



**Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa  
Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia**

**IDENTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
BACTÉRIAS DE SOLO DE CERRADO PERTENCENTES AO  
FILO ACIDOBACTERIA**

**Autor: Virgilio Hipólito Lemos de Castro  
Orientadora: Dr<sup>a</sup> Cristine Chaves Barreto**

**Brasília - DF  
2011**

**VIRGILIO HIPÓLITO LEMOS DE CASTRO**

**IDENTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DE SOLO DE CERRADO PERTENCENTES AO FILO ACIDOBACTERIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Cristine Chaves Barreto

Brasília  
2011

C355i Castro, Virgílio Hipólito Lemos de.

Identificação, isolamento e caracterização de bactérias de solo de cerrado pertencentes ao filo acidobactéria – 2011.

76f. : il.; 30 cm

Dissertação (mestrado – Universidade Católica de Brasília, 2011).

Orientação: Cristine Chaves Barreto

Ficha elaborada pela Biblioteca Pós-Graduação da UCB



Dissertação de autoria de Virgílio Hipólito Lemos de Castro, intitulada “IDENTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DE SOLO DE CERRADO PERTENCENTES AO FILO ACIDOBACTERIA”, apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília em 27 de junho, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

---

Prof. Doutora Cristine Chaves Barreto  
Orientadora  
Ciências Genômicas e Biotecnologia – UCB

---

Prof. Doutora Betânia Ferraz Chaves Barreto  
Examinador Interno  
Ciências Genômicas e Biotecnologia - UCB

---

Prof. Doutora Ieda de Carvalho Mendes  
Examinador Externo  
Embrapa Cerrados - CPAC

Brasília  
2011

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por tudo o que me foi concedido até hoje desde o dom da vida.

Agradeço à minha grande família pelo apoio, aos meus pais, Maria Lúcia Hipólito e Virgílio de Castro, pela educação, amor, respeito, carinho, força e toda a dedicação que tiveram para comigo e a todos os meus irmãos pelos momentos que me fizeram pensar, sorrir, chorar e resmungar – sem estes momentos não seria quem sou hoje (e obrigado aos meus pais, novamente, por me darem tantos irmãos!). Aos meus sobrinhos pelos momentos de diversão, aos pequenos por não me deixarem esquecer como é ser criança e aos mais velhos por sempre me deixarem antenados nas modernidades dos jovens.

Agradeço aos meus professores que me ajudaram desde o início de minha carreira profissional. Agradeço à professora Cristine, professora, doutora e orientadora, muitas vezes empolgada com a pesquisa, e sedenta por novas informações, pela oportunidade concedida, pelas idéias geniais, pelo apoio, pelos ensinamentos e por ser uma pessoa que sempre ajudou quando ao seu alcance.

Agradeço à doutora Betânia F. Quirino e ao doutor Ricardo Henrique Krüger pelo apoio inicial fornecido à pesquisa até aqui realizada. Sem eles, este trabalho não teria chegado até aqui; à doutora Beatriz S. Magalhães pelo apoio dado à pesquisa, pela ajuda fornecida para a obtenção de resultados e produção deste documento, pelos ensinamentos e pela paciência; ao prof. José A. Correia e aos seus alunos, Natália, Ingridh, Felipe e Patrick, pela ajuda com parte deste trabalho; à doutora Ieda de Carvalho Mendes pela participação da avaliação de meu projeto e de minha dissertação, suas críticas foram fundamentais para a objetividade deste trabalho. Agradeço muito aos meus avaliadores, Dra Betânia e Dra Ieda, pela paciência e compreensão.

Agradeço ao doutor Ruy Caldas, ex-diretor do curso de Ciências Genômicas e Biotecnologia e atual pró-reitor da pós-graduação da Universidade Católica de Brasília, pelo incentivo e entusiasmo com a pesquisa, pela busca diária tanto em melhorar o curso, quanto por incentivos às pesquisas aqui realizadas e pela ajuda no fornecimento de amostras utilizadas neste trabalho.

Agradeço a todos os professores do curso de ciências genômicas e biotecnologia, pelo respeito e ensinamentos dados tanto dentro de sala quanto nos corredores do laboratório. Em especial aos doutores Simoni Dias, Octávio Franco e Rinaldo Pereira pelas risadas e momentos de descontração.

Agradeço a todas as pessoas que trabalharam no laboratório e que facilitam a vida de todos que utilizam esse espaço. Agradeço aos nossos técnicos Idacuy, André, Willian, Jefferson, Patrícia, (sequenciamento), Alessandra (que não é mais técnica, mas passou um período organizando o lab), aos secretários Fábio e à Ana por sempre ajudarem na parte burocrática que nós, alunos, temos problemas para entender.

Agradeço à Nayane M. Silva pelo amor, paciência, companheirismo, cuidado, carinho, compreensão e apoio dados em todos os momentos e que são fundamentais para um relacionamento bem sucedido como tem sido. Agradeço à sua família pelos momentos de descontração e apoio que foram frequentes no decorrer desta fase de mestrado.

Agradeço aos meus colegas que entraram comigo nesta caminhada, Leonardo, Silmara, especialmente à Débora e Shelly pela ajuda em entender trabalhos e com as listas de exercícios. Às duas últimas agradeço por partilharem comigo as angústias intrínsecas para obtenção deste título.

Agradeço todos os meus amigos e colegas de trabalho. Muitos deles se tornaram importantes e valiosos. Inicialmente agradeço aos meus atuais colegas de bancada, Rosiane, Laiane, Juliana, Cristiane, Ramon, Daniel e especialmente ao Luis Felipe Shroeder pela constante ajuda, que muitas vezes me pouparam horas de trabalho.

Aos meus antigos amigos de bancada que me treinaram, ajudaram e divertiram, entre eles, Thaís, Adriana, Maíra, Isabel, Janaína (obrigado pelos dados iniciais deste trabalho), Samuel e Aline.

Agradeço aos amigos e colegas de outras bancadas, com os quais muitas vezes me distraí mais do que devia, mas aprendi a ser mais humano e me senti mais querido. Peço desculpa pelos atrasos em almoçar, mas em muitas das vezes foi inevitável. Obrigado Nídia, Amanda, Bárbara, Jéssica, Betúlia, Tainá, Rodrigo, Felipe, Andréa, Mirna, Néelson, Flávia, Renato, Tailce, Ailla, Ricardo, Ana Carol, Ohana e Carlos, tanto pela ajuda em bancada como nos momentos de muitas risadas e descontração.

Agradeço aos amigos que conheci no período de graduação, Ciro, Lucas, Larissa, Leonardo, Ronaldo e Pollyanna pela amizade de vocês, pela ajuda que vocês me deram e pelos momentos em que pude ajudar. Obrigado Ronaldo pelos momentos de risada e pela imensurável ajuda na vida profissional, por ter me escolhido para te substituir como professor. Foi uma experiência inesquecível e muito proveitosa. Espero não perder o contato com vocês.

Agradeço a todos meus amigos pela paciência e compreensão para com meus sumiços devido ao meu trabalho. Minha ausência foi necessária para a qualidade deste trabalho, mas sou grato por sempre estarem dispostos a ajudar quando necessário.

Muito obrigado a todos vocês! Que Deus os abençoe e dê em dobro tudo o que me deram.

## RESUMO

Referência: CASTRO, Virgílio Hipólito Lemos de. **Identificação, isolamento e caracterização de bactérias de solo de cerrado pertencentes ao filo Acidobacteria**. 2011. 65p, Dissertação de mestrado (Ciências genômicas e biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2011.

O solo do bioma Cerrado apresenta uma comunidade microbiana pouco estudada, mas estudos metagenômicos revelaram a presença de Acidobacteria em quatro de suas diferentes fitofisionomias. Embora sequências do gene do RNAr 16S destas bactérias sejam encontradas em amostras de todo o mundo, existem, ao todo, apenas 14 espécies descritas, sendo pouco conhecido sobre sua fisiologia e seu papel no ambiente. No presente trabalho, um meio utilizado para isolamento de Acidobacteria em solo australiano foi testado para cultivar acidobactérias de solo de Cerrado. O solo obtido de reserva do IBGE foi utilizado em experimentos preliminares e demonstrou que em meio VL55 com xilana, quando comparado ao meio R2A, o surgimento das colônias é lento e há uma maior variabilidade na morfologia das colônias. Além disso, mostrou também que a melhor diluição foi a de  $10^{-6}$ , assim como a necessidade de adição de ciclohexamida para inibir crescimento de fungos. Solos de três locais diferentes da Fazenda Capão Comprido foram utilizados para o isolamento de acidobactéria, e apenas o meio VL55 foi utilizado. Inicialmente foi utilizada, a técnica de *plate wash* – PCR, onde todas as colônias de uma placa réplica são ressuspensas e tem seu DNA extraído e submetido a PCR com iniciador específico para observar a presença de Acidobacteria. A presença de fungos impediu o isolamento subsequente das acidobactérias das amostras utilizadas com esta técnica. Outra técnica de detecção testada foi a de *colony* – PCR, na qual cada colônia coletada é utilizada diretamente como *template* para PCR. Essa técnica permitiu a detecção de 19 acidobactérias de um total de 159 colônias submetidas à PCR com iniciador específico. Apenas cinco isolados permaneceram em cultura e a análise das sequências do gene RNAr 16S sugere que sejam novas espécies de Acidobacteria. Os isolados AB20, AB23 e AB 60 apresentam colônias semelhantes entre si sendo diferentes dos isolados AB39 e AB158, embora a análise filogenética das sequências mostre o isolado AB158 dentro do grupo de AB20, AB23 e AB60. Todos os isolados são capazes de utilizar glicose, extrato de levedura e xilana. Quitina, CMC e avicel também foram testadas, mas o resultado não foi conclusivo. O crescimento a 37°C foi analisado nos isolados AB20, AB23 e AB60 e somente o isolado AB23 apresentou crescimento. O isolado AB60 foi testado quanto à variação de pH e ocorreu crescimento em pH 4.5 e 5.5, não sendo observado em 6.5 e o tempo de crescimento em meio líquido foi menor do que o observado em placa. A microscopia mostrou que todos os isolados são Gram-negativos, tendo alguns dos isolados formatos de bacilo ou cocobacilo. Foi realizada também análise do perfil proteico dos isolados por meio de espectrometria de massa MALDI – TOF e visualmente, é possível afirmar que os isolados são diferentes entre si. Os resultados obtidos neste trabalho não foram capazes de diferenciar os isolados, exceto pela espectrometria de massa. Embora a análise filogenética utilizando-se a sequência do RNAr 16S mostre que essas bactérias sejam novas espécies, mais testes bioquímicos são necessários para a confirmação.

Palavras-chave: Acidobacteria, bactéria de solo do Cerrado, xilana, MALDI-TOF.

## ABSTRACT

Referência: CASTRO, Virgílio Hipólito Lemos de. **Identificação, isolamento e caracterização de bactérias de solo de cerrado pertencentes ao filo Acidobacteria**. 2011. 65p, Dissertação de mestrado (Ciências genômicas e biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2011.

Although there are few studies on the soil microbial community from the Cerrado biome a recent metagenomic analysis revealed the dominance of the phylum of Acidobacteria in four different types of vegetation. Although the 16S rRNA gene sequences from these bacteria have been found in samples all over the world, there are only 14 species fully described. Therefore little is known about their physiology and their role in the biogeochemical cycles. In the present work, a culture medium used to isolate several Acidobacteria from an Australian soil was tested to cultivate Acidobacteria from the Cerrado. Soil was collected from the IBGE-RECOR area for preliminary experiments. This soil was plated on VL55 medium with xylan as sole carbon source and the medium R2A. When compared, colonies from bacteria grew slower in VL55 medium and presented higher number of colony morphologies. Moreover, these experiments revealed that  $10^{-6}$  was the appropriate dilution for this soil as well as the need of cycloheximide to inhibit fungal growth. Soil collected in the Fazenda Capão Comprido was used to isolate Acidobacteria using VL55 medium. In order to detect Acidobacteria, *Plate wash* - PCR technique was initially used. This technique requires the extraction of the DNA from all colonies on a Petri dish without their isolation. Acidobacteria was detected by PCR using specific primer for this phylum; however, the presence of fungus prevented subsequent isolation of Acidobacteria. *Colony* - PCR was then used and allowed the detection of 19 Acidobacteria out of 159 colonies tested. Only 5 bacterial isolates were successfully maintained in culture. Sequencing analysis of the 16S rRNA gene suggested that these bacteria are new species of the phylum Acidobacteria. Isolates AB20, AB23, and AB60 presented colonies with similar morphology but distinct from isolates AB39 and AB158. However, phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequence indicated that isolate AB158 belongs to the same group as AB20, AB23 and AB60. All isolates were capable to use glucose, yeast extract and xylan as carbon sources. Chitin, CMC and avicel were tested but the results were inconclusive. Growth at 37°C was analyzed for isolates AB20, AB23 and AB60, but among them only the isolate AB23 exhibited growth at this temperature. The optimum pH for growth was tested for isolate AB60 and growth was observed on pHs 4.5 and 5.5. Microscopy analysis showed that all isolates were Gram-negative bacilli or Gram negative cocobacilli. The analysis of the protein profile by mass spectrometry MALDI-TOF indicated that all isolates were different from each other. Results obtained in this work were not sufficient to differentiate the isolates except for the mass spectrometry. Although the phylogenetic analysis using the sequence of the 16S rRNA gene suggested that these bacteria are new species, more biochemical and molecular tests are necessary to confirm this hypothesis.

Keywords: Acidobacteria, Cerrado soil bacteria, xylan, MALDI-TOF.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Diagrama demonstrando a técnica do *plate wash* - PCR com modificações a serem utilizadas no isolamento e identificação de acidobactéria (modificado de Stevenson et al, 2004). ..... 19
- Figura 2: Distribuição dos diferentes GP's do filo Acidobacteria em relação às diferentes fitofisionomias. Análise de clones da biblioteca do gene RNAr 16S de Acidobacteria encontrados classificados pelo RDP (Ribossomal Database Project 10). Dados obtidos por Araújo, 2011. .... 21
- Figura 3: Número de colônias observadas a cada semana nos meios testados. R2A (A) e VL55 (B) em diferentes diluições. As barras de erro são referentes ao desvio padrão. .... 33
- Figura 5: Colônias selecionadas para isolamento durante experimento piloto realizado utilizando o solo da RECOR. A: A seta indica a colônia CVL1. B: Colônia CVL3 com coloração amarela indicada pela seta. .... 33
- Figura 4: Surgimento sequencial de colônias em placas com diluições de  $10^{-5}$  nos meios testados. R2A (A, B, C e D) e VL55 (E, F, G e H). As figuras A e E foram registradas na primeira semana de incubação, as B e F na terceira semana, a C e G na sexta semana e a D e H na oitava semana. .... 33
- Figura 6: Dendrograma mostrando o parentesco entre as colônias obtidas no experimento e sequências obtidas em banco de dados. CVL# são colônias crescidas em meio VL55 e CR# retirada do meio R2A. Dendrograma obtido pelo método de Neighbor Joining Os valores dos clados são referentes ao bootstrap com 1000 repetições. .... 35
- Figura 7: Amplificação de diferentes amostras utilizando os iniciadores específicos para Acidobacteria em comparação com as mesmas amostras utilizando os iniciadores universais. (A) Iniciadores específicos para Acidobacteria: Acd 31F/1492R (B) Iniciadores universais: 27F/1492R. A seta indica o fragmento de aproximadamente 1500 bp. Amostras: M - *Ladder* 1kb *plus*; 1 – controle sem DNA; 2 – controle positivo (solo de cerrado); 3 – controle negativo (DNA de rúmen); 4 – solo de eucaliptos; 5 – solo de cerrado denso; 6 – solo de cerrado *sensu stricto*. .... 38
- Figura 8: Número de colônias observadas em placa a cada semana, a partir das amostras dos diferentes solos. As barras azul, vermelha e verde mostram a quantidade de colônias de cada tratamento de solo de cerrado *sensu stricto*. As barras de erro são referentes ao desvio padrão. .... 39
- Figura 9: Amplificação do gene do RNAr 16S a partir de DNA obtido de amostras ambientais e de placas pelo método de *plate wash*. A - amplificação com os iniciadores universais M: 1kb ladder; 1: controle negativo (sem DNA); 2: *plate wash* placa 3A; 3: *plate wash* placa 3B; 4: *plate wash* placa 3C; 5: *plate wash* placa 3D; 6: *plate wash* placa 3E; 7: *plate wash* placa

3F; 8: plate wash placa 3G; 9: plate wash placa 3H; 10: plate wash placa 3I; 11: plate wash placa 3J; 12: plate wash placa 3K. B - Amplificação com os iniciadores específicos Acd 31F/1492R. M: 1kb ladder; 1: controle negativo (sem DNA); 2: plate wash placa 3A; 3: plate wash placa 3B; 4: plate wash placa 3C; 5: plate wash placa 3D; 6: plate wash placa 3E; 7: plate wash placa 3F; 8: plate wash placa 3G; 9 plate wash placa 3H; 10: plate wash placa 3I; 11: plate wash placa 3J; 12: plate wash placa 3K. ....	40
Figura 10: Amplificação do gene do RNAr 16S com iniciadores específicos para o filo Acidobacteria a partir de DNA obtido de amostras ambientais e de colônias pelo método "colony-PCR". M: ladder 1kb plus; 1: DNA λ 100 ng; 2: controle negativo (sem DNA); 3: colônia 4; 4: colônia 5; 5: colônia 10; 6: colônia 11; 7: colônia 12; 8: colônia 20; 9: colônia 23; 10: colônia 4; 11: colônia 5; 12: colônia 10; 13: colônia 11; 14: colônia12; 15: colônia 20; 16: colônia 23; 17: controle positivo (DNA de solo de cerrado); 18 e 19: controle negativo (CV1). Os traços (–) são referentes a posições sem aplicação de material.....	41
Figura 11: Dendrograma mostrando o parentesco entre as sequências das colônias isoladas obtidas por colony – PCR (AcidoBr) com as de isolados obtidos no banco de dados (RDP).. O dendrograma foi obtido pelo método Neighbor-Joining com bootstrap de 1000 repetições. ....	43
Figura 12: Digestão com a enzima de restrição AluI do gene RNAr 16S dos isolados de Acidobacteria. M: ladder 1kb plus; 1: DNA λ 100 ng; 2: AB20; 3: AB23; 4: AB39 ; 5: AB60; 6: AB158;.....	44
Figura 13: Crescimento em profundidade dos isolados obtidos em meio semi-sólido. (A) AB20, (B) AB23, (C) AB39 e (D) AB60 inoculados por perfuração com alça microbiológica em meio de cultura semi-sólido para teste de necessidade de aeração. As setas indicam a região mais profunda do inóculo. ....	46
Figura 14: Curva de crescimento dos isolados AB20, AB23 e AB60 incubados por três semanas em VL55 com xilana líquido a 37°C. As barras de erro são referentes ao desvio padrão. ....	47
Figura 15: Curvas de crescimento do isolado AcidoBr60 em diferentes pHs. pH's 4.5 (azul), 5.5 (vermelho) e 6.5 (verde). Os valores de desvio padrão de cada valor estão representado pelas barras ligadas a cada ponto da curva. ....	48
Figura 16: Microscopia óptica dos isolados AB23 e AB60. (A) AB23 e (B) AB60. As barras das figuras se referem a 10 µm. ....	49
Figura 17: Microscopia eletrônica de varredura dos isolados AB23, AB39 e AB60. (A) AB23, (B) AB39 e (C) AB60. As barras indicam 1 µm.....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies descritas mostrando o GP no qual está classificado, o local de isolamento, a variação de pH e temperatura e necessidade de oxigênio. ....	17
Tabela 2: Dados referentes aos locais onde foram realizadas as coletas, constando o nome do local, a data em que a coleta foi realizada e seu georeferenciamento. ....	24
Tabela 3: Colônias selecionadas em meios de cultura VL (CVL) e R2A (CR), suas características principais, a quantidade de pares de base sequenciados e a identidade das sequências comparadas ao banco de dados RDP. ....	35
Tabela 4: Propriedades físico-químicas das amostras de solo coletadas na fazenda Capão Comprido realizadas pela SOLOQUÍMICA - Análises de Solo Ltda. ....	37
Tabela 5: Similaridade entre as sequências do gene RNAr 16S. ....	41
Tabela 6: Valores de similaridade (%) fornecido pelo RDP-X e % de identidade fornecido pelo <i>greengenes</i> utilizando Blast comparando os isolados obtidos com sequências do banco de dados. ....	42
Tabela 7: Características fenotípicas dos isolados de cerrado <i>sensu stricto</i> e <i>A. capsulatum</i> , <i>T. roseus</i> , <i>E. Aggregans</i> , <i>G. Paludicola</i> , <i>G. Pectinivorans</i> , <i>G. Aggregans</i> e <i>G. Rosea</i> . ....	50

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	12
1.1 Isolamento e cultivo de micro-organismos.....	12
1.2 Identificação e caracterização de novas bactérias .....	14
1.3 O filo Acidobacteria .....	15
1.4 Abordagens para cultivo de Acidobacteria .....	18
1.5 Cerrado e Acidobacteria.....	20
2. Justificativa .....	22
3. Objetivos .....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos .....	23
4. Material e Métodos .....	24
4.1 Descrição da área de estudo.....	24
4.2 Coleta de solo .....	25
4.3 Meios de Cultura .....	25
4.4 Avaliação das condições de cultivo para isolamento de bactérias ainda não cultivadas.....	26
4.5 Comparação entre os solos da Fazenda Capão Comprido .....	26
4.6 Métodos para detecção de acidobactérias .....	27
4.7 Amplificação e análise do gene do RNAr 16S (domínio Bacteria e filo Acidobacteria).....	28
4.8 Cultivo e caracterização .....	29
5. Resultados .....	31
5.1 Comparação do crescimento bacteriano em meio R2A e VL55.....	31
5.2 Avaliação das condições de cultivo em meio VL55 .....	33
5.3 Comparação entre os solos da Fazenda Capão Comprido .....	36
5.4 Técnicas de detecção de Acidobacteria: “ <i>plate wash</i> – PCR” e “ <i>colony</i> – PCR” .....	39
5.5 Análise das sequências de DNA dos isolados de Acidobacteria do solo de cerrado <i>sensu stricto</i> .....	41
5.6 Cultivo e caracterização das acidobactérias encontradas .....	44
6. Discussão .....	53
6.1 Testes do meio de cultura e condições para isolamento de Acidobacteria .....	53
6.2 Comparação entre os solos da Fazenda Capão Comprido .....	55

6.3 Comparação entre solos da fazenda Capão Comprido em relação ao número de colônias obtidas em meio VL55.....	56
6.4 Técnicas de detecção de Acidobacteria: “ <i>plate wash</i> – PCR” e “ <i>colony</i> – PCR” .....	56
6.5 Análise das sequências de DNA dos isolados de Acidobacteria do solo de cerrado <i>sensu stricto</i> .....	58
6.6 Caracterização das acidobactérias encontradas .....	60
7. Perspectivas futuras .....	65
8. Referências Bibliográficas .....	66
9. Apêndice .....	72

# 1 Introdução

## 1.1 Isolamento e cultivo de micro-organismos

A técnica de cultivo de micro-organismos em laboratório faz parte da história da microbiologia especialmente na chamada “teoria do germe” como ciência (MADIGAN e MARTINO, 2006). Em 1876, Robert Koch criou os postulados utilizados para averiguar o agente causador de uma doença. Koch também descobriu a possibilidade de se cultivar micro-organismos fora do corpo do animal. Isso foi possível devido à utilização de fluidos nutritivos, percebendo a facilidade em se identificar diferentes morfologias de colônias bacterianas e de isolá-las em uma superfície sólida, como em fatias de batata. Essa percepção fez com que Koch utilizasse meio de cultura semi-sólido aplicando gelatina e posteriormente o ágar nos procedimentos de isolamento de organismos (MADIGAN; MARTINO, 2006). Assim sendo, as pesquisas em microbiologia foram baseadas principalmente na busca por agentes causadores de doenças. Como consequência, o conhecimento sobre patógenos era superior ao conhecimento sobre organismos existentes no ambiente.

Além disso, as pesquisas favoreceram o estudo de micro-organismos que podiam ser cultivados. Em ambientes como o solo observa-se uma diferença entre o que se cultivava em uma placa e o que se podia observar no microscópio. Atualmente acredita-se que a porcentagem de organismos cultivados em meios de cultura tradicionais varia de 0,1 a 1% (HANDELSMAN, 2004).

As técnicas moleculares contribuíram para o estudo sobre a diversidade microbiana ainda desconhecida pelos microbiologistas (HANDELSMAN, 2004; MADIGAN; MARTINO, 2006). A metagenômica, ferramenta utilizada para analisar o conjunto dos genomas de uma determinada comunidade, mostrou o quanto nosso conhecimento é limitado e o quão amplo é a diversidade microbiana no ambiente (HANDELSMAN, 2004; CARDENAS; TIEDJE, 2008).

Os avanços no estudo da ecologia microbiana utilizando-se as técnicas moleculares responderam a pergunta inicial de “quem está ali”, e ajudaram a descrever a composição das comunidades microbianas. Como dito por Handelsman (2004), a pergunta “Quem está lá?” foi modificada para “O que eles estão fazendo?.” O estudo do metagenoma acabou por mostrar os organismos de diversos ambientes, mas ainda não se sabe exatamente o que eles estão fazendo. Embora o genoma nos permita formar hipóteses sobre seus papéis na

natureza, precisamos de culturas puras para estudar seus aspectos funcionais (HANDELSMAN, 2004; GIOVANNONI; STINGL, 2007). Com a publicação recente de vários genomas, foram encontradas informações sobre suas necessidades nutricionais. Estas informações também podem ser utilizadas para a elaboração de meios de cultura que permitam o isolamento de organismos ainda não cultivados (HANDELSMAN, 2004; GIOVANNONI; STINGL, 2007).

Sendo assim, a procura por micro-organismos que ainda não foram cultivados incentivou o surgimento de novas metodologias de cultivo. A dificuldade em ajustar a quantidade dos nutrientes com fatores como pH e temperatura torna o cultivo uma técnica bastante complexa. As substâncias presentes num meio de cultura são limitadas quando comparadas a um ambiente como o oceano ou o solo. Outra diferença importante entre o ambiente e um meio de cultura é a rede de interações entre os organismos. Quando transferidos para meio de cultura, parte das espécies-chave não se adapta eliminando parte da dinâmica existente no ambiente natural (KAEBERLEIN et al, 2002; MADIGAN; MARTINO, 2006).

Na tentativa de sobrepor as dificuldades no cultivo de espécies ainda não cultivadas, alguns trabalhos demonstram o sucesso de técnicas utilizando equipamentos complexos. Entre estas técnicas encontram-se micromanipuladores comerciais (FROHLICH; KONIG, 2000), citometria de fluxo com células encapsuladas (ZENGLER et al, 2002) e câmaras de infusão (KAEBERLEIN et al, 2002). Cada uma destas metodologias superam problemas comuns às técnicas de cultivo tradicionais, seja permitindo a observação de micro colônias, seja mantendo a constituição do ambiente de incubação igual à do ambiente do qual a cultura foi amostrada.

Apesar dos bons resultados por meio do uso de equipamentos complexos, os métodos mais simples continuam sendo os mais utilizados e apresentam maior sucesso no desafio de cultivar novos organismos (SAIT et al, 2002; JOSEPH et al, 2003).

A união de técnicas de cultivo com técnicas moleculares é importante para o sucesso no isolamento de novos organismos. As informações moleculares fornecem evidências sobre qual abordagem adotar, podendo facilitar a adoção de metodologias adequadas para cultivo de espécies ainda não cultivadas.

## 1.2 Identificação e caracterização de novas bactérias

Após obtenção de colônias isoladas, tanto em cultura mista como em cultura pura, o próximo passo é identificar os organismos encontrados. Uma identificação rápida e confiável é fundamental para o prosseguimento da pesquisa (TRÜPER; SCHLEIFER, 2006).

Atualmente entre as técnicas mais utilizadas para identificação está o sequenciamento de parte do gene de RNA ribossomal (RNAr). Este gene codifica um RNA que, em conjunto com proteínas formará o ribossomo. As vantagens de usar a sequência gene do RNAr 16S está no fato desta ser uma sequência de tamanho suficiente que permita a diferenciação de espécies, tendo regiões conservadas e variáveis bem descritas, apresentar uma estrutura secundária, que fornece mais informação para análise além da sequência de nucleotídeos e apresenta um banco de dados amplo, devido principalmente a estudos de metagenômica (WOESE et al, 1980). Uma diferença maior que 98,5% entre sequências deste gene indicam que são derivadas de espécies diferentes (STACKEBRANDT; EBERS, 2006).

Para confirmação da informação fornecida pelo gene RNAr 16S e para continuação da caracterização de espécies de micro-organismos, a análise de reassociação DNA-DNA é imprescindível para a confirmação da nova espécie (STACKEBRANDT; EBERS, 2006). Além disso, é recomendado que o fenótipo seja analisado criteriosamente, sendo sempre comparado com táxons bem descritos (STACKEBRANDT et al, 2002). Entre estes testes pode-se citar o formato das células, presença de flagelos, constituição lipídica total, capacidade de degradação de determinadas substâncias e crescimento em diferentes pH's, temperaturas ou concentrações de oxigênio.

Recentemente, uma nova abordagem para a identificação de cepas bacterianas inclui a aplicação da espectrometria de massa para fornecer um perfil de massas moleculares correspondentes, principalmente, a proteínas ribossômicas em cada micro-organismo (MAIER et al, 2006).

O perfil adquirido é reflexo da composição proteica de cada colônia e é suficiente para distinguir espécies de bactérias. Tal perfil, apesar de único para cada espécie, pode também apresentar variações intraespecíficas de acordo com o estado fisiológico de cada micro-organismo (VALENTINE et al, 2005; MAIER et al, 2006). A maior vantagem desta abordagem está no fato do processamento do material ser rápido e simples, podendo ser utilizado tanto colônias intactas quanto lisados celulares, gerando resultado em um período de tempo menor quando comparado a outras metodologias de identificação (CLAYDON et al, 1996; KRADER; EMERSON, 2004; SENG et al, 2009). Um ponto negativo desta

metodologia é a pequena abrangência dos bancos de dados, já que grande parte dos espectros existentes é derivada de espécies patogênicas humanas. Assim que estes bancos forem alimentados com espectros de massa de isolados ambientais, ele será passível de consulta para identificação e rastreabilidade do momento fisiológico e origem de micro-organismos (KRADER; EMERSON, 2004; STEVENSON et al, 2010).

### 1.3 O filo Acidobacteria

O filo Acidobacteria é formado por grupo de bactérias encontradas em amostras de todo o mundo (BARNES et al, 1999). Estudos de diversidade utilizando o gene de RNAr 16S revelaram uma maior riqueza de espécies deste filo do que filios como Proteobacteria e Actinobacteria (JANSSEN, 2006; KOCH et al, 2008; LEE et al, 2008). Devido a essa característica cosmopolita, acredita-se que este grupo tenha um papel fundamental para a ciclagem de nutrientes no planeta (LEE et al, 2008).

O nome Acidobacteria foi cunhado devido ao fato do primeiro organismo caracterizado ter sido isolado de uma amostra de drenagem ácida de mina, um ambiente extremo com pH baixo. A este primeiro membro foi dado o nome, *Acidobacterium capsulatum* (espécie tipo do grupo) (KISHIMOTO et al, 1991). Posteriormente, acidobactérias foram detectadas por métodos moleculares em locais com características diferentes, sugerindo que este filo contém organismos adaptados a diversas características físico-químicas dos ambientes (KISHIMOTO et al, 1991; COATES et al, 1999; EICHORST et al, 2007; KOCH et al, 2008), embora Jones e colaboradores tenham mostrado uma maior abundância de acidobactérias em ambientes com pH igual ou inferior a 5,5.

Apesar de Acidobacteria ser encontrada com facilidade utilizando-se as técnicas moleculares, existem em todo o mundo apenas 132 isolados. A maior parte dos isolados foi obtida em solos australianos e nomeada "Ellin" devido local de amostragem se chamar Ellinbank. Estes isolados foram obtidos em maior parte nos últimos 10 anos: 12 isolados em dois trabalhos em 2002 (JANSSEN et al, 2002; SAIT et al, 2002), 40 em 2003 (JOSEPH et al, 2003) e 46 em 2006 (SAIT et al, 2006).

O filo está dividido em 26 subgrupos, que foram denominados GP's no RDP. O subgrupo 8, recentemente, se tornou a classe Holophagae que passa a possuir duas ordens: Acanthopleuribacterales e Holophagales. Em busca recente no RDP (Ribossomal Database Project 10) (COLE, 2008), observou-se a presença de 7334 sequências diferentes pertencentes ao filo Acidobacteria. Em 2009, este número era 5312, mostrando o crescente

número de pesquisas realizadas nas quais estes organismos são encontrados em grande número (COLE, 2008).

Dos 132 isolados, apenas 14 espécies foram caracterizadas e apresentam nomenclatura validada (Tabela 1). Dentre as espécies descritas, a espécie *Holophaga phoetida* foi obtida de sedimentos de água doce (LIESACK et al, 1994); a espécie *Geothrix fermentans* foi isolada de um aquífero contaminado por petróleo na Carolina do Sul (EUA) (COATES et al, 1999). A espécie *Terriglobus roseus* foi isolada de solo de uma estação ecológica em Michigan (EICHORST et al, 2007). Já as espécies *Edaphobacter modestus* e *Edaphobacter aggregans* foram isoladas, respectivamente, de solo de montanha (a 1400 metros de altitude com uma temperatura de 30°C) e de solo de uma floresta decídua, ambos na Alemanha. Uma característica interessante das *Edaphobacter* é o pH em que foram isoladas, com valores próximos à neutralidade, sendo que a segunda espécie foi mantida em meio anaeróbico (KOCH et al, 2008). Ainda em 2008, a espécie *Acanthopleuribacter pedis* foi isolada de chiton, um animal marinho. No mesmo trabalho foram sugeridos nomes de classe, ordem, família, separando a espécie *Holophaga phoetida* e *Acanthopleuribacter pedis* (FUKUNAGA et al, 2008).

No ano de 2010, 5 novas espécies de acidobactéria foram propostas. Quatro delas foram isoladas na Rússia em pântano com turfa de *Sphagnum* e foram nomeadas *Granulicella paludicola*, *G. pectinivorans*, *G. aggregans* e *Bryobacter aggregatus* (KULICHEVSKAYA et al, 2010; PANKRATOV; DEDYSHI, 2010). Outra espécie foi isolada na Finlândia, em solo de tundra e é capaz de crescer entre 0°C a 30°C e na faixa de pH de 4,5 a 7,5. Esta foi nomeada *Terriglobus saanensis* (MANNISTO et al, 2010). Neste ano, uma nova espécie foi isolada no Japão, uma na Finlândia e duas na Rússia. No Japão, dois isolados foram obtidos de amostras com pH's 2,3 (drenagem ácida de mina) e 4,8 (plantação de chá) e foram descritas com uma única espécie de um novo gênero: *Acidipila rosea* (OKAMURA et al, 2011). Em abril e maio deste ano foram descritas duas bactérias, ambas isoladas de turfa de *Sphagnum*, na Rússia. A primeira, chamada *Telmatobacter bradus* apresentou alta capacidade celulolítica enquanto que a segunda espécie, chamada *Bryocella elongata*, foi retirada de uma cultura de enriquecimento de metanotróficas (DEDYSH et al, 2011; PANKRATOV et al, 2011).

Tabela 1: Espécies descritas mostrando o GP no qual está classificado, o local de isolamento, a variação de pH e temperatura e necessidade de oxigênio.

<b>Espécie descrita</b>	<b>GP</b>	<b>Local de isolamento</b>	<b>pH/ temperatura/ oxigenação</b>	<b>Referência</b>
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	1	Drenagem ácida de mina Japão	3,0-6,0/ 25-37°C/ aeróbio	(KISHIMOTO et al, 1991)
<i>Holophaga phoetida</i>	8*	Lama negra de água doce anóxica Alemanha	5,5-8,0/ 10-35°C/ Anaeróbio estrito	(LIESACK et al, 1994)
<i>Geothrix fermentans</i>	8*	Sedimento (de aquífero) contaminado com petróleo Estados Unidos	ND/ 35-40°C/ anaeróbio	(COATES et al, 1999)
<i>Terriglobus roseus</i>	1	Solo para agricultura nunca plantado Estados Unidos	5,0-7,0/ 12-23°C/ anaeróbio facultativo	(EICHORST et al, 2007)
<i>Edaphobacter modestus</i>	1	Solo alpino Alemanha	4,5-7,0/ 15-30°C/ aeróbio	(KOCH et al, 2008)
<i>E. aggregans</i>	1	Solo de floresta Alemanha	4,0-7,0/ 15-37°C/ aeróbio	(KOCH et al, 2008)
<i>Acanthopleuribacter pedis</i>	8*	Molusco marinho Japão	5,0-9,0/ 15-30°C/ aeróbio estrito	(FUKUNAGA et al, 2008)
<i>Glanulicella paludicola</i>	1	Pântano com turfa de <i>Sphagnum</i> Rússia	3,0-7,5/ 2-33°C/ aeróbio estrito	(PANKRATOV; DEDYSH, 2010)
<i>G. pectivorans</i>	1	Pântano com turfa de <i>Sphagnum</i> Rússia	3,0-7,5/ 2-33°C/ aeróbio estrito	(PANKRATOV; DEDYSH, 2010)
<i>G. aggregans</i>	1	Pântano com turfa de <i>Sphagnum</i> Rússia	3,0-7,5/ 2-33°C/ aeróbio estrito	(PANKRATOV; DEDYSH, 2010)
<i>G rósea</i>	1	Pântano com turfa de <i>Sphagnum</i> Rússia	3,0-7,5/ 2-33°C/ aeróbio estrito	(PANKRATOV; DEDYSH, 2010)
<i>Bryobacter aggregatus</i>	3	Pântano com turfa de <i>Sphagnum</i> Rússia	4,5-7,2/ 4-33°C/ aeróbio estrito	(KULICHEVSKAYA et al, 2010)
<i>T. saanensis</i>	1	Solo de tundra Finlândia	4,5-7,5/ 4-30°C/ aeróbio	(MANNISTO et al, 2010)
<i>Acidipila rosea</i>	1	Drenagem ácida de mina Japão	3,0-6,0/ 22-37°C/ aeróbio	(OKAMURA et al, 2011)
<i>Telmatobacter bradus</i>	1	Turfa de <i>Sphagnum</i> Rússia	3,0-7,5/ 4-35°C/ anaeróbio facultativo	(Pankratov et al, 2011)
<i>Bryocella elongata</i>	1	Turfa de <i>Sphagnum</i> Rússia	3,2-6,6/ 6-32°C/ aeróbio	(Dedysh et al, 2011)

\* se refere à antiga classificação, já que o GP 8 atualmente é chamado de Holophagae. ND – não disponível.

Apesar de poucos isolados, existem genomas de três espécies deste grupo já sequenciados: *Acidobacterium capsulatum* (espécie tipo), e duas espécies candidatas, “*Koribacter versatilis*” Ellin 345 e “*Solibacter ursitatus*” Ellin 6076. O grupo apresentou

diferença significativa em relação ao tamanho do genoma: enquanto *Acidobacterium capsulatum* apresenta um genoma com 4,1 Mb, o isolado Ellin 345 apresentou 9,9 Mb. Apesar de toda a variação, os genomas apresentam similaridades com outros filões de bactérias, apresentando proteínas com alta similaridade com proteobactérias, cianobactérias e fungo. Além disso, o genoma mostrou que acidobactérias podem realizar a redução de nitrato e nitrito, e podem ser capazes de degradar xilana, celulose, quitina, pectina e amido, alertando para sua importância na ciclagem dos nutrientes e para a possível utilidade como ferramentas biotecnológicas (WARD et al, 2009).

Dentre as informações ecológicas fornecidas pelo genoma, pode-se perceber que estas espécies apresentam um crescimento lento devido ao metabolismo lento no seu ambiente oligotrófico. Analisando o estilo de vida, é sugerido que estas bactérias possuem uma estratégia do tipo K, ou seja, sobrevivem em habitats onde há intensa competição pelos recursos limitados, investindo boa parte da energia para competirem e não para reproduzirem, devido ao pequeno número de cópias do gene RNAr 16S (uma cópia para *A. capsulatum* e Ellin 345 e duas para Ellin 6076). Observando estas características pode-se especular sobre um possível motivo da dificuldade em cultivar organismos pertencentes a este filo. Pelo fato de apresentar um crescimento lento, a formação de uma colônia visível a olho nu é demorada e podendo existir o problema de acidobactérias não conseguirem competir com outras espécies em placa (KLAPPENBACH et al, 2000; STEVENSON; SCHMIDT, 2004; WARD et al, 2009).

#### **1.4 Abordagens para cultivo de Acidobacteria**

O sucesso no isolamento de micro-organismos ainda não cultivados parece estar relacionado adequações do experimento quanto à diluição de inóculo, tempo de incubação e escolha da fonte de carbono. A diluição deve ser realizada ao ponto que permitir o surgimento de colônias bacterianas que apresentem crescimento lento, impedindo o domínio das bactérias de crescimento rápido observadas nos meios de cultura e condições tradicionais. (JANSSEN et al, 2002; JOSEPH et al, 2003; DAVIS et al, 2005; SAIT et al, 2006; PANKRATOV; DEDYSH, 2010). O tempo de incubação, após uma adequação da diluição do inóculo, é fundamental para encontrar organismos de crescimento lento, desde que mantidas em temperatura similar à do ambiente natural. Mantendo estas condições, muitas colônias só se tornam visíveis após meses de incubação. Este tempo longo de incubação, aliado a uma diluição mal planejada pode gerar um experimento falho, já que a difusão de secreções de algumas bactérias pode prejudicar o crescimento das espécies de

crescimento tardio (DAVIS et al, 2010). Quanto à fonte de carbono, os estudos de isolamento de acidobactérias empregam diversos polímeros complexos como fontes de carbono. O uso destas fontes de carbono únicas e complexas age de modo seletivo, eliminando colônias incapazes de utilizar estes compostos para obtenção de energia (KIELAK et al, 2009). A celulose e a xilana são exemplos destes polímeros e cuja degradação apresenta interesse econômico (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

Recentemente uma técnica para identificação de organismos considerados de difícil cultivo foi descrita e permitiu o isolamento de acidobactérias em solos dos Estados Unidos (STEVENSON et al, 2004). Essa técnica foi chamada de “*plate wash* – PCR” e consiste em identificar placas contendo colônias de bactérias pertencentes a um grupo (filó, ordem, classe, etc.) de interesse amplificando por PCR fragmentos do gene do RNAr 16S específico para o grupo em questão. Inicialmente realiza-se o crescimento em meio de cultura sólido, com réplicas. Após a incubação retiram-se todas as colônias de algumas placas utilizando uma solução que permita a extração de DNA. Em seguida, uma PCR é preparada utilizando iniciadores específicos, que mostrarão a presença ou ausência do grupo de interesse. Uma vez constatado o resultado positivo, as réplicas das placas são utilizadas para identificação individual de cada colônia, utilizando-se os mesmos iniciadores específicos (Figura 1).

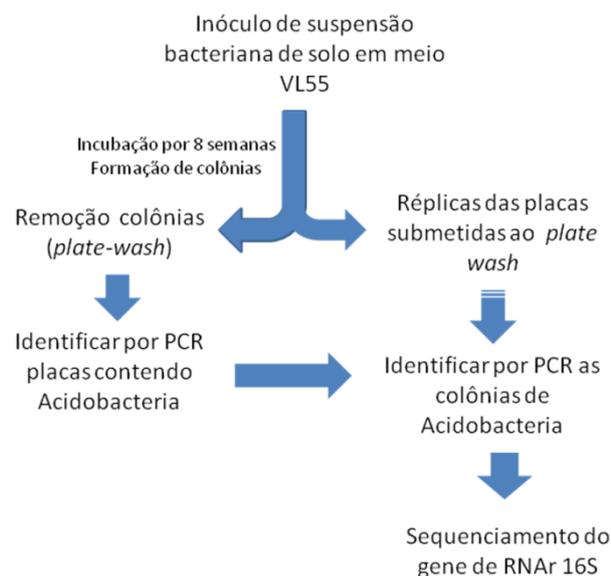


Figura 1: Diagrama demonstrando a técnica do *plate wash* - PCR com modificações a serem utilizadas no isolamento e identificação de acidobactéria (adaptado pelo autor).

Fonte: Stevenson et al, 2004).

A técnica de *plate wash* consiste na busca em larga escala por bactérias que ainda não foram isoladas. A utilização desta metodologia pode ajudar na busca por espécies de

Acidobacteria. Stevenson e colaboradores (2004) isolaram três acidobactérias por meio desta metodologia e parece ser uma metodologia eficaz para o isolamento de novas acidobactérias.

## 1.5 Cerrado e Acidobacteria

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e apresenta uma biodiversidade pouco conhecida. As fisionomias vegetais podem ser organizadas em formações florestais com a vegetação com predominância de espécies arbóreas e apresentando um dossel contínuo (que incluem a Mata Ciliar, a Mata de Galeria, a Mata Seca, e o Cerradão), formações savânicas com estrato arbóreo e arbustivo-herbáceo definido com as árvores distribuídas aleatoriamente sem a presença de um dossel contínuo (que incluem o Cerrado *stricto sensu*, a Vereda, o Parque de Cerrado e o Palmeiral), e as formações campestres com a predominância de fisionomias arbustivo-herbáceo ou herbáceo sem a presença de árvores, podendo a paisagem estar associada a afloramentos rochosos. O Cerrado *sensu stricto* apresenta quatro subtipos, sendo que o solo de dois deles foram utilizados neste trabalho: o Cerrado Típico (tratado no trabalho como Cerrado *sensu stricto*) que apresenta uma vegetação predominantemente arbóreo-arbustivo com cobertura arbórea de 20% a 50% e altura média de 3 a 6 metros; e o Cerrado Denso que apresenta uma vegetação predominantemente arbóreo, com cobertura de 50% a 70% e altura média de 5 a 8 metros (SANO et al, 2008)

As diferentes fisionomias de vegetação estão relacionadas à estacionalidade climática, a disponibilidade hídrica, a profundidade, a disponibilidade de nutrientes no solo, a topografia, o fogo e inúmeros fatores antrópicos (SANO et al, 2008)

O avanço do desmatamento para criação de monoculturas está destruindo esse bioma, que compreende a savana tropical mais rica e ameaçada do planeta (SCARIOT, 2005).

A microbiota existente no Cerrado é pouco conhecida. Em um estudo na região, foi estimada a abundância de filos em duas diferentes áreas de cerrado: uma área transformada em pastagem e uma área nativa. Foi observado um grande número de sequências relacionadas aos filos Proteobacteria e Acidobacteria na área nativa, enquanto na área de pastagens, o filo predominante foi Actinobacteria (QUIRINO et al, 2009).

Em um estudo anterior utilizando-se bibliotecas do gene do RNAr 16S foi observada a predominância de sequências pertencentes ao filo Acidobacteria (ARAÚJO, 2011). Aproximadamente 2000 sequências foram obtidas, por método de Sanger, a partir da

biblioteca do gene de RNAr 16S das quatro fitofisionomias estudadas revelando que mais de 50% das sequências analisadas pertenciam a acidobactérias. Um resultado similar foi obtido após o sequenciamento de 300.000 sequencias realizado com a técnica de pirosequenciamento das mesmas amostras de solo. As sequências foram então comparadas com o banco de dados do RDP e observou-se um maior número de acidobactérias pertencentes aos subgrupos GP1, GP2 e GP3 no grupo de sequências pertencentes ao cerrado *sensu stricto* (Figura 2).

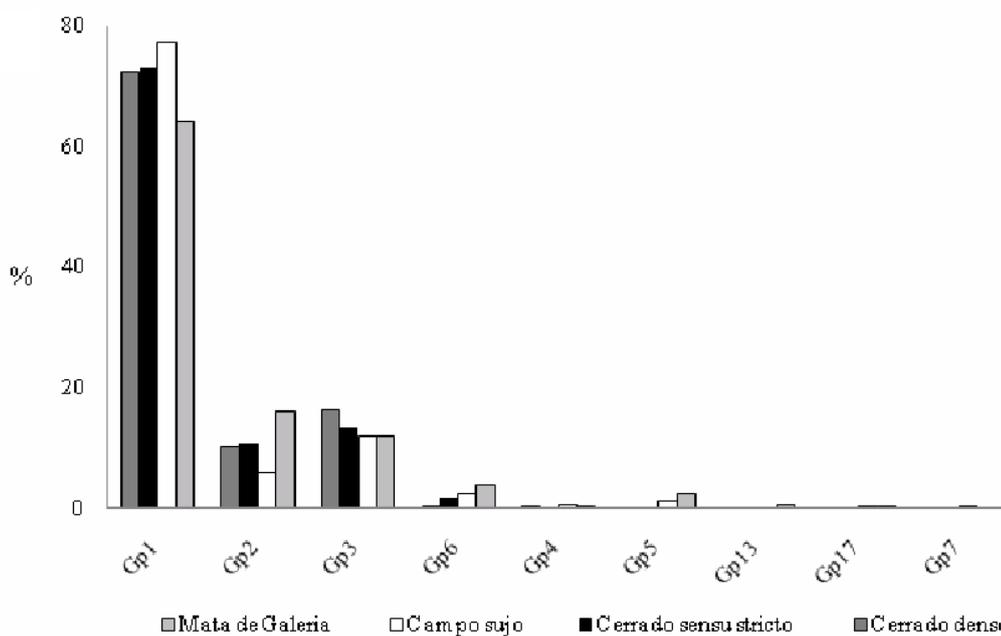


Figura 2: Distribuição dos diferentes GP's do filo Acidobacteria em relação às diferentes fitofisionomias. Análise de clones da biblioteca do gene RNAr 16S de Acidobacteria encontrados classificados pelo RDP (Ribossomal Database Project 10).

Fonte: Araújo, 2011.

O fato de a maioria das sequências pertencerem a bactérias do GP1 pode ter relação com o pH ácido do solo de cerrado. Esta relação é sugerida por Sait e colaboradores (2006), o qual analisou a correlação entre a presença de acidobactérias do GP1 de diversos trabalhos com o pH no qual foram isolados.

A figura 2 corrobora a correlação mostrada por Sait e colaboradores (2006) e essa predominância indica uma importância ecológica das espécies de Acidobacteria para o Cerrado. No entanto, a falta de conhecimento sobre seu metabolismo e fisiologia impede o entendimento do seu real papel no ambiente (QUAISER et al, 2003).

## 2 Justificativa

Acidobacteria consiste em filo cosmopolita associado a solos de pH baixo, porém pouco conhecido. Acredita-se que estas bactérias participem da ciclagem de nutrientes como o nitrogênio ou ainda na degradação de polissacarídeos complexos como a celulose, hemicelulose ou quitina. Essa capacidade na degradação de polissacarídeos complexos representa ainda um potencial biotecnológico para diversas áreas como a bioenergia, por exemplo, a produção de enzimas para utilização na produção de etanol de segunda geração. Estas suspeitas são fundamentadas com base nos genomas já sequenciados

Ainda não existem micro-organismos pertencentes ao filo Acidobacteria isolados de solos brasileiros, e os solos de Cerrado apresentam uma dominância de acidobactéria de acordo com análises moleculares. Assim, o conhecimento da fisiologia e ecologia desses organismos apresenta um papel chave no estudo sobre o funcionamento da ciclagem de nutrientes em solos do bioma Cerrado.

## **3 Objetivos**

### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi isolar bactérias pertencentes ao filo Acidobacteria presentes em solo de Cerrado procurando conhecer seu metabolismo, principalmente em relação à sua capacidade de degradar polissacarídeos complexos como xilana e celulose.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Testar a capacidade do meio de cultura VL55 de permitir o crescimento de bactérias ainda não isoladas em solo de Cerrado;
- Identificar a presença de acidobactérias nas amostras utilizadas;
- Isolar acidobactérias pertencentes a subgrupos acidófilos;
- Caracterizar as acidobactérias isoladas obtendo informações como tolerância à variação de pH, temperatura e uso de polissacarídeos complexos;
- Identificar bactérias que sejam capazes de crescer no meio VL55;

## 4 Material e Métodos

### 4.1 Descrição da área de estudo

As áreas de estudo foram a Reserva ecológica do IBGE (RECOR) localizada no Distrito Federal e a Fazenda Capão Comprido, propriedade particular (Tabela 2).

A RECOR encontra-se a uma altitude que varia de 1.048 metros até 1.150 metros e apresenta um clima sazonal com duas estações bem definidas, sendo uma seca, que vai de abril a setembro, e outra chuvosa que vai de outubro a março. A temperatura média anual permanece em torno de 22°C. A reserva abriga diversas fitofisionomias do Cerrado, entre elas o cerrado *sensu stricto*, cerrado denso, campo sujo, mata de galeria e vereda. O tipo de solo predominante é o latossolo que ocupa 80% da reserva.

A fazenda Capão Comprido está localizada nas proximidades da cidade de Cristalina, Goiás; apresenta áreas cultivadas contendo plantações de eucaliptos e áreas nativas com diferentes fitofisionomias do bioma Cerrado. Foram amostrados três solos de três fitofisionomias diferentes, sendo um deles o cerrado *sensu stricto*, outro o cerrado denso e por último uma área em que havia o cultivo de eucalipto (Tabela 2).

Tabela 2: Dados referentes aos locais onde foram realizadas as coletas, constando o nome do local, a data em que a coleta foi realizada e seu georeferenciamento.

Locais de coleta	Data de coleta	Localização via satélite
RECOR	21 de maio de 2009	Não aferida
Fazenda Capão Comprido, área da Floresta Brasil	13 de dezembro de 2009	S 16° 34' 20.8"; WO 47° 44' 61.3"
Fazenda Capão Comprido, área de cerrado denso	13 de dezembro de 2009	S 16° 34' 21.3"; WO 47° 44' 48.8"
Fazenda Capão Comprido, área de plantação de Eucalipto	13 de dezembro de 2009	S 16° 36' 50.3"; WO 47° 42' 10.9"

## 4.2 Coleta de solo

Para coletar o solo, a serrapilheira foi removida e os 5 cm da camada superior do solo foram retirados com o auxílio de um trado. O material coletado foi armazenado em *Wirl pack* e mantido em gelo para o transporte ao laboratório.

As amostras foram processadas no mesmo dia de coleta. Cada amostra foi peneirada separadamente em peneiras diferentes autoclavadas com abertura de malha de 2 mm.

## 4.3 Meios de Cultura

O meio de cultura bem sucedido no cultivo de acidobactérias de latossolo existente é chamado VL. Neste trabalho, para o isolamento de acidobactéria, o pH do meio foi de 5,5, passando então a se chamar VL55. A constituição do meio sofreu um pequeno aumento na concentração de  $\text{CaCl}_2$  para facilitar o manuseio do meio. Para um litro de meio de cultura utilizou-se: ácido 2-[N-morfolino] etanosulfônico (MES) (3,9 g),  $\text{MgSO}_4$  (0,4 mM),  $\text{CaCl}_2$  (1,2 mM),  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$  (0,4 mM) solução de tungstato/selenito (2 mL), solução de vitaminas (2 mL) e solução de elementos traço (2 mL) (SAIT et al, 2002). A fonte de carbono adicionada foi a xilana de “oat spelts” (Sigma, nº de catálogo X0627) ou de bétula (Sigma, nº de catálogo X0627) a 0,05% e o agente gelificante utilizado foi o fitagel (Gelrite® gellan gum, nº de catálogo G1910), a uma concentração final de 0,8%.

Outros meios que foram utilizados no trabalho foram o R2A (REASONER; GELDREICH, 1985) e o DSMZ 269. O R2A é composto por (para volume final de um litro): extrato de levedura (0,5 g), peptona bacteriológica (0,5 g), caseína hidrolisada (0,5 g), glicose (0,5 g), amido solúvel (0,5 g), ácido pirúvico (0,3 g),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,3 g),  $\text{MgSO}_4$  (0,05 g) e ágar (12 g). Por ser um meio bem estudado, este foi adotado para comparação do meio VL55. O meio DSMZ 269 é composto por (para volume final de um litro): sulfato de amônio (2,0 g), KCl (0,1 g),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,5 g),  $\text{MgSO}_4$  (0,5 g), extrato de levedura (0,1 g) e glicose (1,0 g) (KISHIMOTO; TANO, 1987).

Este meio inicialmente foi utilizado para crescimento de *Acidobacterium capsulatum* e para avaliar o crescimento das Acidobactérias encontradas no trabalho.

#### **4.4 Avaliação das condições de cultivo para isolamento de bactérias ainda não cultivadas**

Nesta avaliação, somente o solo da RECOR foi utilizado. Esta avaliação foi um experimento piloto visando testar as melhores condições para o cultivo de colônias no meio. Foram testados então: i) três diferentes diluições de suspensão de solo em meio VL55; ii) a necessidade de cicloheximida para controlar o crescimento de fungos e; iii) a necessidade de iluminação durante a incubação das placas.

Um grama de solo peneirado foi diluído em 100 mL de água destilada e misturado por meio de um agitador magnético ou vórtex por 30 minutos. A seguir, 1 mL da mistura foi adicionada a 9 mL do meio de sais correspondente ao meio em que seriam plaqueadas (ou R2A, ou VL55). Foram realizadas diluições seriadas de 1:10 até a obtenção das diluições  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ .

De cada diluição, 200  $\mu$ L foram plaqueados nos meios de cultura contendo cicloheximida (concentração final de 0,1  $\mu$ g/mL). As placas então foram incubadas a temperaturas em torno de 23°C por, no máximo, 8 semanas. No decorrer deste período, as colônias foram contadas semana após semana e algumas colônias de cada meio de cultura foram selecionadas para sequenciamento do gene RNAr 16S. A comparação das sequências das colônias dos diferentes meios foi feita para mostrar a capacidade do meio VL55 em dar suporte ao crescimento de colônias antes não cultivadas.

#### **4.5 Comparação entre os solos da Fazenda Capão Comprido**

Depois de estabelecidas as melhores condições para cultivo, os solos da Fazenda Capão Comprido foram amostrados. Parte destas amostras foi submetida a análises físico-químicas realizadas pela SOLOQUÍMICA – Análises de Solo Ltda.

Para cultivo, um grama de cada solo foi preparado separadamente como descrito acima (mistura de um grama em 100 mL de água destilada esterilizada), sendo que o solo de cerrado *sensu stricto* foi preparado em triplicata, como experimentos independentes. As diluições foram realizadas somente até obtenção de uma concentração de  $10^{-6}$ . Desta diluição, 300  $\mu$ L foram plaqueados somente em meio VL55 contendo xilana 0,05% e cicloheximida 0,1  $\mu$ g/mL. As colônias visíveis foram contadas a cada semana para observar diferenças na quantidade de colônias crescidas em cada solo e o número de colônias de cerrado *sensu stricto* foi gerado através da média de colônias nos três tratamentos. Após o

período de 5 semanas incubadas a 23°C, as placas foram examinadas em busca de Acidobacteria.

#### 4.6 Métodos para detecção de acidobactérias

A detecção inicial da presença de Acidobacteria foi realizada extraindo-se o DNA de 1 grama de solo recolhido momento antes da preparação para o plaqueamento utilizando o Power Soil DNA isolation kit (MoBio) e em seguida, uma PCR com iniciador específico (Acd31F: 5´GAT CCT GGC TCA GAA TC - 3´ (BARNES et al, 1999) e 1492R: 5´- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T - 3´ (LANE et al, 1985)) foi realizada. Isso nos permitiu avaliar se seria possível encontrar acidobactéria em cada solo utilizado.

Após plaqueamento e crescimento das colônias, dois métodos foram utilizados para detecção de acidobactérias. A técnica de “*plate wash* – PCR” foi testada inicialmente. Placas derivadas de alguns dos solos positivos para Acidobacteria tiveram suas colônias removidas com 1 mL de solução de sais de VL55. Metade da suspensão bacteriana de cada placa teve seu DNA extraído e a outra metade foi estocada a -80°C depois da adição de glicerol, 15% da concentração final.

A metodologia utilizada nesta extração foi realizada por Wilson (1989), com modificações. Nesta técnica, a lise foi realizada utilizando lisozima (10 mg/mL), proteinase K (20 mg/mL) e SDS 10%. A extração prossegue utilizando clorofórmio álcool-isoamílico 24:1 e clorofórmio, e a precipitação de DNA foi feita em isopropanol. Este DNA foi amplificado por meio de PCR com iniciador específico para Acidobacteria e a presença destes micro-organismos nas réplicas pôde ser verificada em um gel de agarose 0,8%.

Nas réplicas que apresentaram amplificação, a amostra estocada a -80°C foi replaqueada nas mesmas condições anteriormente descritas para uma procura colônia por colônia. Neste *screening*, cada colônia teve seu DNA submetido a uma PCR com o iniciador específico em busca de acidobactérias.

Outro método para detecção utilizado foi o chamado “*colony* – PCR”. Nesta técnica, assim que detectada a presença de acidobactéria na amostra de solo, foi realizada uma busca diretamente nas colônias das placas referentes a este solo. As colônias foram transferidas diretamente para tubos de plástico contendo 20 µL de água bidestilada deionizada. Dessa diluição foi utilizada uma reação de PCR, sem a extração do DNA (“*colony* – PCR”). Colônias que apresentaram amplificação foram posteriormente submetidas a sequenciamento do gene RNAr 16S e ao isolamento em placa.

#### 4.7 Amplificação e análise do gene do RNAr 16S (domínio Bacteria e filo Acidobacteria)

O DNA extraído, ou a solução contendo colônias, foram então submetidos a PCR, utilizando o iniciador específico para o filo: Acd31F e 1492R. Cada reação com 20 µL de volume final foi realizada utilizando 10 ng de DNA e 0,2 µM de cada iniciador. Nas reações foram utilizados 1X de tampão de *Taq* polimerase, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 1U de *Taq* polimerase e 5 µg de BSA. Para realização da PCR específica, as condições foram similares às utilizadas por Barns e colaboradores (1999) sendo realizada da seguinte forma: 94°C por 2 minutos seguido por 30 ciclos com desnaturação de 94°C por 5 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos, terminando com 5 minutos de extensão final a 72°C.

Após a reação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8% para observar a presença ou ausência de bandas, mostrando a existência ou não de DNA de Acidobacteria na amostra submetida à PCR filo específica. Os produtos de PCR obtidos foram purificados e sequenciados no Centro de Genômica do DF, utilizando-se o 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem).

As sequências do gene RNAr 16S obtidas foram utilizadas para a identificação das colônias após comparação com o banco de dados RDP 10 (Ribosomal Database Project 10) (COLE, 2008) e/ou *Greengenes* (DESANTIS et al, 2006).

Para as colônias coletadas dos diferentes meios (R2A e VL55) a reação de amplificação foi feita com iniciadores universais para organismos do Domínio Bacteria. Estes iniciadores são o 27F (5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG – 3') e o 1492R (LANE et al, 1985) e foram sequenciada 600 pares de base correspondente à região inicial do gene de RNAr 16S. As concentrações dos reagentes foram as mesmas utilizadas para os iniciadores Acd31F e 1492R, mas o ciclo de PCR foi o seguinte: 95°C por 3 minutos seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 40 segundos, terminando com 7 minutos de extensão final a 72°C.

Os isolados do filo Acidobacteria foram amplificados com os iniciadores universais 27F e 1492R e seu DNA foi purificado e então sequenciado. A sequência parcialmente completa do gene RNAr 16S, contendo por volta de 1300 pares de base, foi completada utilizando os iniciadores 27F, 338F (5' – ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG – 3') (LANE et al, 1985) e 1492R. As sequências obtidas estão apresentadas no anexo I.

Na tentativa de observar possíveis contaminações com bactérias de outros filos e averiguar se seria possível distinguir os isolados de Acidobacteria entre si, foram realizadas

digestões com as enzimas AluI e HhaI dos fragmentos de PCR amplificados com os iniciadores universais 27F e 1492R. Contaminações foram identificadas quando a soma dos fragmentos da restrição foi superior a 1500 pb.

As matrizes de similaridade foram construídas utilizando-se as ferramentas do MyRDP disponíveis do RDP-X e *Greengenes* (COLE, 2008; DESANTIS et al, 2006). Em cada banco de dados foram utilizados dois sub-grupos de sequências: utilizando-se as sequências de todos os isolados disponíveis ou as sequências de espécies já descritas e caracterizadas.

As sequências mais próximas filogeneticamente encontradas no banco de dados RDP 10 foram utilizadas nessa análise e alinhadas por meio do ClustalW (THOMPSON et al, 1994) presente no programa Bioedit. Dendrogramas foram preparados com o programa MEGA5, pelo método de *Neighbor-Joining* com *bootstrap* de 1000 repetições (TAMURA et al, 2007).

#### **4.8 Cultivo e caracterização**

As acidobactérias assim que encontradas eram transferidas para novos meio de cultura VL55 sólido e com xilana. Novas transferências eram realizadas em média a cada três semanas.

O crescimento foi comparado em meio com aeração e sem aeração, em diferentes fontes de carbono, em temperaturas e pH's diferentes e foram submetidas a espectrometria de massa para análise dos perfis protéicos.

Para testar os isolados quanto a apresentarem capacidade de crescimento em ambiente com menor concentração de oxigênio, dois experimentos foram realizados. Tubos de ensaio de vidro foram preenchidos com meio de cultura padrão contendo gelatina e solidificados em inclinação de 45°. Os isolados foram inoculados com o auxílio de uma alça microbiológica gerando uma perfuração (angulação de 90° em relação à abertura do tubo de ensaio) profunda no meio, deixando inóculo por toda sua extensão. Após quatro semanas de incubação, o crescimento foi avaliado observando-se a presença de crescimento bacteriano por toda a extensão da perfuração.

Foram inoculadas 5 colônias de cada isolado, retiradas de meio sólido, em 50 mL de VL55 com xilana líquido em frascos tipo Erlenmeyers de 250 mL. Estes frascos foram mantidos sem agitação para observar o crescimento bacteriano.

Para caracterização em relação à utilização de diferentes fontes de carbono, foram preparados meios de cultura VL55 tendo a xilana sido retirada ou substituída por glicose, ou

extrato de levedura, ou carboximetil celulose (CMC), ou avicel, ou quitina. Todas as fontes de carbono foram adicionadas ao meio de cultura na mesma concentração da xilana (0,05% (m/v)). Este teste foi realizado tanto em meios sólidos quanto em meios líquidos com exceção da avicel por não ser possível a obtenção de um meio sólido homogêneo. O teste no meio sem fonte de carbono (sem xilana) foi realizado somente em meio sólido e foram feitas duas passagens de colônias para novas placas, sendo a segunda passagem realizada após três semanas de incubação.

Em meios sólidos, depois de inoculadas, as placas contendo uma única fonte de carbono foram incubadas a 25°C e observou-se o crescimento durante quatro semanas. Em meio líquido, para cada bactéria, três tubos de plástico com 5 mL de meio de cultura VL55 (com uma fonte de carbono a ser testada) foram inoculados com uma colônia retirada de uma cultura em meio sólido contendo xilana como fonte de carbono. As culturas foram incubadas a 25°C com agitação de 130 rpm. Como controle, tubos com meio de cultura sem inóculo foram submetidas às mesmas condições. Após três meses de incubação, as amostras foram submetidas à leitura de absorbância para averiguar o crescimento. Considerou-se positiva a capacidade de degradação de um determinado açúcar os isolados que apresentaram absorbância final maior que 0,05 a 540 nm.

Placas inoculadas com os isolados foram incubadas a 25 e 28°C por quatro semanas. Após este período, as placas eram observadas a procura de colônias. O crescimento das diferentes bactérias a 37°C também foi testado. Os isolados foram inoculados em tubos de plástico de 50 mL contendo 20 mL de meio VL55 líquido contendo xilana (triplicata) em agitação (120 rpm) por três semanas. Passado este tempo, a absorbância de cada tubo foi aferida para averiguar aumento da OD<sub>540</sub> e por consequência de crescimento. O mesmo teste foi feito em placas com todos os isolados contendo meio sólido padrão.

Foi realizada a curva de crescimento de um dos isolados. Esta curva foi feita testando o crescimento do isolado em três pHs diferentes durante três semanas. Os pHs testados foram 3,5, 4,5 e 6,5. O meio utilizado foi o VL55 com xilana (0,05%), (50 mL) líquido, em Erlenmeyers de 250 mL. O inóculo inicial foi padronizado para 0,02 em OD<sub>540</sub> e o crescimento foi observado através de leituras de absorbância a 540nm, a cada 24 horas até o terceiro dia e a cada 48 horas após este dia. Foram utilizados como controle três meios sem inóculo com os três pHs testados. Os frascos foram incubados a 28°C a 120 rpm. Ao final deste experimento, 50 µL de cada cultura (incluindo os controles) foram plaqueados para observar possíveis contaminações.

As colônias dos isolados obtidos foram retiradas de meio sólido e imagens foram feitas em microscópio óptico (MO) invertido Zeiss com aumento de 10.000X após teste de

coloração de gram (SEELEY et al, 1995). Os isolados também foram observados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a partir de células precipitadas de culturas líquidas em meio padrão. As imagens foram obtidas pelo professor Dr. José Antônio Correia, da Universidade de Brasília, departamento de Biologia Celular.

As colônias foram também analisadas por espectrometria de massa por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) na Embrapa CENARGEN, Brasília, DF. Três colônias crescidas em meio VL55 com xilana (0,05%) de cada isolado foram retiradas em triplicata e aplicadas diretamente sobre uma placa de MALDI do tipo Anchorchip. Após secagem à temperatura ambiente, 1  $\mu$ L de uma solução saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico foi depositada sobre cada amostra. Os espectros de massa foram adquiridos no equipamento Microflex (Bruker Daltonics) em modo linear positivo com faixa de massa de 4.000 a 20.000 Da. Foram acumulados 3000 tiros de laser para todos os espectros.

## 5 Resultados

Baseado nos resultados obtidos por Araújo (2011) em solo de cerrado, a fitofisionomia cerrado *sensu stricto* foi escolhida como principal área para o desenvolvimento do trabalho por apresentar um maior número de sequências do filo Acidobacteria.

### 5.1 Comparação do crescimento bacteriano em meio R2A e VL55

O intuito deste experimento foi observar a capacidade do meio VL55 em crescer novas acidobactérias e bactérias ainda não cultivadas a partir de amostras de solo de cerrado. O número de colônias nesse meio foi comparado ao número de colônias observadas em meio R2A no período de oito semanas.

No meio R2A (REASONER; GELDREICH, 1985) o número médio de colônias foi superior ao observado no meio VL55. A quantidade de colônias que cresceram no meio R2A na primeira semana foi similar à contabilizada na última semana (Figura 3A), mudando somente o tamanho das colônias (Figura 4A-D). Em VL55, observa-se semanalmente uma quantidade crescente de colônias, semana após semana, (Figura 3B e figura 4E-H). Apesar de 8 semanas de incubação, o crescimento da quantidade de colônias não estabilizou (Figura 3B).

Foram retiradas de cada meio colônias bacterianas para identificação utilizando a filogenia do gene do RNAr 16S. Quatro colônias foram obtidas do meio VL55 e denominadas CVL#. CVL1 apresentou um halo no meio de cultura, (Figura 5A). CVL2 apresentou colônias irregulares e uma coloração variável quando observada contra a luz. CVL3 foi isolado por apresentar um crescimento microaerofílico. As colônias encontravam-se dentro do meio de cultura e não na superfície como era esperado, e possuíam uma cor amarela (Figura 5B). Do meio R2A foram retiradas três colônias e denominadas CR#.

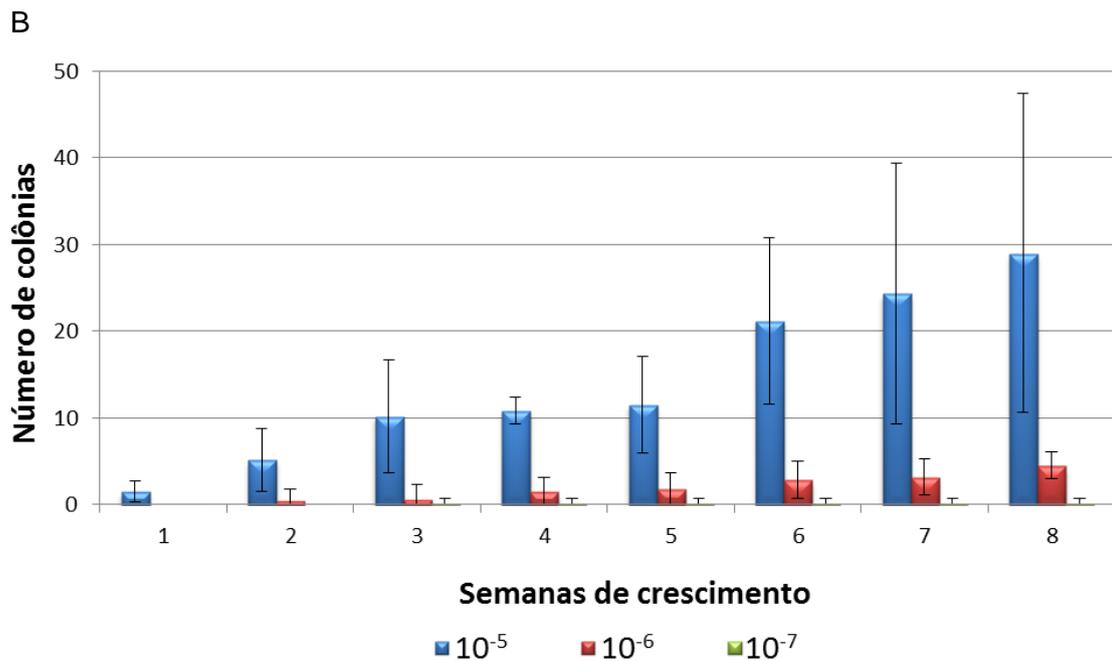
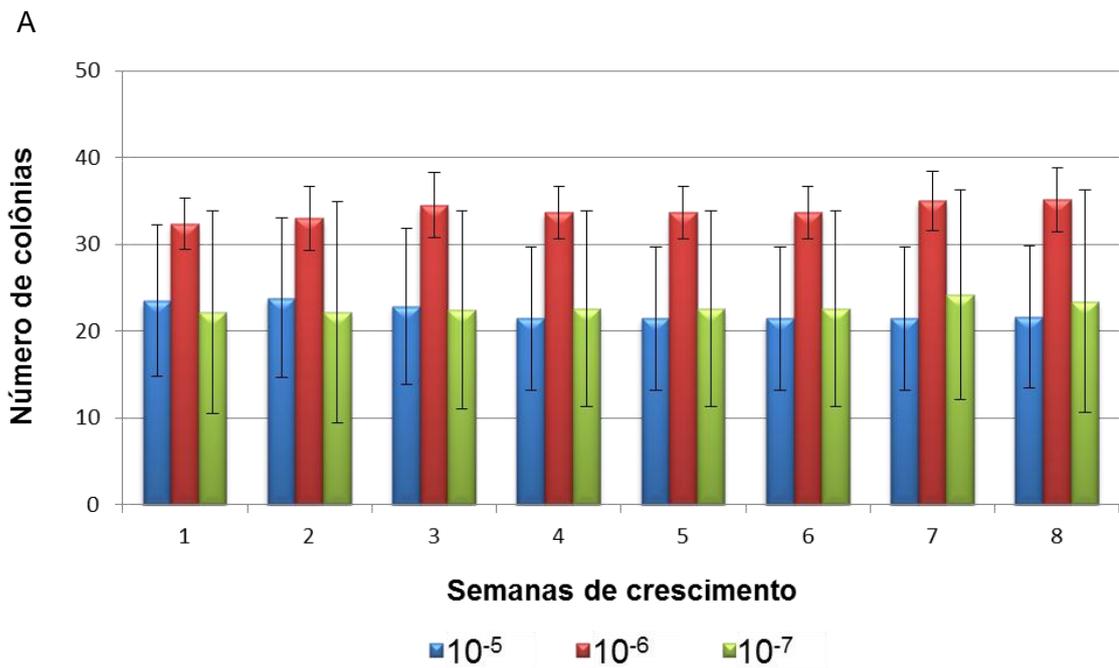


Figura 3: Número de colônias observadas a cada semana nos meios testados. R2A (A) e VL55 (B) em diferentes diluições. As barras de erro são referentes ao desvio padrão.

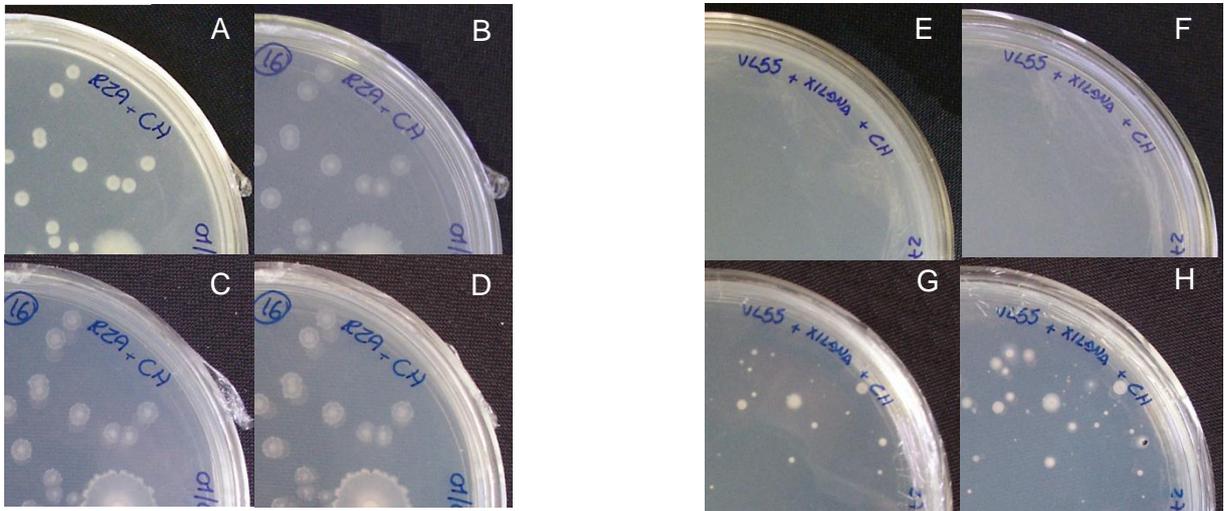


Figura 4: Surgimento sequencial de colônias em placas com diluições de 10<sup>-5</sup> nos meios testados. R2A (A, B, C e D) e VL55 (E, F, G e H). As figuras A e E foram registradas na primeira semana de incubação, as B e F na terceira semana, a C e G na sexta semana e a D e H na oitava semana.

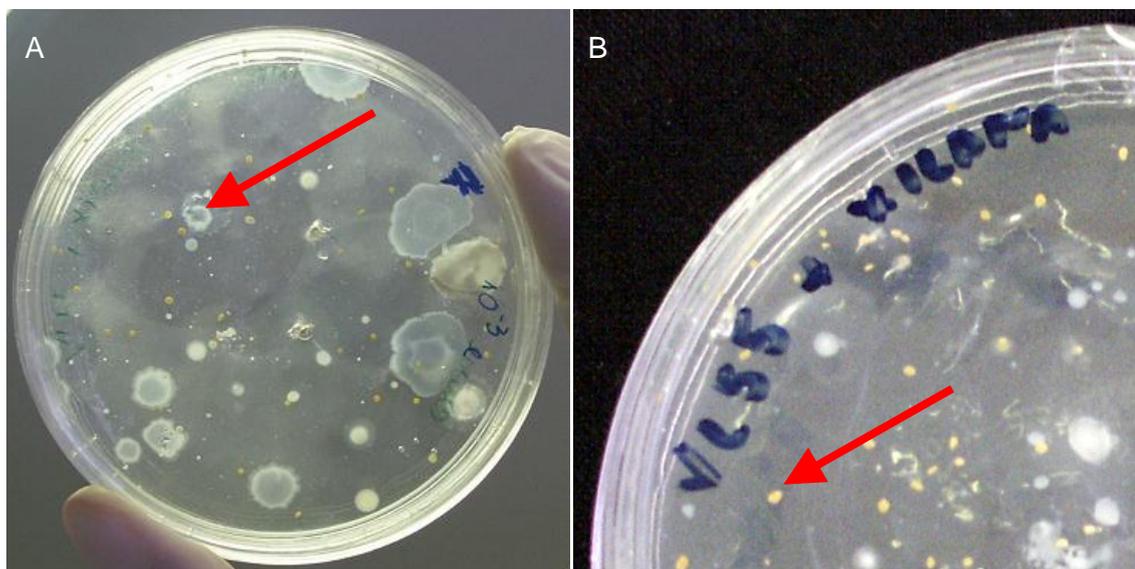


Figura 5: Colônias selecionadas para isolamento durante experimento piloto realizado utilizando o solo da RECOR. A: A seta indica a colônia CVL1. B: Colônia CVL3 com coloração amarela indicada pela seta.

## 5.2 Avaliação das condições de cultivo em meio VL55

O objetivo deste experimento foi padronizar as condições de cultivo quanto à melhor diluição a ser utilizada, necessidade do uso de cicloheximida e relevância da incubação com iluminação, uma vez que esses detalhes não estão explicitados na literatura. Nesta padronização, foi necessária a identificação das bactérias que cresceram nas placas, para averiguar a capacidade do meio de permitir o crescimento de espécies com baixa identidade na sequência do gene do RNAr 16S com as conhecidas.

Dentre as três diluições empregadas, a de  $10^{-5}$  apresentou em média 30 colônias por placa enquanto a diluição  $10^{-6}$  apresentou uma pequena quantidade de colônias, não demonstrando ao final do experimento uma quantidade suficiente de colônias. A diluição  $10^{-7}$  apresentou duas colônias no máximo em uma mesma placa, sendo que em outras nenhum crescimento bacteriano foi observado (Figura 3)

As placas sem cicloheximida apresentaram um número maior de fungos em menor tempo quando comparadas com as placas contendo o antifúngico impossibilitando a contagem de células bacterianas.

No período de oito semanas, o meio de cultura apresentou ressecamento, especialmente nas placas expostas à luminosidade, onde o ressecamento prejudicou o aparecimento de novas colônias.

A região 5' do gene RNAr 16S das colônias retiradas de cada um dos meios (CVL1, CVL2, CVL3, CR1, CR2 e CR3) foi sequenciada (377 bp) e comparadas com banco de dados. Todas as colônias retiradas do meio VL55 pertencem ao filo Proteobacteria (Figura 6 e Tabela 3). A colônia CVL1 (Figura 5A) apresentou identidade, de 90,2% com uma espécie do gênero *Leptothrix*. A colônia CVL3 (Figura 5B) apresentou uma maior identidade (91,5%) com espécies de *Sphingomonas*. A colônia CVL2 apresentou 98,0% de identidade com *Burkholderia cepacia*. As sequências das colônias retiradas de R2A apresentaram 100% de identidade entre elas e 100% de identidade com espécies de *Bacillus* d, membro do filo Firmicutes (Figura 6 e Tabela 3).

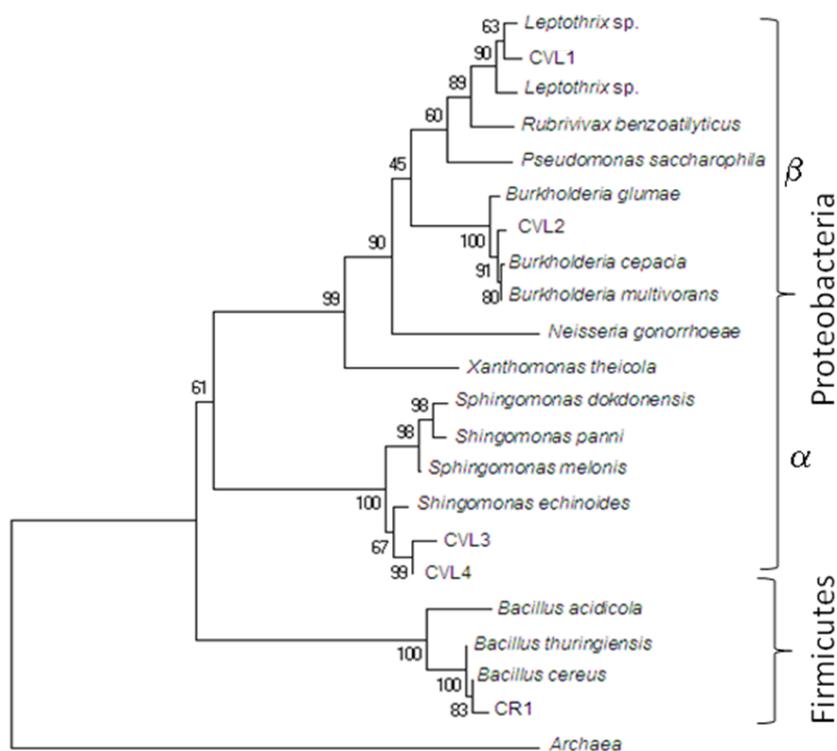


Figura 6: Dendrograma mostrando o parentesco entre as colônias obtidas no experimento e sequências obtidas em banco de dados. CVL# são colônias crescidas em meio VL55 e CR# retirada do meio R2A. Dendrograma obtido pelo método de *Neighbor Joining*. Os valores dos clados são referentes ao *bootstrap* com 1000 repetições.

Tabela 3: Colônias selecionadas em meios de cultura VL (CVL) e R2A (CR), suas características principais, a quantidade de pares de base sequenciados e a identidade das sequências comparadas ao banco de dados RDP.

Bactéria	Característica das colônias	Número de bases sequenciadas	Identidade em nível de família	Identidade com isolados
CVL1	Branca com halo	498	<i>Burkholderiales</i>	90,2% <i>Leptothrix</i> sp.
CVL2	Irregular com cor variável quando observada contra luz	484	<i>Burkholderiales</i>	98,0% <i>Burkholderia cepacia</i>
CVL3	Amarela crescendo dentro do meio	465	<i>Sphingomonadales</i>	91,5% <i>Sphingomonas echinoides</i>
CVL4	Amarela crescendo dentro do meio	453	<i>Sphingomonadales</i>	91,5% <i>Sphingomonas echinoides</i>
CR1	Branca redonda com borda opaca e irregular	459	<i>Bacillaceae</i>	100% <i>Bacillus</i> d

### 5.3 Comparação entre os solos da Fazenda Capão Comprido

Após os resultados do experimento piloto utilizando o solo da RECOR, foi iniciado o experimento para o isolamento utilizando o solo da Fazenda Capão Comprido. Três áreas foram amostradas e caracterizadas de acordo com suas características físico-químicas.

A área de cerrado *sensu stricto* (Floresta Brasil) continha uma pequena quantidade de serrapilheira sobre o solo facilitando a coleta de material. A área de campo sujo não continha serrapilheira e apresentou muitas pedras no solo, o que dificultou sua extração. A terceira área é uma plantação de eucaliptos e o solo continha pouca quantidade de serrapilheira e poucas pedras.

A análise das propriedades físico-químicas do solo (Tabela 4) mostra que o pH dos solos das três localidades do Cerrado estudadas é ácido e varia entre 4,8 e 5,2. Nos três solos a porcentagem granulométrica de areia é maior do que argila e silte e a quantidade de carbono orgânico é similar e considerado adequado no cerrado denso e floresta de eucalipto, e alto na Floresta Brasil. Também foi observado que a concentração de fósforo, cálcio e magnésio é cinco vezes maior na área da floresta de eucalipto do que as outras duas áreas estudadas. A quantidade de potássio das áreas de cerrado denso e de floresta de eucalipto é semelhante enquanto que o solo da Floresta Brasil apresenta menor quantidade deste composto. O alumínio foi encontrado em maior quantidade no solo de Floresta Brasil, totalizando cerca de duas vezes mais deste metal em relação à floresta de eucalipto. Entre os micronutrientes, o ferro está em alta quantidade em todos os solos, especialmente no da Floresta Brasil, tendo, o cerrado denso, pouco mais da metade da quantidade de ferro encontrada na Floresta Brasil.

Tabela 4: Propriedades físico-químicas das amostras de solo coletadas na fazenda Capão Comprido realizadas pela SOLOQUÍMICA - Análises de Solo Ltda.

Parâmetro	Floresta Brasil (Cerrado <i>sensu stricto</i> )	Cerrado denso	Floresta de eucalipto
pH em água	4,8	5,1	5,2
Argila (%)	40,0	32,5	37,5
Areia (%)	47,5	50,0	40,0
Silte (%)	12,5	17,5	22,5
Carbono orgânico (g/kg)	29,4	22	24,2
Fósforo (ppm)	1,1	1,1	5,1
Potássio (cmol/dm <sup>3</sup> )	0,17	0,23	0,25
Cálcio (cmol/dm <sup>3</sup> )	0,2	0,2	0,9
Magnésio (cmol/dm <sup>3</sup> )	0,1	0,1	0,5
Sódio (cmol/dm <sup>3</sup> )	0,01	0,02	0,03
Alumínio (cmol/dm <sup>3</sup> )	2,6	1,5	0,9
Boro (ppm)	0,18	0,06	0,69
Cobre (ppm)	1,17	0,66	1,57
Ferro (ppm)	151	78,8	92,9
Manganês (ppm)	8,4	19,3	21,7
Zinco (ppm)	0,38	0,24	0,76
Enxofre (ppm)	4,2	1,8	3,4

Todas as amostras de solo tiveram o DNA metagenômico extraído e amplificado com iniciadores universais (27F e 1492R) e específicos para acidobactérias (Acd31F e 1492R) (Figura 7). A amostra de DNA extraído de rúmen de caprino foi utilizada como controle negativo para o iniciador de Acidobacteria, pois um estudo anterior mostrou não haver Acidobacteria nesta amostra. Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de solo de cerrado, o mesmo utilizado nos estudos de diversidade utilizando o gene do RNAr 16S por Araújo (2011).

O resultado mostra a presença de Acidobacteria em todos os solos. Como não foi observada amplificação na amostra de rúmen, a possibilidade de amplificação inespecífica dos iniciadores Acd31F e 1492R foi descartada.

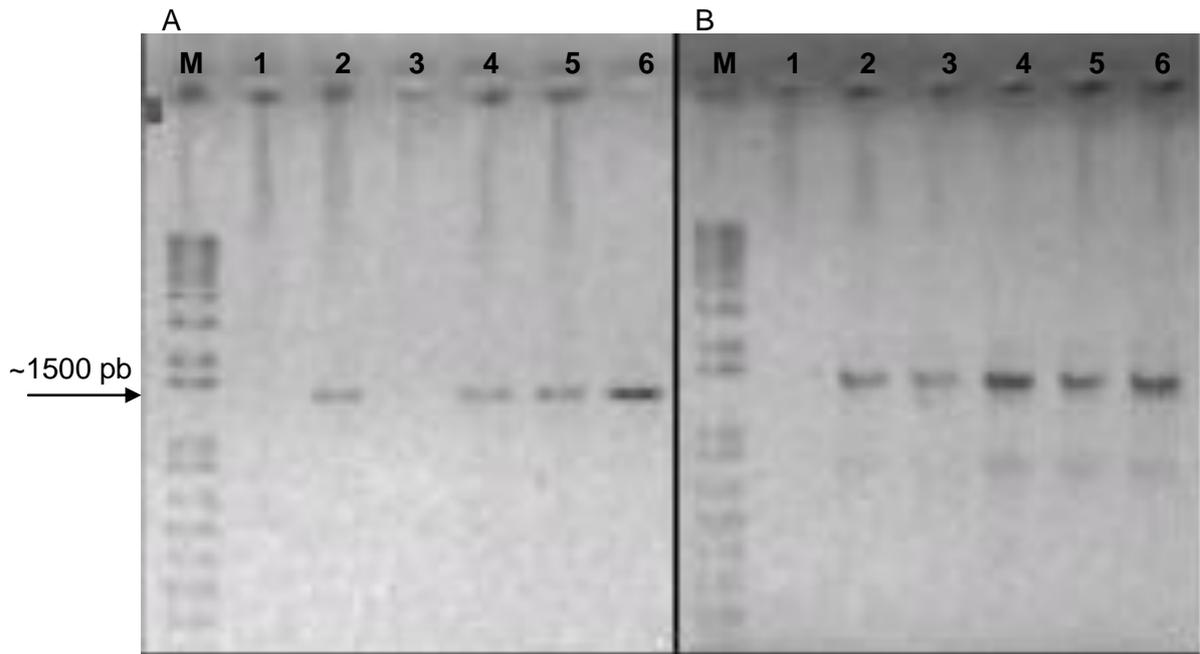


Figura 7: Amplificação de diferentes amostras utilizando os iniciadores específicos para Acidobacteria em comparação com as mesmas amostras utilizando os iniciadores universais. (A) Iniciadores específicos para Acidobacteria: Acd 31F/1492R (B) Iniciadores universais: 27F/1492R. A seta indica o fragmento de aproximadamente 1500 bp. Amostras: M - *Ladder 1kb plus*; 1 – controle sem DNA; 2 – controle positivo (solo de cerrado); 3 – controle negativo (DNA de rúmen); 4 – solo de eucaliptos; 5 – solo de cerrado denso; 6 – solo de cerrado *sensu stricto*.

Os diferentes solos, cerrado *sensu stricto*, cerrado denso e floresta de eucalipto, foram inoculados em diluições de  $10^{-6}$  e comparados quanto ao número de colônias obtidas (Figura 8). Foram produzidas um total de 54 placas, sendo 33 de cerrado *sensu stricto*, 11 de cerrado denso e 10 de floresta de eucalipto.

O solo com o maior número de colônias foi o da floresta de eucalipto, apresentando uma média de 208 colônias por placa, seguido pelo solo de cerrado denso (122 colônias) e cerrado *sensu stricto* (média de 91 colônias nos três tratamentos).

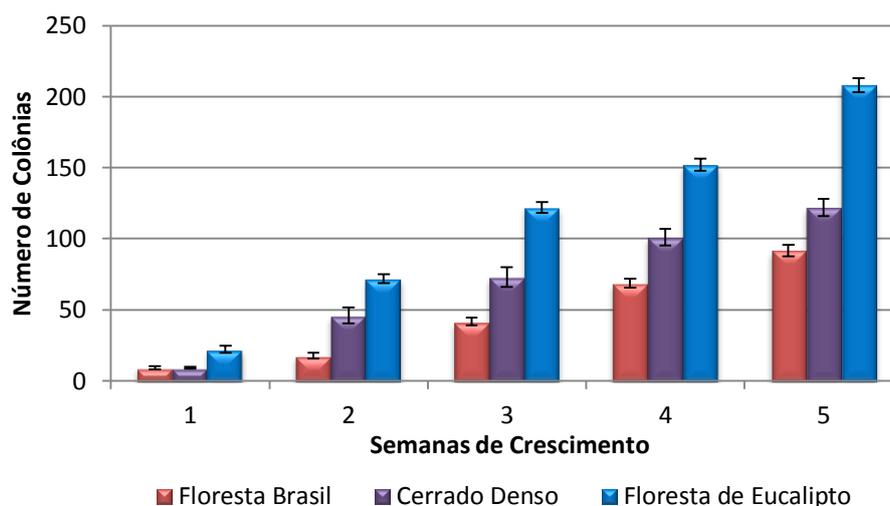


Figura 8: Número de colônias observadas em placa a cada semana, a partir das amostras dos diferentes solos. As barras azul, vermelha e verde mostram a quantidade de colônias de cada tratamento de solo de cerrado *sensu stricto*. As barras de erro são referentes ao desvio padrão.

#### 5.4 Técnicas de detecção de Acidobacteria: “*plate wash – PCR*” e “*colony – PCR*”

Dois técnicas para detecção específica de Acidobacteria foram testadas para averiguar qual delas seria a mais adequada a este trabalho. A técnica de “*plate wash – PCR*” consiste em suspender as colônias por meio de uma lavagem na placa, sendo que metade do material foi utilizada para extração de DNA e a outra metade para re-inóculo. Das 55 placas existentes, 24 foram lavadas e tiveram sua suspensão bacteriana estocada. Dessas 24, 19 tiveram seu DNA extraído com sucesso, sendo 11 placas da Floresta Brasil, 6 da floresta de eucalipto e duas de cerrado denso. Depois de submetidas à PCR com iniciador específico, 7 placas da Floresta Brasil e uma do cerrado denso apresentaram amplificação (Figura 9).

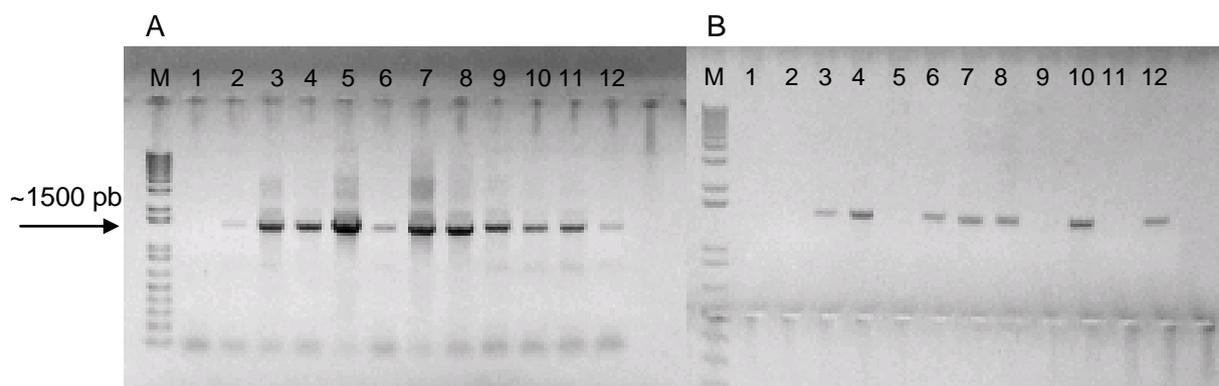


Figura 9: Amplificação do gene do RNAr 16S a partir de DNA obtido de amostras ambientais e de placas pelo método de *plate wash*. A - amplificação com os iniciadores universais M: 1kb ladder; 1: controle negativo (sem DNA); 2: *plate wash* placa 3A; 3: *plate wash* placa 3B; 4: *plate wash* placa 3C; 5: *plate wash* placa 3D; 6: *plate wash* placa 3E; 7: *plate wash* placa 3F; 8: *plate wash* placa 3G; 9: *plate wash* placa 3H; 10: *plate wash* placa 3I; 11: *plate wash* placa 3J; 12: *plate wash* placa 3K. B - Amplificação com os iniciadores específicos Acd 31F/1492R. M: 1kb ladder; 1: controle negativo (sem DNA); 2: *plate wash* placa 3A; 3: *plate wash* placa 3B; 4: *plate wash* placa 3C; 5: *plate wash* placa 3D; 6: *plate wash* placa 3E; 7: *plate wash* placa 3F; 8: *plate wash* placa 3G; 9: *plate wash* placa 3H; 10: *plate wash* placa 3I; 11: *plate wash* placa 3J; 12: *plate wash* placa 3K.

Destas 8 placas com amplificação positiva com iniciadores específicos para o filo Acidobacteria, apenas uma foi replaqueada e o rápido crescimento de fungos impossibilitou o isolamento de colônias bacterianas.

Após o resultado positivo de que Acidobacteria estão presentes nas condições utilizadas de cultivo e pela dificuldade de obter colônias isoladas pelo "*plate wash*", para as placas de solo de cerrado *sensu stricto*, foi utilizada a abordagem de amplificação por PCR diretamente da colônia utilizando-se os iniciadores Acd31F e 1492R.

Foram analisadas 159 das 275 colônias pela técnica de "*colony – PCR*" e ao final de 5 semanas de incubação em placas de cerrado *sensu stricto* foram submetidas a esta técnica e 19 (12%) apresentaram amplificação do fragmento (Figura 10). Essas colônias de acidobactéria foram denominadas AcidoBr# ("#" indica número dado à colônia no processo de detecção) ou de modo simplificado, "AB#". Após sucessivas passagens das culturas, apenas cinco foram isoladas com sucesso em cultura pura (AB20, AB23, AB39, AB60 e AB158) e uma apresenta contaminante (AB4).

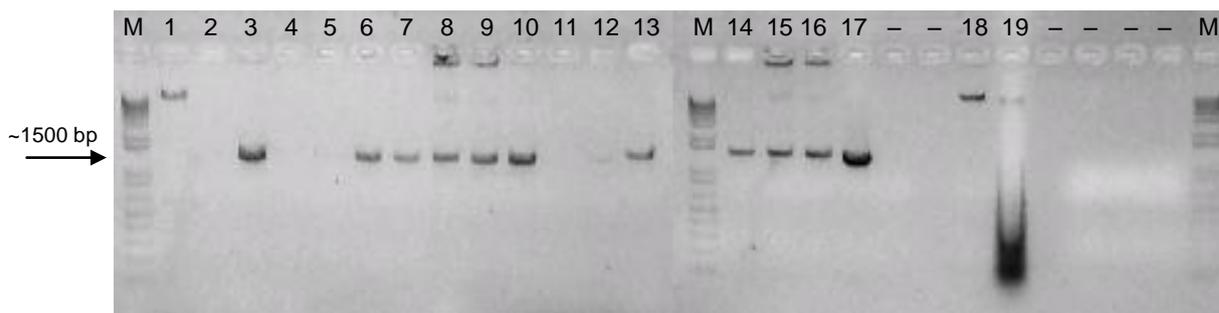


Figura 10: Amplificação do gene do RNAr 16S com iniciadores específicos para o filo Acidobacteria a partir de DNA obtido de amostras ambientais e de colônias pelo método "colony – PCR". M: *ladder* 1kb *plus*; 1: DNA  $\lambda$  100 ng; 2: controle negativo (sem DNA); 3: colônia 4; 4: colônia 5; 5: colônia 10; 6: colônia 11; 7: colônia 12; 8: colônia 20; 9: colônia 23; 10: colônia 4; 11: colônia 5; 12: colônia 10; 13: colônia 11; 14: colônia 12; 15: colônia 20; 16: colônia 23; 17: controle positivo (DNA de solo de cerrado); 18 e 19: controle negativo (CV1). Os traços (–) são referentes a posições sem aplicação de material.

## 5.5 Análise das sequências de DNA dos isolados de Acidobacteria do solo de cerrado *sensu stricto*

Foram realizados os sequenciamentos do gene do RNAr 16S pertencentes a cinco colônias positivas (anexo I). Uma comparação entre as sequências dos isolados aqui obtidos e entre a espécie tipo do filo (*A. capsulatum*) mostrou que a similaridade entre elas variou de 93,6% (AB39 e AB60) a 98,1% (AB20 e AB23) (Tabela 5). O isolado AB39 apresentou a menor similaridade com os demais isolados enquanto que os isolados AB20 e AB23 são os mais próximos entre todos os demais.

Tabela 5: Similaridade entre as sequências do gene RNAr 16S dos isolados obtidos.

	AB23	AB39	AB60	AB158
AB20	98,1	94,1	97,6	96,8
AB23		93,7	96,9	96,3
AB39			93,6	94,2
AB60				97,4

A comparação dessas sequências com os bancos de dados RDP-X e *Greengenes* mostra que todas pertencem ao subgrupo1, ou GP1 (Figura 11). Segundo dados do RDP-X, o isolado AB20 apresenta 99,6% de identidade com o isolado *bacterium* Ellin5237, o isolado AB23 99,6% de identidade com o isolado *bacterium* Ellin5017, o AB39 apresenta 98,6% e

98,4% de identidade com *E aggregans* e *Acidobacteriaceae bacterium* Gsoil149, respectivamente, o AB60 apresenta 97,5% de identidade com o isolado *bacterium* Ellin5237 e o AB158 apresenta 98,3% de identidade com o isolado *bacterium* Ellin5058 (e 96% de identidade com *A. capsulatum*). No *Greengenes*, o isolado Ellin 5222 foi o isolado mais próximo de todos os isolados e a espécie descrita mais próxima coincidiu com o resultado do RDP-X, sendo que as porcentagens mostradas foram em sua maioria menores que as encontradas pelo RDP-X (Tabela 6).

Tabela 6: Valores de similaridade (%) fornecido pelo RDP-X e % de identidade fornecido pelo *greengenes* utilizando Blast comparando os isolados obtidos com sequências do banco de dados.

Isolado	% similarity score	Isolado/espécie descrita mais próxima
<b>AB20</b>	99,6	<i>Bacterium</i> Ellin5237 (AY234588) <sup>a</sup>
	94,7	<i>Acidobacterium capsulatum</i> (T); ATCC 51196 (CP001472) <sup>b</sup>
	97,1	Soil isolate Ellin5222 (AY234573.1) <sup>c</sup>
	94,8	<i>Acidobacterium capsulatum</i> str. ATCC 51196 (CP001472.1) <sup>d</sup>
<b>AB23</b>	99,6	<i>Bacterium</i> Ellin 5017 (AY23443) <sup>a</sup>
	94,2	<i>Acidobacterium capsulatum</i> (T); ATCC 51196 (CP001472) <sup>b</sup>
	95,7	Soil isolate Ellin5222 (AY234573.1) <sup>c</sup>
	94,2	<i>Acidobacterium capsulatum</i> str. ATCC 51196 (CP001472.1) <sup>d</sup>
<b>AB39</b>	98,4	<i>Acidobacteriaceae bacterium</i> Gsoil 149 (AB245339) <sup>a</sup>
	98,6	<i>Edaphobacter aggregans</i> (T); Wbg-1 (DQ528761) <sup>b</sup>
	93,1	Soil isolate Ellin5222 (AY234573.1) <sup>c</sup>
	98,3	<i>Edaphobacter modestus</i> str. Wbg-1 (DQ528761.1) <sup>d</sup>
<b>AB60</b>	97,5	<i>Bacterium</i> Ellin5237 (AY234588) <sup>a</sup>
	94,8	<i>Acidobacterium capsulatum</i> (T); ATCC 51196 (CP001472) <sup>b</sup>
	96,6	Soil isolate Ellin5222 (AY234573.1) <sup>c</sup>
	94,9	<i>Acidobacterium capsulatum</i> str. ATCC 51196 (CP001472.1) <sup>d</sup>
<b>AB158</b>	98,3	<i>Bacterium</i> Ellin5058 (AY234475) <sup>a</sup>
	96,0	<i>Acidobacterium capsulatum</i> (T); ATCC 51196 (CP001472) <sup>b</sup>
	95,9	Soil isolate Ellin5222 (AY234573.1) <sup>c</sup>
	95,9	<i>Acidobacterium capsulatum</i> str. ATCC 51196 (CP001472.1) <sup>d</sup>

a) e b) Sequências mais próximas encontradas pelo RDP-X; a) Sequência de isolado mais próximo; b) Sequência de espécie descrita. c) e d) Sequências mais próximas encontradas pelo *Greengenes*: c) Sequência de isolado mais próximo; d) Sequência de espécie descrita.

O dendrograma presente na figura 11 mostra o isolado AB39 em um ramo contendo os gêneros *Edaphobacter*, *Terriglobus*, *Granulicella* e *Bryocella* enquanto que os isolados AB20, AB23 AB60 e AB158 ficaram no mesmo ramo da *A. capsulatum* e *Telmatobacter*

*bradus*. A espécie *A. capsulatum* permaneceu mais externa ao grupamento dos isolados enquanto que *Telmatobacter bradus* está como táxon irmão ao isolado AB60 e mais próxima ao isolado 5222, que segundo o *Greengenes* é o isolado mais parecido com todos os isolados.

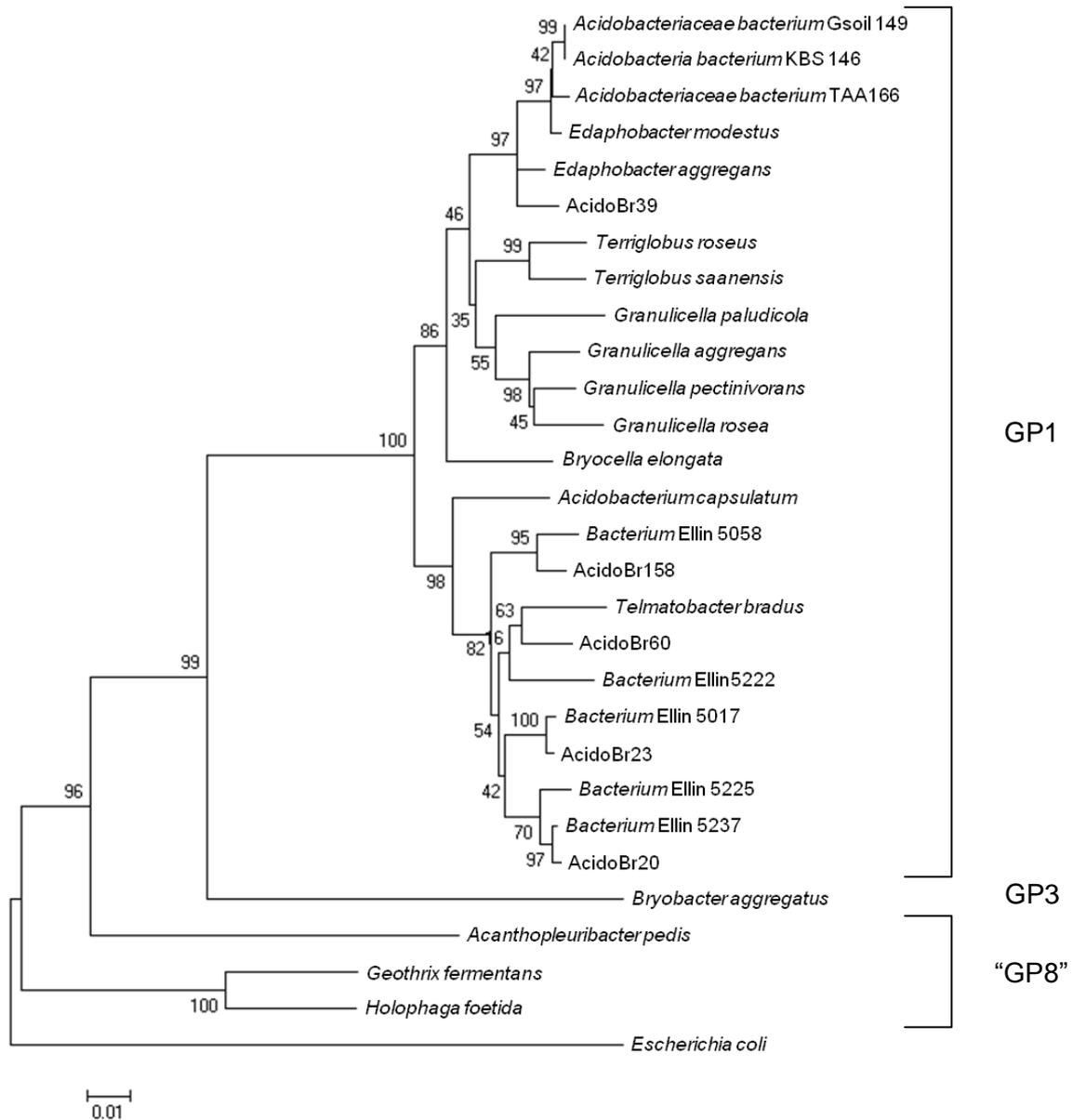


Figura 11: Dendrograma mostrando o parentesco entre as sequências das colônias isoladas obtidas por *colony* – PCR (AcidoBr) com as de isolados obtidos no banco de dados (RDP). O dendrograma foi obtido pelo método *Neighbor-Joining* com *bootstrap* de 1000 repetições.

Como o tempo de incubação destas bactérias é longo, organismos contaminantes são eventualmente encontrados. Para a identificação rápida dos isolados foi utilizado o padrão de restrição do gene do RNAr 16S com as enzimas AluI e HhaI.

Nas digestões com enzimas de restrição, foi possível observar diferenças de fragmentos de digestão entre os isolados. Nenhuma diferença de fragmentos foi observada entre os isolados com a digestão utilizando a enzima HhaI. Observa-se que, quando digeridas com AluI, os isolados AB20, AB23 e AB60 apresentam padrão de bandas diferente dos isolados AB39 e AB158 (Figura 12).

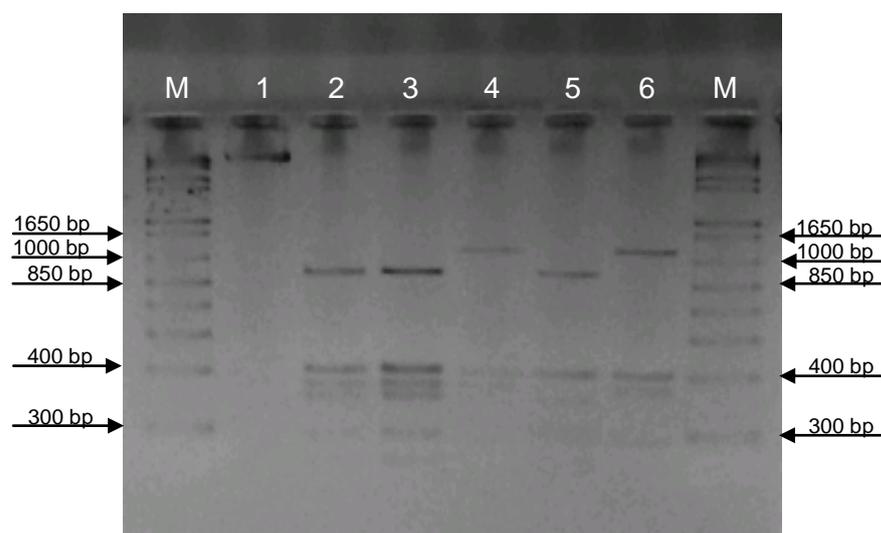


Figura 12: Digestão com a enzima de restrição AluI do gene RNAr 16S dos isolados de Acidobacteria. M: *ladder 1kb plus*; 1: DNA  $\lambda$  100 ng; 2: AB20; 3: AB23; 4: AB39 ; 5: AB60; 6: AB158;

## 5.6 Cultivo e caracterização das acidobactérias encontradas

Após observar a baixa identidade das sequências dos cinco isolados ainda não descritos com as sequências de espécies descritas na literatura, testes foram realizados para confirmar que estas bactérias não foram descritas, observando semelhanças e diferenças fenotípicas entre os isolados e entre as espécies já descritas. Os testes realizados averiguaram a necessidade de aeração, fontes de carbono utilizáveis, crescimento em diferentes temperaturas, crescimento em diferentes pH's, microscopia e análise dos perfis protéicos (Tabela 7 e Figura 17)

Em meio VL55 contendo xilana como única fonte de carbono, os isolados AB20, AB23 e AB60 apresentam, após 4 semanas de incubação a 25°C, colônias com diâmetro máximo de 0,2, 0,15 e 0,15 mm respectivamente, brancas no início do crescimento e

rosadas após três semanas de incubação. Os isolados AB39 e o AB158 apresentam colônias brancas, com diâmetro máximo de 0,4 e 0,2 mm respectivamente, e apresentam-se aderidas ao meio sólido, sendo difícil sua retirada. A aderência ao meio sólido por parte do AB39 é tão alta que sempre um fragmento do meio é retirado junto com a colônia.

Em relação ao tempo de crescimento, no início do isolamento, os isolados formam colônias isoladas por volta de quatro semanas de incubação. Os isolados AB20, AB23, AB39 e AB60 formam colônias isoladas após duas semanas e o isolado AB158 ainda apresenta crescimento lento, levando por volta de quatro semanas para colônias isoladas crescerem em placa.

No teste que avaliou a necessidade de aeração, realizado com um inóculo profundo em meio sólido em tubo de ensaio, todos os isolados testados apresentaram crescimento por toda a extensão do inóculo (Figura 13), sugerindo que estes isolados são aeróbios, aerotolerantes ou anaeróbios facultativos. Os isolados AB20, AB23 e AB60 apresentaram duas colorações na extensão do inóculo, sendo uma cor rosa na região superior e uma cor branca na região mais profunda. O isolado AB158 não foi testado neste experimento.

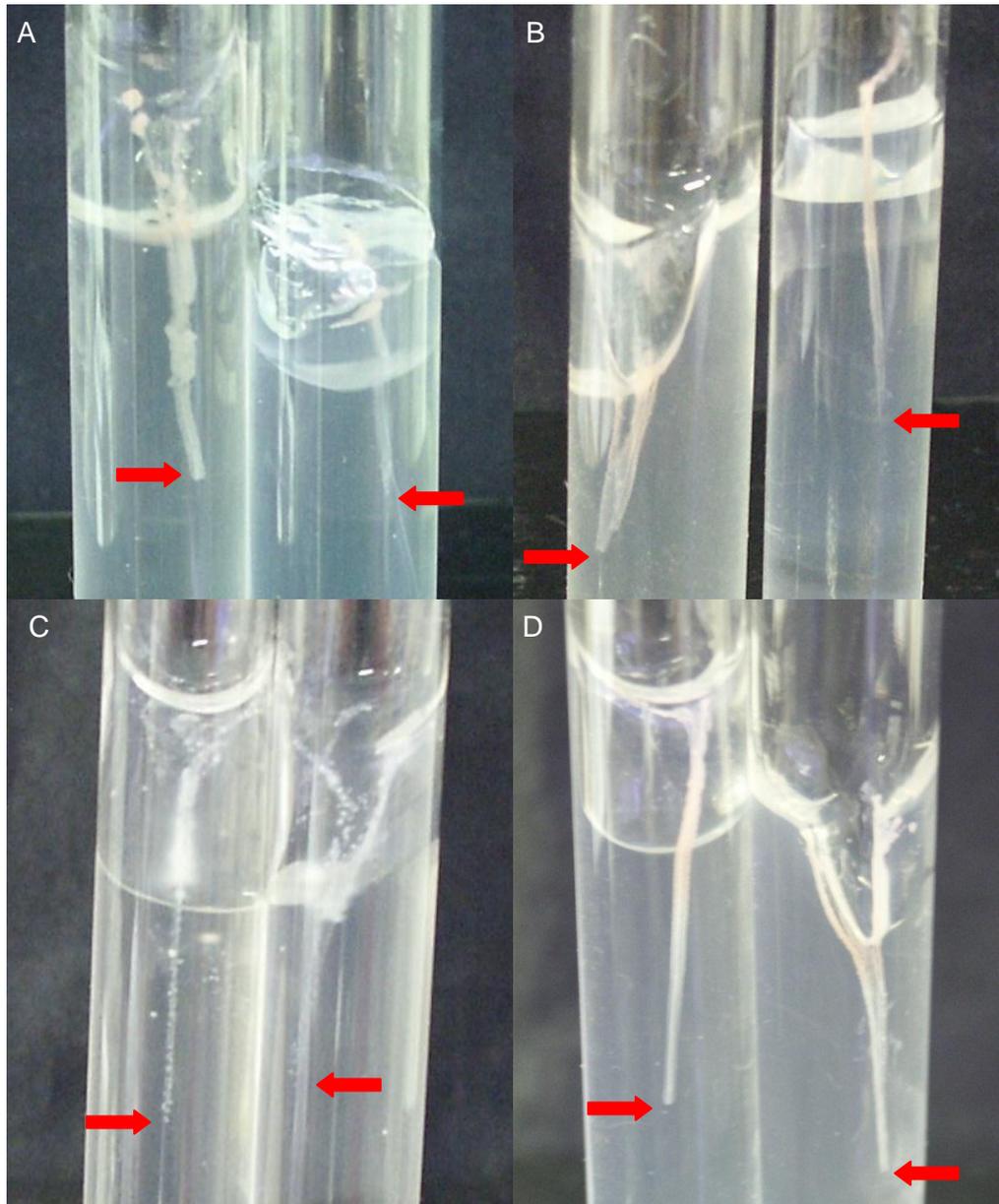


Figura 13: Crescimento em profundidade dos isolados obtidos em meio semi-sólido. (A) AB20, (B) AB23, (C) AB39 e (D) AB60 inoculados por perfuração com alça microbiológica em meio de cultura semi-sólido para teste de necessidade de aeração. As setas indicam a região mais profunda do inóculo.

Todos os isolados cresceram no experimento em meio líquido sem agitação. Embora não tenha sido aferida a absorvância das culturas, o crescimento foi similar ao que ocorre em frascos sob agitação. Nestas culturas foi observada a formação de biofilme em quatro isolados: AB23, AB60, AB39 e AB158. Os biofilmes dos isolados AB23 e AB60 aparentavam uma película delgada, de fácil desagregação, enquanto que o biofilme de AB39 e AB158

formou grânulos de difícil desagregação formando flocos. No isolados AB20 não foi observado biofilme.

No teste que investigou a utilização de diferentes fontes de carbono, em meio sólido, foi observado crescimento de todos os isolados em todas as fontes de carbono testadas. No teste sem xilana (sem fonte de carbono), na primeira passagem, colônias tornaram-se visíveis, embora menores quando comparadas ao meio com xilana, no tempo normal de incubação, mas na segunda passagem, nenhuma colônia foi observada. Em meio líquido, todos são capazes de usar xilana, glicose e extrato de levedura como fonte de carbono. Em CMC, avicel e quitina, nenhum dos isolados apresentou crescimento.

Todos os isolados crescem nas temperaturas 25 e 28°C, não sendo observada diferença no crescimento entre os isolados incubados a estas temperaturas. No teste de temperatura a 37°C, em meio líquido, somente os isolados AB20, AB23 e AB60 foram testados, já que as colônias dos isolados AB39 e AB158 formam flocos e não seria possível aferir suas absorvâncias. Observando a curva mostrada na Figura 14, entre os isolados testados, apenas o AB23 apresentou valores de absorvância em OD<sub>540</sub> que ultrapassaram 0,05, indicando que este é capaz de crescer a esta temperatura, atingindo sua maior absorvância depois de duas semanas de incubação. Em placa, após duas semanas de incubação, nenhum crescimento foi observado em nenhuma das triplicadas de cada isolado.

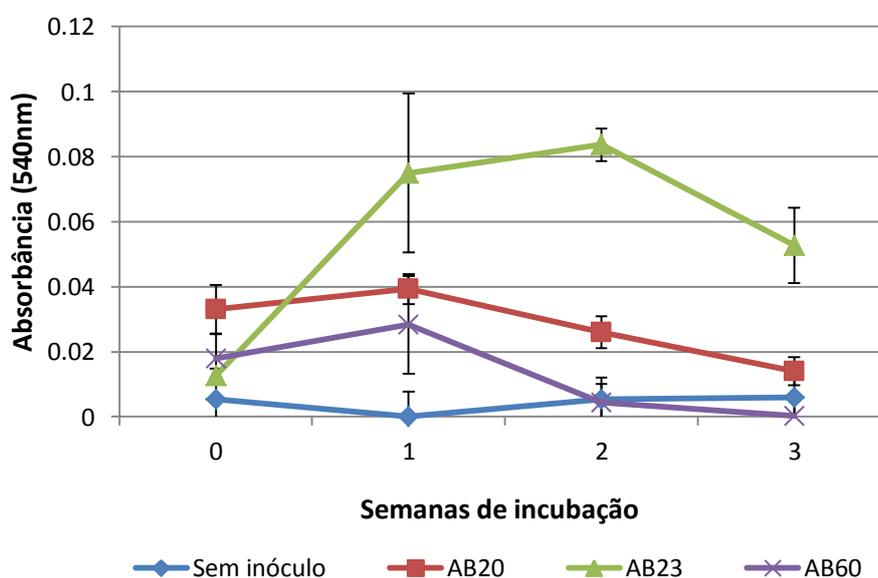


Figura 14: Curva de crescimento dos isolados AB20, AB23 e AB60 incubados por três semanas em VL55 com xilana líquido a 37°C. As barras de erro são referentes ao desvio padrão.

No teste de pH, somente o isolado AB60 foi estudado já que este apresentou maior densidade ótica de crescimento. Analisando as curvas de crescimento com diferentes pH's (Figura 15), observa-se que ele é capaz de crescer nos pH's 4,5 e 5,5. No pH 6,5, um pequeno aumento de absorbância foi observado do segundo para o terceiro dia, se manteve no quinto dia de aferição, mas caiu no sétimo dia, mostrando o não crescimento do isolado AB60 no pH 6,5.

Quanto à curva de crescimento do AB60 (pH 5,5, em vermelho na Figura 15) a fase *lag* dura até o segundo dia de incubação e a fase estacionária por volta do sétimo. Os valores de desvio padrão também foram calculados.

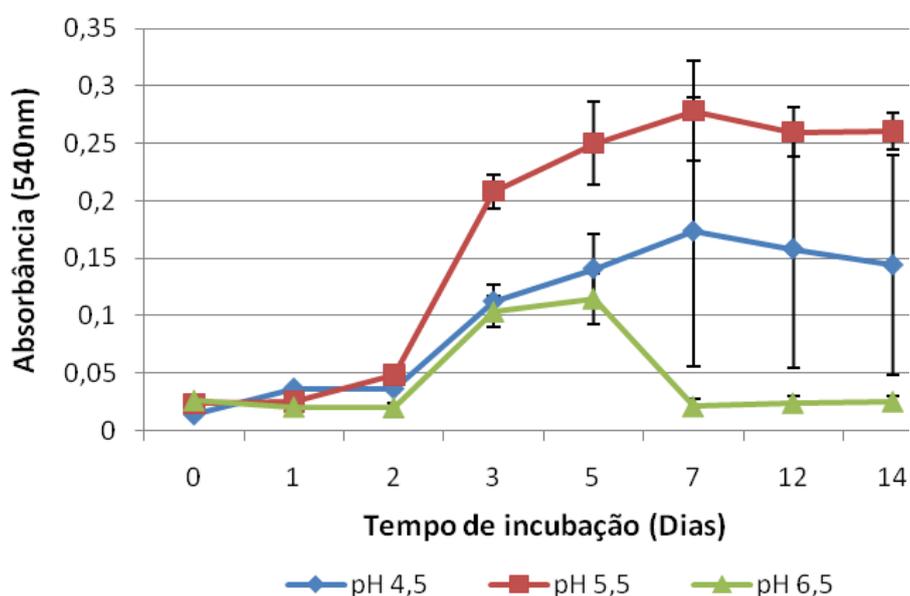


Figura 15: Curvas de crescimento do isolado AcidoBr60 em diferentes pHs. pH's 4.5 (azul), 5.5 (vermelho) e 6.5 (verde). Os valores de desvio padrão de cada valor estão representados pelas barras ligadas a cada ponto da curva.

Todos os isolados observados são Gram-negativos, entretanto apresentaram diferenças morfológicas. O isolado AB23 (Figura 16A e Figura 17A) apresenta células de tamanho aproximado de 1,2  $\mu\text{m}$  (Figura 17A). O isolado AB 39 (Figura 17B) apresenta células em forma de bacilos, com comprimento em torno de 1,5  $\mu\text{m}$ . O isolado AB60 (Figura 16B e Figura 17C) apresenta colônias menores que 1  $\mu\text{m}$  com formato de bacilo e, em microscopia óptica, aparentemente formam fileiras. Os isolados AB20 e 158 não tiveram suas colônias observadas por microscopia.

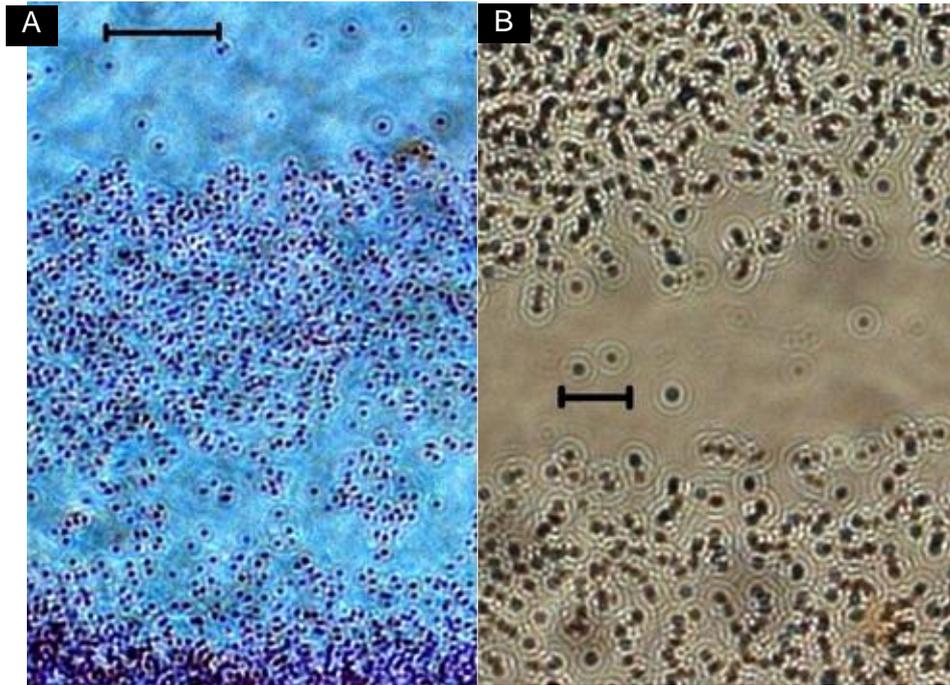


Figura 16: Microscopia óptica dos isolados AB23 e AB60. (A) AB23 e (B) AB60. As barras das figuras se referem a 10  $\mu\text{m}$ .

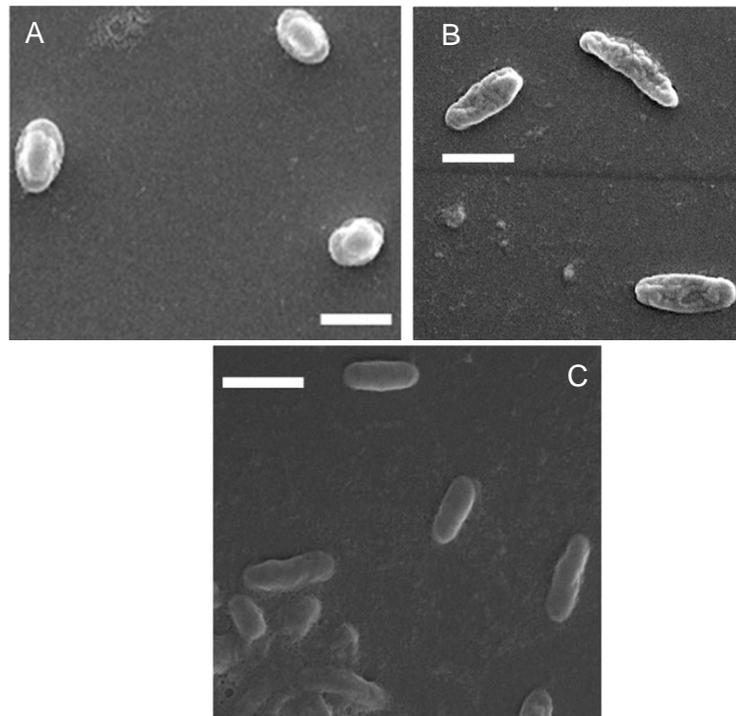


Figura 17: Microscopia eletrônica de varredura dos isolados AB23, AB39 e AB60. (A) AB23, (B) AB39 e (C) AB60. As barras indicam 1  $\mu\text{m}$ .

A comparação dos resultados de caracterização dos isolados obtidos com algumas acidobactérias já descritas está representada na Tabela 7.

Tabela 7: Características fenotípicas dos isolados de cerrado *sensu stricto* e *A. capsulatum*, *T. roseus*, *E. Aggregans*, *G. Paludicola*, *G. Pectinivorans*, *G. Aggregans* e *G. Rosea*.

	A.											
	AB20	AB23	AB39	AB60	AB158	<i>capsulatu</i> <i>m</i>	<i>T. roseus</i>	<i>E. Aggregans</i>	<i>G. Paludicola</i>	<i>G. Rosea</i>	<i>G. Pectinivorans</i>	<i>G. Aggregans</i>
<b>Formato da célula</b>	ND	cocobacilo	bacilo	cocobacilo	ND	Bacilo	Bacilo (cocobacilo)	Bacilo (cocobacilo)	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
<b>Coloração da colônia</b>	Rosa	Rosa	Branca	Rosa	Branca	Laranja	Rosa	ND	Rosa a vermelha	Rosa	Rosa a vermelha	Rosa
<b>pH</b>	5,5 <sup>1</sup>	5,5 <sup>1</sup>	5,5 <sup>1</sup>	4,5-5,5	5,5 <sup>1</sup>	3,0-6,0	5,0-7,0	4,0-7,0	3,0-7,5	3,0-7,5	3,0-7,5	3,0-7,5
<b>Temperatura °C</b>	25-28	25-37	25-28 <sup>2</sup>	25-28	25-28 <sup>2</sup>	25-37	12-23	15-37	2-33	2-33	2-33	2-33
<b>Requerimento de oxigênio</b>	Aeróbio <sup>3</sup>	Aeróbio	Anaeróbio facultativo	Aeróbio	Aeróbio estrita	Aeróbio estrita	Aeróbio estrita	Aeróbio estrita				
<b>Fontes de carbono</b>												
<b>Glicose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Extrato de levedura</b>	+	+	+	+	+	+	ND	+	ND	ND	ND	ND
<b>Xilana</b>	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+	+	+	+
<b>CMC</b>	+(?)	+(?)	+(?)	+(?)	+(?)	ND	-	+	-	-	-	-
<b>Quitina</b>	+(?)	+(?)	+(?)	+(?)	+(?)	ND	ND	ND	-	-	-	-

<sup>1</sup> Crescimento em outros pHs não foram testados. <sup>2</sup> Crescimento a 37°C não foi avaliado. <sup>3</sup> Apenas crescimento aeróbio testado. <sup>(?)</sup> Crescimento observado em meio sólido, porém não confirmado por passagens adicionais em mesmo meio.

O experimento de espectrometria de massa MALDI-TOF mostrou que os diferentes isolados apresentaram perfis protéicos distintos como demonstrado pelos espectros de massa adquiridos (Figura 17). A figura 17 mostra dois dos espectros adquiridos dos diferentes isolados e de *A. capsulatum*. O eixo x corresponde à razão massa/carga ( $m/z$ ) dos íons detectados e o eixo y corresponde à intensidade do sinal em unidades arbitrárias não normalizadas neste experimento. Os espectros de massa adquiridos para cada isolado apresentaram massas moleculares próximas com variações de 1 a 3 Da, uma margem de erro esperado para essa faixa de massas moleculares. O perfil de íons apresentou também intensidades semelhantes para massas moleculares equivalentes. Como exemplo, nos espectros do isolado AB20, as proteínas correspondentes aos íons com  $m/z$  de 4.721, 6.801, 7.454 e 9.444, além de estarem presentes nos dois espectros, possuem intensidade similar. De forma análoga, essa interpretação pode ser feita para os espectros dos demais isolados comparando as massas moleculares mostradas nos espectros.

Entretanto, quando comparados os espectros dos diferentes isolados, íons com  $m/z$  divergem entre as espécies possibilitando a distinção entre elas. Como exemplo de íons únicos, pode-se citar o íon de  $m/z$  14.282 do isolado AB158 e o de  $m/z$  9.291 de *A. capsulatum*.

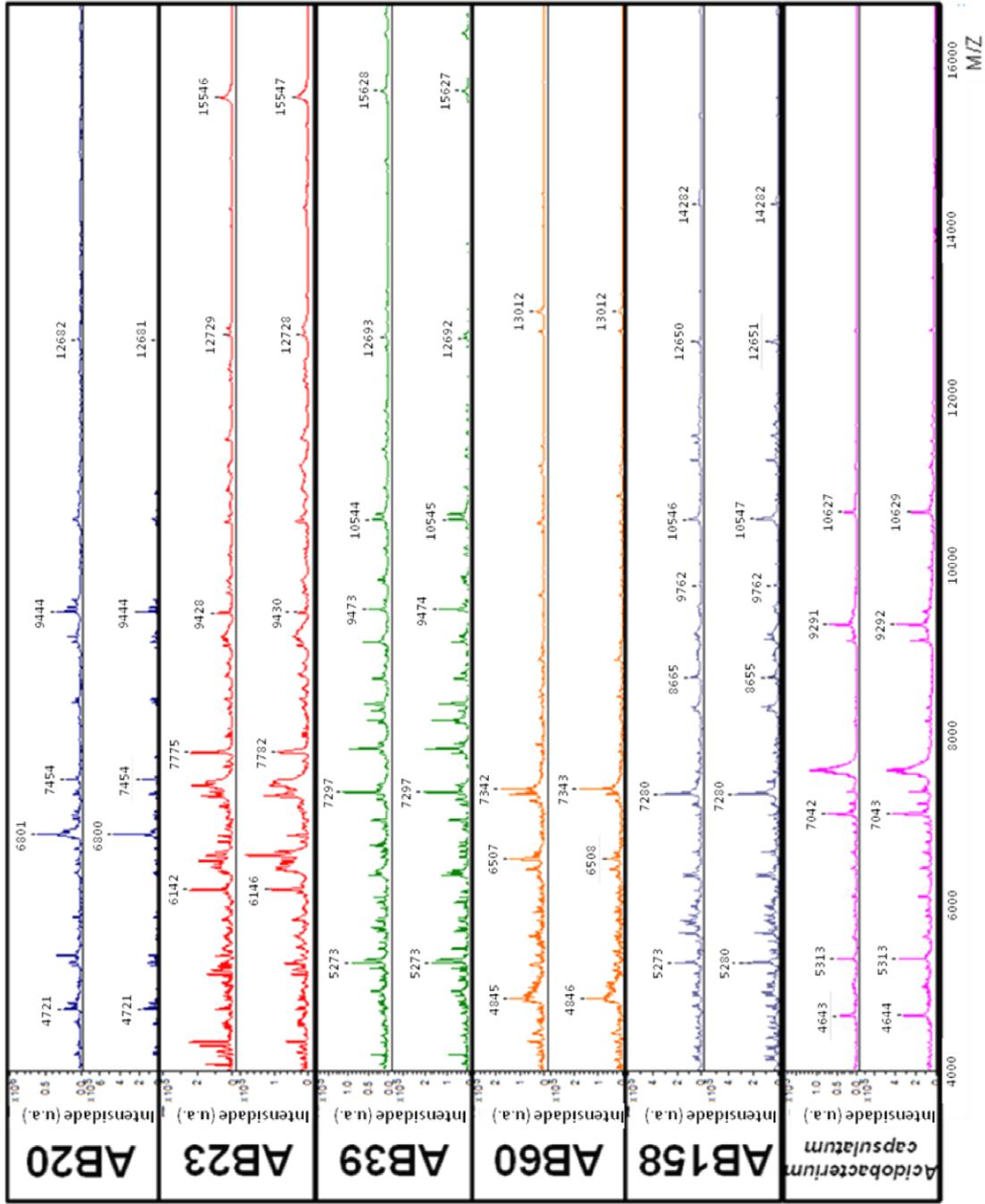


Figura 17: Espectros de massa MALDI-TOF das réplicas dos isolados de Acidobacteria crescidas em meio sólido e adquiridos em modo linear positivo. No eixo "Y" observa-se a intensidade do íon em unidades arbitrárias e no eixo "X" a massa da proteína sobre a quantidade de cargas a ela adicionadas.

## 6 Discussão

### 6.1 Testes do meio de cultura e condições para isolamento de Acidobacteria

O solo da RECOR foi utilizado para testar as metodologias para isolamento de Acidobacteria, uma vez que dados mostrados por Araújo (2011) revelaram a presença destes micro-organismos neste solo.

O experimento realizado para comparar o crescimento bacteriano entre o meio utilizado pela primeira vez neste solo (VL55 com xilana) e outro já estudado (R2A) mostrou a sua real capacidade de permitir o crescimento de bactérias ainda não crescidas em placa. Foi possível perceber um enriquecimento diferenciado entre os meios testados pela observação das morfologias das colônias (Figura 4). As figuras 4E-H demonstram bactérias com morfologias distintas cujo surgimento foi observado em diferentes datas, enquanto que no meio R2A (Figura 4A-D), as colônias que crescem primeiro apresentam a mesma morfologia até o último dia de experimento.

A comprovação desta análise visual ocorreu com o sequenciamento do gene RNAr 16S de colônias dos diferentes meios. Embora com sequências pequenas, com mais de 465 pares de bases sequenciados, as porcentagens de identidade das colônias obtidas em VL55 com xilana foram relativamente baixas (menores que 92%), com exceção da colônia CVL2, sendo provável que as colônias amostradas pertençam a espécies ainda não cultivadas. Já as colônias amostradas em R2A apresentaram 100% de identidade com bactérias já estudadas (Tabela 3). Este resultado indica uma grande capacidade do meio VL55 em cultivar espécies ainda não cultivadas até então.

O meio VL55 com xilana pode facilmente ser adotado para um estudo mais aprofundado de isolamento de espécies ainda não cultivadas em solo de Cerrado. Prova disso são os diversos estudos responsáveis pelos isolados "Ellin" que encontraram muitos isolados novos (SAIT et al, 2002; JOSEPH et al, 2003; SAIT et al, 2006). O meio VL é adequado para cultivo de micro-organismos, já que segue as quatro regras seguintes: de fácil reprodutibilidade, permite o crescimento de uma grande variedade de bactérias presentes na amostra, permite um pequeno crescimento de organismos indesejados, e reprime o crescimento de colônias que se espalham pela placa (DAVIS et al, 2005; JANSSEN et al, 2002).

As condições de cultivo testadas primeiro experimento permitiram a escola da quantidade ideal de inóculo para um crescimento em placa que não a saturasse com

organismos de rápido crescimento, nem que poucas colônias aparecessem depois de semanas de incubação. Assim sendo, como o inóculo de 200  $\mu\text{L}$  da concentração  $10^{-5}$  apresentou placas com fungos, a concentração de  $10^{-6}$  apresentou poucas colônias (Figura 3B) em oito semanas de incubação, decidiu-se então por optar, na próxima etapa (realizada na fazenda Capão-comprido) plaquear 300 $\mu\text{L}$  da diluição a  $10^{-6}$  para se obter uma quantidade satisfatória de colônias.

Essas condições de cultivo devem ser ajustadas sempre que um novo local for estudado. Embora trabalhos como o de Janssen e colaboradores (2002) mostrem as diluições adotadas para seus estudos, estes não devem ser adotados como padrão, já que diferentes ambientes apresentam quantidade e diversidade de colônias diferentes e precisam de diluições e quantidade de inóculos diferentes (FALLON et al, 1983; JANSSEN et al, 2002).

Das outras condições testadas, o uso da cicloheximida foi fundamental neste experimento. Os fungos, em placas sem cicloheximida crescem rapidamente e em maior quantidade quando em placas sem este químico. O aparecimento de fungos dificulta o isolamento das bactérias na mesma placa, impedindo o crescimento de culturas bacterianas ou crescendo sobre as colônias. Trabalhos anteriores que utilizam o meio VL não fazem referências significativas sobre contaminações por fungos (DAVIS et al, 2005; SAIT et al, 2006). Janssen e colaboradores (2002), embora não tenham utilizado o meio VL, comentam que 21% das colônias inicialmente isoladas são perdidas por contaminação.

Quanto à iluminação, além do problema com ressecamento causado pelo aquecimento das placas, o crescimento bacteriano pode ter sido prejudicado pelo fato dos compostos das soluções de vitaminas e elementos traço de metais presentes no meio VL55 apresentarem sensibilidade à luz (The Merck Index, 2001). A tentativa de manter as culturas sob iluminação foi realizada após a publicação de uma espécie candidata ao Acidobacteria que é capaz de utilizar energia luminosa no seu metabolismo (BRYANT et al, 2007). Devido ao problema em manter os meios de cultura íntegros por muitas semanas de incubação, o cultivo de organismos que necessitam de luz para sobreviver não pôde ser realizado.

O longo tempo de incubação é um fator importante para o aparecimento de colônias tardias nas placas. As oito semanas de incubação são fundamentais para o sucesso de experimentos de cultivo como este. Trabalhos como o de Janssen e colaboradores (2002) e Davis e colaboradores (2005; 2010) demonstram que o número de colônias que aparecem após a décima semana é significativo, e portanto um período maior de incubação permite o crescimento de colônias nunca antes observadas.

O solo da RECOR foi utilizado com o propósito de testar o meio VL, utilizado anteriormente em latossolo australiano. Com os resultados obtidos neste experimento,

adequações relacionadas a quantidade de inóculo, uso de cicloheximida e iluminação puderam ser feitas para encontrar as acidobactérias.

## 6.2 Comparação entre os solos da Fazenda Capão Comprido

A análise química do solo foi importante para se averiguar diferenças de composição entre os solos não alterados (Floresta Brasil e cerrado denso) e o solo modificado para plantio de eucaliptos. Os compostos encontrados em maior quantidade na floresta de eucalipto (fósforo, cálcio, magnésio e manganês) são derivados de produtos colocados no solo para possibilitar a implantação da cultura. Já o alumínio é mais abundante em solo “nativo” de cerrado. Sabe-se ainda da toxicidade deste elemento, que pode gerar problemas para alguns organismos no caso de acúmulo deste (HARIDASAN, 1985).

Em relação ao pH, seria esperado uma diferença maior, com o solo de eucalipto mais ácido se comparado com solo nativo (SILVA et al, 2009). Apesar da maior diferença de pH entre os solos ter sido de 0,4, o solo da floresta de eucalipto é considerado de média acidez quando comparado com os solos nativos, considerados muito ácido.

De acordo com as informações fornecidas pela empresa responsável pela análise de solo, o fósforo está em concentração muito baixa nos solos nativos, enquanto que na floresta de eucalipto a concentração de  $5,1\text{mg/dm}^3$  é considerada média, mas inferior ao adequado, segundo informações contidas nas análises do solo. Os valores cálcio, embora cinco vezes mais concentrado no solo de floresta de eucalipto ( $0,9\text{cmol/dm}^3$ ) do que nos naturais ( $0,2\text{cmol/dm}^3$ ) em ambos, foram todos considerados baixos, já que a quantidade média é considerada entre 2,0 a  $5,0\text{cmol/dm}^3$ . E o magnésio está em quantidade média em solo de floresta de eucalipto enquanto que em cerrado *sensu stricto* e cerrado denso essas quantidades são consideradas baixos. O potássio é considerado em alta concentração em todos os solos, e o alumínio mais presente em solo de cerrado *sensu stricto* (Floresta Brasil) apresenta alta toxicidez nos solos nativos e média toxicidez em solo da floresta de eucalipto.

No teste de amplificação com o iniciador específico para acidobactérias, o sucesso na amplificação dos solos e a não amplificação do DNA extraído de rúmen caprino comprovou a especificidade do iniciador. Isso porque no DNA de rúmen não foram identificadas sequências de Acidobacteria na biblioteca do gene RNAr 16S (CUNHA et al, 2011). Já em solo de Cerrado, utilizado como controle positivo, sabe-se da presença e da composição das acidobactérias como mostrado em Araújo (2011). Esse resultado permitiu a continuação do processo de procura por novas acidobactérias em todas as placas preparadas, já que todas apresentam algum micro-organismo do filo Acidobacteria.

### 6.3 Comparação entre solos da fazenda Capão Comprido em relação ao número de colônias obtidas em meio VL55

Neste experimento, o solo de floresta de eucalipto apresentou uma quantidade maior de colônias do que a dos solos de cerrado *sensu stricto* (Floresta Brasil) e Cerrado denso (Figura 8).

O número maior de colônias no tratamento da floresta de eucalipto pode ter ocorrido devido a uma partícula de solo que foi carregada pelas diferentes diluições realizadas na preparação do experimento. Essa possível correlação, também pode ter influenciado um tratamento realizado com solo de cerrado *sensu stricto* (Floresta Brasil 2). Este solo também apresentou uma partícula entre as diluições. Sabe-se que as partículas apresentam um aglomerado de bactérias, sendo o local de fixação dos micro-organismos (MUMMEY et al, 2006). Assim sendo, seria de se esperar um maior número de colônias nas placas derivadas do inóculo com a partícula, entretanto, embora um tratamento do solo de cerrado *sensu stricto* tenha tido uma partícula, o desvio padrão observado é pequeno, mostrando pouca influência do material particulado nas diluições consecutivas (Figura 8).

O fato do solo de eucalipto apresentar uma média muito maior do que os outros solos utilizados pode ser explicado também pelo maior pH e pela menor quantidade de alumínio, que apresenta valores de alta toxicidade nos solos de cerrado *sensu stricto* e cerrado denso, que podem ser considerados condições seletivas (HUGHES et al, 2007). Além disso, a quantidade dos macro e micronutrientes pode ter relação com a maior quantidade de colônias observadas. Como exemplo, o fósforo e o magnésio podem ter favorecido este fato. O fósforo é necessário para crescimento celular: quanto mais fósforo, maior o crescimento celular, desde que abaixo da quantidade que se torna tóxica. E o magnésio é importante por ser presente nos ribossomos, e seu excesso acaba favorecendo também um aumento na microbiota (OVERMANN, 2006).

### 6.4 Técnicas de detecção de Acidobacteria: “*plate wash – PCR*” e “*colony – PCR*”

Sabendo da presença de acidobactérias em todos os solos amostrados (Figura 7), as técnicas, “*plate wash – PCR*” e “*colony – PCR*”, foram realizadas e se mostraram eficazes para encontrar por acidobactérias.

A técnica de “*plate wash – PCR*” requer a eliminação de algumas placas para extração do DNA total das colônias crescidas.

A única amostra em que todas as placas foram utilizadas apenas no método “*plate wash – PCR*” foi um dos tratamentos de cerrado *sensu stricto*. Das 11 placas cujo DNA foi extraído do tratamento, 7 delas apresentaram amplificação positiva de DNA de Acidobacteria, ou seja 63% das placas. De acordo com os princípios dessa técnica, as placas restantes seriam réplicas e a detecção positiva de Acidobacteria no DNA total da placa, indicaria a presença de colônia pertencente ao filo-alvo. Um viés desta técnica é que, nestas amostras, o termo “réplica” não corresponde ao observado, já que foi observada diferença entre as colônias encontradas em diferentes placas. Sendo assim, depois de submetidas à reação de PCR com iniciadores específicos é possível perceber a presença ou ausência, não sendo possível inferir a quantidade de colônias positivas. Exemplo de que essa é uma possibilidade real é que os isolados AB20 e AB23 foram encontrados em uma mesma placa. Caso o DNA desta placa fosse amplificado, seria detectada a presença de acidobactéria, mas a presença de dois isolados não seria notada. E não sendo réplicas, as espécies de uma placa com DNA extraído podem ser únicas e não mais recuperadas em suas réplicas.

O replaqueamento de parte da suspensão obtida no “*plate wash – PCR*”, com a intenção de não perder colônias não presentes em réplicas, o problema encontrado foi o crescimento dos fungos. A única placa testada mostrou que não é possível replaquear a solução contendo as colônias vindas de uma placa que contenha algum fungo. O rápido crescimento destes organismos e a alta capacidade reprodutiva (produção de esporos) impedem o isolamento de bactérias. Embora teoricamente, essa metodologia pudesse ser aplicada em placas contendo somente bactérias, essa possibilidade é mínima. Considerando essa possibilidade, para replaquear a suspensão, diluições deverão ser realizadas a fim de permitir o crescimento isolado das colônias. Outro problema com o replaqueamento é relacionado com o tempo de incubação para novo crescimento das colônias que acaba favorecendo o crescimento de fungos.

Com os problemas em se trabalhar com o replaqueamento das suspensões de “*plate wash – PCR*”, o método chamado “*colony – PCR*” foi realizado com sucesso. A vantagem principal deste método é a economia de tempo já que não é necessária a extração das colônias das placas, seguido pela extração de DNA, amplificação por PCR e busca por colônias pertencentes ao grupo detectado. Neste procedimento, a busca entre as colônias é direta, bastando a detecção à partir do DNA total extraído da amostra a ser trabalhada. Das colônias testadas com os iniciadores específicos, menos de 12% delas apresentaram amplificação do DNA com o iniciador específico. Esta porcentagem de acidobactérias encontradas é similar aos 11% encontrados por Joseph e colaboradores (2003) e 14 % encontrados por Sait e colaboradores (2002).

Das 19 colônias detectadas, apenas 6 colônias restaram em cultivo, sendo que uma delas não está pura. A dificuldade em isolar todas as colônias detectadas está no rápido crescimento dos fungos, já comentado. Outra dificuldade está em manter esses isolados, uma vez que alguns não apresentam crescimento após algumas passagens sucessivas de colônias para novas placas, fato também registrado por Janssen e colaboradores (2002) e Davis e colaboradores (2010). A interrupção do crescimento de colônias após passagens sucessivas para novas placas pode ocorrer pela ausência de micro-organismos presentes na comunidade original do solo que auxiliam no crescimento uns dos outros, ou ainda devido à ausência de um composto essencial, e em alguns casos, o excesso, pois bactérias oligotróficas têm seu crescimento inibido por altas concentrações de alguns nutrientes (KOCH, 2001).

## **6.5 Análise das sequências de DNA dos isolados de Acidobacteria do solo de cerrado *sensu stricto***

A análise da sequência do gene RNAr 16S dos 5 isolados demonstram que todos os isolados pertencem ao GP1. Este resultado era esperado, uma vez que as condições dos meios de cultura e o iniciador específico favorecem o crescimento e a detecção, respectivamente, de bactérias deste grupo formado em sua maioria por bactérias acidófilas (BARNES et al, 1999; SAIT et al, 2006).

A comparação entre os isolados obtidos mostra um parentesco maior entre os isolados AB20 e AB23 (98,1% de identidade), resultado este que reforça a semelhança fenotípica das colônias destes isolados. O isolado AB60 também se assemelha fenotipicamente com estes isolados, sendo que apresentou maior identidade com o isolado AB20 (97,6%). O isolado AB158, cujas colônias se assemelham às colônias do isolado AB39, apresentou uma maior identidade com o isolado AB60 (97,4%). O isolado AB39 foi o de menor identidade com todos os isolados (maior identidade de 94,2%).

Como sugerido por Stackbrandt e Eber (2006) uma identidade menor que 98,7% entre sequências do gene RNAr 16S indica que as espécies são diferentes. Assim, as baixas identidades entre as sequências de acidobactérias encontradas neste trabalho e as sequências do banco de dados (Tabela 6) sugerem que estas sejam novas espécies, já que o máximo entre as identidades com espécies já descritas foi observado entre AB39 e *E. aggregans* de 98,6%. Comparando as análises realizadas no RDP-X e as realizadas no *Greengenes*, as diferenças podem ter ocorrido devido ao método usado para calcular estas

identidades ou ainda pelo fato do banco de dados próprio do *Greengenes* ser um banco de dados curado, apresentando somente sequências de DNA de boa qualidade.

Observando as identidades entre as sequências do gene RNAr 16S dos isolados pode-se deduzir que somente o sequenciamento desta não é suficiente para separar isolados. Prova disso é a acidobactéria *Terriglobus saanensis* que apresenta identidade da sequência de RNAr 16S de 97,2% com *Terriglobus roseus*, mas sua análise de hibridização DNA-DNA demonstrou uma homologia de 3,1% com *T. roseus* comprovando a existência de uma nova espécie (MANNISTO et al, 2010).

Na análise filogenética do gene de RNAr 16S (Figura 11), o dendrograma indica ainda que AB39 é um isolado pertencente ao gênero *Edaphobacter* (sustentado por valor de *bootstrap* de 97), embora a definição de parentesco dentro do grupo não esteja clara, já que as relações entre AB39 e *E. aggregans* com o grupo maior não estão bem definidas. E embora o dendrograma mostre a presença de AB39 no grupo das *Edaphobacter*, é importante ressaltar a diferença entre as identidades do gene de RNAr 16S de AB39 com as espécies deste gênero foi maior que 9% (segundo RDP-X), o que sugere uma nova espécie. Já os isolados AB20, AB23 AB60 e AB158 permaneceram em um grupo sustentado por *bootstrap* de 98. Dentro do grupo, AB158 aparece como mais antigo juntamente com um isolado australiano, o que corrobora as identidades entre os isolados. O isolado AB60 aparece unido à bactéria *Telmatobacter bradus*, recentemente descrita, e ao isolado 5222 (sugerido pelo *Greengenes* como o isolado do banco de dados mais próximo a todos os isolados obtidos neste trabalho), porém com o ramo pouco sustentado, com 54 de *bootstrap*. Os isolados AB20 e AB23 aparecem em taxa irmãos, embora também pouco sustentado (42 de *bootstrap*).

O maior parentesco entre as sequências de AB60 e *Telmatobacter bradus* não foi confirmado pela busca realizada em bancos de dados e pode ter ocorrido uma vez que esta é uma espécie nova e os bancos de dados não utilizaram a sequência na comparação.

Os dados de caracterização confirmam a distância filogenética entre AB39 e os outros isolados apresentados no dendrograma, já que este apresenta uma colônia rígida e que não pode ser retirada sem o meio de cultura sólido quando em placa e apresenta flocos quando em meio líquido. E embora o isolado AB158 também apresente colônia rígida e de mesma cor que o AB39, o parentesco entre elas não foi comprovado pelo dendrograma. E contrariando o fenótipo rígido e branco, o AB158 permaneceu mais próximo das colônias rosadas AB20, AB23 e AB60, que ficaram num mesmo ramo do dendrograma.

Observando as informações fornecidas pela análise do gene de RNAr 16S, não é possível afirmar que os isolados são diferentes entre si, assim como não é possível afirmar que são espécies novas, já que os valores de identidade entre os isolados e sequências de

bancos de dados demonstram identidades próximas ao limite de identidade de 98,7%, como observado no isolado AB39.

## 6.6 Caracterização das acidobactérias encontradas

Os testes realizados para caracterização averiguaram a necessidade de oxigênio para sobrevivência, fontes de carbono utilizáveis, variação de temperatura, variação de pH e análise dos perfis proteicos.

As colônias dos isolados AB20, AB23 e AB60 são semelhantes entre si e inicialmente poderiam ser consideradas um único isolado. O tom rosado e o formato das colônias são muito similares. Quanto à textura, a AB20 já é diferenciada pela maior rigidez das colônias. As colônias dos isolados AB39 e AB158 apresentam rigidez e são de cor branca, sendo a AB39 de mais difícil manipulação, pelo problema de se coletar uma colônia do meio de cultura sólido (a colônia é aderida ao meio de cultura). Esta característica representou uma barreira para testes realizados em meio líquido nos quais a absorvância não pode ser aferida, como testes de pH e temperatura.

No teste que avaliou o crescimento em gradiente de oxigênio, todas as colônias testadas apresentaram resultados semelhantes, não sendo possível afirmar que os isolados sejam aeróbios, microaerofílicos, anaeróbios facultativos ou aerotolerantes. Uma vez inoculado em tubos fechados, a concentração de oxigênio por todo o inóculo e dentro do tubo começa a diminuir pela atividade metabólica dos isolados. Como a perfuração do inóculo não foi realizada até o final do tubo de ensaio, não é possível confirmar a possibilidade de estes organismos sobreviverem com menor concentração de oxigênio. Já a variação de coloração na extensão do inóculo por parte dos isolados AB20, AB23 e AB60 foi similar à observada nas colônias quando em meio sólido. Após uma semana de incubação, apresentam colônias brancas e pequenas e ao final de duas semanas, as colônias começam a tomar um tom rosado, que se intensifica com o passar do tempo.

De modo similar, Eichorst e colaboradores (2007), ao isolar *Terriglobus roseus* observaram mudança de coloração dependendo da concentração de oxigênio a que o isolado era submetido. Tons maiores de rosa, causado pela presença de carotenóides, foram observados em placas contendo maior quantidade de oxigênio, demonstrando reatividade das colônias em presença de oxigênio. Os resultados de Eichorst e colaboradores (2007) parecem ter relação com o resultado obtido neste trabalho. A submissão destes isolados a diferentes concentrações de oxigênio e o isolamento da

substância responsável pela coloração são necessárias para a confirmação das causas e do composto responsável pela coloração.

No experimento em meio líquido sem agitação, todos os isolados, inclusive o AB158, não testado no experimento anterior, apresentaram crescimento. Sem agitação, a concentração de oxigênio dentro do frasco reduz com o passar do tempo, assim como na cavidade do experimento realizado em tubos de ensaio. Não é possível descartar a possibilidade dos isolados serem aeróbios uma vez que o crescimento foi perceptível devido à formação de biofilme no fundo do frasco ou da turbidez do meio de cultura. A coloração rosada dos isolados AB20, 23 e 60 foi novamente observada em suas células depois de precipitadas por centrifugação.

A comprovação do uso de uma determinada fonte de carbono deve ser realizada em, no mínimo, duas passagens para meios de cultura com mesma fonte de carbono. O teste em meio sólido no qual o meio não apresentava fonte de carbono mostrou que uma passagem não é suficiente para provar a capacidade de degradação da fonte de carbono. Assim sendo, uma explicação para os resultados em meio sólido e meio líquido com CMC, avicel e quitina não terem coincidido é o fato de, em meio sólido, as colônias terem crescido devido a resquícios do meio de cultura inicial contendo xilana. Uma segunda passagem deveria ser realizada para a comprovação do uso de determinada fonte de carbono. Entretanto, o experimento realizado em meio líquido pode não ter representado a real capacidade de crescimento destes organismos com as fontes de carbono testadas. Esse fato pode ter ocorrido devido ao lento e pequeno crescimento destes isolados, que pode ter prejudicado a medição da absorbância, não permitindo que o resultado fosse considerado positivo já que a faixa de corte adotada é de 0,05 de absorbância. Outro problema pode estar relacionado à necessidade de aeração para degradação de determinadas fontes de carbono, já que tubos de plástico de 15 mL são pequenos e não apresentam grande quantidade de oxigênio assim como, mesmo quando agitados, não permitem grande difusão de oxigênio para dentro do meio. Levando isto em consideração, novo teste deve ser realizado, porém em frasco de vidro de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura com uma única fonte de carbono.

Outra informação importante neste teste é o não crescimento de *A. capsulatum* em meios com quitina ou com CMC. A observação de crescimento desta espécie nestas fontes de carbono era esperada, já que uma  $\beta$ -glucosidase de *A. capsulatum* foi descrita (KISHIMOTO et al, 1991) e foi encontrado em seu genoma sequências referentes a quitinases e sequências parciais de celulasas (glicosídeo hidrolase) (WARD et al, 2009).

No teste de crescimento a 37°C, em meio sólido, nenhum crescimento foi observado provavelmente devido ao pouco tempo de incubação ao qual os isolados foram submetidos.

Já os três isolados testados (AB20, AB23 e AB60) em meio líquido, embora todos tenham vindo da mesma amostra de solo, somente o isolado AB23 apresentou crescimento em meio líquido a esta temperatura. Comparando com as espécies descritas do subgrupo 1, somente *A. capsulatum*, *Acidipila rosea* e *E. aggregans* são capazes de crescer a 37°C e comparando a análise filogenética, o isolado AB23 é o isolado mais próximo de *A. capsulatum* (Figura 11). Se o parentesco apresentado no dendrograma pudesse ser levado em consideração, seria esperado que o isolado AB39 também fosse capaz de crescer nesta temperatura devido ao seu parentesco com *E. aggregans*, assim como seria esperado que AB158 não fosse capaz de crescer nesta condição devido ao parentesco com os isolados AB60 e AB20.

Para observar se as hipóteses são reais, um maior tempo de incubação a 37°C em meio de cultura sólido deveria ser testado, até mesmo para confirmar os resultados já obtidos em meio líquido.

A capacidade de crescimento a esta temperatura é interessante também se for levado em conta o ambiente no qual o isolado foi encontrado. Pesquisas utilizando análises de satélite mostram que as temperaturas superficiais do bioma cerrado prevalecem por volta de 30 a 40°C (SANTOS et al, 2011). Partindo desta análise, estas bactérias poderiam manter suas colônias próximas à superfície mesmo em períodos mais quentes, considerando que outras condições como a falta de água na zona mais superficial do solo podem ser importantes.

No experimento de pH realizado com o isolado AB60, é clara a capacidade de crescimento deste isolado nos pH's 4,5 e 5,5. A capacidade de crescimento a 4,5 era esperado uma vez que o pH do solo de origem dos isolados apresentou pH 4,8. Novo teste com o pH 3,5 deve ser realizado já que outras acidobactérias apresentam crescimento até pH 3,0 (embora estas tenham sido isoladas de mina de drenagem ácida). Quando comparado a velocidade de crescimento em meio líquido e sólido, a curva de crescimento (pH 5,5) apresentou absorvância máxima no sétimo dia enquanto que em placa, colônias só se tornam visíveis a partir do décimo segundo dia de incubação. Os isolados restantes devem também ser testados em diferentes pH's para averiguar qual a variação de pH suportada por eles. Para simplificar o experimento, a aferição de absorvância deve ser realizada no dia de realização do inóculo e no décimo segundo dia pós inóculo.

Os resultados fornecidos pela microscopia mostram que todos os isolados observados (AB23, AB39 e AB60) são Gram-negativos assim como todas as acidobactérias descritas.

Ao final dos testes realizados, não é possível diferenciar os isolados entre si nem entre as espécies já descritas. Análises como hibridização DNA-DNA, constituição de

lipídeos e conteúdo G+C do DNA são fundamentais para uma caracterização que permita afirmar que os isolados são realmente espécies ainda não descritas e quantas espécies de fato os cinco isolados representam.

Por outro lado, foi realizada uma técnica que recentemente tem sido utilizada para diferenciação de espécies bacterianas, por meio da comparação de perfis protéicos, a espectrometria de massa MALDI-TOF.

A análise por espectrometria de massa, os resultados obtidos neste trabalho mostram diferenças dos perfis protéicos dos isolados e da *A. capsulatum*. Os espectros de massa foram adquiridos em triplicatas e foram poucas as variações entre as réplicas de cada isolado, demonstrando a reprodutibilidade desta metodologia já que colônias independentes do mesmo isolado fornecem espectros semelhantes ao menos por inspeção visual.

Infelizmente, pela falta de um banco de dados, a comparação entre os isolados e com outras bactérias não foi possível. No entanto, espera-se usar o software chamado *Biotyper* (Bruker Daltonics), capaz de realizar comparações entre os perfis gerados, fornecendo assim dados quantitativos, ao gerar árvores filogenéticas. Seria interessante o uso do software para comparar esta análise com os dados obtidos pelo sequenciamento da região do gene de RNAr 16S (MAIER et al, 2006; SAUER; KLIEM, 2010).

A comparação entre o resultado da análise dos espectros gerado pelo software e a análise da sequência do gene RNAr 16S poderia validar a aplicação da espectrometria de massa para caracterização bacteriana.

Já o banco de dados de espectros de massa, ainda que este estivesse disponível não seria útil para identificação direta dos isolados já que a grande maioria de dados produzidos apresenta somente dados sobre bactérias patogênicas humanas, sendo as bactérias de origem ambiental minoria ou ainda ausentes (SENG et al, 2009). Quando o banco de dados tiver mais informações guardadas, será possível, ao encontrar uma acidobactéria, saber se esta seria uma nova candidata ou se já está isolada, como um passo de identificação inicial.

Esta análise, embora com um foco restrito, tem sua importância já que trata-se da primeira tentativa de se aplicar esta metodologia para distinguir isolados ainda pouco estudados. Além disso, as informações geradas podem ser inseridas em bancos de dados, facilitando assim a busca por novas acidobactérias.

Como a caracterização está em andamento, colônias utilizadas em testes com diferentes fontes de carbono, ou mesmo crescidas em pH's e temperaturas diferentes poderão ser submetidas a esta técnica para aumentar o conhecimento sobre os isolados estudados.

Concluindo, o presente trabalho confirmou a capacidade do meio de cultura VL55 em cultivar bactérias ainda não isoladas, isolou com o auxílio da metodologia de “*colony* – PCR” acidobactérias pertencentes a grupos acidófilos e caracterizou de forma incompleta os isolados obtidos. A continuação da caracterização destes isolados é importante, uma vez que suas sequências do gene de RNAr 16S apresentaram baixa identidade com sequências de bancos de dados e as características analisadas até o momento não indicam que os isolados já tenham sido descritos.

O isolamento e caracterização de acidobactérias podem ser importantes do ponto de vista ecológico, uma vez que a abundância deste organismo no solo pode estar relacionada com a decomposição de matéria orgânica, podendo degradar materiais complexos como polissacarídeos ou ainda pode estar relacionado com o ciclo do nitrogênio.

Do ponto de vista econômico, genomas publicados e alguns trabalhos indicam a presença de enzimas com interesse biotecnológico como celulasas, quitinases, pectinases, xilanases e carboximetil-celulase ou ainda com a capacidade de degradar gelatina (WARD et al, 2009 e PANKRATOV et al, 2011). Além da possibilidade de apresentar enzimas de uso comercial que podem conter características peculiares, como tolerância a baixo pH por exemplo, estas bactérias podem ser utilizadas como controles positivo para testes enzimáticos.

## 7 Perspectivas futuras

Todos os isolados em estudo deverão ser caracterizados quanto a crescimento em diferentes pH's, fontes de carbono utilizáveis e morfologia celular. O crescimento em diferentes pH's será realizada com todos os isolados assim como foi feita para a AB60, porém aferindo a absorbância no dia de inóculo e no décimo segundo dia. Quanto às fontes de carbono, novo teste em meio sólido com duas passagens consecutivas deverão ser realizadas. O experimento deve ser realizado novamente em meio líquido, em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido, com a medição de absorbância sendo realizada após o inóculo e na quarta semana de incubação. Além destes, testes de catalase e oxidase devem ser realizados com todos os isolados para caracterização.

Todos os isolados devem ser analisados por microscopia eletrônica, tanto de transmissão quanto de varredura. Nesta análise, além da morfologia das colônias, deve-se observar a presença ou ausência de cápsula e flagelo, bem como a análise de presença de vesículas próximas às células já observadas como nos trabalhos de Eichorst e colaboradores (2007) e Dedysh e colaboradores (2011).

A constituição lipídica dos isolados deve ser realizada, já que de fundamental importância para diferenciação das espécies, assim como deve ser realizada a hibridização do DNA e a análise do conteúdo G+C do DNA.

O gene *rpoB* deve ser sequenciado para análise filogenética de outra região gênica e comparado com os resultados obtidos via sequenciamento do gene de RNAr 16S.

As bactérias serão testadas quanto à resistência ao alumínio e requerimento de ferro, já que o solo de cerrado apresenta uma grande quantidade destes metais como demonstrado na análise realizada. Outro teste relacionado com resistência a antibióticos deve ser realizado, já que algumas espécies descritas apresentam esta característica.

Os isolados precisam ter seu genoma completo sequenciado para contribuir com o conhecimento geral sobre Acidobacteria, seus possíveis papéis nos ciclos biogeoquímicos além de viabilizar a identificação da presença de enzimas de interesse biotecnológico.

## 8 Referências Bibliográficas

- ARAÚJO, J. F. D. **Diversidade bacteriana do solo em diferentes fitofisionomias do bioma Cerrado e perspectivas biotecnológicas**. 2011. 153 pp. (Doutorado). Programa em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília.
- BARNS, S. M.; TAKALA, S. L.; KUSKE, C. R. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom Acidobacterium in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**. 65: 1731-7. 1999.
- BRYANT, D. A.; COSTAS, A. M.; MARESCA, J. A.; CHEW, A. G.; KLATT, C. G.; BATESON, M. M.; TALLON, L. J.; HOSTETLER, J.; NELSON, W. C.; HEIDELBERG, J. F.; WARD, D. M. Candidatus *Chloracidobacterium thermophilum*: an aerobic phototrophic Acidobacterium. **Science**. 317: 523-6. 2007.
- CARDENAS, E.; TIEDJE, J. M. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**. 19: 544-9. 2008.
- CLAYDON, M. A.; DAVEY, S. N.; EDWARDS-JONES, V.; GORDON, D. B. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. **Nature Biotechnology**. 14: 1584-6. 1996.
- COATES, J. D.; ELLIS, D. J.; GAW, C. V.; LOVLEY, D. R. *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 49 Pt 4: 1615-22. 1999.
- COLE, J. R., WANG, Q., CARDENAS, E., FISH, J., CHAI, B., FARRIS, R. J., KULAM-SYED-MOHIDEEN, A. S., MCGARRELL, D. M., MARSH, T., GARRITY, G. M. AND TIEDJE, J. M. . The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**. 37: 141-145. 2008.
- CUNHA, I. S.; BARRETO, C. C.; COSTA, O. Y.; BOMFIM, M. A.; CASTRO, A. P.; KRUGER, R. H.; QUIRINO, B. F. Bacteria and Archaea community structure in the rumen microbiome of goats (*Capra hircus*) from the semiarid region of Brazil. **Anaerobe**. 2011.
- DAVIS, K. E.; JOSEPH, S. J.; JANSSEN, P. H. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. 71: 826-34. 2005.
- DAVIS, K. E.; SANGWAN, P.; JANSSEN, P. H. Acidobacteria, Rubrobacteridae and Chloroflexi are abundant among very slow-growing and mini-colony-forming soil bacteria. **Environmental Microbiology**. 13: 798-805. 2010.
- DEDYSH, S. N.; KULICHEVSKAYA, I. S.; SERKEBAEVA, Y. M.; MITYAEVA, M. A.; SOROKIN, V. V.; SUZINA, N. E.; RIJPSTRA, W. I.; DAMSTE, J. S. *Bryocella elongata* gen. nov., sp. nov., a novel member of Subdivision 1 of the Acidobacteria isolated from a methanotrophic enrichment culture, and emended description of *Edaphobacter aggregans* Koch et al 2008. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2011.

- DESANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E. L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D.; HU, P.; ANDERSEN, G. L. *Greengenes*, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**. 72: 5069-72. 2006.
- EICHORST, S. A.; BREZNAK, J. A.; SCHMIDT, T. M. Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the phylum Acidobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. 73: 2708-17. 2007.
- FALLON, R. D.; NEWEL, S. Y.; HOPKINSON, C. S. Bacterial production in marine sediments: will cell-specific measures agree with whole-system metabolism? **Marine Ecology - Progress Series**. 11: 119-127. 1983.
- FROHLICH, J.; KONIG, H. New techniques for isolation of single prokaryotic cells. **FEMS Microbiology Reviews**. 24: 567-72. 2000.
- FUKUNAGA, Y.; KURAHASHI, M.; YANAGI, K.; YOKOTA, A.; HARAYAMA, S. *Acanthopleuribacter pedis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from a chiton, and description of Acanthopleuribacteraceae fam. nov., Acanthopleuribacterales ord. nov., Holophagaceae fam. nov., Holophagales ord. nov. and Holophagae classis nov. in the phylum 'Acidobacteria'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 58: 2597-601. 2008.
- GIOVANNONI, S.; STINGL, U. The importance of culturing bacterioplankton in the 'omics' age. **Nature Reviews in Microbiology**. 5: 820-6. 2007.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 68: 669-85. 2004.
- HARIDASAN, M. Accumulation of nutrients by eucalyptus seedlings from acidic and calcareous soils of the cerrado region of Central Brazil. **Plant and Soil**. 86: 35-45. 1985.
- HUGHES, B. S.; CULLUM, A. J.; BENNETT, A. F. Evolutionary adaptation to environmental pH in experimental lineages of *Escherichia coli*. **Evolution**. 61: 1725-34. 2007.
- JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**. 72: 1719-28. 2006.
- JANSSEN, P. H.; YATES, P. S.; GRINTON, B. E.; TAYLOR, P. M.; SAIT, M. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. **Applied and Environmental Microbiology**. 68: 2391-6. 2002.
- JOSEPH, S. J.; HUGENHOLTZ, P.; SANGWAN, P.; OSBORNE, C. A.; JANSSEN, P. H. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. 69: 7210-5. 2003.
- KAEBERLEIN, T.; LEWIS, K.; EPSTEIN, S. S. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. **Science**. 296: 1127-9. 2002.
- KIELAK, A.; PIJL, A. S.; VAN VEEN, J. A.; KOWALCHUK, G. A. Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. **ISME Journal**. 3: 378-82. 2009.

KISHIMOTO, N.; KOSAKO, Y.; TANO, T. *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: An acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment. **Current Microbiology**. 22: 1-7. 1991.

KISHIMOTO, N.; TANO, T. Acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic mine drainage, sewage, and soils. **Journal of General and Applied Microbiology**. 33: 11-25. 1987.

KLAPPENBACH, J. A.; DUNBAR, J. M.; SCHMIDT, T. M. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. 66: 1328-33. 2000.

KOCH, A. L. Oligotrophs versus copiotrophs. **BioEssays** 23: 657-661. 2001.

KOCH, I. H.; GICH, F.; DUNFIELD, P. F.; OVERMANN, J. *Edaphobacter modestus* gen. nov., sp. nov., and *Edaphobacter aggregans* sp. nov., acidobacteria isolated from alpine and forest soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 58: 1114-22. 2008.

KRADER, P.; EMERSON, D. Identification of archaea and some extremophilic bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. **Extremophiles**. 8: 259-68. 2004.

KULICHEVSKAYA, I. S.; SUZINA, N. E.; LIESACK, W.; DEDYSH, S. N. *Bryobacter aggregatus* gen. nov., sp. nov., a peat-inhabiting, aerobic chemo-organotroph from subdivision 3 of the Acidobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 60: 301-6. 2010.

LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** 82: 6955-9. 1985.

LEE, S. H.; KA, J. O.; CHO, J. C. Members of the phylum Acidobacteria are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. **FEMS Microbiology Letters**. 285: 263-9. 2008.

LIESACK, W.; BAK, F.; KREFT, J. U.; STACKEBRANDT, E. *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. **Archives of Microbiology**. 162: 85-90. 1994.

MADIGAN; MARTINO. **Brock Biology of Microbiology**. 11. Pearson, 2006. 992 ISBN 9780132017848.

MAIER, T.; KLEPEL, S.; RENNER, U.; KOSTRZEWA, M. Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. **Nature Methods**. 22: 2p. 2006.

MANNISTO, M. K.; RAWAT, S.; STAROVOYTOV, V.; HAGGBLOM, M. M. *Terriglobus saanensis* sp. nov., a novel Acidobacterium isolated from tundra soil of Northern Finland. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2010.

**The Merck Index - an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 13<sup>a</sup>. Whitehouse Station, New York: MERCK & CO., INC, 2001.

MUMMEY, D.; HOLBEN, W.; SIX, J.; STAHL, P. Spatial stratification of soil bacterial populations in aggregates of diverse soils. **Microbial Ecology**. 51: 404-11. 2006.

OKAMURA, K.; KAWAI, A.; YAMADA, T.; HIRAISHI, A. *Acidipila rosea* gen. nov., sp. nov., an acidophilic chemoorganotrophic bacterium belonging to the phylum Acidobacteria. **FEMS Microbiology Letters**. 317: 138-42. 2011.

OVERMANN, J. Principles of enrichment, isolation, cultivation, and preservation of prokaryotes. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S., *et al* (Ed.). **The Prokaryotes**. New York, NY: Springer, v.1, 2006. cap. 1.4, p.58-79.

PANKRATOV, T. A.; DEDYSH, S. N. *Granulicella paludicola* gen. nov., sp. nov., *G. pectinivorans* sp. nov., *G. aggregans* sp. nov. and *G. rosea* sp. nov., novel acidophilic, polymer-degrading Acidobacteria from *Sphagnum* peat bogs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2010.

PANKRATOV, T. A.; KIRSANOVA, L. A.; KAPARULLINA, E. N.; KEVBRIN, V. V.; DEDYSH, S. N. *Telmatobacter bradus* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic facultative anaerobe from subdivision 1 of the Acidobacteria and emended description of *Acidobacterium capsulatum* Kishimoto *et al* 1991. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2011.

QUAISER, A.; OCHSENREITER, T.; LANZ, C.; SCHUSTER, S. C.; TREUSCH, A. H.; ECK, J.; SCHLEPER, C. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. **Molecular Microbiology**. 50: 563-75. 2003.

QUIRINO, B. F.; PAPPAS, G. J.; TAGLIAFERRO, A. C.; COLLEVATTI, R. G.; NETO, E. L.; DA SILVA, M. R.; BUSTAMANTE, M. M.; KRUGER, R. H. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiological Research**. 164: 59-70. 2009.

REASONER, D. J.; GELDREICH, E. E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied and Environmental Microbiology**. 49: 1-7. 1985.

SAIT, M.; DAVIS, K. E.; JANSSEN, P. H. Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum Acidobacteria occurring in soil. **Applied and Environmental Microbiology**. 72: 1852-7. 2006.

SAIT, M.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P. H. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. **Environmental Microbiology**. 4: 654-66. 2002.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 1279

SANTOS, N. B. F. D.; JÚNIOR, L. G. F.; FERREIRA, N. C. Distribuição espacial da temperatura de superfície no bioma cerrado: uma análise a partir de dados orbitais de resolução moderada, para o período de 2003 a 2008. . XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, 2011. Curitiba, Paraná, Brasil. INPE, 5 de maio. p.5965-5972.

SAUER, S.; KLIEM, M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. **Nature Reviews in Microbiology**. 8: 74-82. 2010.

SCARIOT, E. A. "Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação". **Ministério do Meio Ambiente. Brasília - DF.**: 439p. 2005.

SEELEY, H. W.; VANDERMARK, P. J.; LEE, J. J. **Microbes in action, a laboratory manual of microbiology**. 4th. New York, NY: W. H. Freeman and Company, 1995.

SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F.; LA SCOLA, B.; FOURNIER, P. E.; ROLAIN, J. M.; RAOULT, D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Infectious Diseases**. 49: 543-51. 2009.

SILVA, L. G. D.; MENDES, I. D. C.; JUNIOR, F. B. R.; FERNANDES, M. F.; MELO, J. T. D.; KATO, E. Atributos físicos, químicos e biológicos de um latossolo de cerrado em plantio de espécies florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 44: 613-620. 2009.

STACKEBRANDT, E.; EBERS, J. **Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards**. *Microbiology Today*: 152-155 p. 2006.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M. C.; NESME, X.; ROSSELLO-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H. G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 52: 1043-7. 2002.

STEVENSON, B. S.; EICHORST, S. A.; WERTZ, J. T.; SCHMIDT, T. M.; BREZNAK, J. A. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. **Applied and Environmental Microbiology**. 70: 4748-55. 2004.

STEVENSON, B. S.; SCHMIDT, T. M. Life history implications of rRNA gene copy number in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**. 70: 6670-7. 2004.

STEVENSON, L. G.; DRAKE, S. K.; SHEA, Y. R.; ZELAZNY, A. M.; MURRAY, P. R. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. **Journal of Clinical Microbiology**. 48: 3482-6. 2010.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical Reviews in Biotechnology**. 22: 33-64. 2002.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. 24: 1596-1599. 2007.

THE MERCK INDEX - AN ENCYCLOPEDIA OF CHEMICALS, D. A. B. 13<sup>a</sup>. Whitehouse Station, New York: MERCK & CO., INC, 2001

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. 22: 4673-46. 1994.

TRÜPER, H. G.; SCHLEIFER, K.-H. Prokaryote characterization and identification. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S., *et al* (Ed.). **The Prokaryotes**. 3. New York, NY: Springer, v.1, 2006. cap. 1.4, p.58-79.

VALENTINE, N.; WUNSCHHEL, S.; WUNSCHHEL, D.; PETERSEN, C.; WAHL, K. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**. 71: 58-64. 2005.

WARD, N. L.; CHALLACOMBE, J. F.; JANSSEN, P. H.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; WU, M.; XIE, G.; HAFT, D. H.; SAIT, M.; BADGER, J.; BARABOTE, R. D.; BRADLEY, B.; BRETTIN, T. S.; BRINKAC, L. M.; BRUCE, D.; CREASY, T.; DAUGHERTY, S. C.; DAVIDSEN, T. M.; DEBOY, R. T.; DETTER, J. C.; DODSON, R. J.; DURKIN, A. S.; GANAPATHY, A.; GWINN-GIGLIO, M.; HAN, C. S.; KHOURI, H.; KISS, H.; KOTHARI, S. P.; MADUPU, R.; NELSON, K. E.; NELSON, W. C.; PAULSEN, I.; PENN, K.; REN, Q.; ROSOVITZ, M. J.; SELENGUT, J. D.; SHRIVASTAVA, S.; SULLIVAN, S. A.; TAPIA, R.; THOMPSON, L. S.; WATKINS, K. L.; YANG, Q.; YU, C.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; KUSKE, C. R. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology**. 75: 2046-56. 2009.

WILSON, K. **Preparation of genomic DNA from bacteria**. New York: Wiley, John & Sons, Inc., 1989.

WOESE, C. R.; MAGRUM, L. J.; GUPTA, R.; SIEGEL, R. B.; STAHL, D. A.; KOP, J.; CRAWFORD, N.; BROSIUS, J.; GUTELL, R.; HOGAN, J. J.; NOLLER, H. F. Secondary structure model for bacterial 16S ribosomal RNA: phylogenetic, enzymatic and chemical evidence. **Nucleic Acids Research**. 8: 2275-93. 1980.

ZENGLER, K.; TOLEDO, G.; RAPPE, M.; ELKINS, J.; MATHUR, E. J.; SHORT, J. M.; KELLER, M. Cultivating the uncultured. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** 99: 15681-6. 2002.

## 9 Apêndice A - Sequências completas do gene RNAr 16S das acidobactérias cultivadas e utilizadas nas análises deste trabalho

Sequências completas do gene RNAr 16S das acidobactérias cultivadas e utilizadas nas análises deste trabalho. As sequências aqui apresentadas foram editadas e somente as sequências de alta qualidade são mostradas.

AcidoBr 20

```
GCGCACGGGTGAGTAACACGTGACTAACCTACCCTGGAGTGGGGGATAACTGAGGGAA
ACCTTAGCTAATACCGCATAACACCTACGGGTCAAAGGAGCAATTCGCTTCAGGAGGGG
GTCGCGGCCGATTAGTTAGTTGGCAGGGTAATGGCCTACCAAGACGATGATCGGTATC
CGGCCTGAGAGGGCGCACGGACACACTGGAAGTAAACACGGTCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATTTTTCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCG
TGGAGGATGAAGTCCTTCGGGACGTAAACTCCTTTTCGATCGGGACGATTATGACGGTAC
CGGAAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAGGGGGGC
GAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTTGGTAAGTCTTATG
TGAAATCTACAGGCTCAACTTGTAGTCTGCATGAGAACTGCCGGGCTTGAGTATGGGA
GAGGTGAGTGGAAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAGGAACACCT
GTGGCGAAAGCGGCTCACTGGACCATAACTGACGCTGATGCACGAAAGCTAGGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCTAGCCCTAAACGATGACTGCTTGGTGTGACGG
GTACCCAATCCCGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGCAGTCCGCCTGGGGAGTACGG
TCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTCGAAATGTTATGGACCGGAG
TGAAACATTCTTCCCGCAAGGGGCCGTAATATAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAG
CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTCAGTTG
CTACCATTTAGTTGAGCACTCTGACGAAACCGCCTCGGATAACGGGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAGTCCTCATGGCCTTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCG
GTACAAACCGTCGCAAACCCGTGAGGGGGAGCTAATCGGAAAAAGCCGGCCTCAGTTC
GGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGA
ATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACATCACGAAAGT
GGGTTGCACTAGAAGTCGGTGAGCCAACCGCAAGGAGGCAGCCGCCCAAGGT
```

## AcidoBr 23

GCGCACGGGTGAGTAACACGTGACTAACCTACCCAGGAGTGGGGGATAACTGAGGGAA  
ACCTTAGCTAATACCGCATAACACCTACGGGTCAAAGGAGCAATTCGCTTCTGGAGGGG  
GTGCGGGCCGATTAGTTAGTTGGCAGGGTAATGGCCTACCAAGACGATGATCGGTATC  
CGGCCTGAGAGGGCGCACGGACACACTGGAAGTAAACACGGTCCAGACTCCTACGG  
GAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCG  
TGGAGGATGAAATCCCTTCGGGACGTAAACTCCTTTTCGATCGGGACGATTATGACGGTAC  
CGGAAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAGGGGGGC  
GAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTTGTAAGTCTGAT  
GTGAAATCTATGGGCTCAACTCATAGTCTGCATCGGAAACTGCCGGGCTTGAGTGTGG  
GAGAGGTGAGTGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAGGAACAC  
CTGTGGCGAAAGCGGCTCACTGGACCATAACTGACGCTGATGCACGAAAGCTAGGGGA  
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCTAGCCCTAAACGATGACTGCTTGGTGTGAC  
GGTACCCAATCCCGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGCAGTCCGCCTGGGGAGTAC  
GGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT  
GTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGCTCGAAATGTACAGGAATCC  
AGTGAAACATTGGCGTCCCGCAAGGGACCTGTATATAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC  
AGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTCAGT  
TGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTGACGAAACCGCCTCGGATAACGGGGAGGAAGGTG  
GGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCTTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGC  
CGGTACAAACCGTCGCAAACCCGTGAGGGGGAGCTAATCGGAAAAGCCGGCCTCAGT  
TCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA  
GAACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACATCACGAAA  
GTGGGTTGCACTAGAAGTCGGTGAGCCAACCGCAAGGAGGCAGCCGCCCAAGGT

## AcidoBr 39

GCGCACGGGTGAGTAACACGTGAATGATCTACCTCCGAGTGGGGAATAACCTAGAGAA  
ATCTGGGCTAATACCGCATAACACTTACGAGTCAAAGCAGCAATGCGCTTGGAGAGGAG  
TTCGCGGGCCGATTAGTTAGTTGGCGGGGTAATGGCCCACCAAGACGATGATCGGTATC  
CGGCCTGAGAGGGCGCACGGACACACTGGAAGTAAACACGGTCCAGACTCCTACGG  
GAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCG  
TGGAGGATGAAATCCCTTGGGATGTAAACTCCTTTTCGATCGGGACGATTATGACGGTAC  
CGGAAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAGGGGGGC  
AAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTGACAAGTCTGAT

GTGAAATCTCTGGGCTCAACTCAGAGTCTGCATTAGAAACTGTCGGGCTTGAGTATGGG  
AGAGGTGCGTGGAATTTCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGAAGGAACACC  
TGTGGCGAAAGCGGCGCACTGGACCATAACTGACGCTGAGGGCGCGAAAGCTAGGGGA  
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCTAGCCCTAAACGATGATTGCTTGGTGTGAC  
AGGTACCCAATCCTGTTCGTGCCGAAGCTAACGCGATAAGCAATCCGCCTGGGGAGTAC  
GGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT  
GTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTCGAAATGTAGTGGACCG  
GGGTAGAAATATCCCTTCCAGCAATGGGCTGCTATATAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC  
AGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTCCAGT  
TGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTGGCGAAACCGCCTCGGATAACGGGGAGGAAGGTG  
GGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCTTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGC  
CGGTACAAACCGCTGCAAACCCGTGAGGGGGAGCTAATCGGAAAAAGCCGGCCTCAGT  
TCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCA  
GCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC

AcidoBr 60

GCGCACGGGTGAGTAACACGTGACTAACCTACCCTGGAGTGGGGGATAACTGAGGGAA  
ACCTTAGCTAATACCGCATAACACCTACGGGTCAAAGGAGCAATTCGCTTCAGGAGGGG  
GTCGCGGCCGATTAGTTAGTTGGCGGGTAATGGCCCACCAAGACGATGATCGGTATC  
CGGCCTGAGAGGGCGCACGGACACACTGAACTGAAACACGGTCCAGACTCCTACGG  
GAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCG  
TGGAGGATGAAGTACTTCGGTACGTAACTCCTTTGATCGGGACGATTATGACGGTAC  
CGAGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAGGGGGGC  
GAGCGTTGTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTTGGTAAGTCTGAT  
GTGAAATCTATGGGCTCAACTCATAGTCTGCATCGGAAACTGCCGGGCTTGAGTGTGG  
GAGAGGTGAGTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAGGAACAC  
CTGTGGCGAAAGCGGCTCACTGGACCATAACTGACGCTGATGCACGAAAGCTAGGGGA  
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCTAGCCCTAAACGATGACTGCTTGGTGTGAC  
GGGTACCCAATCCCGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGCAGTCCGCCTGGGGAGTAC  
GGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT  
GTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTCGAAATGCTATGGACCG  
GGGTGGAACATCCCTTCCCCGCAAGGGGGCCGTAGTATAGGTGCTGCATGGCTGTCGT  
CAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTACTTCCA  
GTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTGGCAGAACCGCCTCGGATAACGGGGAGGAAGG  
TGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCTTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATG  
GCCGGTACAAACCGTCGCAAACCCGTGAGGGGGAGCTAATCGGAAAAAGCCGGCCTC

AGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGA  
TCAGAATACCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC

AcidoBr 158

GCGCACGGGTGAGTAACACGTGACTAACCTACCCTCGAGTGGGGAATAACTTCGGGAA  
ACCGAGGCTAATACCGCATAATACCCACGGGTCAAAGGAGAAATCCGCTTGAGGAGGG  
GGTCGCGGCCGATTAGTTAGTTGGCAGGGTAATGGCCTACCAAGACGATGATCGGTAT  
CCGGCCTGAGAGGGCGCACGGACACACTGGAACCTGAAACACGGTCCAGACTCCTACG  
GGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGC  
GTGGAGGATGAAGTCTTCCGGGACGTAAACTCCTTTTCGATCGGGACGATTATGACGGTA  
CCGGAAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAGGGGGG  
CGAGCGTTGTTCCGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTTGGTAAGTCTGA  
TGTGAAATCTATGGGCTCAACTCATAGTCTGCATCGGAAACTGCCGGGCTTGAGTGTGG  
GAGAGGTGAGTGGAAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAGGAACAC  
CTGTGGCGAAAGCGGCTCACTGGACCACAACCTGACGCTGATGCACGAAAGCTAGGGGA  
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCTAGCCCTAAACGATGACTGCTTGGTGTGAC  
GGGTACCCAATCCCGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGCAGTCCGCCTGGGGAGTAC  
GGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT  
GTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTCGAAATGCTATGGACCG  
GGGTAGAAATATCCCTTCCCCGCAAGGGGCCGTAGTATAGGTGCTGCATGGCTGTCGT  
CAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTACCCCCA  
GTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTGGTGGAAACCGCCTCGGATAACGGGGAGGAAGG  
TGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCTTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATG  
GCCGGTACAAACCGTCGCAAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCGGAAAAGCCGGCCTC  
AGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGA  
TCAGAACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACATCACG  
AAAGTGGGTTGCACTAGAAGTCGGTACGCCAACC GCAA

*Acidobacterium capsulatum* ATCC 51196

AGAATCAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACAAGAAAGGGACTTCGG  
TCCTGAGTACAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGACTAACCTACCCTCGAGTGGGG  
AATAACTTCGGGAAACCGAGGCTAATACCGCATAATACCCACGGGTCAAAGGAGCAATT  
CGCTTGAGGAGGGGGTCGCGGCCGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAATGGCCCACCAAG  
GCAGTGATCGGTATCCGGCCTGAGAGGGCGCACGGACACACTGGAACCTGAAACACGG  
TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCGCAATGGGGGAAACCCTGAC  
GCAGCAACGCCGCGTGGAGGATGAAGTCTCTTGGGACGTAAACTCCTTTTCGATCGGAA

CGATTATGACGGTACCGGAAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGT  
AATACGAGGGGGGCGAGCGTTGTTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGT  
TCGGTAAGTTTGATGTGAAATCTTCGGGCTCAACTCGAAGTCTGCATCGAAAAGTCCG  
GGCTTGAGTGTGGGAGAGGTGAGTGAATTTCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA  
TCGGAAGGAACACCTGTGGCGAAAGCGGCTCACTGGACCACAAGTACGCTGATGCAC  
GAAAGCTAGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCTAGCCCTAACGATGAT  
CGCTTGGTGTGGCGGGTACCCAATCCCGTCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGCGATCC  
GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA  
AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTCGAA  
ATGTAGTGGACCGGGGTAGAAATATCCCTTCCCCGCAAGGGGCTGCTATATAGGTGCT  
GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCA  
ACCCTTATTGCCAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTGGTGAGACCGCCTCGGATAA  
CGGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCTTTATGTCCAGGGCTACAC  
ACGTGCTACAATGGCCGGTACAAACCGCCGCAAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCGGA  
AAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGC  
TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC  
CCGTCACATCACGAAAGTGGGTCTACTAGAAGCGGGTGAGCCAACCGTAAGGAGGCA  
GCCTTCCAAGGTGTGATTCATGATTGGGGTG