas por estes seres, constituem uma interessante alternativa. Isso porque possuem a capacidade de suportar condições de processos industriais que seriam destrutivas para

biocatalisadores produzidos por microrganismos provenientes de ambientes onde as pressões seletivas são menos restritivas (Figura 2) (Elleuche et al, 2014).

### Biocatalisadores Clássicos x Extremozimas

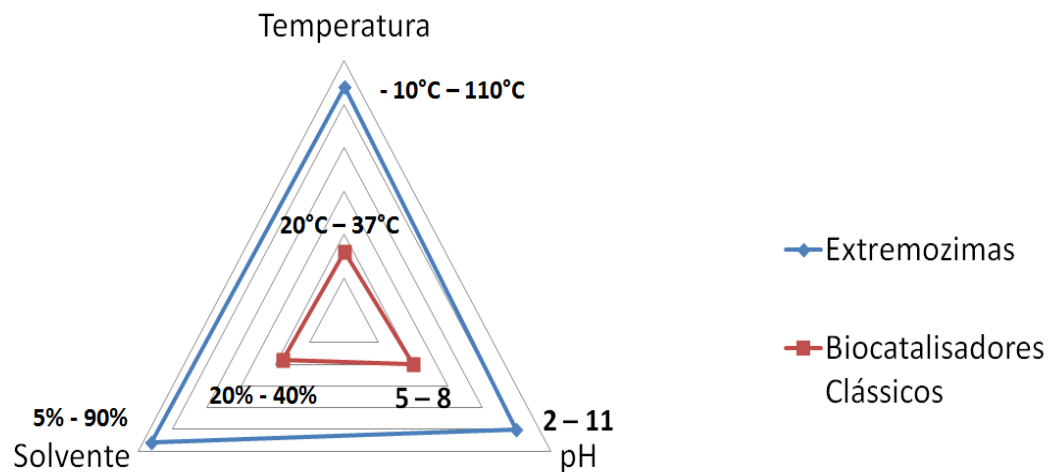


Figura 2: Comparação entre as capacidades operacionais de Biocatalisadores Clássicos e Extremozimas. Foram levados em consideração os parâmetros: temperatura, pH e porcentagem de solvente, todos relevantes quando consideradas condições industriais de produção. Dados aproximados com base em Elleuche et al, 2014.

Referente agora às consequências geradas pelas atividades industriais e outras ações humanas, o estudo da ecologia microbiana apresenta semelhante relevância. Bactérias estabelecem uma intrincada e dinâmica relação com o funcionamento de um ecossistema. Isso faz com que suas reações a mudanças antropogênicas sejam rápidas, resultando numa mudança do perfil da comunidade microbiana facilmente avaliável e detectável, permitindo o reconhecimento de contaminações e/ou alterações por mais sutis que sejam. Assim os microrganismos, em detrimento dos macrorganismos, possuem grande potencial de serem utilizados como *bioindicadores* das condições de um ambiente (McArthur, 2001).

Ainda neste âmbito, a faculdade dos microrganismos não se limita à detecção de contaminações, abrangendo também uma forma de solucioná-la: a *biorremediação*. Este é um processo que consiste na metabolização de contaminantes até formas inócuas ou menos tóxicas, através da utilização (primariamente) de microrganismos capazes de realizar tal detoxificação (Vidali, 2001). Um exemplo relevante para os tempos contemporâneos são as

contaminações causadas pela indústria de combustíveis fósseis e a utilização de microrganismos capazes de degradar os compostos tóxicos em componentes inofensivos e que podem se integrar naturalmente aos ciclos biogeoquímicos (Peixoto, Vermelho e Rosado, 2011).

## 1.2 - Técnicas

Desde o estabelecimento de culturas puras como parâmetro para a descrição de microrganismos (final do séc. XIX), esta tem sido a técnica padrão para o desenvolvimento dos diversos campos da microbiologia (Tamaki, 2009). Contudo, com o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento de ácidos nucleicos e dos estudos de Carl Woese e Norman Pace, ao final do séc. XX, as problemáticas inerentes às técnicas de cultivo, principalmente quando relacionadas às tentativas de estudos evolutivos, são revolucionadas à base da biologia molecular (Woese, 1987; Pace, 1997; Green e Keller, 2006).

Para contornar a questão da não-cultivabilidade, permitindo a identificação taxonômica de microrganismos não cultivados e estudar a ecologia e a evolução microbiana, desenvolveram-se técnicas de análise comparativa de DNA e RNA dos genes codificantes das subunidades ribossomais (*rRNAs*) (16S em procaríotos e 18S em eucariotos). A escolha desta última molécula foi feita baseada em sua onipresença em todas as formas celulares e por possuir regiões essenciais conservadas em todos os domínios filogenéticos, permitindo estudos que pudessem depreender relações entre organismos (Head, Saunders e Pickup, 1998).

Apesar de revolucionarem o quadro geral da microbiologia, as análises filogenéticas com base na sequência do *rRNA* contribuíram em peso para estudos filogenéticos e de caracterização enquanto forneceram pouco aprofundamento nas características fisiológicas e bioquímicas dos novos seres descritos (Handelsman, 2004). Como uma das formas para contornar esse aspecto, desenvolvem-se as técnicas envolvendo *metagenômica*, que consiste no sequenciamento do DNA genômico total de uma comunidade isolado diretamente do ambiente que se deseja estudar, permitindo a descoberta de novos genes e novas espécies sem que seja necessário o cultivo destes microrganismos. Através desta abordagem também é possível a montagem de parte, ou até mesmo da totalidade, do genoma de um organismo ainda não cultivado por artifício da sobreposição de sequências dos diferentes fragmentos sequenciados, permitindo maiores esclarecimentos sobre sua fisiologia e função ecológica dentro daquele ambiente (Handelsman, 2004; Eisen, 2007).

As técnicas moleculares passam então a ser parte integrante e indispensável da microbiologia ambiental e ecologia microbiana. No entanto, o cultivo de isolados em laboratório segue como uma etapa indispensável para alguns estudos (boa anotação genômica permitindo detalhamento metabólico e manipulação genética são exemplos), mantendo sua relevância e persistência como um desafio na atualidade (Leadbetter, 2003; Pham e Kim, 2012; Overmann, Abt e Sikorski, 2017) (Figura 3). Os avanços em metodologias de cultivo não foram descontinuados e diversos esforços foram e são feitos para desenvolvê-las. As abordagens são diversas: utilização de meios com concentrações de nutrientes mais diluídas (Reasoner e Geldreich, 1987; Connon e Giovannoni, 2002) e maiores tempos de incubação, ambos para microrganismos oligotróficos (Vartoukian, Palmer e Wade, 2010), complementação do meio de cultura com nutrientes necessários e específicos para o crescimento do microrganismo desejado (Tripp et al, 2008), co-cultivo com cepas que possam prover interações benéficas e promotoras de crescimento (Ohno et al, 2000) e tentativas de reproduzir as condições do ambiente em laboratório (Kaeberlein, Lewis e Epstein, 2002) são exemplos.

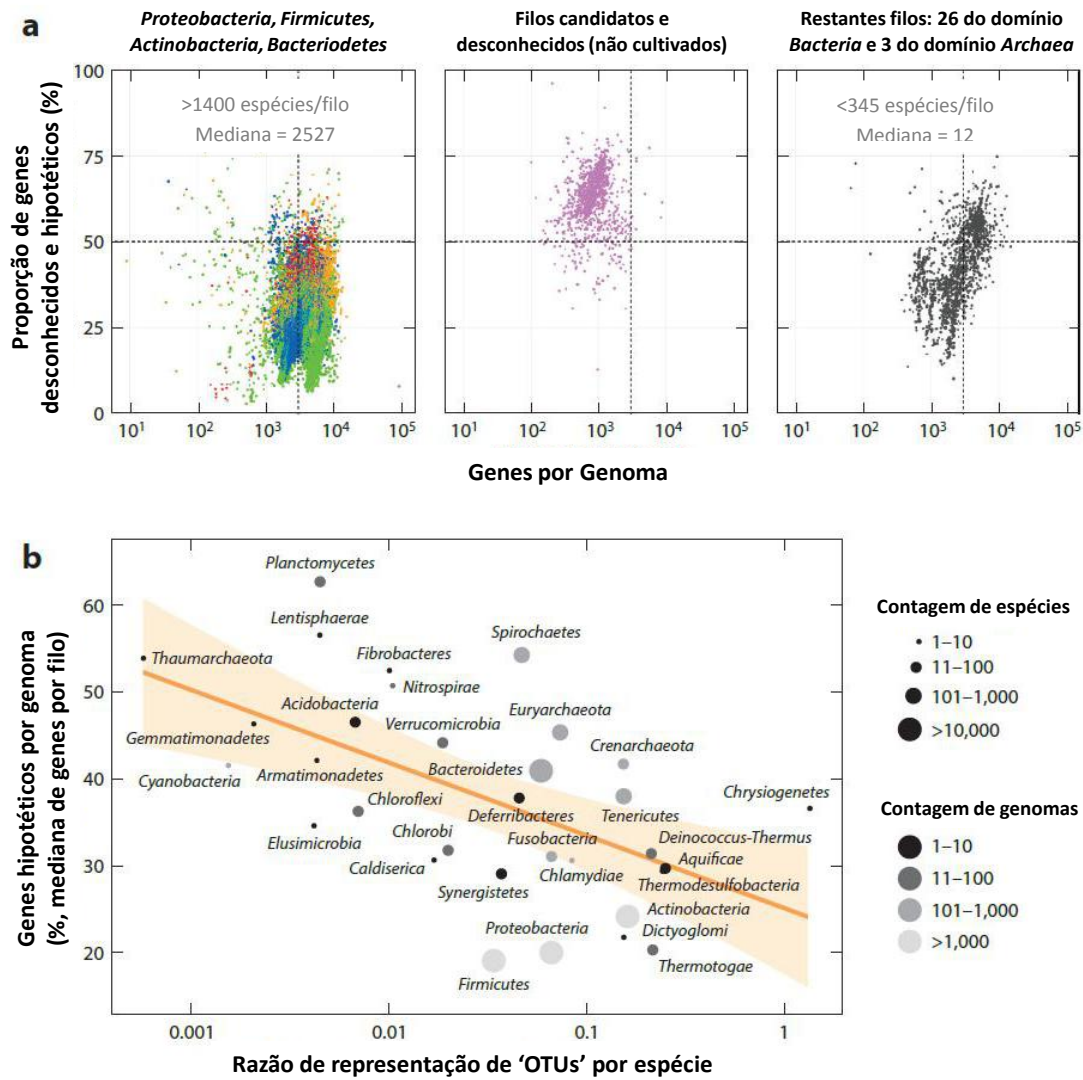


Figura 3: Características genômicas de espécies em filios cultivados e não cultivados. (a) Percentual da anotação do genoma. Os pontos representam 57.741 genomas dos filios com grande representatividade de cultivados *Proteobacteria* (verde), *Actinobacteria* (laranja), *Firmicutes* (azul) e *Bacteroidetes* (vermelho); 1.167 genomas de candidatos não cultivados e filios desconhecidos (rosa); e 2.131 genomas dos 29 filios remanescentes (cinza escuro). (b) A porcentagem da anotação do genoma correlaciona-se negativamente com a representação de filios por espécies cultivadas. A taxonomia de 226.267 unidades taxonômicas operacionais de nível de espécie (OTUs), conforme definido pelo agrupamento de sequências 16S *rRNA* completas e de alta qualidade, foi obtida do banco de dados SILVA. As contagens de espécies cultivadas foram obtidas a partir do banco de dados atual da Nomenclatura Procariótica (<https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>). A correlação do ranque Spearman é significativa ( $P = 0,00065$ ,  $\rho = -0,58$ ). A área sombreada representa o intervalo de confiança de 95%. Adaptado de Overmann, Abt e Sikorski, 2017.



Uma outra abordagem possível para o isolamento de microrganismos, principalmente em casos onde um ou mais deles crescem simultaneamente no meio de cultura, é a utilização de antibióticos para isolamento de culturas axênicas. Diferenças celulares estruturais podem conferir resistência natural a determinadas classes de antimicrobianos (Figura 4). Torna-se então possível, de acordo com tais diferenças, a utilização de diferentes substâncias microbicidas que possibilitem o crescimento de um microrganismo naturalmente resistente em detrimento de um outro suscetível (Walsh e Wencewicz, 2016).

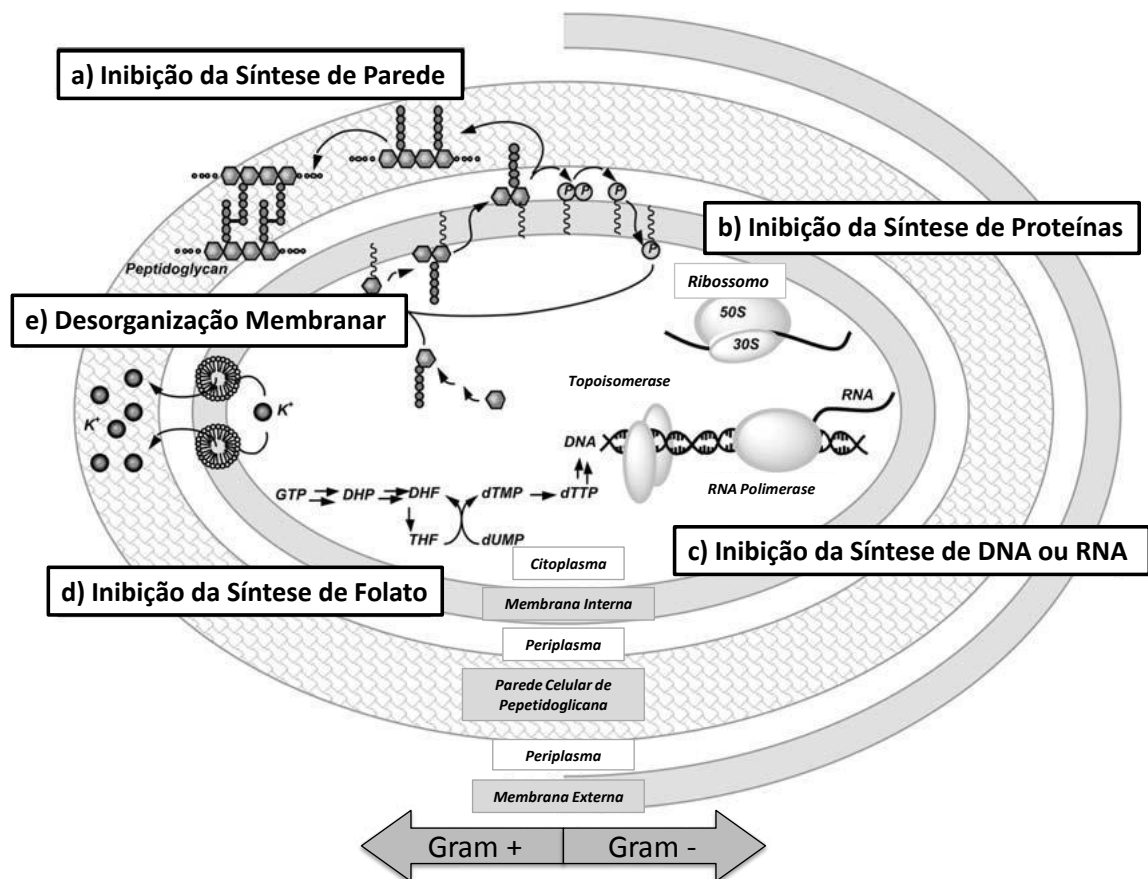


Figura 4: Demonstração dos possíveis alvos de ação dos antibióticos correlacionados às diferenças morfológicas dos grupos de Gram. Adaptado de Walsh e Wencewicz, 2016.

### *1.3 - Bioprospecção*

Bioprospecção consiste em perscrutar a natureza e sua biodiversidade por recursos (químicos ou genéticos) de interesses econômico, biotecnológico e conservacionista ambiental (Firn, 2003). Dessa forma, sendo o potencial da descoberta de moléculas biotecnologicamente aplicáveis diretamente proporcional ao tamanho da diversidade que se explora, a prospecção de microrganismos caracteriza-se virtualmente como o mais oportuno âmbito desta atividade (Bull, Ward e Goodfellow, 2000; Egorova e Antranikian, 2005), em virtude da imensa variedade já abordada.

As características atraentes dos microrganismos não se restringem ao enorme potencial gerado por sua diversidade, também apresentando vantagens na praticidade técnica de suas aplicações. A chance de cultivá-los em grande quantidade em um período de tempo comparativamente curto, representa a possibilidade de uma produção substancial e constante do produto desejado. Ainda, as proteínas que sintetizam apresentam maior estabilidade quando comparadas àquelas sintetizadas por macrorganismos, viabilizando grandes tempos de estocagem em condições pouco exigentes sem grande perda de poder catalítico (Headon e Walsh, 1994; Acharya e Chaudhary, 2012).

O debate referente à que tipo de catalisadores deve ser utilizado: de origem química ou orgânica, levanta argumentos que justificam o exercício da bioprospecção. Além do já exposto interesse em sustentabilidade, outra consideração central diz respeito à limitação da complexidade dos reagentes sintéticos. A elaboração e produção de estruturas moleculares artificiais altamente complexas que sejam capazes de realizar a reação desejada é extremamente dispendiosa e muitas vezes ineficaz para humanos. Em contraste, microrganismos são capazes de sintetizar facilmente estruturas tão altamente complexas quanto específicas (Firn, 2003).

Correlacionado ao avanço geral da microbiologia com o desenvolvimento das técnicas moleculares (Lorenz e Eck, 2005; Ferrer et al, 2016), a bioprospecção e seus posteriores benefícios evoluíram de tal forma que hoje centenas de processos de escala industrial, como a produção de acrilamida e vitamina B12, por exemplo, empregam a utilização de biocatalisadores ou células inteiras (Woodley, 2013; Carvalho, 2017). Embora as aplicações destaquem-se na indústria farmacêutica (Pollard e Woodley, 2007), o alcance dessa biotecnologia se espalha por muitos outros campos industriais, desde cosméticos até a indústria de papel (Wenda et al, 2011; Acharya e Chaudhary, 2012).

Na contemporaneidade, a bioprospecção tornou-se ainda mais proeminente devido aos avanços em engenharia de proteínas e técnicas de evolução dirigida. Tais progressos possibilitaram contornar problemas como a obtenção de moléculas naturais de baixo rendimento, baixa especificidade e condições de produção distantes das condições ideais enzimáticas dentre outros (Bornscheuer et al, 2012; Turner e Truppo, 2013).

Inserido no contexto da bioprospecção e mineração genômica, as actinobactérias apresentam hoje forte expressividade na procura de novas biomoléculas aplicáveis (Goodfellow e Fiedler, 2010). Este filo é responsável pela produção superior a 70% de moléculas naturais antimicrobianas (Gomez-Escribano e Bibb, 2014). Ainda assim argumenta-se que a prospecção de novos e menos conhecidos membros deste filo seja uma maneira de encontrar novos metabólitos secundários relevantes (Goodfellow e Fiedler, 2010). Os avanços nas técnicas de cultivo e de sequenciamento ocasionaram um aumento exponencial no aporte de dados genômicos referentes a estes microrganismos. Centenas dessas sequências são depositadas de forma pública anualmente como fruto de estudos direcionados a procura de novos produtos naturais e vias biossintéticas (Gomez-Escribano, Alt e Bibb, 2016), ressaltando a expressividade deste filo.

#### 1.4 - *Actinobactérias*

*Actinobacteria* denomina um dos mais extensos e reconhecidos filos pertencentes ao domínio *Bacteria* (Ludwig et al, 2015). Seus representantes contém como característica a coloração Gram-positiva e o alto conteúdo de pares guanina-citosina (GC) em seus genomas. O solo é o ambiente ecológico onde mais se encontram actinobactérias, embora o filo não se restrinja a esse habitat, ocupando os mais diversos ambientes naturais e antrópicos (Goodfellow e Williams, 1984; Barka et al, 2016).

Este filo é tão extenso quanto diverso (Figura 5). Embora em maioria seus representantes sejam de natureza saprofítica (caracterizada pela decomposição de detritos de matéria orgânica (Paul, 2014)), existem integrantes de destaque na área clínica como patógenos e componentes da microbiota, evidenciados nas ordem *Bifidobacteriales* e subordem *Corynebacterineae* (Figura 5) (Ventura et al., 2007; Barka et al, 2016). Ademais, o filo possui importantes representantes de simbioses de plantas, chamados *simbiontes actinorrízicos*, cuja nodulação em raízes de plantas é um importante fator promotor de crescimento (Pawlowski e Demchenko, 2012).

Sob a perspectiva de aplicações biotecnológicas e fonte de produtos naturais, o filo *Actinobacteria* apresenta forte expressividade. Seus integrantes apresentam diversidade tamanha que são incorporados em diversos setores, são exemplos: *Rhodococcus* que configura um gênero cuja versatilidade metabólica pode ser aplicada em processos de biorremediação e degradação de xenobiontes (Larkin, Kulakov e Allen, 2005); O gênero *Bifidobacterium* engloba componentes capazes de propiciar o estado saudável através da regulação microbiota intestinal (Liévin et al, 2000) e que podem ser utilizados como probióticos ou fornecedores de prebióticos (Ouwehand, Salminen e Isolauri, 2002); O gênero *Salinispora* possui integrantes capazes de produzir "salinosporamida A", uma substância com capacidade clínica antitumoral (Fenical et al, 2009).

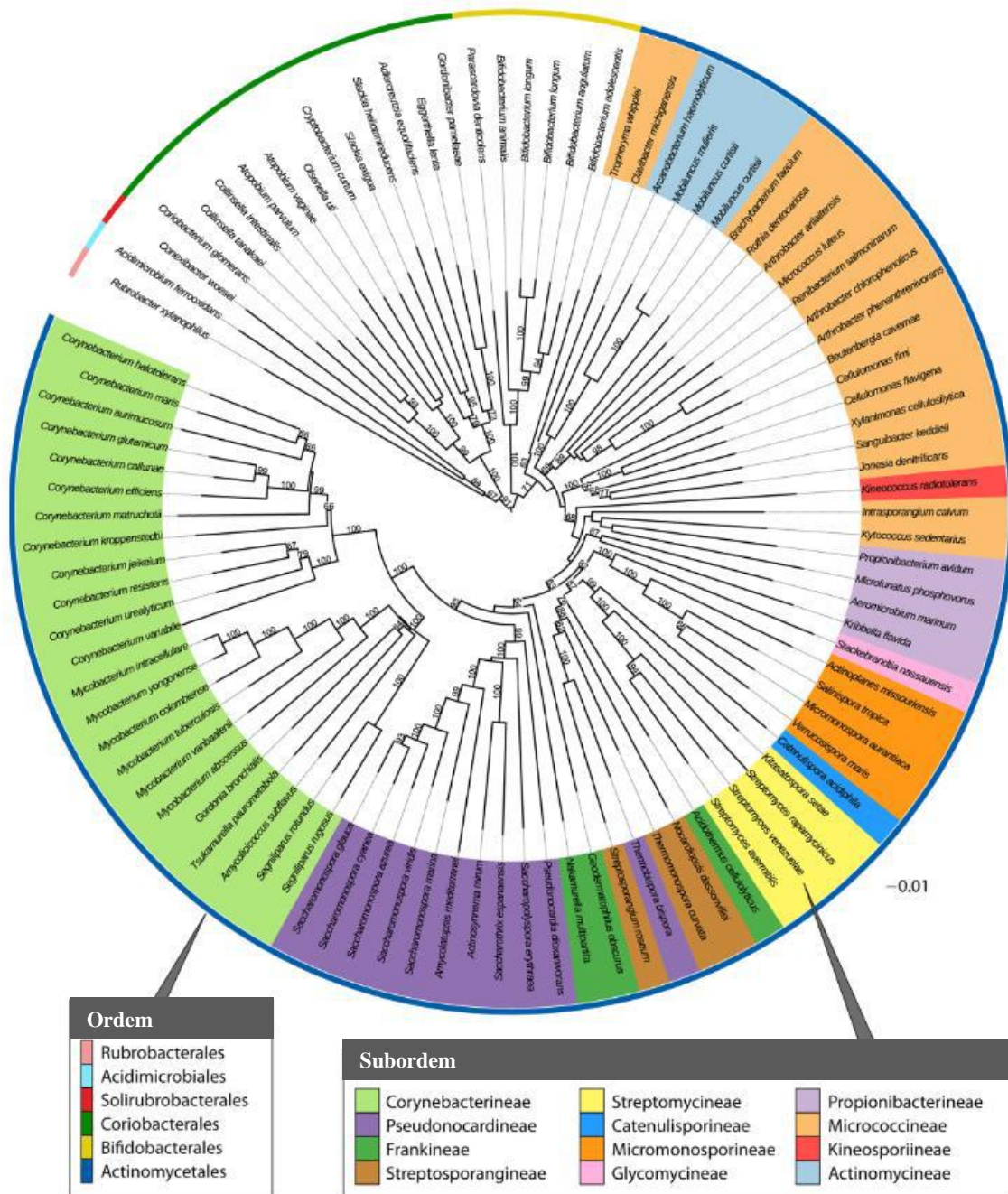


Figura 5: Árvore filogenética baseada em 97 seqüências genômicas do filo Actinobacteria. O projeto de genomas de cepas tipo foi selecionado de acordo com Göker e Klenk, 2013, desde que houvesse o rendimento de no máximo 25 contigs. A reconstrução filogenética, incluindo a avaliação de suporte aos ramos, foi feita usando seqüências de aminoácidos de acordo com os métodos descritos por Meier-Kolthoff et al, 2013. A árvore foi utilizada através do programa ITOL (Letunic e Bork, 2011). Adaptado de Barka et al, 2016.

Apesar dos diversos representantes biotecnologicamente interessantes, como os citados anteriormente, o gênero *Streptomyces* ocupa uma posição de destaque. Este gênero é responsável pela maior produção de metabólitos bioativos para fins terapêuticos no universo microbiano (Hopwood, 2007; Wohlleben et al, 2016; Van der Heul et al, 2018). Concomitantemente, os streptomicetos são de suma importância na ciclagem de nutrientes na natureza, sendo saprófitos capazes de hidrolisar uma vastidão de compostos orgânicos provenientes dos mais diversos organismos (Fungos, plantas, helmintos, entre outros) (Chater et al, 2010). A versatilidade metabólica do gênero vai além, sendo capaz de degradar pesticidas organoclorados e outros compostos poluentes xenobióticos (Cuozzo et al, 2017). Assim sendo, o gênero configura um candidato chamativo para bioprospecção de novos biocatalizadores e biomoléculas aplicáveis, seja na procura de novas espécies ou na exploração de genomas depositados porém pouco explorados (Spasic et al, 2018).

### *1.5 - Resultados Anteriores*

O presente projeto caracteriza-se como uma ramificação dos estudos de Trabalho de Conclusão de Curso (2015) e Dissertação de Mestrado (2016) do atual doutorando Yuri Pinheiro Alves de Souza do Laboratório de Ecologia Molecular Microbiana da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LEMM - URFJ), sob orientação do Prof. Dr. Alexandre Soares Rosado.

Os trabalhos anteriores tiveram suas justificativas pautadas na problemática da fixação de nitrogênio. O paulatino aumento de sua demanda para suplementação da produção agrícola em função do crescimento populacional e da produção de biocombustíveis é uma questão que persiste na atualidade como um desafio de caráter industrial e ecológico (Zhang et al, 2015). A utilização de espécies reativas de nitrogênio em grandes quantidades gera o seu acúmulo em sistemas ecológicos, causando uma sobrecarga da ciclagem do elemento e levando a danos ambientais (Roberts et al, 2010). Tal desequilíbrio ambiental causado pela fixação artificial de nitrogênio, sua má administração e utilização na agricultura (Galloway et al, 2008) e a produção de compostos nitrogenados artificiais que não existem naturalmente, como náilon (Gu et al, 2010), demandam soluções que amenizem os impactos ecológicos decorrentes. Um dos vieses para alcançar tal objetivo é a utilização da biotecnologia para o melhoramento da fixação de nitrogênio através da descoberta e utilização de enzimas bacterianas, como uma nova nitrogenase aplicável industrialmente (Oldroyd e Dixon, 2014), realçando a importância de estudos de caracterização e bioprospecção como os de Souza (2015 e 2016).

No decorrer destes trabalhos, obteve-se um consórcio microbiano termofílico quimiolitotrófico através da prospecção de um solo destinado ao rejeito e carbonização de matéria vegetal, localizado em Seropédica, município do estado do Rio de Janeiro. A aquisição do consórcio foi feita através da inoculação do meio de cultura N-Fix (suplementado com cloreto de amônia (NH<sub>4</sub>Cl)) com amostras do solo citado. A escolha do meio foi feita de acordo com Gadkari, Mörsdorf e Meyer (1992) para o estudo de um possível sistema alternativo de fixação de nitrogênio pela actinobactéria *Streptomyces thermoautotrophicus*.

As colônias do consórcio apresentavam fluuabilidade em meio líquido (Figura 6A e C), permanecendo em contato com a fase gasosa que possuía as únicas fontes de carbono e nitrogênio. A faixa de temperatura necessária para o crescimento era estritamente entre 50°C e 65°. As análises de microscopia ótica revelaram uma estrutura filamentosa, característica de *Streptomyces thermoautotrophicus* se comparada às descrições anteriores de Gadkari e seu grupo (1992). Para melhor caracterização dos componentes do consórcio foram realizados procedimentos de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura (Figura 6D, E e F) (resultados não publicados).

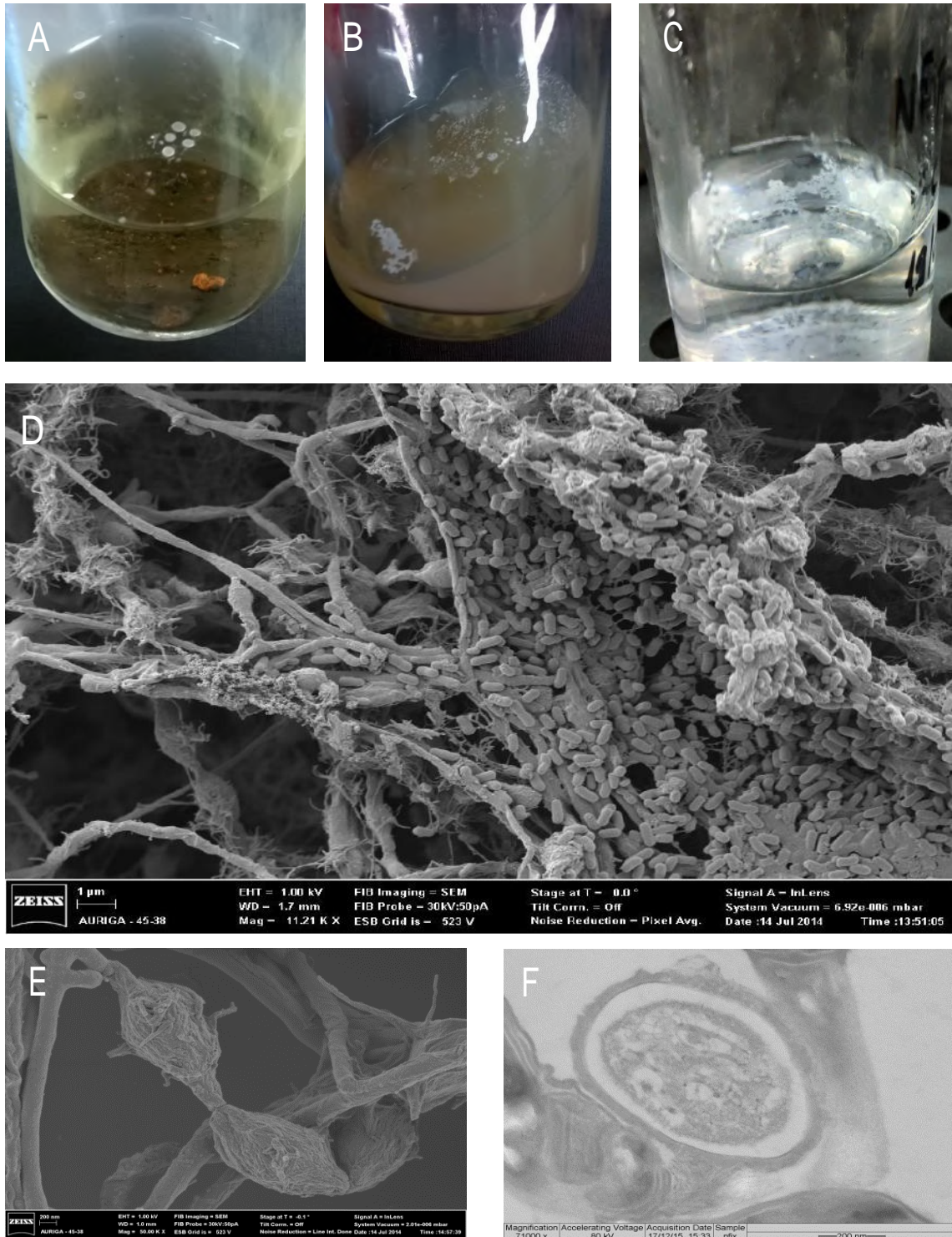


Figura 6: Figura utilizada em Souza, C. T. C. C., 2015, reproduzida com autorização do autor. Visão geral da morfologia do consórcio quimiolitotrófico. Crescimento inicial a partir de amostras de solo. Em (A) colônias que crescem em meio mineral suplementado com  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , e em seguida transferidas para o mesmo meio solidificado com ágar (B). Após o primeiro enriquecimento, as colônias foram cultivadas em meio de N-FIX (C), isento de fontes de N. Imagem (D) de ampliação 11,210x) mostra as várias bactérias não filamentosas depositadas sobre as hifas de actinobactéria. Depois, o detalhe das estruturas dos esporos em microscopia de varredura eletrônica (E) ampliação de 51.000x) e microscopia eletrônica de transmissão (F) ampliação da 71.000x) mostrando vacúolos e parede de membrana celular bem delimitada.



Na tentativa de isolar a actinobactéria presente, foram realizadas diversas passagens no meio de cultura além da realização de protocolos empregados na área clínica para o isolamento de patógenos deste gênero. O resultado dos esforços não foi bem sucedido, falhando em obter uma cultura pura do microrganismo almejado.

Com o objetivo de identificar o microrganismo de interesse e os outros componentes do consórcio, realizou-se uma análise molecular. Após extração do material genético (DNA), fez-se um sequenciamento utilizando o método de pirosequenciamento no sistema 454 Junior (Roche®).

Os dados obtidos foram analisados pelo programa Mothur. Os resultados foram então comparados à plataforma 16S Silva e estão ilustrados na tabela a seguir.

Tabela 1: Similaridade das OTUs após a seleção de qualidade e alinhamento no programa Mothur. Adaptado de Souza, C.T.C.C., 2015.

<b>Número de Seqs</b>	<b>Proporção</b>	<b>Hits mais próximos</b>	<b>Similaridade</b>
4811	39%	<i>Thermobispora bispora</i>	91%
4036	32%	<i>Acidothermus cellulolyticus e Frankia</i>	96% e 95%
2889	23%	<i>Chelatococcus</i>	99%
395	3%	<i>Luteiomonas e Xantomonas</i>	97%
163	1%	<i>Geobacillus debilis e Bacillus</i>	99%
91	1%	<i>Aneurinibacillus, Geobacillus e Bacillus</i>	93%
68	1%	<i>Thermovum composti</i>	99%
33	0%	<i>Cohnella</i>	93%

Após a análise de bioinformática, verificou-se na tabela que os *hits* de maior abundância entre as sequências correspondiam a gêneros de actinobactérias (dois primeiros itens da tabela). Considerando que estes apresentaram um percentual de similaridade abaixo do limiar utilizado para afirmar o pertencimento a uma espécie (abaixo de 97%, como destacado em vermelho na tabela) (Madigan et al, 2016), deduziu-se a possibilidade de serem dois organismos distintos ou talvez ambas pertencerem ao mesmo microrganismo que poderia, concomitantemente, configurar uma nova espécie. As suposições foram feitas em virtude de relatos como os de Wang e colaboradores em 1997 que descreveram um microrganismo termofílico contendo duas sequências gênicas de RNA da subunidade ribossômica (rrs) 16S distintas.

Quanto aos outros componentes: os gêneros correspondiam a microrganismos cujas características eram coerentes com as condições naturais de crescimento do consórcio (termofílicos e/ou autotróficos) (Kämpfer et al, 2015; Nazina et al, 2001; Mohagheghi et al, 1986). Por apresentarem potencial biotecnológico e para depreensão de correlações metabólicas, realizaram-se tentativas de isolar estes componentes através da utilização de meios diferenciais. O resultado obtido, até o presente momento, foi o isolamento do membro *Geobacillus spp.*, cujo material genético foi extraído e sequenciado para análise. A montagem do *draft* genômico foi depositada, publicada e a estirpe nomeada LEMMY01 (de Souza, da Motta e Rosado, 2017).

Deve-se ressaltar que o consórcio em questão é mantido desde sua obtenção (2015) em meio mineral sem adição de amônia, sendo as únicas fontes de carbono e nitrogênio disponíveis aquelas presentes na atmosfera do frasco. A proporção dos gases utilizados é: Ar sintético (80% Nitrogênio/20% Oxigênio) - 50%; Monóxido de Carbono - 45%; Gás Carbônico 5%. Ademais, análises do metagenoma do consórcio não apresentam genes conhecidos de fixação de nitrogênio, o que reforça, levando em consideração o tempo de manutenção em meio mineral sem adição de compostos nitrogenados, o potencial biotecnológico do consórcio.

A descoberta de uma nova nitrogenase, que possua como característica ser capaz de resistir a tensões de oxigênio, representaria algo inédito na literatura e seria, potencialmente, a melhor solução para uma aplicação industrial (através da inserção de seu gene codificante em plantas) que traria avanços expressivos para a problemática já exposta.

## **2 - Justificativa**

Inserido na perspectiva manifesta de encontrar alternativas para a questão da fixação de nitrogênio e associado à problemática do cultivo já exposta, a obtenção de isolados puros é de extrema importância (sendo muitas vezes indispensável). Não somente para estudos descritivos e de base, mas também para aqueles de caráter aplicado, envolvendo principalmente o desenvolvimento da biotecnologia.

Dessa forma, considerando que os trabalhos anteriores foram obstaculizados por essa mesma questão e a permanência do grande interesse em adquirir o isolado puro da actinobactéria presente neste consórcio, a justificativa deste trabalho é a persecução desse empenho através da aplicação de técnicas diversas que cheguem, por fim, ao objetivo. O alcance desse isolado possibilitaria um maior entendimento das relações metabólicas do

consórcio e a possível identificação de uma via alternativa de fixação de nitrogênio e seus genes de interesse biotecnológico, além de caracterização da via de fixação de Carbono (quimioautotrofia).

### 3 – Objetivos

- Isolar a actinobactéria componente de um consórcio microbiano termofílico quimiolitotrófico obtido do solo através do uso diferencial de antibióticos e meios de cultivo.
- Realizar a identificação microscópica e taxonômica molecular do isolado obtido.

### 4 - Materiais e Métodos

#### 4.1 - Cultivo

Para fins de tentativa de isolamento foram escolhidos meios de cultura específicos para alguns membros componentes do consórcio. Tais escolhas basearam-se nos meios utilizados pelo "The Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures" (DSMZ) para a manutenção de estirpes de microrganismos que apresentassem similaridades aos do consórcio. As escolhas para o experimento foram tais como na tabela a seguir.

Tabela 2: Relação dos microrganismos do consórcio e os meios selecionados para tentativa de isolamento.

<b>Microrganismo</b>	<b>Meio de Cultura Selecionado</b>
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	R2A (DSMZ 830)
<i>Streptomyces thermoautotrophicus</i>	GYM (DSMZ 65)
<i>Chelatococcus spp.</i>	Nitriolotriacetato (DSMZ 463)

Os repiques foram feitos em placas de petri contendo os meios selecionados na forma sólida (ágar a 1,2%) para que se realizasse a técnica de esgotamento em estrias, afim de se obter colônias isoladas.

A semeadura foi realizada utilizando-se uma alça de platina com a qual se colheu uma amostra do consórcio crescido em meio N-FIX líquido transferindo-a para a placa contendo os meios selecionados. Feitos o inóculo e o primeiro espalhamento, procedeu-se com a técnica de esgotamento por estrias, esterilizando a alça com auxílio de um bico de Bunsen nos intervalos entre cada estria.

As placas contendo meio sólido foram seladas utilizando parafilme e incubadas até que se visualizasse crescimento numa estufa à 55°C, temperatura utilizada para o crescimento do consórcio.

As colônias isoladas obtidas nas etapas anteriores foram repicadas em frascos de penicilina de 100ml contendo 40ml do meio de cultura correspondente ao da placa de petri. Foram selecionados para repique morfotipos distintos obtidos nas culturas em meio sólido.

Os frascos foram fechados com tampas de borracha e lacres de alumínio e incubados nas mesmas condições das placas até que se visualize crescimento bacteriano.

#### *4.2 - Estocagem e Cópia de Segurança*

As colônias isoladas foram ressuspensas em criotubos de 5ml contendo uma solução de meio de cultura e glicerol com concentração final de 20% e congeladas à - 80°C para fins de estocagem e manutenção de cópias de segurança.

#### *4.3 - Concentração Mínima Inibitória*

Para o experimento de Concentração Mínima Inibitória (Minimal Inhibitory Concentration/MIC) foram adaptados protocolos pré-estabelecidos (Andrews, 2001).

O experimento foi realizado utilizando uma placa de vinte e quatro poços para o teste simultâneo de dois antibióticos com concentrações variando de 512µg/ml até 1µg/ml, utilizando um fator de diluição de 1:2. A organização dos poços deu-se da seguinte forma: 20 poços para as diluições (10 para cada antibiótico), 2 para os controles positivos e 2 para os controles negativos, como ilustrado na figura a seguir:

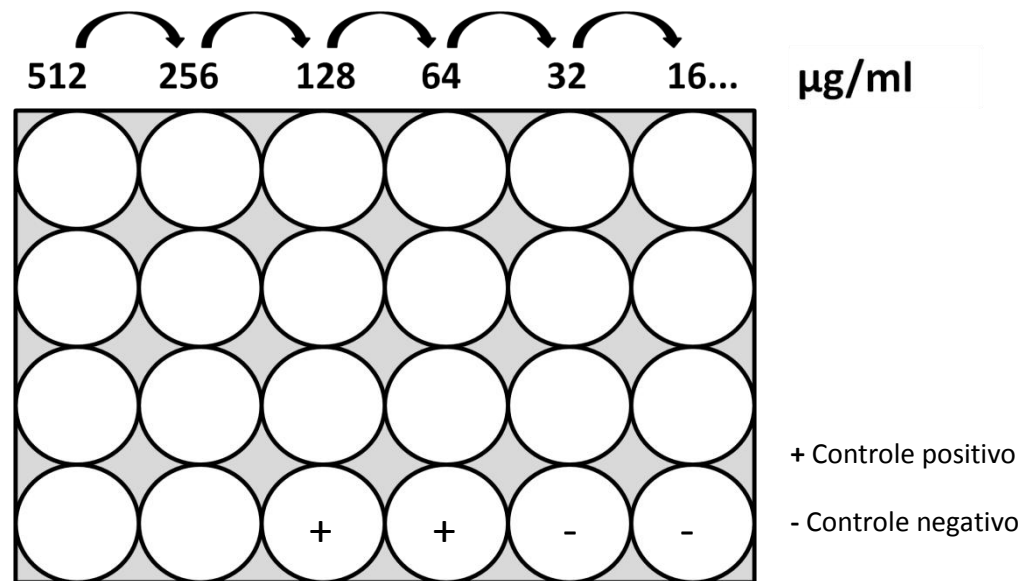


Figura 7: Esquemática da placa de 24 poços utilizada para o experimento de concentração mínima inibitória. Controles positivos: poços sem antibiótico inoculados com bactéria. Controle negativo: poços contendo apenas meio adicionado de antibiótico.

Para obtenção das diluições desejadas preparou-se uma solução estoque utilizando 10ml de diluente para 0,02g de antibiótico, resultando uma concentração de 2000µg/ml. Diluentes específicos foram utilizados para cada antibiótico de acordo com o estabelecido pela literatura (Andrews, 2001). Nos casos em que o diluente utilizado não foi etanol 70%, submeteu-se a solução à filtragem utilizando filtros de 0,22µm, para fins de esterilização, previamente à estocagem.

As soluções estoque foram divididas em tubos eppendorf® de 2ml envoltos em papel alumínio, selados com parafilme e armazenados em um freezer à -20°C.

Para a obtenção das diluições desejadas em placa, utilizou-se a solução estoque para a preparação de 1ml de uma solução de 1024µg/ml. Esta solução foi então depositada no primeiro poço da série de diluição contendo 1ml do meio de cultura específico para a bactéria que seria submetida ao teste. Desta forma, a concentração neste poço resultará em 512µg/ml. Para as diluições seguintes coletava-se 1ml deste poço e depositava-se no poço seguinte contendo, igualmente, 1ml de meio, resultando num fator de diluição 1:2. Repetiu-se o processo até que se completasse a série de 10 poços. A cada diluição realizava-se uma homogeneização utilizando a ponteira da micropipeta. Ao final do procedimento, descartou-se 1ml do último poço para que todos os poços contivessem a mesma quantidade de meio de cultura.

Todos os poços, com exceção dos destinados aos controles negativos, foram inoculados com uma suspensão bacteriana padronizada à 0,5 McFarland, como estabelecido pela literatura (Andrews, 2001), com auxílio de uma alça calibrada.

Os poços referentes ao controle positivo continham apenas 1ml de meio de cultura inoculados com a bactéria em questão, sem adição de antibióticos. Já os de controle negativo possuíam 1ml com concentração de 512µg/ml dos antibióticos utilizados no teste, sem inóculo bacteriano.

A escolha dos antibióticos, mostrada na tabela a seguir (Tabela 3), foi feita com base nas diferenças morfológicas (categorização de Gram) dos microrganismos (Walsh e Wencewicz, 2016). As escolhas feitas em relação às actinobactérias foram baseadas não somente na coloração mas também em estudos da literatura que contivessem informações relacionadas ao uso de antibióticos para inibição de tal classe (Williams e Davies, 1964; Miao e Davies, 2010).

Tabela 3: Relação dos microrganismos do consórcio (ou relacionados), coloração de Gram e os antibióticos selecionados para cada membro.

<b>Microrganismo</b>	<b>Coloração de Gram</b>	<b>Antibiótico Selecionado</b>
<i>Geobacillus spp.</i>	+	Amoxicilina
<i>Chelatococcus spp.</i>	-	Tetraciclina
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	-	Cloranfenicol

#### 4.4 Testes de Quimiolitotrofia do Isolado

Foram realizados dois experimentos: primariamente a inoculação do isolado em frasco contendo 40 ml de meio N-Fix com a aclimação atmosférica do recipiente utilizada para o crescimento do consórcio: 50% de ar sintético (80% nitrogênio e 20% oxigênio), 45% de monóxido de carbono e 5% de gás carbônico. A aclimação foi feita utilizando seringas de 10ml para retirada e introdução dos gases. Retiraram-se 20 ml da fase gasosa do frasco e, em seguida, introduziram-se os gases nas proporções citadas anteriormente.

Posteriormente, realizou-se o mesmo experimento, porém desta vez utilizando a forma sólida do meio N-Fix utilizando o agente solidificante *Agar Noble* por apresentar alto grau de pureza, diminuindo as chances de prover uma fonte heterotrófica de nitrogênio. Houve

também a adição de 0,03% de clinoptilolita (zeolita com alta afinidade por amônia), de forma a minimizar ao máximo, ou até mesmo eliminar, qualquer fonte de nitrogênio heterotrófica contaminante.

#### *4.5 Microscopia*

As colônias do isolado obtido foram submetidas à visualização em microscópio ótico composto para contraste de fase diferencial, etapa realizada na Unidade de Microscopia Padrón-Lins (UniMicro) do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (IMPPG). (Axioplan 2 - Zeiss®) e microscópio ótico simples para visualização das colorações de Gram. Os protocolos da coloração foram seguidos de acordo com a técnica convencional.

Realizaram-se adicionalmente: Microscopias Eletrônicas de Transmissão (MET) utilizando o microscópio Morgani - FEI® (UniMicro) e Microscopias Eletrônicas de Varredura (MEV), utilizando o microscópio Quanta 250 - FEI® no Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO).

O processamento das amostras para ambas as microscopias foi feito de acordo com os protocolos da UniMicro, vide caderno de anexos (Anexos 6 e 7).

#### *4.6 Extração de DNA*

As culturas puras que foram utilizadas para extração eram provenientes de meios sólidos ou líquidos, dependendo-se da avaliação de qual dos meios possibilitaria uma maior obtenção de biomassa dos isolados, resultando em um maior aporte de material genético ao final da extração.

A extração para sequenciamento do material genômico dos isolados obtidos foi feita através da utilização do QIAamp™ DNA Mini Kit - Genomic DNA (QIAGEN®). Os protocolos quanto a utilização de amostras de meio sólido ou meio líquido foram seguidos de acordo com as instruções do fabricante.

A quantificação do material genético extraído foi feita por fluorimetria utilizando o sistema Qubit™ (Thermo Fisher Scientific®). Quanto a análise qualitativa, esta foi feita através do sistema Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific®).

#### 4.7 Sequenciamento

Para o sequenciamento do material genético obtido após a etapa de extração de DNA utilizou-se o MiSeq™ System - Illumina®. Esta etapa foi realizada no "Genome Center" da Universidade da Califórnia em Davis (UC Davis).

#### 4.8 Análise de Dados

Os arquivos de leitura do genoma, recebidos após a etapa anterior, foram primeiramente submetidos a um processo de combinação das leituras diretas (*forward reads*) e das leituras reversas (*reverse reads*) do sequenciamento através do programa SPAdes (*Saint Petersburg genome Assembler*) (Prjibelski et al, 2014).

Posteriormente, utilizando o mesmo programa, foi feita a montagem das regiões contíguas entre as leituras pareadas (*contigs*). Como forma de identificar se o sequenciamento possuía alguma contaminação ou não, tais *contigs* foram analisados por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al, 1990) cuja base de dados para comparação é o NCBI (*National Center for Biotechnological Information* - [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Após esta checagem, para fins de classificação taxonômica, as sequências foram exploradas em procura de regiões que contivessem genes de rrs16S através da utilização do programa BarRNAP (VBC - *Victorian Bioinformatics Consortium*) (Seeman, 2015). Assim que localizadas em quais *contigs* e em que posição dentro dos mesmos se encontravam tais genes, estes foram analisados no programa Artemis (*Wellcome Sanger Institute*) (Carver et al, 2011) para visualização de tais sequências.

Finalmente, as informações obtidas foram comparadas ao banco de dados RDP (*Ribosome Database Project*) (Cole et al, 2005) para obtenção de sequências já descritas que fossem próximas às obtidas do sequenciamento. Tais informações foram então utilizadas para montagem de uma árvore taxonômica através do programa MEGA7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0*) (Kumar e Tamura, 2016).



## 5. Resultados

### 5.1 Cultivo

Os meios testados inicialmente, foram: GYM e R2A. As placas do meio GYM apresentaram o crescimento de colônias de forma circular, elevação convexa e margem lobulada, não sendo características de actinobactéria (Figura 8a e b). No entanto, as placas do meio R2A apresentaram o crescimento de dois morfotipos coloniais, sendo um deles puntiforme, branco e semelhante ao crescimento característico de actinobactérias (Erikson, 1949; Gadkari, Mörsdorf e Meyer, 1992) (Figura 8c e 8d).

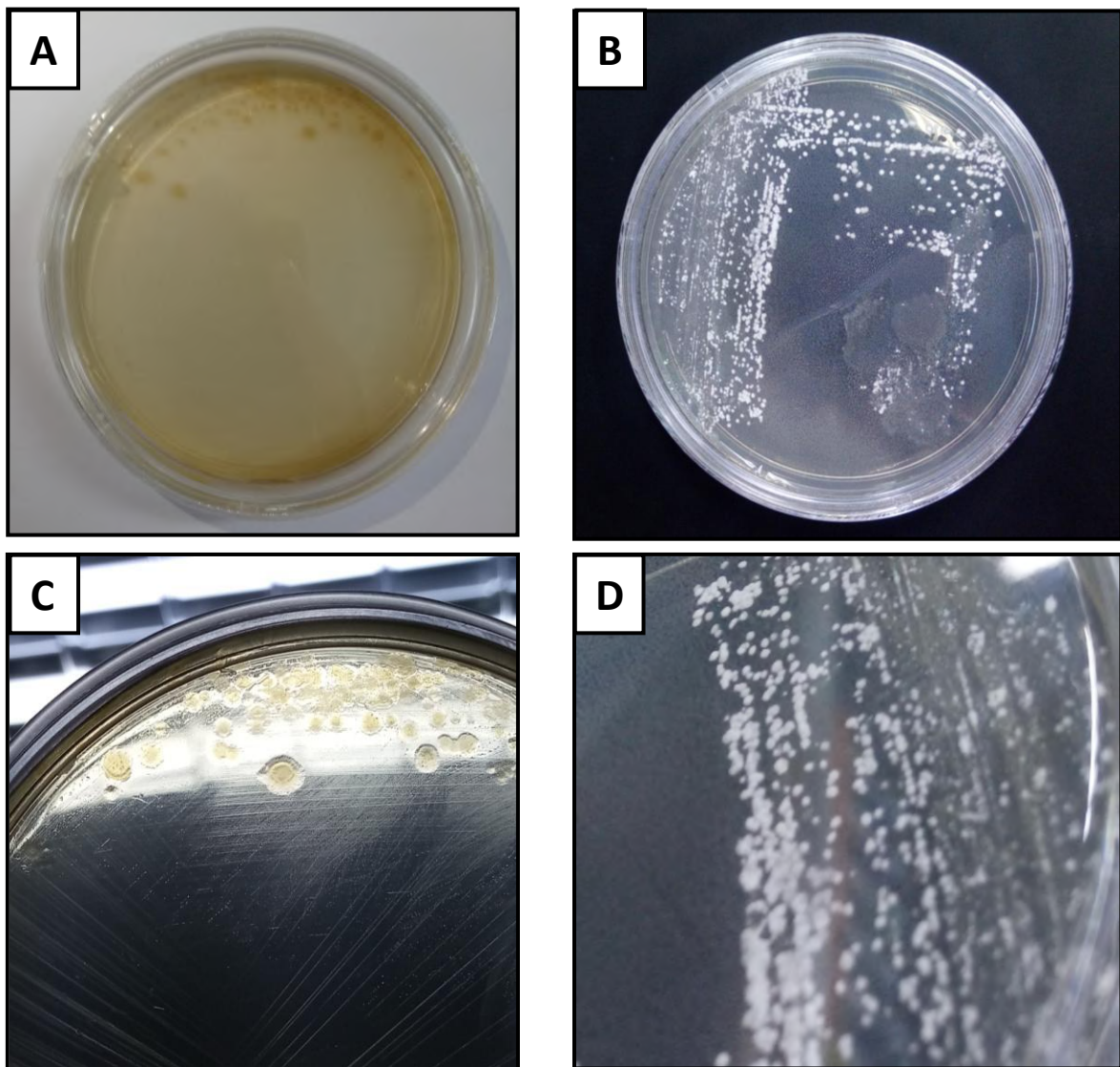


Figura 8: A - Placa com meio GYM apresentando crescimento de colônias amarronzadas. C - Imagem aproximada das colônias para visualização clara do morfotipo. B - Placa com meio R2A apresentando crescimento de dois morfotipos coloniais. Circulado em vermelho, colônias puntiformes brancas, características de actinomiceto. Circulado em **verde**, colônias translúcidas disformes. D - Imagem aproximada para visualização do morfotipo colonial da actinobactéria.

Tais colônias típicas de actinomiceto foram, então, repicadas no meio R2A em forma líquida (R2B) para verificar a pureza e viabilidade no meio desejado. Observou-se novamente o surgimento de dois tipos de colônias: um apresentava flutuação, permanecendo na superfície do líquido (semelhante ao crescimento observado em meio N-Fix), enquanto o outro se apresentava como grumos depositados no fundo do frasco (Figura 9). Na tentativa de isolar a actinobactéria, as colônias flutuantes foram repicadas novamente em meio sólido. A tentativa, no entanto, foi mal sucedida, sendo observado novamente o crescimento de dois morfotipos coloniais idênticos ao primeiro repique.

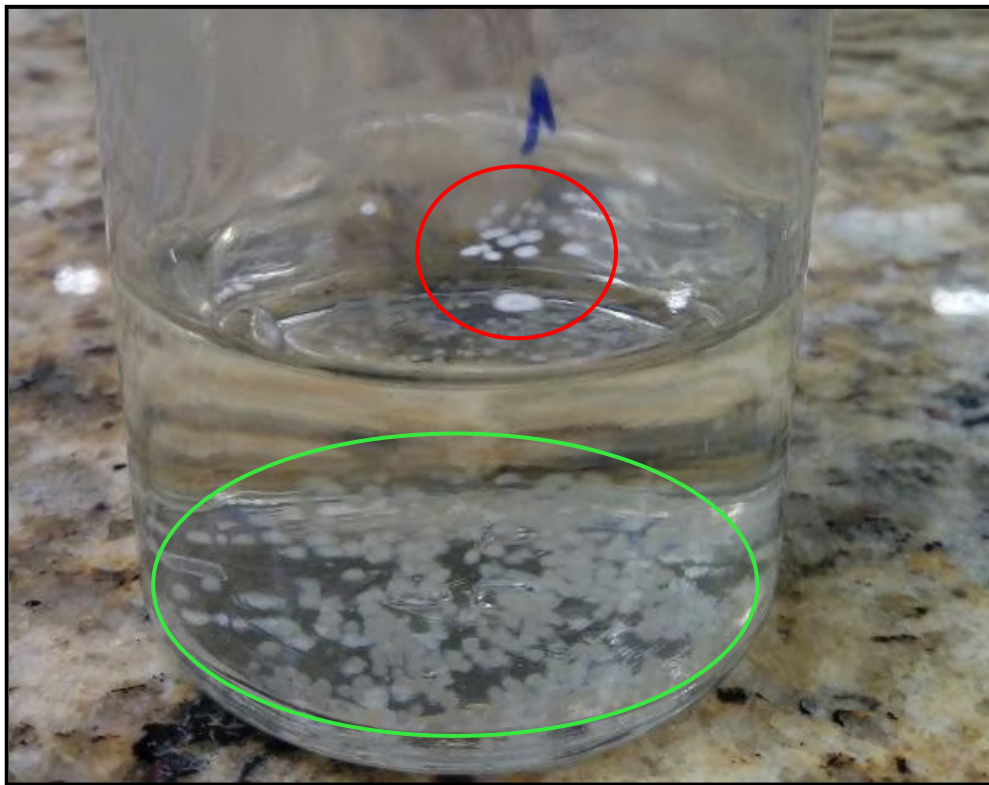


Figura 9: Frasco contendo meio R2A em forma líquida. Identificam-se dois crescimentos distintos: colônias brancas flutuantes (circuladas em vermelho) e colônias em forma de grumos acinzentados depositadas ao fundo do frasco (circuladas em verde).

Para melhor identificação dos morfotipos obtidos dos experimentos anteriores e planejamento do curso de ação seguinte, realizaram-se colorações de Gram das seguintes amostras: morfotipo de actinobactéria do meio R2A sólido, morfotipo disforme do meio R2A sólido e grumos do meio R2B. A observação em microscópio ótico das colorações confirmaram que as colônias puntiformes brancas obtidas no meio sólido eram resultado do crescimento de uma actinobactéria, evidenciado pelas estruturas filamentosas visualizadas (Figura 10A). Quanto às colônias disformes, as observações revelaram que seu surgimento era

proveniente da proliferação de células bacilares Gram positivas com aparente capacidade de produção de endósporos (Figura 10B). Tais características correspondiam àquelas do conhecido componente *Geobacillus spp. LEMMY01* já isolado do consórcio, configurando uma aparente contaminação cruzada entre os membros. Os grumos revelaram conter endósporos assim como as formas bacilares descritas anteriormente (Figura 10C).

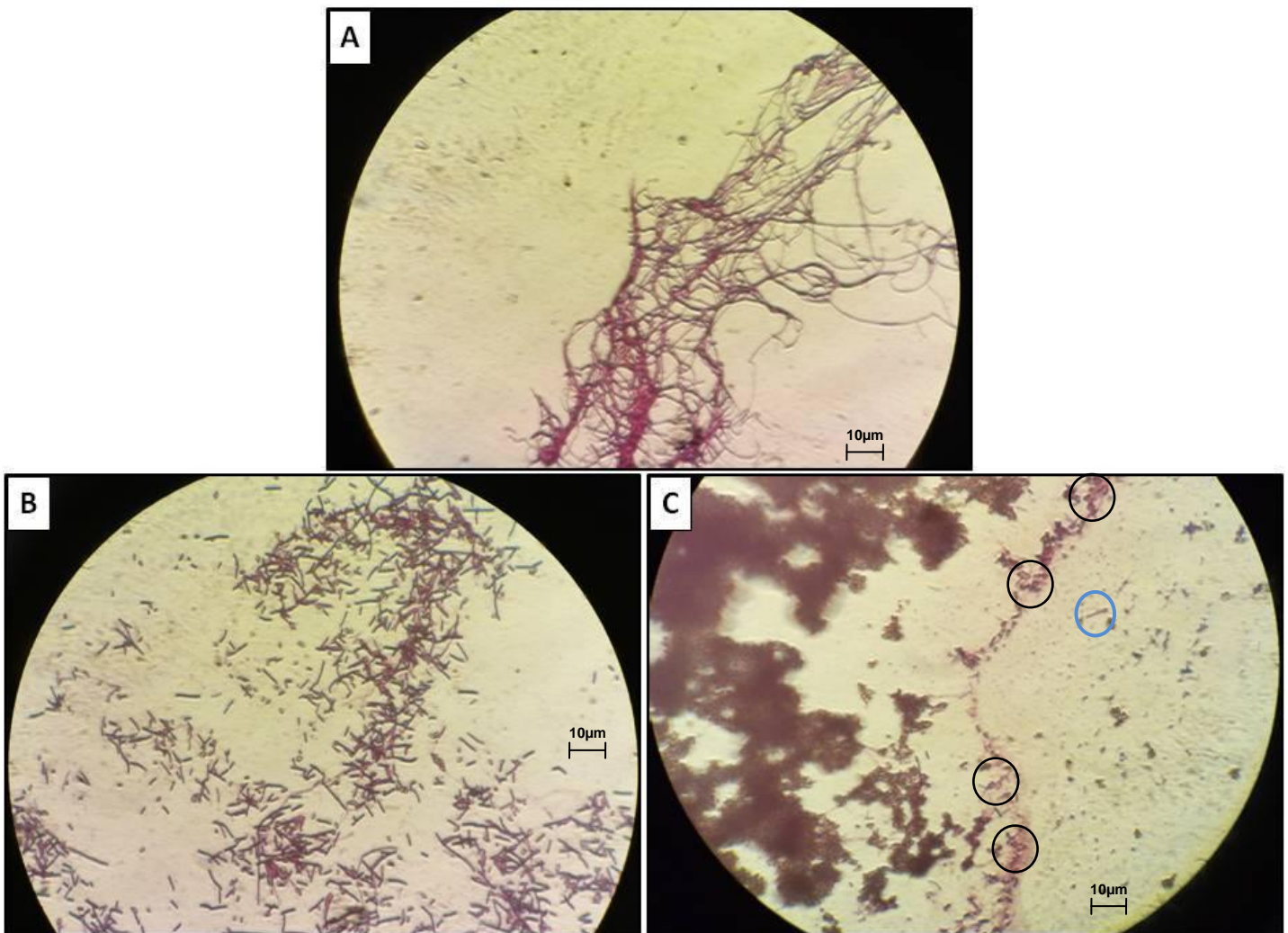


Figura 10: Visualização de colorações de Gram das amostras: **A** - Colônia puntiforme branca obtida do meio R2A sólido. Observa-se um emaranhado de estruturas filamentosas. **B** - Colônias disformes obtidas no meio R2A sólido. Observam-se formas bacilares Gram positivas, algumas com endósporos em suas regiões terminais e endósporos livres. **C** - Colônias em forma de grumo observadas submersas em meio R2A líquido. Observam-se uma estrutura bacilar com um endósporo em sua extremidade (circulada em azul) assim como esporos livres (circulados em preto). Todas as imagens possuem o aumento de 1000 vezes.

Repetições do repique das colônias de actinobactéria do meio sólido para o meio líquido, e vice-versa, apresentavam o mesmo resultado invariavelmente: dois crescimentos distintos. Tais fatos evidenciaram que a simples repetição da metodologia descrita não seria suficiente para a obtenção de uma cultura axênica. Decidiu-se, então, recorrer à utilização de antibióticos de forma a tentar eliminar a contaminação pelo *Geobacillus spp.*

## 5.2 Concentração Mínima Inibitória

No experimento destinado a determinação da concentração mínima inibitória (MIC) de *Geobacillus spp. LEMMY01* testaram-se dois antibióticos: tetraciclina e amoxicilina. Os poços de número um até dez e de onze até vinte foram utilizados para concentrações dos antimicrobianos citados respectivamente.

Após incubação de 24 horas à 53°C, os resultados obtidos denotavam que: a última concentração testada de tetraciclina (1µg/ml) foi capaz de inibir o crescimento do *Geobacillus spp* (Figura 11). Quanto às concentrações de amoxicilina, observou-se crescimento discreto, evidenciado por aumento na turbidez e presença de precipitados, nos dois últimos poços (2µg/ml e 1µg/ml, respectivamente) (Figura 11). Assim sendo, os resultados deste experimento foram: MIC de Tetraciclina < 1µg/ml; MIC de Amoxicilina > 2µg/ml.

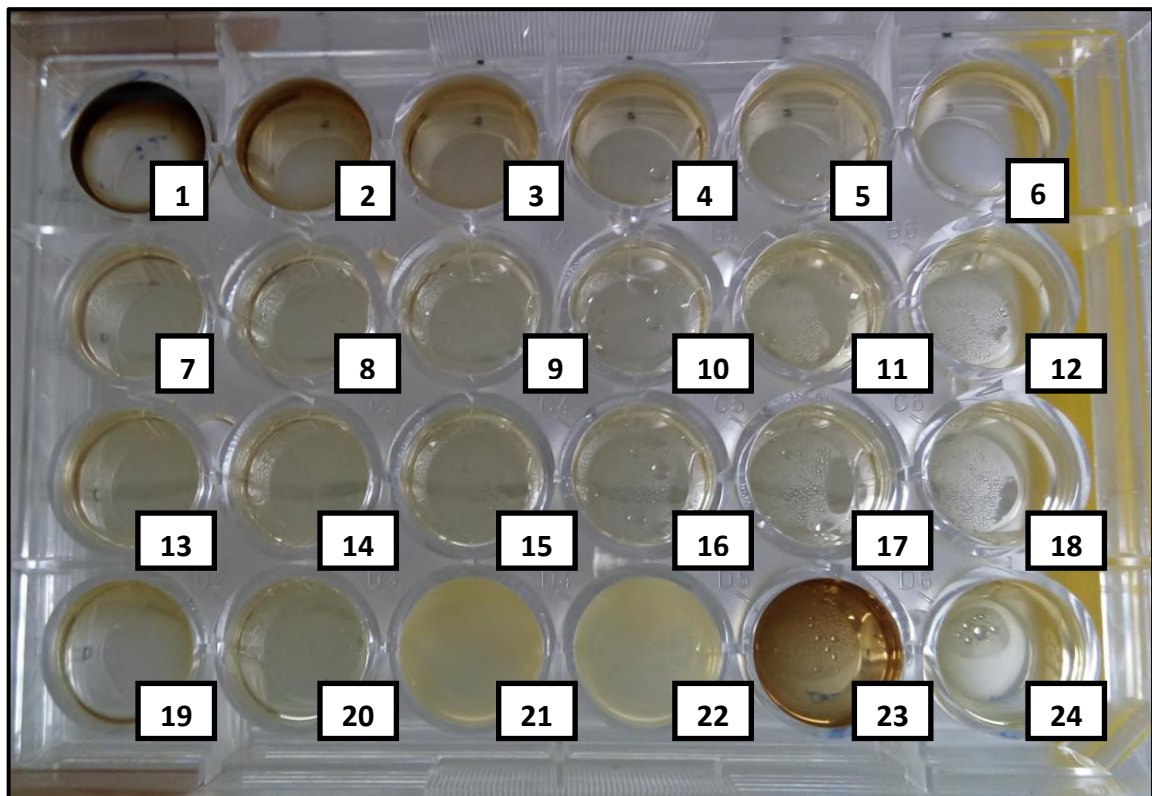


Figura 11: Placa de 24 poços utilizada para experimento de concentração mínima inibitória de *Geobacillus spp.* Poços 1 - 11 contendo concentrações de Tetraciclina. Poços de 11 - 20 contendo concentrações de Amoxicilina. Poços 19 e 20 apresentando turbidez levemente elevada quando comparados aos poços anteriores (11 - 18) e controle negativo de Amoxicilina (poço 24).

Sendo o MIC de Tetraciclina de natureza menor do que o limite detectável do teste realizado, optou-se por prosseguir os experimentos utilizando somente o antimicrobiano Amoxicilina. Deste modo, os dados obtidos e concentrações utilizadas seriam mais precisos e apresentariam maior confiabilidade.

Para que se pudesse testar se a concentração de amoxicilina obtida seria efetiva em meio sólido, foram realizados repiques do contaminante em placas de meio OTTOW (meio de isolamento do *Geobacillus spp.*) e meio R2A. Este teste foi realizado de tal forma que se testasse a concentração mínima inibitória obtida no experimento anterior assim como uma concentração de razão maior e uma de razão menor, sendo assim as proporções testadas: 4µg/ml, 2µg/ml e 1µg/ml. Os resultados foram positivos, havendo eficiente inibição do crescimento em todas as concentrações testadas (Figura 12).

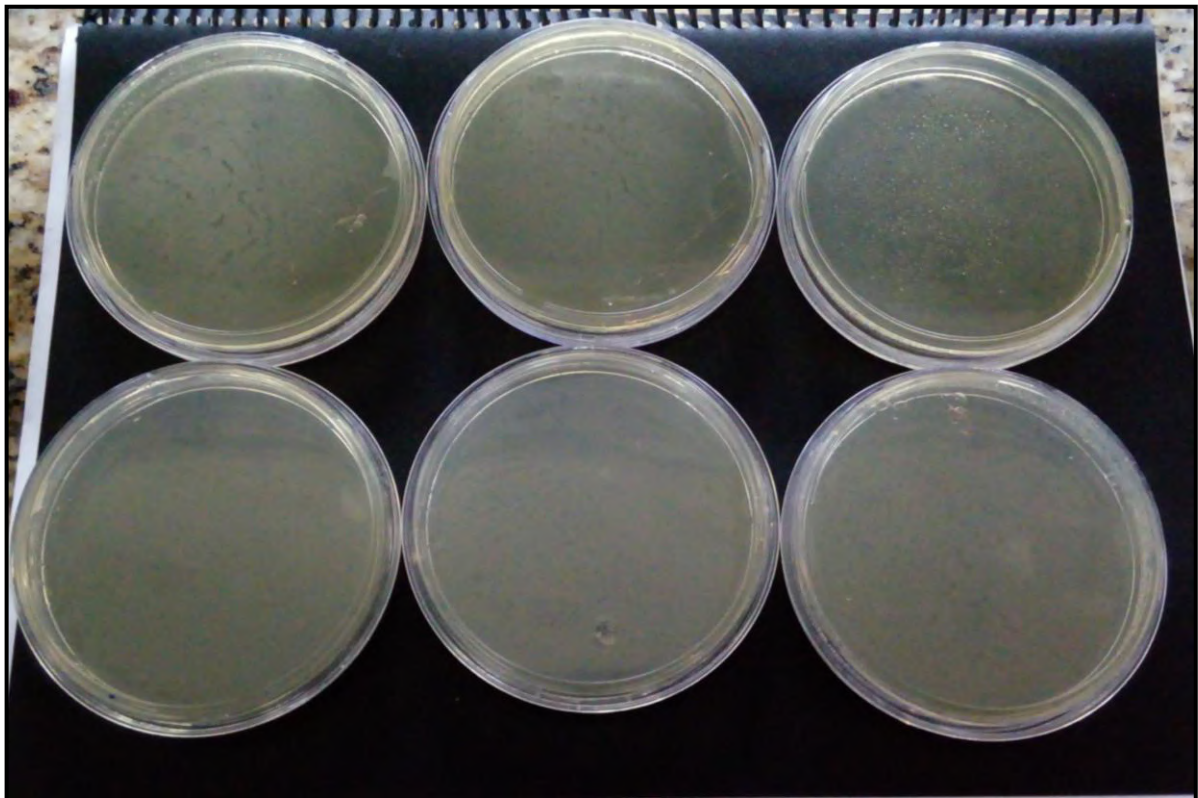


Figura 12: Placas de meio OTTOW (fileira superior) e R2A (fileira inferior) contendo gradiente de concentrações de amoxicilina: 4µg/ml, 2µg/ml e 1µg/ml (da esquerda para a direita em ambas as fileiras).

Confirmadas as inibições do crescimento do contaminante em meio sólido, o procedimento seguinte realizado foi o de inoculação do consórcio crescido em meio N-Fix líquido para placas de R2A contendo este mesmo gradiente de concentrações.

Em tais placas observaram-se três situações: a placa contendo a concentração de 4µg/ml não apresentou crescimento; aquela contendo a concentração de 2µg/ml apresentou crescimento tênue de colônias da actinobactéria e aquela contendo a concentração de 1µg/ml apresentou crescimento expressivo da actinobactéria (Figura 13). Em nenhuma das situações

observou-se o crescimento de qualquer outro tipo de colônia, indicando uma possível obtenção de uma cultura pura.

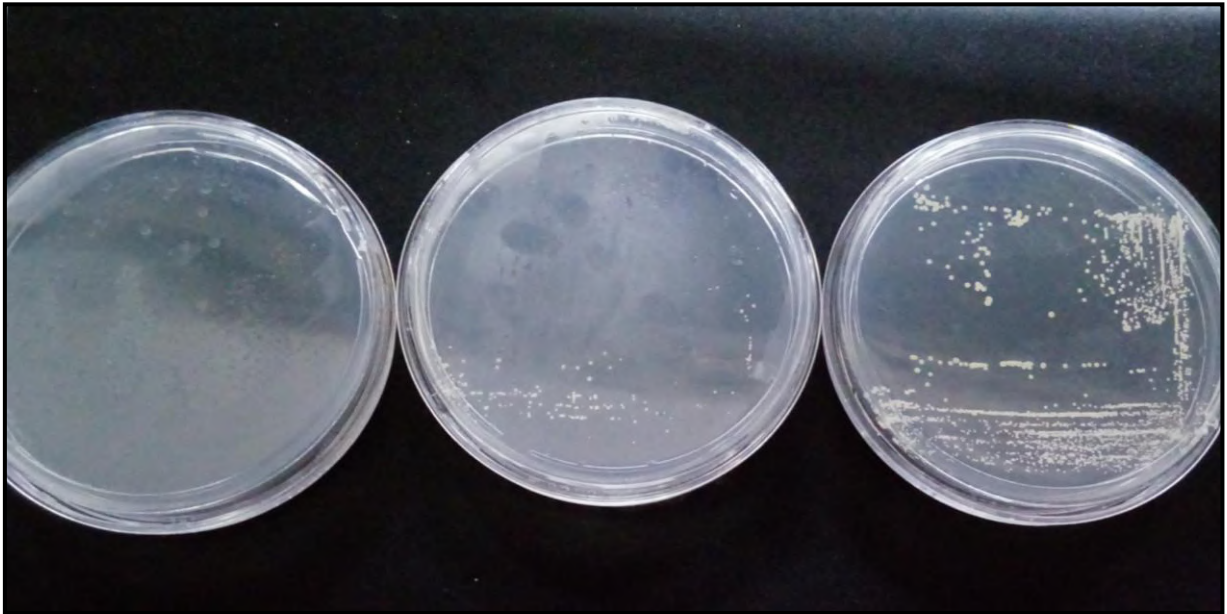


Figura 13: Placas de meio R2A contendo concentrações distintas de amoxicilina: 4µg/ml, 2µg/ml e 1µg/ml (da esquerda para a direita, respectivamente).

Para que se pudesse confirmar se as colônias obtidas estavam de fato puras, colônias das placas de concentração 2µg/ml e 1µg/ml foram repicadas em placas sem a adição de antibióticos. Após esse procedimento, observou-se, além do crescimento da actinobactéria, o crescimento das colônias de *Geobacillus spp.*, revelando que as colônias crescidas em meio com antibiótico não eram axênicas. Considerando a capacidade esporulativa do contaminante (Nazina et al, 2001), era provável que o crescimento filamentosso característico das actinobactérias formasse emaranhados capazes de abarcar os esporos do bacilo. Desta forma, embora não houvesse germinação devido ao ambiente hostil da placa contendo antibiótico, os esporos permaneciam viáveis e eram transmitidos para o repique seguinte, germinando no ambiente sem antibiótico.

A estratégia empregada para contornar o obstáculo foi a realização de sucessivos repiques das colônias obtidas de placas com antibiótico em placas de condição semelhante, no intuito de purificar os isolados e eliminar a presença de esporos. Após a terceira passagem, as colônias foram repicadas em uma placa sem adição de antibiótico para verificação da pureza dos isolados. O que observou-se foi o crescimento solitário de colônias de actinobactéria (Figura 14a). Repiques subsequentes desta placa em placas sem antibiótico foram realizados

para confirmar que as colônias não apresentavam contaminação, sendo o resultado positivo (Figura 14b).

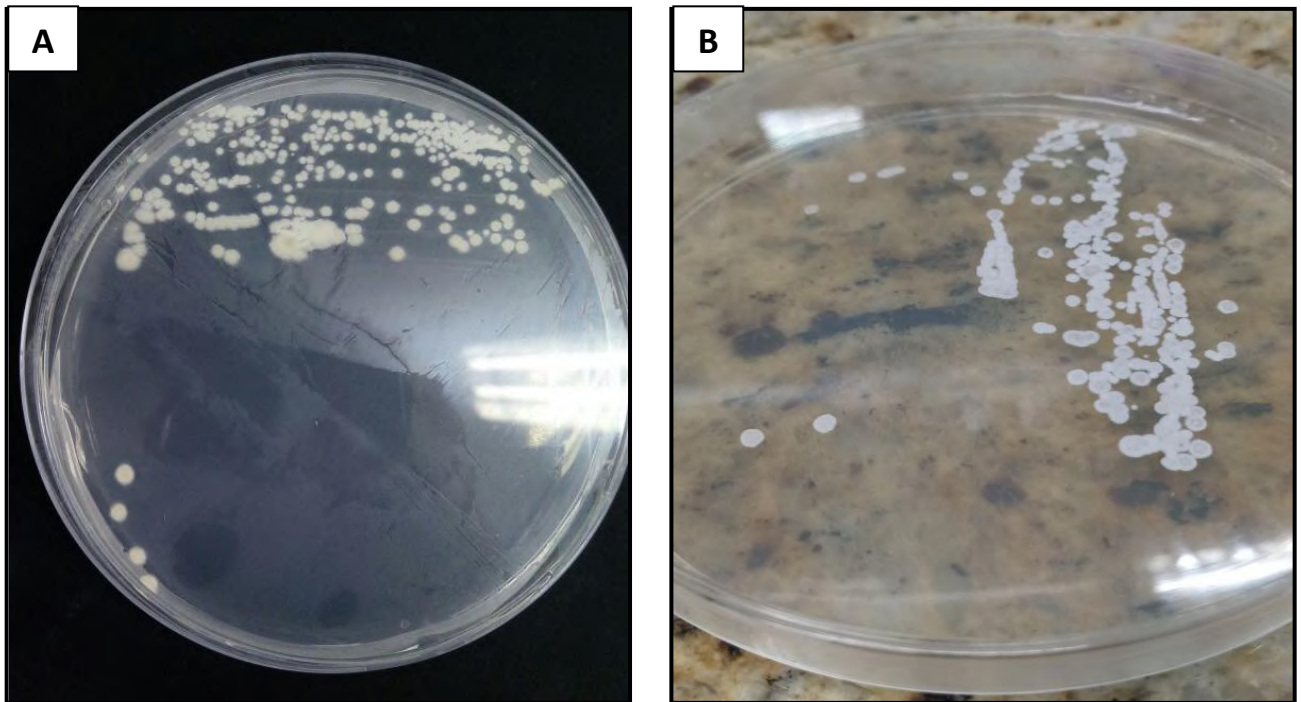


Figura 14: Placas de meio R2A com crescimento de morfotipo único de actinobactéria. **A** - Repique em placa sem antibiótico após terceira passagem em placas contendo antibióticos. **B** - Segunda passagem em placa sem antibiótico sem presença de contaminação.

### 5.3 Testes de Quimiolitotrofia do Isolado

Os resultados da inoculação do isolado em meio N-Fix foram positivos (Figura 15), comprovando sua capacidade de crescer em meio isento de fontes heterotróficas de carbono e nitrogênio.



Figura 15: Frascos de meio N-Fix apresentando crescimento da actinobactéria isolada. Crescimento em forma de massa esbranquiçada, semelhante ao crescimento do consórcio no mesmo meio.

Realizou-se um repique do crescimento obtido para o meio R2A na forma sólida, sem adição de antibióticos, com o intuito de verificar novamente a pureza do isolado, além de certificar que o processo de inoculação e aclimação do meio N-Fix havia se realizado de forma estéril. O resultado surpreendente foi a observação, novamente, dos dois morfotipos coloniais evidenciados no segmento inicial deste trabalho. A coloração de Gram e microscopia do contaminante apresentaram identidade com o *Geobacillus spp.*

Tais circunstâncias levaram ao questionamento da possível fonte de contaminação existente. A esterilidade dos frascos foi testada através da incubação de 40ml de meio R2A líquido estéril por 24h à 53°C. O resultado foi a ausência de qualquer crescimento. Testou-se a esterilidade do meio N-Fix através da inoculação de uma amostra do meio líquido em uma placa de meio R2A sólido. Após a incubação, observou-se, da mesma forma, a ausência de crescimento. A hipótese da persistência de esporos nos isolados foi descartada em virtude da contundência dos resultados das passagens em meio com antibiótico. Hipotetizou-se, então, que os gases utilizados para aclimação dos frascos poderia configurar uma fonte de contaminação. Implementou-se, portanto, a filtração (filtros Jet Biofil® de polietersulfona de porosidade 0,22µm) dos gases à metodologia de aclimação da atmosfera dos frascos para que se pudesse testar a hipótese. Ao final da realização dos procedimentos adaptados, não se observou crescimento do contaminante no meio sólido, sendo comprovada a especulada fonte de contaminação.

Os resultados do teste de capacidade de crescimento em meio N-Fix sem traços de amônia foi positivo (Figura 16), reforçando a probabilidade da capacidade de fixação de nitrogênio.



Figura 16: Crescimento dos isolados de actinobactéria em meio N-Fix sem traços de amônia: solidificado através da utilização de ágar ultrapuro (Agar Noble) contendo 0,03% de clinoptilolita (quelante de amônia).



### 5.4 Análise de Microscopia

As amostras utilizadas para microscopia de luz (DIC) foram colônias do isolado crescido em meio N-Fix sem adição de compostos nitrogenados. A visualização revelou que a estrutura da colônia é formada por um aglomerado das células filamentosas, onde se observam projeções dos filamentos nas bordas bem como presença expressiva de esporos (Figura 17), características típicas de actinobactérias (Barka et al, 2016) e semelhantes às descritas para cepa UBT1 de *Streptomyces thermoautotrophicus* (Gadkari, Mörsdorf e Meyer, 1992; MacKellar et al, 2016). Na figura 17 observa-se uma cadeia de esporos próxima à borda da colônia, característica descrita como comum em espécies de streptomicetos (Tresner, Davies e Backus, 1961). Ainda na mesma figura, pode-se observar filamentos desprendidos da estrutura coesa da colônia assim como esporos livres. Pode-se ver também, na extremidade de um filamento, o início da formação de uma cadeia de esporos.

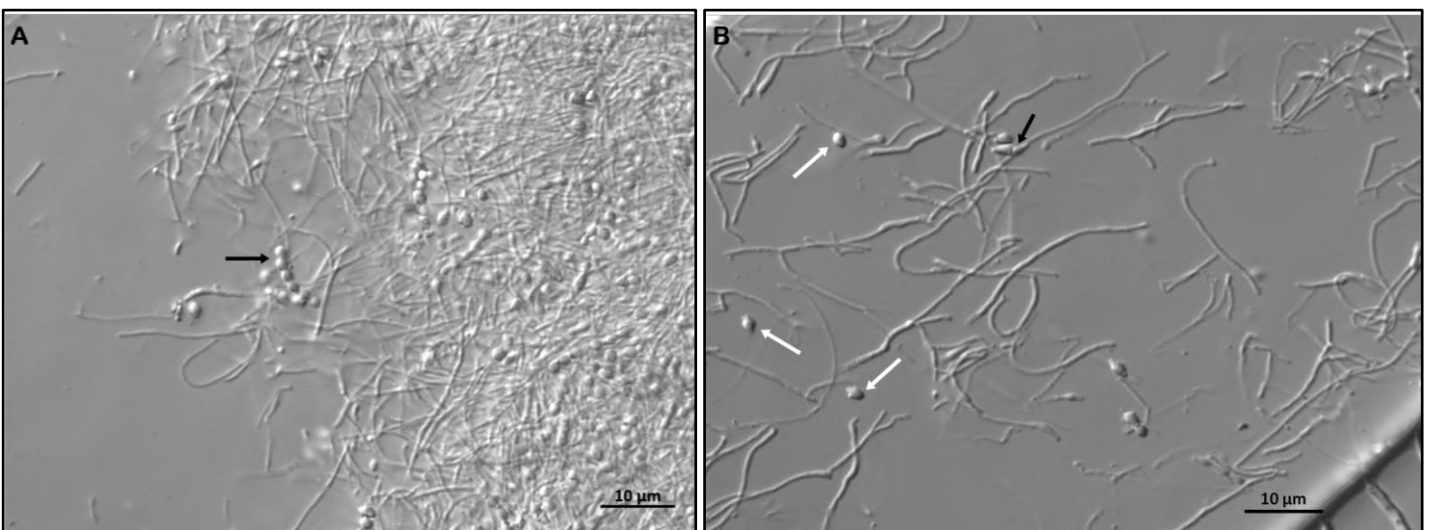


Figura 17: Imagens de microscopia ótica com contraste de fase diferencial (DIC) do isolado crescido em meio N-fix sem fontes de nitrogênio fixadas. **A:** Borda da colônia: massa de filamentos apresentando projeções. Apontado em preto, cadeia de esporos. **B:** Filamentos desprendidos da colônia principal. Apontado em preto, processo de formação de cadeia de esporos não finalizado. Apontado em branco, esporos livres. Aumento de 200 vezes.

Não foi observado nenhuma forma condizente com um esporo em germinação. Formas celulares distintas das de actinobactéria foram igualmente não encontradas, atestando a pureza do isolado.

As amostras utilizadas para realização de MET eram da mesma proveniência das anteriores. Os resultados do processamento possibilitaram a visualização de estruturas internas das células do isolado (Figura 18 A e B). Para fins de caracterização morfológica, as

microscopias corroboram com a característica de uma parede celular Gram positiva, sendo coerente com coloração observada anteriormente neste trabalho e nos trabalhos que o precedem (Souza 2015).

Quanto à natureza dos microcompartimentos bacterianos (*Bacterial Micro Compartments* - BMCs) observados (Figura 18 C e D), é provável que os pontos escuros observados configurem carboxissomos: organização periódica de enzimas responsáveis pela fixação de carbono, causando aumento de eficiência do processo (Tanaka et al, 2008). No entanto, serão necessárias confirmações posteriores, não somente com microscopias de maior aumento mas também com evidências presentes no genoma.

Ademais, é possível identificar uma estrutura intracitoplasmática cuja função não pode ser inferida. Assim, reforça-se a necessidade de outro procedimento de MET que vá além dos aumentos alcançados neste trabalho.

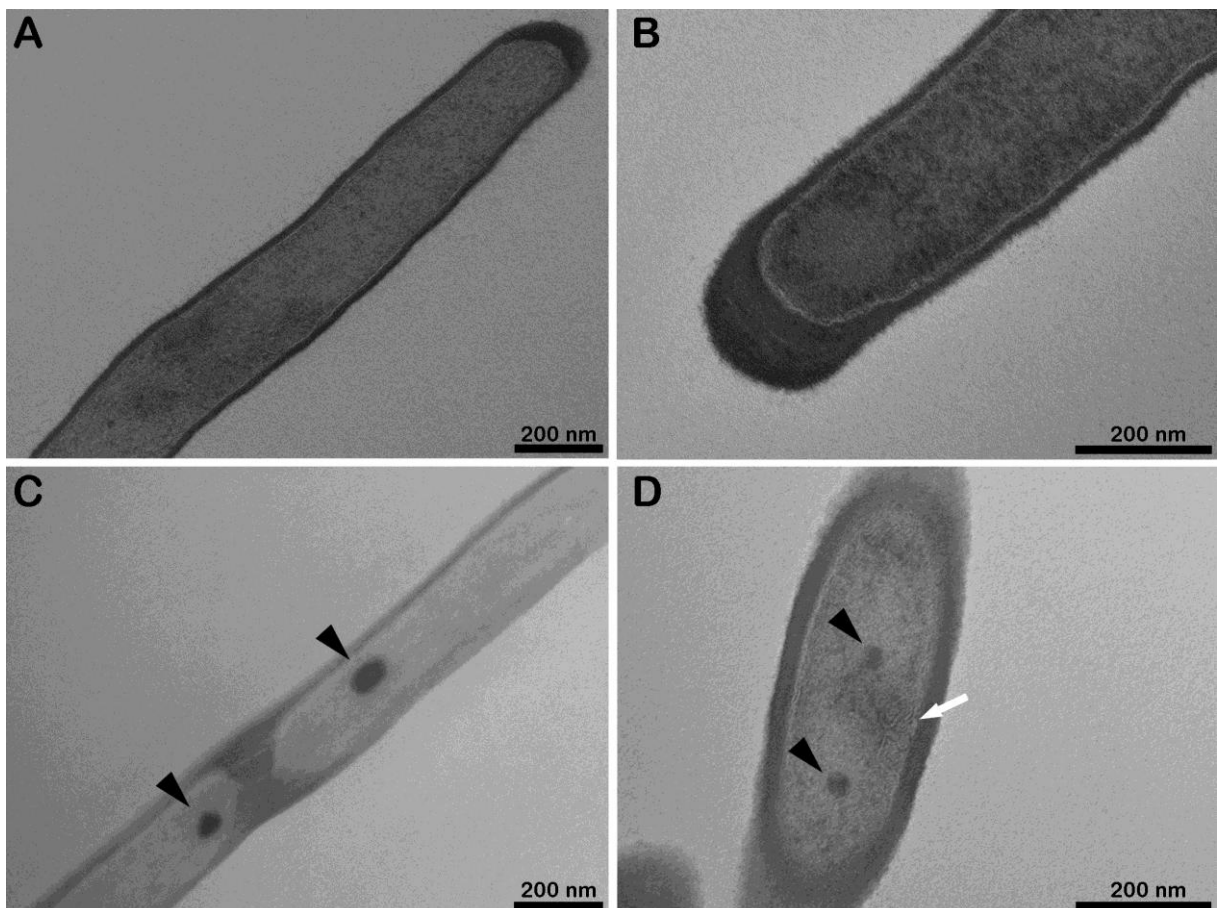


Figura 18: Imagens de MET. Observa-se a morfologia da célula de actinobactéria e sua parede celular Gram + (A e B). C: Observam-se dois citoplasmas de células distintas separadas por um septo de parede celular, assim como BMCs possivelmente identificáveis como carboxissomos (apontados em preto). D: Observa-se no mesmo citoplasma dois possíveis carboxissomos (apontados em preto) assim como BMC de estrutura e função não identificadas (apontado em branco).

Referente às microscopias de varredura, as amostras utilizadas foram o crescimento em meio N-fix líquido (sem adição de fontes de nitrogênio heterotróficas) colônias do isolado obtidas em meio R2A (Incubação de dois dias). As colônias foram recortadas do ágar e submetidas ao processamento para MEV. As imagens resultantes do procedimento de MEV revelaram detalhes estruturais das colônias assim como das células dos isolados. Na figura 18 observam-se níveis diferentes de estruturação de acordo com o aumento visualizado. A organização da colônia foi condizente com a observada na microscopia ótica.

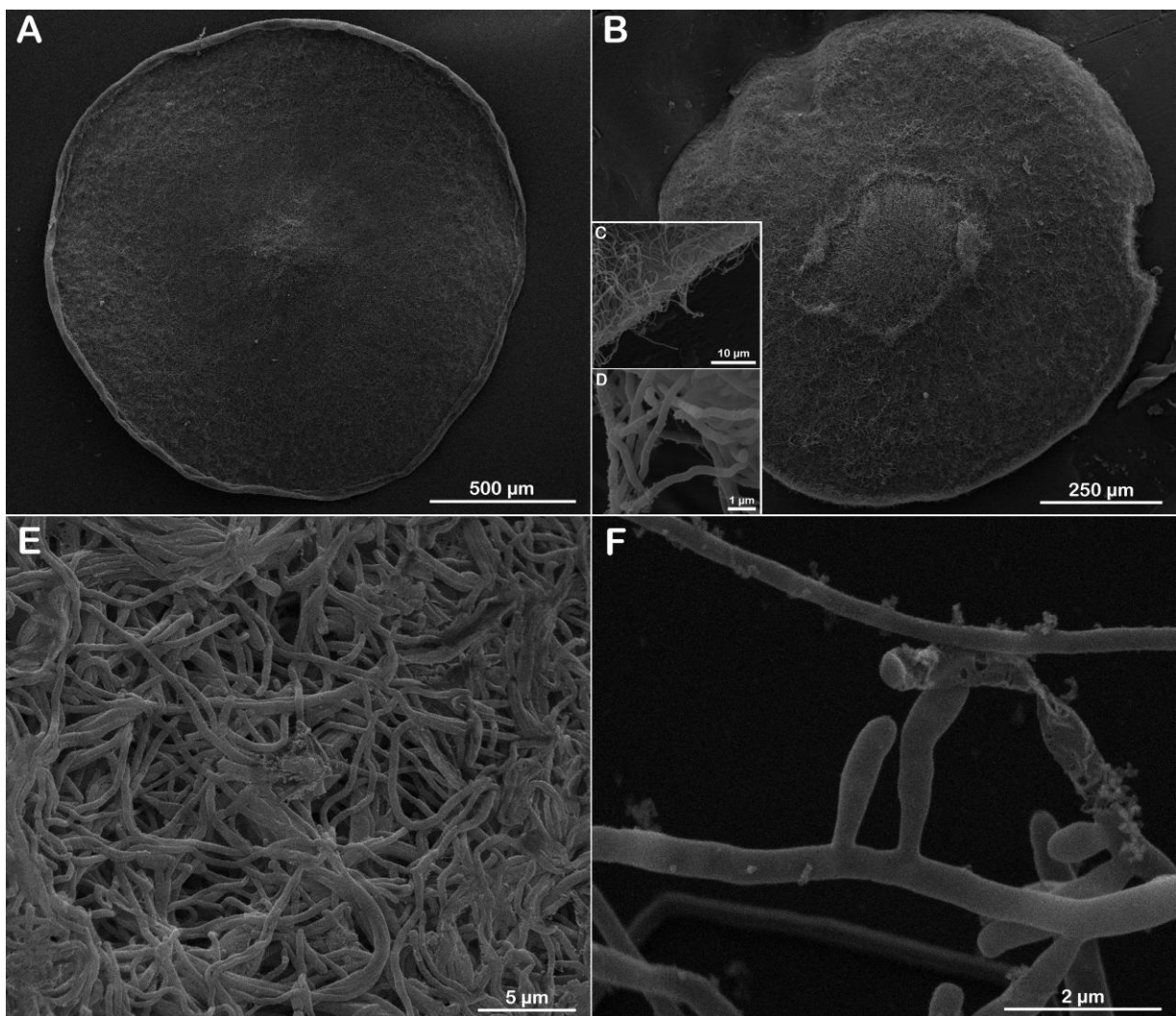


Figura 19: Imagens de MEV. **A e B:** Colônias sobre ágar visualizadas em baixo aumento. **C e D:** Maior aumento para visualização da borda inferior da colônia B, mostrando projeção dos filamentos e substância extracelular de revestimento. **E:** Maior aumento para visualização de superfície da colônia A, observa-se pouco revestimento celular e ausência de esporos. **F:** Amostra de colônias crescidas em meio N-Fix líquido. Observa-se o brotamento hifas (aéreas ou não), célula lisada e seu extravazado e revestimento celular presente nos outros filamentos visíveis.

Contudo, a varredura eletrônica possibilitou a visualização de substâncias extracelulares produzidas nos filamentos que se projetavam para fora da colônia (Figura 19 C e D). Presumivelmente, trata-se de um lipopolissacarídeo cuja hidrofobicidade confere fluutuabilidade às colônias no meio líquido, como evidenciado por Gadkari e colaboradores em 1992 e também descrito na literatura (Flärdh e Buttner 2009). As amostras do meio N-fix apresentaram baixo rendimento, havendo poucas células na amostra metalizada. No entanto, pode-se observar o que aparenta ser o brotamento de hifas aéreas e o revestimento celular mais expressivo (Figura 19 F).

No emaranhado de filamentos da Figura 19 E (amostra colônia) é notável a ausência de esporos na superfície da colônia, fato que contrasta com as observações da microscopia de luz. Entretanto, é preciso destacar que as duas amostras em comparação provêm de meios diferentes e foram submetidas a diferentes processamentos.

No âmbito da visualização de estruturas relacionadas ao processo de esporulação, os procedimentos de MEV possibilitaram observar células com intumescências e esporos em diferentes estágios de maturação. Nas Figuras 20 A e B (amostras de N-Fix) é possível observar células em processo de formação de cadeia de esporos, fato evidenciado por seus diferentes graus de turgência. Ainda na Figura 20 B, nota-se uma septação no filamento central da imagem, acontecimento característico na formação de hifas aéreas para esporulação (Flärdh et al, 2009). Prosseguindo na mesma figura, pode-se reparar a morfologia de diferentes estágios de amadurecimento de esporos. Constata-se um esporo globular de superfície lisa e diâmetro pouco maior que  $1,5\mu\text{m}$  (Figura 20C). Próximo, há outro de forma semelhante, porém de maior volume (diâmetro aproximado de  $2\mu\text{m}$ ) e vestígios do revestimento de um esporo maturado (Figura 20 C). Em outra imagem é possível ver um esporo destacado da colônia, depositado sobre superfície do meio de cultura (Figura 20 D) cujas características são substancialmente diferentes daquelas apresentadas nas imagens anteriores: sua superfície apresenta um revestimento por substâncias que figuram pelos e seu diâmetro alcança, aproximadamente,  $4\mu\text{m}$ . Este último é tido como um dos esporos de morfologia típica de streptomicetos (Locci, 2006).

Em últimas análises, não foram observados morfotipos celulares contaminantes ou semelhantes aos vistos nos trabalhos previamente realizados (Souza 2015), novamente comprovando a obtenção de uma cultura axênica.

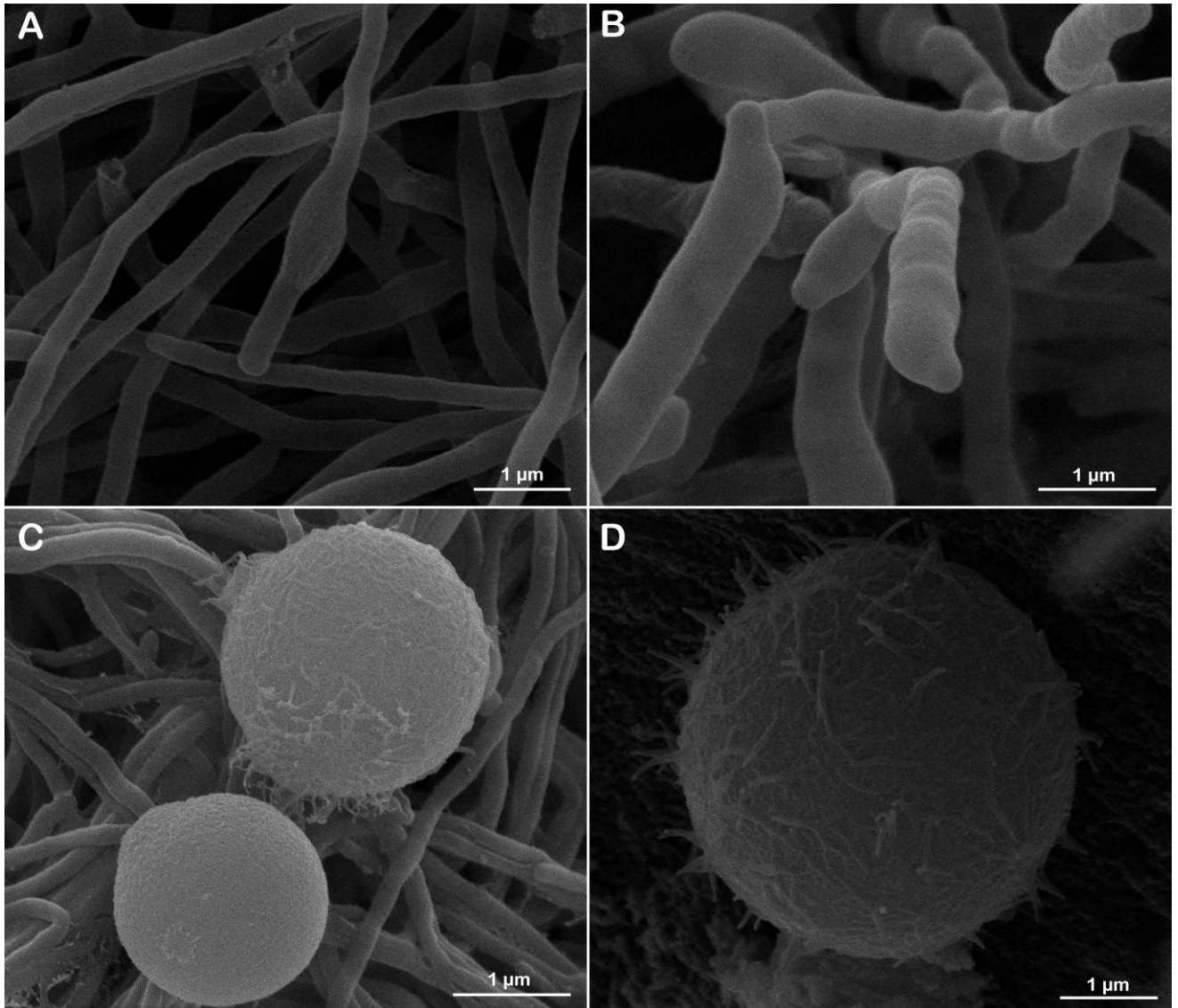


Figura 20: Imagens de MEV. **A:** Célula intumescida devido ao processo de esporulação (amostra de meio N-Fix líquido). **B:** Filamento septado apresentando diferentes graus de turgidez devido ao início da formação de cadeia de esporos. **C:** Esporos sobre colônia apresentando diferentes graus de maturação. **D:** Esporo maturado destacado de borda da colônia. Apresenta diâmetro aumentado quando comparado aos anteriormente visualizados e ornamentação em forma de pelos em sua superfície.

### 5.5 Análise de Dados

Os arquivos de leitura resultaram em um genoma de aproximadamente 4681086 pares de base (4.6 Mb). A procura pelos genes de *rRNA* 16S sucedeu em duas unidades distintas deste gene, as quais foram utilizadas para montagem da árvore taxonômica. Os resultados foram como a figura seguinte.

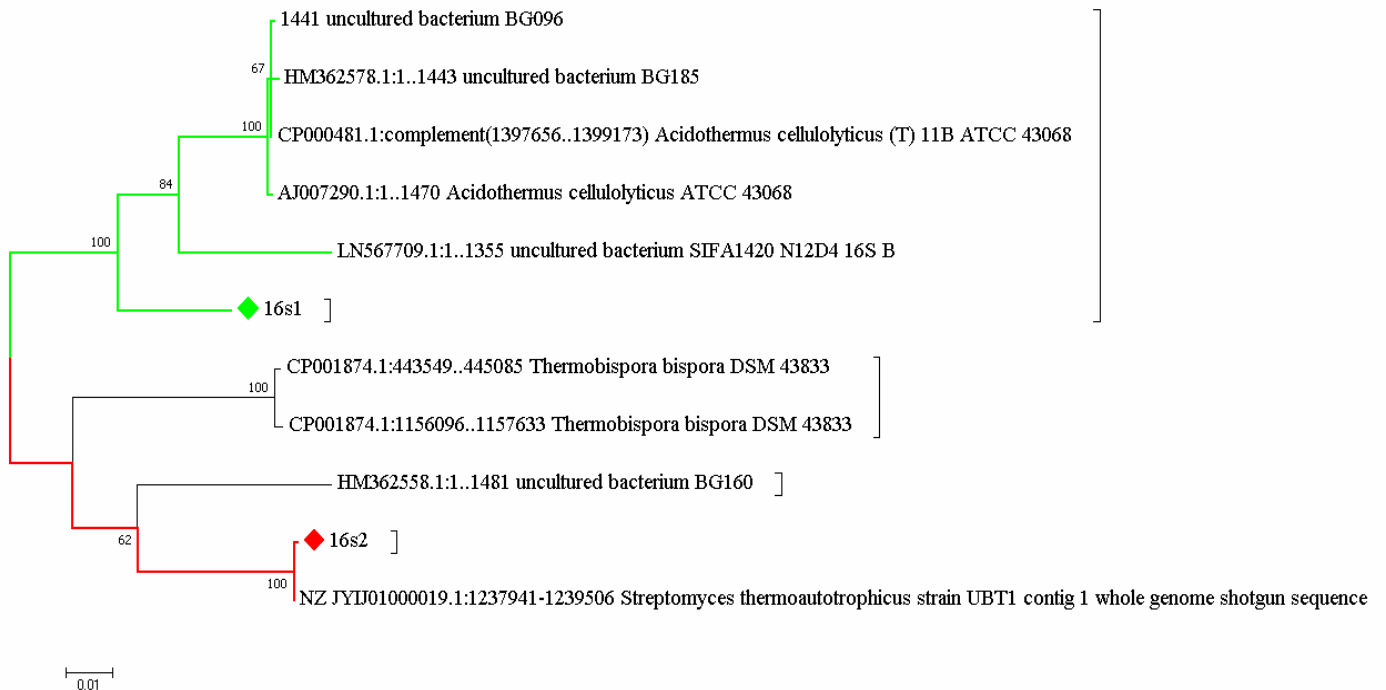


Figura 21: A história evolutiva foi inferida usando o método da máxima verossimilhança baseado no modelo de Tamura-Nei. A árvore com a maior probabilidade de log (-3615.24) é mostrada. A porcentagem de árvores nas quais o taxa associado agrupado é mostrada ao lado das ramificações. A (s) árvore (s) inicial (is) para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando algoritmos de Neighbor-Join e BioNJ em uma matriz de distâncias entre pares estimadas usando a abordagem MVI (Maximum Composite Likelihood) e selecionando a topologia com valor de probabilidade logarítmica superior. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramificações medidas no número de substituições por sítio. A análise envolveu 11 sequências nucleotídicas. Todas as posições contendo lacunas e dados perdidos foram eliminadas. Houve um total de 1339 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA7.

Quando analisadas as proximidades taxonômicas das subunidades simultaneamente, o resultado torna-se instigante: enquanto uma delas apresenta 100% de similaridade com a cepa UBT1 (identificada inicialmente por Gadkari e colaboradores em 1992), a outra apresenta maior proximidade com representantes ainda não cultivados. Em adendo, a sequência do gene *rrs16S1* apresenta certa similaridade (94%) com o microrganismo *Acidothermus cellulolyticus*, uma actinobactéria cujas características termofílicas são similares às do isolado. (Mohagheghi et al, 1986). Comparações referentes às proximidades de níveis taxonômicos foram feitas na tabela a seguir.

Tabela 3: Comparações de ordens taxonômicas entre as actinobactérias *Acidothermus cellulolyticus* e *Streptomyces thermoautotrophicus*

<b>Microrganismo</b>	<b>Classe</b>	<b>Ordem</b>	<b>Família</b>
<i>A. cellulolyticus</i>	Actinobacteria	Actinomycetales	Frankineae
<i>S. thermoautotrophicus</i>	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae

Em quadro geral, os resultados obtidos da análise de dados confirmam a existência de duas unidades do gene codificante para rrs16S taxonomicamente distintas e identificam o isolado parcialmente como *Streptomyces thermoautotrophicus*. Assim sendo, são necessárias análises mais aprofundadas para a caracterização do que pode configurar uma nova espécie de actinobactéria.

## 6. Discussão

A obtenção de uma cultura axênica permanece no cerne dos estudos de base da microbiologia ambiental, principalmente quando referente à identificação e caracterização de novos microrganismos. Portanto, o empenho em cultivar o ainda não cultivável é incessante e não deve ser esmaecido, sendo de suma importância para a microbiologia em sua totalidade, levando a avanços de ambos os campos aplicado e descritivo, cujas técnicas moleculares atuais em sua solitude não seriam capazes de proporcionar.

O desafio de superar a não cultivabilidade dialoga com as diversas disciplinas que constroem a microbiologia como área acadêmica. A interação entre os conhecimentos específicos de cada área é uma forma de sobrepujar as atuais limitações que revolvem esta questão central do campo. A aplicação de um protocolo proveniente da microbiologia médica neste trabalho de ecologia microbiana é um exemplo da interdisciplinaridade que se pode aplicar para contornar obstáculos de cultivabilidade.

O presente trabalho teve como principal desafio o isolamento de uma actinobactéria componente de um consórcio de características termofílicas e quimiolitotróficas, sendo sua aparente capacidade de fixação de nitrogênio resistente a tensões de oxigênio. Devido ao isolamento de um actinomiceto de características semelhantes há 26 anos por Gadkari, Morsdörf e Meyer, teorizou-se que a actinobactéria identificada no consórcio seria a

responsável por tal via alternativa de fixação do nitrogênio, justificando o interesse em seu isolamento.

Em hipóteses iniciais, imaginou-se que alcançar o objetivo teria como principal obstáculo uma possível co-dependência metabólica entre os membros do consórcio. No entanto, os resultados obtidos revelaram a total capacidade da actinobactéria de crescer na ausência dos outros membros e em um meio ainda não reportado, refutando tal hipótese. Através da inoculação do consórcio em um meio inespecífico (R2A), obtivemos o crescimento de colônias puntiformes brancas da actinobactéria. O resultado foi surpreendente em dois aspectos: o microrganismo semelhante (*S. thermoautotrophicus*) havia sido descrito por Gadkari e seu grupo como sendo autotrófico obrigatório, ou seja, incapaz de se desenvolver em meios contendo glicose, peptona, piruvato, casaminoácidos, extrato de levedura e amido solúvel (todos ingredientes do meio citado) como fonte de carbono (Gadkari et al, 1990). Embora não se possa inferir quais são as fontes de fato utilizadas pela actinobactéria, estudos posteriores aos de Gadkari confirmam a capacidade da cepa UBT1 de utilizar piruvato como fonte de carbono (MacKellar et al, 2016), sendo este o mais provável nutriente metabolizado portanto. Quanto a natureza do meio R2A, este é utilizado para a manutenção de uma estirpe de *Acidothermus cellulolyticus* (ATCC 43068), uma actinobactéria semelhantemente termofílica porém não quimiolitototrófica (Mohagheghi et al, 1986). Esta cepa possui certa proximidade taxonômica a uma das unidades de 16S da estirpe do presente trabalho, como evidenciado na árvore taxonômica apresentada (Figura 17). Deve-se ressaltar que o meio OTTOW, utilizado para cultura de streptomicetos, não foi permissivo à actinobactéria, mas sim ao *Geobacillus spp.*

A identificação da contaminação pelo *Geobacillus spp.* foi um obstáculo que levantou indagações. O obstáculo consistia em separá-lo da actinobactéria através de um antimicrobiano que fosse ineficaz contra esta e eficaz contra aquele. O sucesso desta técnica é consequência de um dos dois fatos seguintes: diferença entre as paredes celulares de ambos os microrganismos, sendo a parede da actinobactéria mais densa e robusta, conferindo-lhe uma resistência natural ao antibiótico, ou a presença de um elemento genético de resistência natural à actinobactéria. O segundo fato confirmou-se pela constatação da presença de genes de resistência à amoxicilina no isolado (Rosado, A. S., comunicação pessoal). Já as indagações levantadas reduziam-se às fontes de contaminação, cuja última suspeita, a contaminação dos gases utilizados, foi a que se confirmou. Embora curiosa, a presença de esporos desta bactéria no ar não é estranha à comunidade acadêmica, havendo descrição da



existência de esporos deste gênero ao redor de todo o planeta e nos mais diversos ambientes, fenômeno denominado "O Paradoxo do *Geobacillus*" (Zeigler, 2014).

As imagens de microscopia evidenciaram que o isolado de fato se trata de um streptomiceto se levados em consideração os modelos morfológicos preconizados na literatura (Erikson, 1949; Tresner et al, 1960; Barka et al, 2017). A análise da morfologia dos esporos, suas cadeias e como se dá sua produção, caracteriza-os como *atrosporos*: esporos produzidos pelo crescimento interno anelar, gerando intumescência nas células que os produzem (Locci, 2006). A cadeia de esporos maduros é mantida unida por uma camada externa responsável pela produção de adornos na superfície do esporo, embora seja possível que os esporos se destaquem antes da formação da cadeia completa (Locci, 2006), algo observado nas microscopias eletrônicas de varredura. Em adendo, a falta da abundância de esporos sobre as colônias em tais microscopias pode possuir três razões: o curto tempo de incubação das amostras, a perda de material no processamento e (ou) uma diferença na expressão de esporos do meio R2A para o meio N-Fix. Por não apresentarem exclusão entre si, torna-se inviável a inferência de uma causa mais provável. As imagens de MET demonstraram a presença de BMCs no isolado cuja elucidação das funções representa uma possibilidade de estudos posteriores. Enquanto a dedução da presença de carboxissomos seja coerente devido à quimioautotrofia do isolado (Saier Jr., 2013), a mera visualização não é comprobatória, sendo necessários estudos mais aprofundados que permitam a visualização da organização poliédrica da estrutura (Tanaka et al, 2009) e a comprovação da presença dos genes necessários para sua confecção.

Quanto à suposta diazotrofia do isolado, seu crescimento em meio mineral corrobora com a provável capacidade de fixação de nitrogênio, embora este resultado em si não seja suficiente para afirmá-la. O crescimento no mesmo meio, adicionado de um poderoso quelante de amônia e utilizando um agente solidificante ultrapuro, reforça a teórica diazotrofia da actinobactéria, porém, estudos mais avançados ainda se fazem necessários para confirmação. Deve-se ressaltar que a utilização da zeolita em questão não é inédita na literatura acadêmica, porém em experimentos anteriores foi utilizada na fase gasosa do frasco (Dahal et al, 2017). Outra forte evidência é a ausência de genes canônicos de fixação de nitrogênio nas análises previamente realizadas (Souza 2016) e a capacidade do consórcio de se manter cultivável, em meio mineral sem a adição de fontes heterotróficas de nitrogênio, desde sua aquisição (2015) até a atualidade. Deve-se notar que a característica de flutuação do crescimento em meio líquido esta possivelmente relacionada ao fato de que a actinobactéria

necessita do contato com a fase gasosa do frasco, de onde adquire o carbono e, supostamente, o nitrogênio necessários para seu crescimento. No entanto, a flutuabilidade não pode ser exclusivamente ligada a este fator devido aos relatos na literatura que confirmam a produção de componentes hidrofóbicos nas paredes celulares de actinobactérias, com ênfase na produção de hifas aéreas (Flärdh e Buttner, 2009). A termofilia do isolado também pode estar relacionada diazotrofia: uma maior temperatura representa um maior grau de agitação molecular que, por sua vez, pode contribuir para a quebra da ligação covalente tripla da molécula de dinitrogênio (N<sub>2</sub>), assim contribuindo para a fixação.

Recentemente, MacKellar e seu grupo (2016) afirmaram que a capacidade de fixação de nitrogênio pelo *S. thermoautotrophicus* era altamente improvável, baseado na análise dos genomas e capacidade de fixar o isótopo <sup>15</sup>N<sub>2</sub> de 3 estipes, em contrapartida, os autores sugerem que esse microrganismo possuiria uma excepcional capacidade de utilizar fontes heterotróficas resquiciais de nitrogênio. Embora tenha admitido que artefatos técnicos e metodológicos possam ter mascarado a incorporação de nitrogênio gasoso na biomassa, MacKellar afirma que a probabilidade da existência de um sistema alternativo de fixação neste organismo é extremamente baixa. O autor adiciona que não se pode confirmar que cepas anteriores às utilizadas no estudo não apresentassem uma nova nitrogenase que se perdeu devido aos diversos repiques e longo tempo de cultura em laboratório. Embora a actinobactéria obtida neste trabalho apresente semelhante capacidade de crescer a 55°C em meio mineral sem adição de cloreto de amônia e possua uma sequência codificante de *rRNA* 16S idêntica à estirpe UBT1, as diferenças entre o isolado desse projeto e as cepas utilizadas no trabalho de MacKellar et al. (2016) são substanciais. O expressivo aumento de biomassa em meio mineral solidificado com Agar Noble e quelante de amônia não foi reportado no trabalho citado e configura uma marcante diferença que denota uma maior robustez fisiológica por parte do isolado em questão. Desta forma, a actinobactéria obtida neste trabalho apresenta contrastes significativos que justificam o empenho em confirmar sua capacidade de fixação do nitrogênio. Quanto à identificação taxonômica, a segunda sequência do gene codificante para *rRNA* 16S presente em nosso isolado não foi taxonomicamente associada ao *S. thermoautotrophicus*. Assim, reforça-se a necessidade de aprofundamento dos estudos de ancestralidade e até mesmo uma recharacterização deste microrganismo, algo também proposto por MacKellar et al.,(2016).

Quando analisadas as descrições de estirpes de actinobactérias termofílicas quimiolitototróficas isoladas em cultivo, encontram-se apenas três representantes: aquelas

utilizadas por MacKellar em seus experimentos. Observa-se também um hiato de duas décadas entre a obtenção da primeira cepa em 1990 (Gadkari, Morsdörf e Meyer, 1992) e da segunda em 2012 (MacKellar et al, 2016). Este intervalo evidencia a dificuldade em isolar um microrganismo com tais características. A estirpe obtida neste trabalho representa a quarta de seu tipo na comunidade acadêmica, sendo relevantemente diferente daquelas já descritas em virtude das características supracitadas.

A obtenção da cultura axênica da actinobactéria em questão representou um objetivo não alcançado nos trabalhos anteriores dos quais este se ramifica. A superação deste obstáculo abriu a possibilidade para o sequenciamento total do genoma da estirpe e seu estudo procurando por genes de interesse biotecnológico, a descrição de uma nova espécie ou até mesmo gênero de actinobactéria, a eventual manipulação de seu genoma para os fins desejados e a facilitação de estudos de expressão proteica que podem levar a identificação das vias de fixação de Carbono e da nitrogenase aerotolerante. A identificação desta nova nitrogenase representaria uma descoberta sem paralelos na ecologia e biotecnologia microbiana, trazendo avanços para a área e para a sociedade como um todo.

Em últimas considerações, caso se confirme a incapacidade de fixação de nitrogênio e a inexistência de uma nova nitrogenase no isolado, a capacidade de capturar e utilizar traços ínfimos de compostos nitrogenados configura uma característica de interesses ecológico e biotecnológico, mantendo o interesse em aplicações biotecnológicas deste isolado.

## 7. Conclusões

- A utilização de meios de cultura diferenciais foi bem sucedida para a obtenção de uma colônia da actinobactéria.
- O uso de antibióticos para descontaminação e isolamento de uma cultura axênica da bactéria de interesse foi uma estratégia eficaz.
- A actinobactéria não apresenta dependência metabólica de outros membros do consórcio onde foi originalmente encontrada, sendo capaz de crescer em condições de quimiolitotrofia.
- A análise taxonômica revelou que o microrganismo em questão identifica-se parcialmente com *Streptomyces thermoautotrophicus*, configurando uma nova cepa.
- Finalmente, embora apresente semelhanças com cepas de *Streptomyces thermoautotrophicus* quanto à capacidade de crescer em meio mineral em alta temperatura e uma sequência codificante do gene *rRNA* 16S, o isolado apresenta capacidades inéditas quando comparado a outras estirpes descritas.

## 8. Referências Bibliográficas

1. Acharya, S., & Chaudhary, A. (2012). Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 844-856.
2. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
3. Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl 1), 5-16.
4. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
5. Bennett, J. W., & Chung, K. T. (2001). Alexander Fleming and the discovery of penicillin. *Advances in Applied Microbiology*, v. 49, p. 163–184.
6. Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C., & Robins, K. (2012). Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, 485(7397), 185.
7. Bull, A. T., Goodfellow, M., & Slater, J. H. (1992). Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annual Reviews in Microbiology*, 46(1), 219-246.
8. Bull, A. T., Ward, A. C., & Goodfellow, M. (2000). Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 573-606.
9. Canganella, F., & Wiegel, J. (2011). Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften*, 98(4), 253-279.
10. Carvalho, C. C. (2017). Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry. *Microbial biotechnology*, 10(2), 250-263.
11. Carver, T., Harris, S. R., Berriman, M., Parkhill, J., & McQuillan, J. A. (2011). Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics*, 28(4), 464-469.
12. Chater, K. F., Biró, S., Lee, K. J., Palmer, T., & Schrempf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS microbiology reviews*, 34(2), 171-198.
13. Cole, J. R., Chai, B., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., McGarrell, D. M., Garrity, G. M. & Tiedje, J. M. (2005). The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput *rRNA* analysis. *Nucleic acids research*, 33(suppl\_1), D294-D296.
14. Cannon, S. A., & Giovannoni, S. J. (2002). High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), 3878-3885.
15. Chater, K. F., Biró, S., Lee, K. J., Palmer, T., & Schrempf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS microbiology reviews*, 34(2), 171-198.
16. Dahal, B., NandaKafle, G., Perkins, L., & Brözel, V. S. (2017). Diversity of free-living nitrogen fixing *Streptomyces* in soils of the badlands of South Dakota. *Microbiological research*, 195, 31-39.
17. DeLong, E. F. (2004). Microbial population genomics and ecology: the road ahead. *Environmental Microbiology*, 6(9), 875-878.
18. Egorova, K., & Antranikian, G. (2005). Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Current opinion in microbiology*, 8(6), 649-655.

19. Erikson, D. (1949). The morphology, cytology, and taxonomy of the actinomycetes. *Annual Reviews in Microbiology*, 3(1), 23-54.
20. Eisen, J. A. (2007). Environmental shotgun sequencing: its potential and challenges for studying the hidden world of microbes. *PLoS biology*, 5(3), e82.
21. Elleuche, S., Schröder, C., Sahn, K., & Antranikian, G. (2014). Extremozymes—biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Current opinion in biotechnology*, 29, 116-123.
22. Erikson, D. (1949). The morphology, cytology, and taxonomy of the actinomycetes. *Annual Reviews in Microbiology*, 3(1), 23-54.
23. Fenical, W., Jensen, P. R., Palladino, M. A., Lam, K. S., Lloyd, G. K., & Potts, B. C. (2009). Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(6), 2175-2180.
24. Ferrer, M., Martínez-Martínez, M., Bargiela, R., Streit, W. R., Golyshina, O. V., & Golyshin, P. N. (2016). Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: current status and future trends. *Microbial biotechnology*, 9(1), 22-34.
25. Firn, R. D. (2003). Bioprospecting—why is it so unrewarding?. *Biodiversity & Conservation*, 12(2), 207-216.
26. Flärdh, K., & Buttner, M. J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), 36.
27. Gadkari, D., Mörsdorf, G., & Meyer, O. (1992). Chemolithoautotrophic assimilation of dinitrogen by *Streptomyces thermoautotrophicus* UBT1: identification of an unusual N<sub>2</sub>-fixing system. *Journal of bacteriology*, 174(21), 6840-6843.
28. Gadkari, D., Schrickler, K., Acker, G., Kroppenstedt, R. M., & Meyer, O. (1990). *Streptomyces thermoautotrophicus* sp. nov., a thermophilic CO<sub>2</sub>-and H<sub>2</sub>-oxidizing obligate chemolithoautotroph. *Applied and environmental microbiology*, 56(12), 3727-3734.
29. Goodfellow, M., & Fiedler, H. P. (2010). A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 98(2), 119-142.
30. Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Reviews in Microbiology*, 37(1), 189-216.
31. Gomez-Escribano, J., Alt, S., & Bibb, M. (2016). Next generation sequencing of actinobacteria for the discovery of novel natural products. *Marine drugs*, 14(4), 78.
32. Gomez-Escribano, J. P., & Bibb, M. J. (2014). Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: from genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 41(2), 425-431.
33. Green, B. D., & Keller, M. (2006). Capturing the uncultivated majority. *Current opinion in biotechnology*, 17(3), 236-240.
34. Gu, B., Chang, J., Min, Y., Ge, Y., Zhu, Q., Galloway, J. N., & Peng, C. (2013). The role of industrial nitrogen in the global nitrogen biogeochemical cycle. *Scientific Reports*, 3, 2579.
35. Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(4), 669-685.
36. Head, I. M., Saunders, J. R., & Pickup, R. W. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial ecology*, 35(1), 1-21.

37. Headon, D. R., & Walsh, G. (1994). The industrial production of enzymes. *Biotechnology advances*, 12(4), 635-646.
38. Hopwood, D. A. (2007). *Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers*. Oxford University Press
39. Iverson, V., Morris, R. M., Frazar, C. D., Berthiaume, C. T., Morales, R. L., & Armbrust, E. V. (2012). Untangling genomes from metagenomes: revealing an uncultured class of marine Euryarchaeota. *Science*, 335(6068), 587-590.
40. Kaerberlein, T., Lewis, K., & Epstein, S. S. (2002). Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 296(5570), 1127-1129.
41. Kämpfer, P., Arun, A. B., Busse, H. J., Zhang, Z. L., Young, C. C., & Glaeser, S. P. (2015). *Chelativorans intermedius* sp. nov. and proposal to reclassify *Thermovum composti* as *Chelativorans composti* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(5), 1646-1652.
42. Kasting, J. F., & Siefert, J. L. (2002). Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science*, 296(5570), 1066-1068.
43. Keller, M., & Zengler, K. (2004). Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 141.
44. Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
45. Kyrpides, N. C., Hugenholtz, P., Eisen, J. A., Woyke, T., Göker, M., Parker, C. T., ... & Colwell, R. R. (2014). Genomic encyclopedia of bacteria and archaea: sequencing a myriad of type strains. *PLoS biology*, 12(8), e1001920.
46. Larkin, M. J., Kulakov, L. A., & Allen, C. C. (2005). Biodegradation and *Rhodococcus*—masters of catabolic versatility. *Current opinion in Biotechnology*, 16(3), 282-290.
47. Leadbetter, J. R. (2003). Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Current opinion in microbiology*, 6(3), 274-281.
48. Letunic, I., & Bork, P. (2011). Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic acids research*, 39(suppl\_2), W475-W478.
49. Lievin, V., Peiffer, I., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J. R., & Servin, A. L. (2000). *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*, 47(5), 646-652.
50. Locci, R. (2006). Actinomycete spores. *Encyclopedia of life sciences*. Wiley Chichester [http: www. els. net](http://www.els.net) (DOI: 10.1038/nng. els. 004237).
51. Lorenz, P., & Eck, J. (2005). Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology*, 3(6), 510.
52. Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Kämpfer, P., & Whitman, W. B. (2015). Road map of the phylum Actinobacteria. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-37.
53. Macura, J. (1974). Trends and advances in soil microbiology from 1924 to 1974. *Geoderma*, 12(4), 311-329.

54. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. & Stahl, D. A. (2016). *Microorganisms and Microbiology*, pp. 1 - 18 & *Microbial Evolution and Systematics*, pp. 369 - 375 In: *Brock biology of microorganisms 14<sup>th</sup>ed.* (Pearson Education, Inc.)
55. Madsen E. L. (2015). Significance, History and Challenges of Environmental Microbiology. In: *Environmental Microbiology: From Genomes to Biochemistry, Second Edition* (Jonh Wiley & Sons. Inc.) pp. 1 - 15.
56. Margulis, L. (1993). *Symbiosis in cell evolution: Microbial communities in the archaean and proterozoic Eons. Segunda Edição* (Freeman, São Francisco), cap. 7, pp. 327 - 343.
57. Martiny, J. B. H., Bohannan, B. J., Brown, J. H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. A., Green, J. L., ... & Morin, P. J. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology*, 4(2), 102.
58. McArthur, J. V. (2001). 12 Bacteria as Biomonitors. *Bioassessment and Management of North American Freshwater Wetlands*, p. 249 - 261.
59. Meyer, O., & Schlegel, H. G. (1983). Biology of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 37(1), 277-310.
60. Miao, V., & Davies, J. (2010). Actinobacteria: the good, the bad, and the ugly. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 98(2), 143-150.
61. Mohagheghi, A., Grohmann, K. M. M. H., Himmel, M., Leighton, L., & Updegraff, D. M. (1986). Isolation and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* gen. nov., sp. nov., a new genus of thermophilic, acidophilic, cellulolytic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(3), 435-443
62. Mohapatra, P. K. (2008). Scope and Applications of Environmental Microbiology. In *Textbook of Environmental Microbiology* (I.K. International Publishing House Pvt. Ltd) pp. 1 - 5.
63. Morris, J. J., Lenski, R. E., & Zinser, E. R. (2012). The Black Queen Hypothesis: evolution of dependencies through adaptive gene loss. *MBio*, 3(2), e00036-12.
64. Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., ... & Ivanov, M. V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenuatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(2), 433-446.
65. O'Malley, M. A. (2008). 'Everything is everywhere: but the environment selects': ubiquitous distribution and ecological determinism in microbial biogeography. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 39(3), 314-325.
66. Ohno, M., Shiratori, H., Park, M. J., Saitoh, Y., Kumon, Y., Yamashita, N., ... & Beppu, T. (2000). *Symbiobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov., a symbiotic thermophile that depends on co-culture with a *Bacillus* strain for growth. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(5), 1829-1832.
67. Oldroyd, G. E., & Dixon, R. (2014). Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Current opinion in biotechnology*, 26, 19-24.
68. Overmann, J., Abt, B., & Sikorski, J. (2017). Present and future of culturing bacteria. *Annual review of microbiology*, 71, 711-730.



69. Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276(5313), 734-740.
70. Paul, E. A. (2014). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Academic press.
71. Pawlowski, K., & Demchenko, K. N. (2012). The diversity of actinorhizal symbiosis. *Protoplasma*, 249(4), 967-979.
72. Peixoto, R. S., Vermelho, A. B., & Rosado, A. S. (2011). Petroleum-degrading enzymes: bioremediation and new prospects. *Enzyme research*, 2011.
73. Pepper, I. L., Gerba, P.C. e Gentry, T.J. (2014) Introduction to Environmental Microbiology. In. *Environmental Microbiology 3<sup>a</sup>ed*. Elsevier, Academic Press, pp. 3 - 8.
74. Pham, V. H., & Kim, J. (2012). Cultivation of unculturable soil bacteria. *TRENDS in Biotechnology*, 30(9), 475-484.
75. Pollard, D. J., & Woodley, J. M. (2007). Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *TRENDS in Biotechnology*, 25(2), 66-73.
76. Prjibelski, A. D., Vasilinetc, I., Bankevich, A., Gurevich, A., Krivosheeva, T., Nurk, S., ... & Pevzner, P. A. (2014). ExSPAnDer: a universal repeat resolver for DNA fragment assembly. *Bioinformatics*, 30(12), i293-i301.
77. Reasoner, D. J., & Geldreich, E. E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and environmental microbiology*, 49(1), 1-7.
78. Roberts, R. A., Smith, R. A., Safe, S., Szabo, C., Tjalkens, R. B., & Robertson, F. M. (2010). Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicology*, 276(2), 85-94.
79. Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 39-67.
80. Saier Jr, M. H. (2013). Microcompartments and protein machines in prokaryotes. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 23(4-5), 243-269.
81. Seemann, T. (2015). *BarRNAp* - [github.com/tseemann/barRNAp](https://github.com/tseemann/barRNAp).
82. SILVA *rRNA* Database Proj. 2016. SILVA SSU Ref NR 99 128 dataset. Release Number 128, Sep. 2016. Bremen, Ger.:MaxPlank Inst. Mar. Microbiol., Jacobs Univ. <https://www.arb-silva.de/projects/ssu-ref-nr/>
83. Souza, Y. P. A. (2015). Cultivo e caracterização microscópica e molecular de bactérias termofílicas, aeróbicas e fixadoras de nitrogênio isoladas do solo. Monografia (Graduação em Microbiologia e Imunologia) - Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, f.47-51.
84. de Souza, Y. P. A., da Mota, F. F., & Rosado, A. S. (2017). Draft Genome Sequence of *Geobacillus* sp. LEMMY01, a Thermophilic Bacterium Isolated from the Site of a Burning Grass Pile. *Genome announcements*, 5(19), e00200-17.
85. Souza, Y. P. A. (2016). Metagenômica e Genômica comparativa na busca por sistemas alternativos de fixação de nitrogênio em um consórcio bacteriano termofílico e autotrófico. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) - Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 77f.
86. Spasic, J., Mandic, M., Djokic, L., & Nikodinovic-Runic, J. (2018). *Streptomyces* spp. in the biocatalysis toolbox. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(8), 3513-3536.

87. Strohl, W. R. (2000). The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discovery Today*, v. 5, n. 2, p. 39–41.
88. Tamaki, H., Hanada, S., Sekiguchi, Y., Tanaka, Y., & Kamagata, Y. (2009). Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment. *Environmental microbiology*, 11(7), 1827-1834.
89. Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 5(3), 240-245.
90. Torsvik, V., Øvreås, L., & Thingstad, T. F. (2002). Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 296(5570), 1064-1066.
91. Tresner, H. D., Davies, M. C., & Backus, E. J. (1961). Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. *Journal of Bacteriology*, 81(1), 70.
92. Tripp, H. J., Kitner, J. B., Schwalbach, M. S., Dacey, J. W., Wilhelm, L. J., & Giovannoni, S. J. (2008). SAR11 marine bacteria require exogenous reduced sulphur for growth. *Nature*, 452(7188), 741.
93. Turner, N. J., & Truppo, M. D. (2013). Biocatalysis enters a new era. *Current opinion in chemical biology*, 2(17), 212-214.
94. Van der Heul, H. U., Bilyk, B. L., McDowall, K. J., Seipke, R. F., & van Wezel, G. P. (2018). Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: new perspectives from the post-genomic era. *Natural product reports*
95. Vartoukian, S. R., Palmer, R. M., & Wade, W. G. (2010). Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS microbiology letters*, 309(1), 1-7.
96. Ventura, M., Canchaya, C., Fitzgerald, G. F., Gupta, R. S., & van Sinderen, D. (2007). Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91(4), 351-372.
97. Vidali, M. (2001). Bioremediation. an overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163-1172.
98. Walsh, C., & Wencewicz, T. (2016). Major Classes of Antibiotics and Their Modes of Action. In: *Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities* (American Society for Microbiology Press) pp. 29 - 31
99. Wang, Y. U. E., Zhang, Z., & Ramanan, N. (1997). The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S *rRNA* genes. *Journal of bacteriology*, 179(10), 3270-3276.
100. Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., ... & Starr, M. P. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 463-464.
101. Wenda, S., Illner, S., Mell, A., & Kragl, U. (2011). Industrial biotechnology—the future of green chemistry?. *Green Chemistry*, 13(11), 3007-3047.
102. Williams, S. T., & Davies, F. L. (1965). Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *Microbiology*, 38(2), 251-261.
103. Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2), 221.
104. Wohlleben, W., Mast, Y., Stegmann, E., & Ziemert, N. (2016). Antibiotic drug discovery. *Microbial biotechnology*, 9(5), 541-548.
105. Woodley, J. M. (2013). Protein engineering of enzymes for process applications. *Current opinion in chemical biology*, 17(2), 310-316

106. Zeigler, D. R. (2014). The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet?. *Microbiology*, 160(1), 1-11.
107. Zhang, X., Davidson, E. A., Mauzerall, D. L., Searchinger, T. D., Dumas, P., & Shen, Y. (2015). Managing nitrogen for sustainable development. *Nature*, 528(7580), 51.

## 9. Caderno de Anexos

### Anexo 1

#### Meio de Nitrilotriacetato (DSMZ 463)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O .....	0.41 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.26 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O .....	1.00 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O .....	0.20 g
Solução de Elementos Traço .....	1.00 ml
Solução de Vitamínica .....	1.00 ml
Nitrilotriacetato .....	1.00 g
Água Destilada .....	1000.00 ml

pH 6.5

#### *Solução de Elementos Traço:*

FeCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O .....	1.50 g
ZnCl <sub>2</sub> .....	68.00 mg
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O .....	100.00 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	62.00 mg
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O .....	120.00 mg
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O .....	17.00 mg
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O .....	24.00 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O .....	24.00 mg
HCl, 0.05 molar .....	1000.00 ml

#### *Solução Vitamínica:*

Vitamina B12 .....	50.00 mg
Ácido Pantotênico .....	50.00 mg
Riboflavina .....	50.00 mg
Piridoxamina -HCl .....	10.00 mg
Biotina .....	20.00 mg
Ácido Fólico .....	20.00 mg
Ácido Nicotínico .....	25.00 mg
Amina de Nicotina .....	25.00 mg
Ácido α-lipóico .....	50.00 mg
Ácido p-aminobenzóico .....	50.00 mg
Tiamina-HCl x 2 H <sub>2</sub> O .....	50.00 mg
Água Destilada .....	1000.00 ml

Agitar por algumas horas e realizar filtragem para esterilização.

**Anexo 2****Meio GYM para Streptomyces (DSMZ 63)**

Glicose .....	4.0g
Extrato de Levedura .....	4.0g
Extrato de Malte .....	10.0g
CaCO <sub>3</sub> .....	2.0g
Ágar .....	12.0g
Água destilada .....	1000.0 ml

Ajustar pH para 7.2 antes de adicionar ágar. Retirar CaCO<sub>3</sub> se o meio for líquido.

**Anexo 3****Meio R2A (DSMZ 830)**

Extrato de Levedura.....	0.50 g
Peptona.....	0.50 g
Casaminoácidos.....	0.50 g
Glicose.....	0.50 g
Amido Solúvel.....	0.50 g
Piruvato de Sódio.....	0.30 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.30 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O.....	0.05 g
Ágar.....	15.00 g
Água Destilada.....	1000.00 ml

pH 7.2 final; ajustar com K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ou KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> cristalino antes de adicionar ágar. Adicionar ágar, aquecer meio até fervura para dissolvê-lo e autoclavar por 15 minutos a 121°C.

**Anexo 4****Meio OTTOW (DSMZ 467)**

Glicose .....	1.0g
Peptona .....	7.5g
Extrato de Carne .....	5.0g
Extrato de Levedura .....	2.5g
Casaminoácidos .....	2.5g
NaCl .....	5.0g
Água .....	1000.0ml

Ajustar pH para 8.5.

## Anexo 5

### Meio para fixadores de nitrogênio (N-FIX) (Gadkari, Mörsdorf e Meyer, 1992)

#### Solução A

MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O .....	0.3 g/l
NaCl .....	0.2 g/l
CaCl 2H <sub>2</sub> O .....	0,1 g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O .....	12.6 mg/l
Solução de elementos traço.....	2ml

Avolumar para 800 ml com água MiliQ e autoclavar separadamente.

#### Solução de elementos traço (Meyer e Schendel, 1983)

ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O .....	100 mg/l
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O .....	30 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	300 mg/l
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O .....	200 mg/l
CuCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O .....	10 mg/l
NiCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O .....	20 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O .....	900 mg/l
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> .....	20 mg/l

Autoclavar a 120°C, a 1,5 ATM durante 20 minutos.

#### Solução B

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.9 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.1g/l

Avolumar para 200 ml com água MiliQ e autoclavar separadamente.

Combinar as duas soluções antes do uso. O pH final deve estar entre 7.3 e 7.5.





## Anexo 6

### Preparação de amostras para MET

#### - Preparo do Fixador

Volume de Fixador	1ml	5ml	10ml
Glutaraldeído 25%	100 µl	500 µl	1 ml
Tampão Cacodilato de Sódio 0,2M	500 µl	2,5ml	5 ml
Água milli-Q	400 µl	2ml	4 ml

#### - Fixação

- Glutaraldeído 2,5% + tampão cacodilato de sódio 0,1 M durante 1 h em temperatura ambiente ou overnight na geladeira.

- Lavagem em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M (3x). Se a afixação tiver ocorrido muito tempo, realizar 3 lavagens em intervalos de 30', 20' e 20'. Se tiver sido feita em 1 h, os intervalos vão ser de 15'.

#### - Pós-fixação

- Pós-fixação em 1% OsO<sub>4</sub> com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (1:1), durante 1 h. (medir em gotas com a pipeta Pasteur)

- Lavagem como descrito anteriormente.

#### - Desidratação

- Em etanol ou acetona: diluição seriada de 30, 50, 70, 90 e 100% de concentração. (15 minutos em cada e 3x na última concentração).

#### - Infiltração

- Resina tipo epóxi, Epon (Luft, 1961).

Em temperatura ambiente:

Solvente 2:1 resina = por 24h

Solvente 1:1 resina = de 8 à 16h

Solvente 1:2 resina = de 8 à 16h

Resina pura 2x, deixando 24h cada.

#### - Inclusão

Transferir a amostra para moldes de silicone ou cápsulas BEEM. Incluir a resina Epon sem deixar bolhas. Se necessário utilizar uma ponteira ou um palito para retirá-las.

Levar para estufa a 68°C por 72h.



## Anexo 7

### Preparação de amostras para MEV

#### - Preparo do Fixador

Volume de Fixador	1ml	5ml	10ml
Glutaraldeído 25%	100 µl	500 µl	1 ml
Tampão Cacodilato de Sódio 0,2M	500 µl	2,5ml	5 ml
ASW – Água milli-Q	400 µl	2ml	4 ml

#### - Montagem da amostra:

-Prepare uma lâmina ou lamínula de vidro tratada com Poli-L-lisina por 5 minutos (retirando excesso com papel filtro).

-Deposite a amostra sobre a lâmina/lamínula e deixe por 5 minutos.

#### - Fixação:

- Glutaraldeído 2,5% + tampão cacodilato de sódio 0,1 M durante 1 h.

- Lavagem em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M (3x).

- Pós-fixação em 2% OsO<sub>4</sub> com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (1:1), durante 1 h.

- Lavagem como descrito anteriormente.

#### - Desidratação:

- Desidratação em etanol ou acetona: 30, 50, 70, 90 e 100% de concentração. (15 minutos cada e 3x na última concentração). Várias trocas são necessárias para assegurar remoção completa da água.

**Caso precise parar o processamento, manter as amostras submersas na concentração de 70% do etanol e guardar na geladeira)**

#### - Secagem das amostras:

- No aparelho de ponto crítico, usando gás carbônico.

- Em seguida a amostra deve ser montada em “Stub” com fita dupla face de carbono.

#### - Metalização:

Seguir POP do aparelho.