



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN).**

BIOTECNOLOGIA

**ISOLAMENTO E CULTIVO DE PROCARIOTOS OXIDADORES DE AMÔNIA A
PARTIR DE AMOSTRAS DO SOLO DO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU**

SAMUEL DOS SANTOS RIBEIRO

Foz do Iguaçu
2024



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN).**

BIOTECNOLOGIA

**ISOLAMENTO E CULTIVO DE PROCARIOTOS OXIDADORES DE AMÔNIA A PARTIR
DE AMOSTRAS DO SOLO DO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU**

SAMUEL DOS SANTOS RIBEIRO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Rafaella Costa Bonugli dos Santos


Foz do Iguaçu
2024

SAMUEL DOS SANTOS RIBEIRO


ISOLAMENTO E CULTIVO DE PROCARIOTOS OXIDADORES DE AMÔNIA A PARTIR DE AMOSTRAS DO SOLO DO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.


BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **RAFAELLA COSTA BONUGLI SANTOS**
Data: 27/02/2025 14:06:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rafaella Costa Bonugli dos Santos
UNILA

Documento assinado digitalmente
 **NATHALIA CORREA CHAGAS DE SOUZA**
Data: 27/02/2025 14:12:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Nathália Corrêa Chagas de Souza
UNILA

Documento assinado digitalmente
 **CRISTIAN ANTONIO ROJAS**
Data: 28/02/2025 14:04:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas
UNILA

Foz do Iguaçu, 15 de outubro de 2024

RESUMO

O ciclo biogeoquímico do nitrogênio, onde ocorre ampla participação de bactérias e arqueas, desempenha um papel fundamental nos ecossistemas. Em uma das partes desse ciclo, a oxidação de amônia, ainda há vastas lacunas no entendimento do processo devido à falta de microrganismos isolados. A identificação e o isolamento de novos microrganismos participantes do processo é crucial para a compreensão das suas funções ecológicas e desenvolvimento de tecnologias. Visando ampliar o conhecimento sobre a diversidade procariótica e identificar novos isolados com potencial biotecnológico, foram coletadas amostras de solo em diferentes pontos do Parque Nacional do Iguaçu em Foz do Iguaçu/PR. Utilizando uma estratégia de enriquecimento com posterior cultivo em meio sólido diferenciado à base de agarose e amônia, que possibilita o isolamento diferencial de microrganismos com as propriedades investigadas, foram isolados e preservados 16 microrganismos procariontes. Entre os isolados, quatro foram identificados como bactérias dos gêneros *Cupriavidus* e *Phreatobacter*, microrganismos de difícil isolamento e/ou pouco estudados. Esses resultados demonstram a eficácia da metodologia empregada e a riqueza da biodiversidade microbiana presente no ambiente estudado. Os isolados foram depositados na Coleção de Cultura de Micro-organismos de Importância Biotecnológica e Ambiental da UNILA, tornando-se disponíveis para a continuidade das análises filogenéticas dos demais isolados, além de futuros estudos e aplicações.

Palavras-chave: Floresta Estacional Semidecidual; Bactérias Oxidadoras de Amônia; Arqueas Oxidadoras de Amônia; Ciclo do Nitrogênio; Biotecnologia.

ABSTRACT

The nitrogen biogeochemical cycle, where bacteria and archaea play a significant role, is fundamental to ecosystems. In one part of this cycle, ammonia oxidation, there are still vast gaps in the understanding of the process due to the lack of isolated microorganisms. The identification and isolation of new microorganisms involved in the process is crucial for understanding their ecological functions and developing technologies. Aiming to expand knowledge about prokaryotic diversity and identify new isolates with biotechnological potential, soil samples were collected at different points of the Iguaçu National Park in Foz do Iguaçu/PR. Using an enrichment strategy with subsequent cultivation in a differentiated solid medium based on agarose and ammonia, which enables the differential isolation of microorganisms with the investigated properties, 16 prokaryotic microorganisms were isolated and preserved. Among the isolates, four were identified as bacteria of the genera *Cupriavidus* and *Phreatobacter*, microorganisms that are difficult to isolate and/or little studied. These results demonstrate the effectiveness of the methodology employed and the richness of microbial biodiversity present in the studied environment. The isolates were deposited in the Culture Collection of Microorganisms of Biotechnological and Environmental Importance of UNILA, making them available for the continuation of phylogenetic analyzes of the other isolates, as well as for future studies and applications.

Key words: Semideciduous Seasonal Forest; Ammonia-oxidizing bacteria; Ammonia-oxidizing archaea; Nitrogen cycle; Biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação simplificada do ciclo do nitrogênio.....	18
Figura 2 - Representação atual resumida da árvore da vida, onde os eucariotos ficam incluídos dentro do domínio Archaea.....	21
Figura 3 - Exemplos de morfologias distribuídas pelo domínio Archaea.....	23
Figura 4 - Diferentes morfologias de bactérias.....	25
Figura 5 - Pontos de coleta(P), do 1 ao 4.....	31
Figura 6 - Mapa evidenciando os pontos de coleta.....	31
Figura 7 - Placas de Petri com meio Arq S inoculadas e com crescimento ativo, mas de difícil visualização em diferentes fundos.....	35
Figura 8 - Crescimento indesejado nos enriquecimentos.....	36
Figura 9 - Comparação de placas novas (à esquerda) com placas antigas (à direita) durante um repique.....	37
Figura 10 - Visão através de estereomicroscópio de um meio ativo com uma semana (à esquerda) e um meio degradado (à direita).....	38
Figura 11 - Comparação de crescimento de amostra da boca em meio Czapek após 24 horas (à esquerda), mostrando crescimento notável, com meio Arq S após 48 horas (à direita), sem qualquer indício de crescimento.....	39
Figura 12 - Síntese dos resultados obtidos a partir da primeira semana do enriquecimento.....	40
Figura 13 - Síntese dos resultados obtidos a partir da segunda semana do enriquecimento.....	41
Figura 14 - Síntese dos resultados obtidos a partir da segunda semana do enriquecimento.....	42
Figura 15 - Distribuição da quantidade de placas totais com culturas puras.....	43
Figura 16 - Colônias invisíveis a olho nu visualizadas em estereomicroscópio (marcação verde; superior) em comparação à visão nu em diferentes níveis focais de um aparelho celular (centro e inferior).....	44
Figura 17 Diferentes aspectos da placa inoculada de acordo com a incidência de luz, com exemplos de colônias marcadas em vermelho.	44
Figura 18 - Exemplos de morfologia celular e coloração de gram(inconclusivo à esquerda	

e positivo à direita), mostrando células muito pequenas de difícil certeza do formato, às vezes sendo possível identificar (coco à esquerda) após magnificação através de lente telemacro de aparelho celular em conjunto com distorção focal.....45

Figura 19 - Resultado da morfologia celular das placas analisadas, mostrando que a maioria das células analisadas possuíam um aspecto de difícil compreensão.....46

Figura 20 - Distribuição dos isolados em relação ao ponto de coleta.....47

Figura 21 - Árvore filogenética (neighbor-joining, Kimura 2-parâmetros) baseada em sequências do gene 16S rRNA comparando as sequências dos isolados com sequências obtidas (Genbank) pela análise de ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico (BLAST). Os valores de porcentagem de bootstrap de 1.000 réplicas estão localizados nos nós da árvore.48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos nitrogenados envolvidos no ciclo do nitrogênio.....	17
Tabela 2 - Síntese das identificações obtidas.....	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 A BIODIVERSIDADE NO SOLO E O CICLO DO NITROGÊNIO	17
3.2 O DOMÍNIO ARCHAEA	20
3.2.1 O Filo Nitrososphaerota	24
3.3 O DOMÍNIO BACTÉRIA	25
3.3.1 As Bactérias Oxidadoras de Amônia	26
3.4 ARQUEAS OXIDADORAS DE AMÔNIA E BACTÉRIAS OXIDADORAS DE AMÔNIA NA BIOTECNOLOGIA	27
4 METODOLOGIA	28
4.1 PROJETO PILOTO	28
4.1.1 Coleta de Amostras do Solo	28
4.1.2 Enriquecimento da Amostra	28
4.1.3 Isolamento e Cultivo em Meios Sólidos	28
4.1.4 Caracterização Microscópica	29
4.2 PROJETO OFICIAL	29
4.2.1 Coleta De Amostras Do Solo	30
4.2.2 Enriquecimento das amostras	32
4.2.3 Isolamento e Cultivo em Meio Sólido	32
4.2.4 Purificação e Preservação	33
4.2.5 Caracterização Molecular	33
4.2.5.1 Extração do DNA	33
4.2.5.2 Ensaio de PCR e sequenciamento	34
4.2.5.3 Análises de bioinformática	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 PROJETO PILOTO	35
5.2 COLETA, MEIOS DE CULTURA E ISOLAMENTO	36
5.3 PURIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS E MORFOLOGIA CELULAR	39
5.4 PRESERVAÇÃO, EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO GENÉTICO.	46
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
7 REFERÊNCIAS	53
8 APÊNDICES	65

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer à Santa Trindade: Alice, Camila e Olívia. Essas três professoras do IFF foram as primeiras pessoas que eu senti fortemente que acreditavam em mim e no meu futuro, e foram elas que me deram força para correr atrás de uma vida melhor em um lugar tão distante da minha cidade. Ainda no IFF, meus grandes amigos Allan, Thiago e Leo, formam uma outra trindade e continuamente me fazem perceber a alegria nas diferenças e que, mesmo com objetivos tão distintos, ainda somos unidos pelo destino. Mesmo a experiência acadêmica do IFF não tendo sido das melhores para mim, diversos outros professores e amizades continuam me iluminando até hoje. Ainda assim, trancar minha vida ao IFF e agora à UNILA me privou ou me afastou de diversas outras amizades. Entre as que permaneceram, tenho um agradecimento especial à Jéssica, que sempre me acolheu nos meus retornos.

Já na UNILA, diversos amigos e professores também me ajudaram nessa longa jornada e merecem um agradecimento especial por terem me aguentado durante o poço de estresse que eu estive nesse TCC. Agradeço à minha orientadora, Professora Rafaella, pelo tempo investido na orientação deste projeto. Agradeço a Professora Ana Alice, que não me expulsou do Ecologia e Saúde depois de eu ter passado meses faltando reunião por causa dos experimentos, e também por ter colaborado muito com a melhora da minha escrita acadêmica. Agradeço também à Professora Nath, que, sendo sincero, foi a única barreira que estava me impedindo (fisicamente e psicologicamente) de colocar as placas de Petri na luz UV. Dentre meus amigos que colaboraram no TCC, agradeço inicialmente à minha companheira de laboratório, Quémili, que esteve comigo durante as dificuldades e me ajudou com algumas miscelâneas do laboratório. Os momentos de fofoca e desabafo com meus colegas de biotecnologia, em especial Daiane, Heveli, Laura e Matheus, também foram essenciais nesse momento. Meus colegas do curso de música da UNILA, incluindo os professores Marcelo e Danilo, que tiveram que me aguentar nos ensaios para os recitais enquanto eu cuspiam um monólogo sobre arqueas e microbiologia em geral ao invés de ensaiar as peças como seria o indicado, também merecem um agradecimento. E, é claro, não poderia esquecer da minha família adotiva da UNILA: Meu orgulho e minha filha, Maria; e meu pilar e minha mãe, Bela. O limite textual desse agradecimento não é o suficiente para demonstrar a importância da Bela na minha vida durante todos os meus anos da UNILA e eu vou sentir falta de ir tomar café na casa dela após passar o dia inteiro sem comer no laboratório (às vezes por falta

de dinheiro e às vezes por falta de tempo). Por fim, agradeço minha família, no qual minha relação melhorou muito nos últimos anos e que me apoia na medida do possível. Em especial: minha mãe, Rita, e minha tia, Andréa, no qual não mediram forças para apoiar minhas finanças aqui. E, é claro, o melhor membro da família: meu cachorrinho, Bradock, que é minha felicidade diária. Sem mais delongas, agradeço a mim mesmo por, no fundo, ter esperança.

1 INTRODUÇÃO

O surgimento e a perpetuação da vida no planeta Terra têm sido motivo de amplo e complexo debate, em especial considerando que sua forma original pode ter sido tão efêmera e sensível que nunca descendeu (Wächtershäuser, 1988)¹. Apesar disso, a vida existir até o momento garante que sua adaptação para a transferência de informações genéticas criou um legado imperecível há mais de quatro bilhões de anos atrás (Martin, 2008). Desde então, diversas alterações abióticas e bióticas garantiram que o planeta desenvolvesse os mais variados ecossistemas com extensa biodiversidade. A partir do surgimento da vida nas profundezas abissais, explosões de vidas próximas da superfície oceânica prosperaram (Mallof, 2010), só para, então, serem quase completamente dizimadas (Briggs, 1989), possivelmente por um único gênero de organismos unicelulares (Rothman *et al.*, 2014) e, por fim, rastejarem para fora dos confins marítimos e estabelecerem novas e inovadoras formas diante do solo terrestre (Wellman, 2000).

As nuances escondidas no trajeto da evolução terrestre ainda se encontram parcialmente enterradas em camadas tão hadais quanto sua contraparte oceânica, mas a vida perpetuada nos tempos presentes sustenta um equilíbrio seguindo o princípio *ex nihilo nihil fit*² entre vida, morte e fatores abióticos. Esse equilíbrio manifesta-se a partir de diferentes representações dos domínios da vida celular, como animais, bactérias, fungos, plantas, arqueas e protistas, assim como estruturas virais e sub-virais.

Nesse equilíbrio, processos como o ciclo do nitrogênio, realizado por microrganismos, são cruciais para a manutenção da vida humana e do ecossistema terrestre como um todo. O nitrogênio é um elemento naturalmente abundante e essencial para todos os organismos vivos, sendo necessário para a biossíntese de componentes celulares importantes, como proteínas e ácidos nucleicos, mas que não está naturalmente biodisponível (Kuypers *et al.*, 2018).

Do ponto de vista biogeoquímico, os microrganismos são considerados essenciais na disponibilização do nitrogênio assimilável pelas plantas. Historicamente, considerava-se que as bactérias eram os únicos organismos responsáveis pela

¹ A frase refere-se às teorias relacionadas aos organismos que eram capazes de realizar processos biológicos autônomos, mas não de passar a informação genética adiante, como abordado por Wächtershäuser

² “Nada surge do nada”

transformação no nitrogênio atmosférico, principalmente devido ao estudo da associação desses organismos com as leguminosas (Zahran, 1999). Porém, análises mais recentes expandiram o conhecimento sobre o ciclo em outros ambientes e evidenciaram a importância de outros microrganismos de vida livre no ambiente, como as arqueas no oceano aberto e até mesmo no solo (DeLong, 1992). A dificuldade no isolamento e cultivo de arqueas impossibilita a compreensão detalhada da função destes organismos, e a proporção de bactéria/arquea disponível para estudo em cultura isolada chega próximo de 50:1 na coleção de microrganismos mais diversa do mundo, a *Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*. No Brasil, até mesmo uma das maiores coleções nacionais como a Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria – CBMAI, não possui qualquer exemplar de arquea disponível para distribuição (SpeciesLink, 2024).

Adicionalmente, diversos grupos bacterianos permanecem desconhecidos e os já existentes não são perfeitamente conhecidos e/ou não estão disponíveis, restringindo estudos e aplicações biotecnológicas na área. Diante disso, o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas que permitam o cultivo seletivo de bactérias e arqueas oxidadoras de amônia torna-se essencial para aprofundar o conhecimento sobre sua função no ambiente. Assim, o objetivo deste trabalho, ao focar no aprimoramento de métodos de seleção e cultivo de procariotos oxidadores de amônia, busca contribuir diretamente para a superação dessa lacuna, ampliando a disponibilidade de organismos para estudos e aplicações.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver técnicas e estratégias para o cultivo seletivo, seguido de isolamento e preservação de microrganismos procariotos capazes de oxidar amônia, a partir de amostras do solo do Parque Nacional do Iguaçu.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar um projeto piloto para avaliar a plausibilidade da realização do projeto na Universidade Federal da Integração Latino-Americana - UNILA.
- Coletar amostras do solo do Parque Nacional do Iguaçu em profundidade aeróbica.
- Enriquecer as amostras coletadas em um meio baseado em amônia.
- Cultivar as amostras em um meio capaz de permitir o cultivo seletivo.
- Isolar as linhagens.
- Preservar as linhagens isoladas.
- Extrair o DNA das linhagens obtidas.
- Sequenciar o DNA extraído.
- Realizar a filogenia dos microrganismos encontrados.
- Depositar os isolados na CCMIBA.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A BIODIVERSIDADE NO SOLO E O CICLO DO NITROGÊNIO

O nitrogênio, um dos elementos mais abundantes na Terra, desempenha um papel essencial na formação de diversas moléculas, como proteínas e ácidos nucleicos. No ciclo do nitrogênio, o elemento químico circula pela atmosfera, água, solo e organismos vivos, assumindo diferentes formas e atrelado a diferentes outros elementos e compostos (Kuypers *et al*, 2018), como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1 - Compostos nitrogenados envolvidos no ciclo do nitrogênio.

Composto	Amônia	Nitrito	Nitrato	Óxido Nitroso	Óxido Nítrico	Gás Nitrogênio
Fórmula	NH_4^+ ou NH_3	NO_2^-	NO_3^-	N_2O	NO	N_2
Estado de oxidação do nitrogênio	-3	+3	+5	+1	+2	0

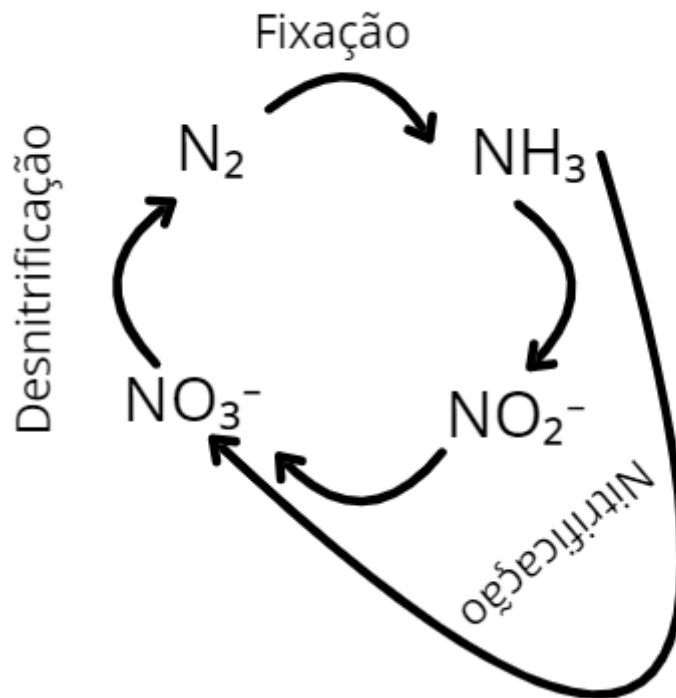
Fonte: Autoria própria.

Das inúmeras formas assumidas pelo nitrogênio, apenas três são absorvidas pelas plantas: amônia, nitrito e nitrato, sendo, este último, o único plenamente eficiente. Neste contexto, para que o ciclo ocorra, em especial considerando o benefício mútuo para microrganismos e plantas superiores, quatro processos envolvendo o nitrogênio são cruciais: fixação, nitrificação, assimilação e desnitrificação. Durante a fixação, microrganismos convertem o nitrogênio atmosférico majoritariamente em amônia, que então, durante a nitrificação, é convertido em nitrito e nitrato (Wagner, 2011), sendo o último absorvido pelas plantas por diversos transportadores baseados em gradiente de prótons durante o processo de assimilação (Tischner, 2000). Para completar o ciclo, ocorre a redução de nitrito e outros compostos nitrogenados em nitrogênio atmosférico (Christopher *et al*, 2008).

Dentro do ciclo do nitrogênio, o processo de nitrificação ocorre em duas diferentes etapas: na primeira, a amônia disponível no ambiente é oxidada em nitrito,

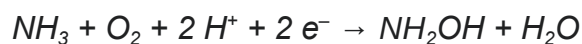
enquanto na segunda etapa a oxidação do nitrito resulta em nitrato (Figura 1). A primeira etapa costuma ser o fator limitante do processo e ocorre através de dois grupos de organismos: Bactérias Oxidadoras de Amônia (BOA) e Arqueas Oxidadoras de Amônia (AOA) através de um processo comumente aeróbico (Konneke, 2014).

Figura 1 - Representação simplificada do ciclo do nitrogênio

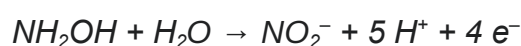


Fonte: Adaptado de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nitrogen_cycle.jpg

O grupo BOA compreende o filo Pseudomonadota, nas classes Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria, destacando-se os gêneros *Nitrosococcus* e *Nitrosomonas* (Hatzenpichler, 2012). A oxidação de amônia é possível devido a presença de genes codificantes de duas enzimas: Amônia monooxigenase (AMO) e hidroxilamina oxidoreductase (HAO). AMO atua catalisando a oxidação da amônia para hidroxilamina (NH_2OH) através da equação 1, que então prossegue para a atuação da HAO na equação 2 (Cabaleiro, 2019).



Equação 1



Equação 2

O grupo AOA é representado pelo filo Nitrososphaerota, cujos microrganismos possuem uma enzima análoga à AMO, mas codificada por genes diferentes, e uma diferente via metabólica substituta da ação da HAO (Vajrjala, 2013), que requer uma concentração muito menor de oxigênio no substrato para terem a mesma eficiência das BOAs e, por consequência, podem ser mais relevantes na nitrificação do que as BOAs em uma vasta gama de cenários, apesar de perecerem em comparação às BOAs em outros casos (Leininger *et al*, 2006). Em geral, ambos os grupos, BOA e AOA, trabalham em conjunto durante o processo de nitrificação, apesar do estudo com as arqueas ainda carecer de muitas informações essenciais (Prosser, 2008).

O estudo de Leininger e colaboradores (2006), demonstrou que as AOA são frequentemente mais abundantes e ativas do que suas contrapartes bacterianas em 12 tipos diferentes de solo, verificando que as cópias do gene *amoA* das arqueas eram até 3.000 vezes mais abundantes do que os genes *amoA* das bactérias, indicando a predominância das arqueas na oxidação da amônia. Essa predominância é crucial para o ciclo do nitrogênio, pois influencia a disponibilidade de nitrato, um nutriente essencial para o crescimento das plantas, e afeta a qualidade da água subterrânea por meio da lixiviação de nitrato.

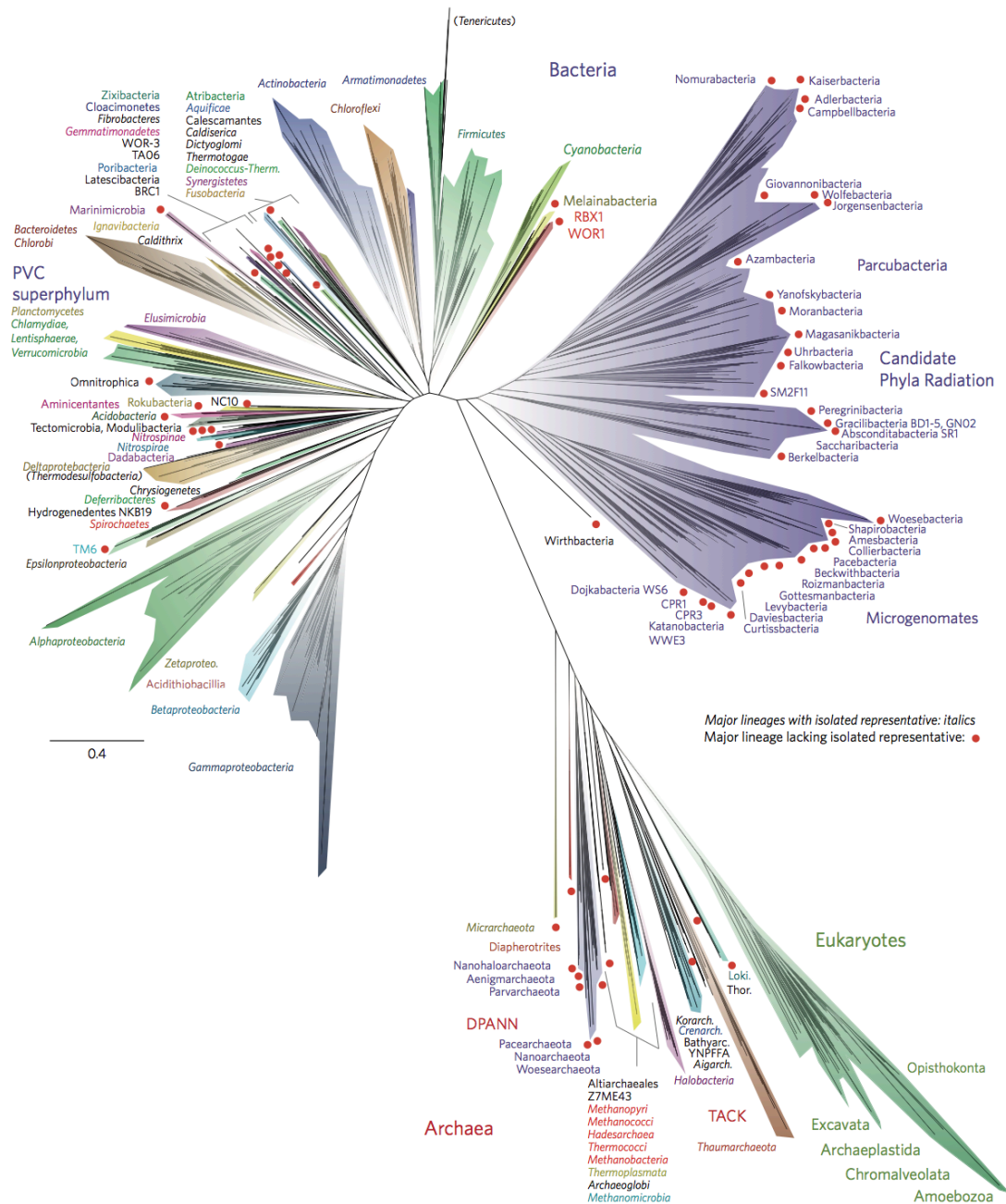
A biodiversidade do solo é fundamental para manter as funções e os serviços do ecossistema. Contudo, fatores ambientais, como a salinidade do solo, o pH e a disponibilidade de nutrientes, influenciam significativamente na estrutura e na função da comunidade microbiana. Na Bacia de Tarim, por exemplo, a salinidade do solo molda as comunidades microbianas, com as arqueias halofílicas desempenhando um papel fundamental na oxidação da amônia e em outros processos de reciclagem de nitrogênio (Ren *et al*, 2018). Da mesma forma, em cultivos vegetais em estufa, o cultivo contínuo altera a estrutura da comunidade microbiana, afetando a abundância e a atividade dos microrganismos oxidadores de amônia (Li *et al*, 2022).

A perda da diversidade microbiana pode afetar significativamente o ciclo do nitrogênio. Por exemplo, uma redução na diversidade de desnitrificadores pode levar a uma diminuição na atividade de desnitrificação, que é crucial para remover o excesso de nitrogênio do solo, e pode resultar no acúmulo de nitrogênio no solo, levando a problemas como acidificação do solo e desequilíbrios de nutrientes (Philippot *et al*, 2013).

3.2 O DOMÍNIO ARCHAEA

As arqueas são seres unicelulares sem núcleo celular e, portanto, organismos procariotos, com morfologia, ao alcance limitado da tecnologia humana atual, semelhante ao domínio Bacteria (Pace, 2006). A semelhança ao alcance da visão humana expandida pelos microscópios mostrou-se uma falha grande o suficiente para chamá-las de “Arqueobactérias” por um extenso período (Woese, 1977), colocando-as como organismos arcaicos ancestrais às bactérias e que resistiam a condições extremas semelhantes ao início da vida na Terra. O avanço da biologia molecular, porém, permitiu esclarecer inicialmente que as arqueas eram completamente separadas das bactérias e eucariotos (Woese, 1990), só para então uma revolução indicar que as arqueas, apesar de separadas das bactérias, podiam estar muito mais intrinsecamente ligadas aos eucariotos do que parecia (Spang, 2015), como pode ser visto na figura 2:

Figura 2 - Representação atual resumida da árvore da vida, onde os eucariotos ficam incluídos dentro do domínio Archaea.



Fonte: Hug *et al*, 2016.

A partir da exploração da região conhecida como Castelo de Loki, um grupo de arqueas (atualmente denominado Lokiarchaeota) revelou que os minúsculos seres possuíam uma quantidade de proteínas e outras estruturas moleculares que pensava-se serem exclusivas dos eucariotos. Essa descoberta impulsionou diversas pesquisas subsequentes, culminando na identificação do superfilo ASgard (representado na figura 2 por Loki. e Thor.) reforçando a hipótese de que os eucariotos

teriam definitivamente se originado a partir de um ramo da árvore da vida das arqueas (Xie, 2021).

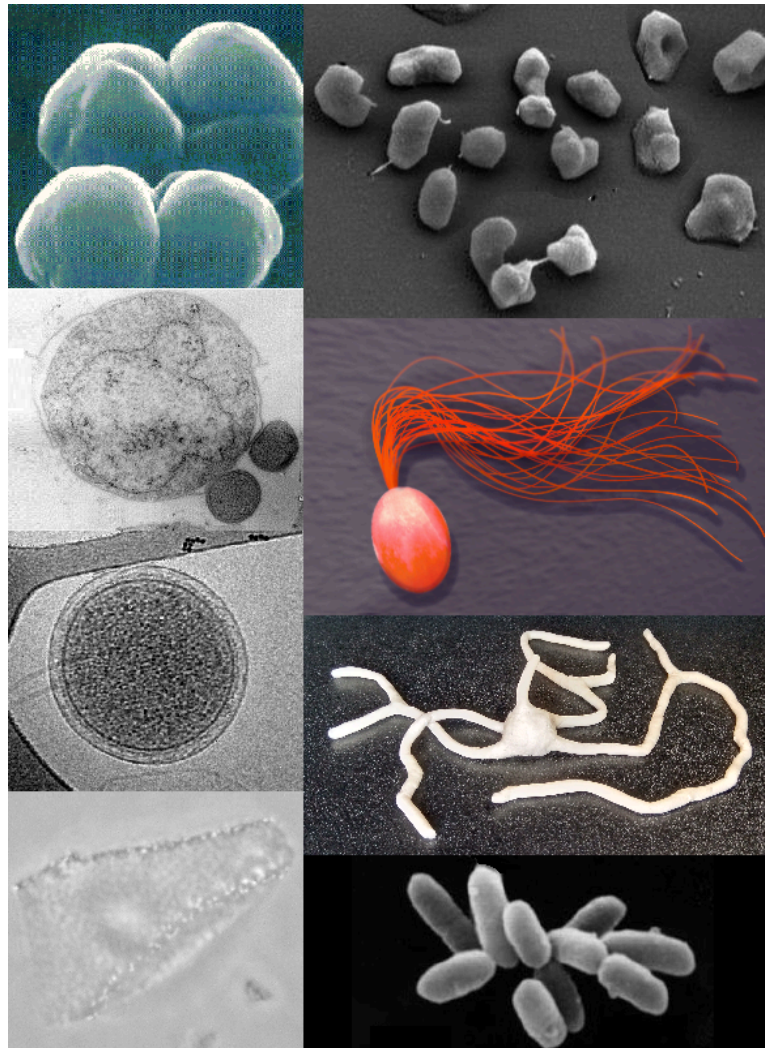
Essa teoria proposta reestrutura a ideia da endossimbiose, onde um ancestral eucarioto teria incorporado uma bactéria em sua célula sem fagocitar, formando a mitocôndria e, posteriormente, outras estruturas semelhantes (Callier, 2022). Apesar do superfilo ter recebido mais destaque por essa ocasião, outros filós além de ASGARD possuem enorme relevância na evolução do planeta e nas tecnologias humanas, de formas boas e ruins para outros organismos.

O gênero de arqueas *Methanosarcina* do filo Euryarchaeota, por exemplo, hoje em dia é atrelado à produção de biogás pelos humanos em biorreatores e possui população controlada na natureza. Porém, uma teoria proposta por Rothman *et al.* (2014) indica que sua reprodução exponencial através da aquisição de uma nova via metabólica, por transferência de genes, permitiu ao procarioto consumir rapidamente vastos depósitos de carbono orgânico em sedimentos marinhos, levando a um ambiente terrestre euxínico, que matou cerca de 90% das espécies do mundo durante o evento conhecido como Extinção do Permiano-Triássico.

Diversas outras tecnologias derivadas de arqueas também foram viabilizadas pelo avanço da biotecnologia, muitas delas já aplicadas, enquanto outras ainda passíveis de estudos conclusivos (Pfeifer, 2021). Dentre os exemplos, a enzima Pfu polimerase, descoberta da arquea *Pyrococcus furiosus* e posteriormente recombinante em *Escherichia coli* (Littlechild, 2015) é vastamente usada na amplificação do DNA, a partir da reação em cadeia da polimerase (PCR moderno), enquanto as celulases, xilanases e lacases, respectivamente provenientes das arqueas dos gêneros *Haloarcula*, *Pyrodictium* e *Haloferax* (Amoozegar, 2019), possuem expectativas de otimizar os processos envolvendo a produção de biocombustíveis (Kasirajan, 2015).

As arqueas possuem estruturas morfológicas muito semelhantes ao domínio Bacteria, assumindo normalmente formas de cocos ou bacilos, apesar de também possuíram inúmeros outros formatos exclusivos ao domínio, como é o caso da célula quadrada da *Haloquadratum waslbyi* (Stoeckenius, 1981), exemplificados na figura 3:

Figura 3 - Exemplos de morfologias distribuídas pelo domínio Archaea



Fonte: Criado por Maulucioni, 2020³. Disponível em: <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Archaea.png>>

As arqueas estão universalmente presentes em todos os biomas, em parte pela sua capacidade de utilizar diferentes fontes de energia (compostos orgânicos, luz, amônia, íons metálicos, gás hidrogênio, enxofre, entre outros), parte pela alta taxa de divisão assexual (por fissão binária, fragmentação e blastogênese) e parte pela tolerância aos mais diversos e extremos habitats (Moissi-Eichinger, 2017).

Apesar da capacidade de viverem em diferentes ambientes extremos,

³ Na colagem, à esquerda e de cima para baixo estão representadas: *Methanosarcina barkeri*, *Ignicoccus hospitalis*, ARMAN (abreviatura de *Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms* ou Nanoorganismos Acidofílicos Arqueanos da Mina Richmond) e *Haloquadratum walsbyi*. À direita: *Methanohalophilus mahii*, *Pyrococcus furiosus*, *Protheoarchaeum syntrophicum* e *Halobacterium* sp. linhagem NRC-1.

caracterizando alguns grupos como extremófilos, vários outros grupos são encontrados em sua plenitude em ambientes mesófilos, como em corpos de animais, em vida livre nos mares e, especialmente, no solo, com muitas arqueas sendo responsáveis por parte da manutenção de importantes ciclos biogeoquímicos, como as AOA no ciclo do nitrogênio (Hatzenpichler, 2012).

3.2.1 O Filo Nitrososphaerota

Considerando o pensamento inicial de que arqueas só existiam em ambientes extremos, é recente a noção da abundância de arqueas em ambientes mesófilos (DeLong, 1998). A partir desse entendimento, muitos novos táxons foram descobertos nos mais diversos ambientes, e, em muitos casos, mostraram-se responsáveis por uma quantidade considerável da biomassa total (Hoshino, 2019). Uma dessas descobertas foi a existência do filo Nitrososphaerota (sin. Thaumarchaeota) a partir da diferença filogenética notada na espécie *Cenarchaeum symbiosum*, pertencente a esse filo, em relação aos outros filios de arquea (Brochier-Armanet, 2008). Posteriormente, a presença das AOA foi identificada em análises de amostras solo de jardim (Stiegmeler, 2014) e amostras oceânicas (Konneke, 2005), levando à descoberta, respectivamente, das espécies *Nitrososphaera viennensis* e *Nitrosopumilus maritimus*, ambos microrganismos extremamente comuns em seus respectivos habitats.

Além do solo de jardim e do mar aberto, representantes desse filo já foram encontrados distribuídos em uma quantidade muito ampla de habitats, como outros tipos de solo, pântanos, estuários, sedimentos abissais, água subterrânea, sedimentos de drenagem de minas ácidas e outras regiões marcadas por níveis consideráveis de nitrogênio, criando nichos específicos dentro dos microhabitats para colaborar com outras arqueas (como arqueas marcadas pela presença no ciclo do Ferro/Enxofre) ou diferentes bactérias, transformando-se em importantes protagonistas e marcadores ecológicos (Walker, 2010; Gupta et al, 2021; Saghai et al, 2022).

O metabolismo dentro desse filo é diverso. Apesar de marcado pela presença da enzima AMO arqueana, codificada pelo gene *AmoA*, nem todos os representantes do filo, inclusive alguns com o gene *AmoA*, são de fato AOA. Alguns representantes são capazes de metabolizar ureia (Qin, 2014), enquanto outros conseguem metabolizar metano, expandindo a possibilidade de metabolismos dentro do

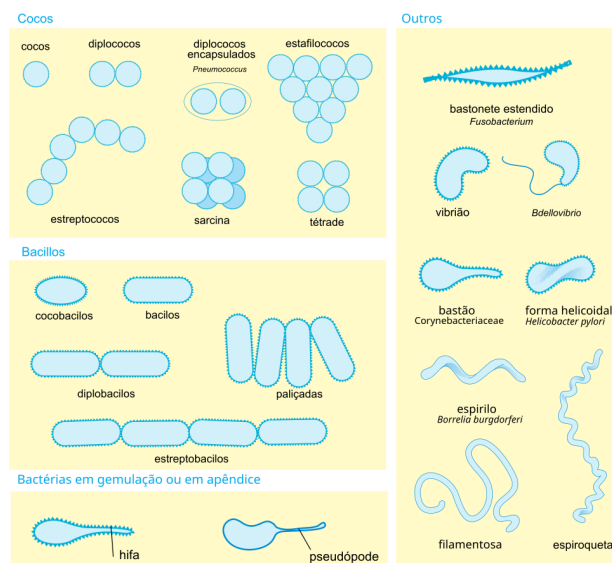
filo (Mussman, 2014). Por outro lado, o filo possui uma característica universalmente distribuída: Fixação de carbono através de HCO_3^- (Walker, 2010) e CO_2 , sendo que a via metabólica do CO_2 é a via para fixação de carbono mais eficiente do tipo conhecida (Konneke, 2014).

Em relação ao gênero *Nitrososphaera*, na membrana citoplasmática há a presença de crenarqueol e outros Glicerol Dialquil Glicerol Tetraéter (GDGT), sendo o primeiro uma marca importante para identificação das AOAs (Schouten, 2013). Duas espécies já foram caracterizadas morfologicamente *Nitrososphaera viennensis*, *Nitrososphaera gargensis* (Stiegmelier, 2014; Konneke, 2005).

3.3 O DOMÍNIO BACTERIA

As bactérias, assim como as arqueas, são organismos procariotos com diversas morfologias e presentes na vasta maioria dos habitats (refbac). Apesar de participar ativamente da maioria dos ciclos biogeoquímicos do planeta e serem bem mais compreendidas do que as arqueas, apenas uma ínfima parcela pode ser cultivada em laboratório através dos métodos atuais, enviesando as informações que possuímos sobre as mesmas(refbac2). Desde sua descoberta, diversos formatos foram observados, como pode ser visto na figura 4:

Figura 4 - Diferentes morfologias de bactérias.



Fonte: Traduzido do inglês por Patrícia R. (2009), desenvolvido por Mariana “LadyofHats” Ruiz (2006) e baseado em Wiesmann, Ernst(1986). Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacterial_morphology_diagram-pt.svg

3.3.1 As Bactérias Oxidadoras de Amônia

As BOAs podem utilizar diferentes tipos de substratos, em especial metano (CH₄) e monóxido de Carbono (CO) (Wang *et al*, 2024). Desde o isolamento da primeira BOA identificada, uma diversidade de estudos foram realizados para definir sua diversidade, resultando em diversos grupos conhecidos (Koops e Pommerening-Röser 2001). A partir de então, cinco gêneros de bactérias foram descobertos, sendo quatro dentro da subclasse betaproteobacteria (*Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* e *Nitrosolobus*) e um na subclasse gammaproteobacteria (*Nitrosococcus*), apesar das posições filogenéticas constantemente serem alteradas dentro dos grupos (Purkhold *et al.* 2000). Porém, assim como no caso das arqueas, essa classificação historicamente foi limitada pelas técnicas de cultivo e co-cultivo, que, no caso desses microrganismos, são complexas e necessitam de muito tempo devido ao lento crescimento dos mesmos (Geets *et al.*, 2006). Com o avanço das técnicas moleculares, constantemente novas bactérias capazes de oxidar amônia são descobertas e, assim, novas técnicas de isolamento são desenvolvidas.

As AOB podem ser classificadas de quatro formas de acordo com sua morfologia: pela forma da célula, tamanho da célula, flagelos e arranjo de membranas intracitoplasmáticas (Soliman *et al*, 2018). O gênero *Nitrosomonas*, por exemplo, é definido pelas suas células esféricas elipsoidais com medidas que variam de 1,5 a 2,5 µm, enquanto o gênero *Nitrospira* possui células espirais com invaginações nas membranas intracitoplasmáticas e tamanho que varia de 0,3 a 8,0 µm (Koops e Pommerening-Röser 2001).

A partir dessas características, são divididas em três grupos. O primeiro grupo, dividido ainda em seis linhagens, compreende o gênero *Nitrosomonas*, sendo a primeira linhagem (*N. europae*, *N. eutropha*, *N. halophila* e *N. mobilis*) notável pela atividade da enzima urease e exigência moderada de sal, enquanto a segunda linhagem (*N. communis*) não possui exigência de sal ou atividade da urease; a terceira (*N. nitrosa*) e quarta (*N. ureae* e *N. oligotropha*) linhagem se assemelham a segunda ao não possuir exigência de sal, mas possui atividade da urease assim como a primeira. As linhagens cinco (*N. marina* e *N. aestuarii*) e seis (*N. cryotolerans*) são halófilas obrigatórias e com atividade da urease. O segundo grupo compreende os gêneros *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio* e *Nitrospira*, sendo semelhantes ao grupo um. O último grupo, gênero *Nitrosococcus*,

espécies *Nitrosococcus oceani* e *Nitrosococcus halophilus*, tem halofilia obrigatória, sendo a primeira espécie com atividade da urease e a segunda sem. Cada uma das linhagens dentro dos grupos possui ainda características ecofisiológicas específicas em relação à quantidade ideal de amônia como substrato e são encontradas em locais diferentes (Koops e Pommerening-Röser 2001).

3.3 ARQUEAS OXIDADORAS DE AMÔNIA E BACTÉRIAS OXIDADORAS DE AMÔNIA NA BIOTECNOLOGIA

O uso de organismos oxidadores de amônia na biotecnologia vem sendo estudado desde suas respectivas descobertas (Kowalchuk, G. & Stephen, J., 2001). Wu e colaboradores (2021) realizaram uma extensa revisão onde avaliaram a participação de arqueas e bactérias oxidadoras de amônia na remoção de diversos produtos farmacêuticos no solo, em especial os antibióticos, e concluíram que esses microrganismos podem aumentar consideravelmente a remoção desses farmacêuticos em sistemas de tratamento de águas residuais. De forma semelhante, diversos gêneros de bactérias e arqueas do solo possuem capacidade de remoção de diferentes tipos de moléculas e elementos, como ocorre na remoção de metais pelo gênero de bactérias *Cupriavidus* (Vicentin *et al*, 2018).

O fato de a vasta maioria dos microrganismos serem desconhecidos (Curtis *et al*, 2002), porém, limita o avanço da aplicação imediata de biorremediadores nos mais diversos ambientes e, mesmo quando descobertos através da biologia molecular, o cultivo desses microrganismos ainda é uma tarefa a ser superada, no qual então seria novamente barrado pela dificuldade de escalonar a produção em larga escala (Velastegui *et al*, 2023).

4 METODOLOGIA

4.1 PROJETO PILOTO

Para avaliar os meios de cultivo e as possibilidades de execução, um estudo piloto foi realizado previamente à coleta da amostra de interesse.

4.1.1 Coleta de Amostras do Solo

Para o piloto, que durou aproximadamente 3 meses, foi selecionada uma amostra composta do solo do Parque Nacional do Iguaçu (25°32'42.5"S e 54°24'58.1"W) coletada no dia 20 de fevereiro de 2024 de uma profundidade aeróbica (10-20 cm). A região é característica de uma floresta estacional semidecidual de formação submontana (altitude entre 251 m e 284 m) e solo do tipo latossolo vermelho (IBAMA, 2000). Contudo, o local é uma borda artificial do parque, que está separado da matriz agrícola por uma estrada com uma largura entre 6 m e 7 m. Após coleta, o solo foi mantido resfriado e, após seis dias, foi aliquotado para enriquecimento a partir de meios específicos para organismos oxidadores de amônia.

4.1.2 Enriquecimento da Amostra

Dois meios (líquidos) de enriquecimento, nomeados Arq I e Arq II, foram preparados, sendo: Arq I composto por 1 g/L NaCl, 0,40 g/L MgSO₄, 0,10 g/L CaCl₂, 0,20 g/L KH₂PO₄, 0,50 g/L KCl, 0,17g/L NaHCO₃, 0,027g/L NH₄Cl, modificado a partir de Lehtovirta-Morley *et al.* (2011) e Arq II composto por 0,68 g/L KH₂PO₄, 0,71 g/L Na₂HPO₄, 0,40 g/L NH₄Cl, 0,15 g/L KCl, 0,26 g/L NaHSO₃, 0,30 g/L NaCl, 0,06 g/L CaCl₂, 0,036 g/L MgSO₄, modificado a partir de Simon *et al.*, 2005. Todos os reagentes foram dissolvidos em água destilada e autoclavados a 121°C por 20 minutos. A amostra do solo foi pesada em vidro de relógio limpo com álcool 70% e então dissolvida nos enriquecimentos em 5% p/v. Os enriquecimentos foram incubados a 37 °C sem agitação por oito dias.

4.1.3 Isolamento e Cultivo em Meios Sólidos

Três diferentes meios sólidos, nomeados Arq I, Arq II e Arq III foram

preparados. O preparo dos dois primeiros meios foi semelhante às suas contrapartes para meio líquido, com o diferencial da adição de 14 g/L de agarose para solidificação do meio antes da esterilização. O meio Arq-III foi preparado com 5 g/L de extrato de levedura, 14 g/L de agarose e, em cada placa de Petri, 100 µL de Nistatina à 10.000 UI/mL. Para os meios Arq I e Arq II, foi adicionado inicialmente à placa 100 µL de Nistatina à 10.000 UI/mL, 100 µL de Ampicilina 10% e 50 µL de Canamicina 5%. Para o controle, também foram preparados meios Arq I e Arq II sem adição dos antibióticos. Após oito dias de cultivo, 100 µL de cada enriquecimento foi inoculado, em duplicata, usando a alça de Drigalsky nos meios de cultura Arq I, Arq II e Arq III. As placas foram mantidas em estufa a 37° C e o crescimento acompanhado semanalmente. Após 23 dias, os microrganismos resultantes que possuíam morfologia de colônia distintos nas placas com adição de antibióticos foram transferidos, em duplicatas, para novas placas usando a técnica de esgotamento por estriamento. Placas que possuíam colônias de difícil diferenciação foram transferidas a partir de áreas aleatórias de 1 cm² dentro das placas para isolamento posterior. As novas placas Arq I e Arq II, todas com nistatina, foram divididas em três subcategorias: sem adição de antibióticos; com adição de ampicilina e canamicina, e, por fim, com adição de ampicilina, canamicina e de gentamicina. As placas foram repicadas até a obtenção de culturas puras. Em todos os casos, as novas placas foram preparadas utilizando como base o mesmo meio sólido da placa que seria repicada, e todas as placas receberam a adição de 100 µL de Nistatina à 10.000 UI/mL, 100 µL de Ampicilina 10%, 50 µL de Canamicina 5% e 10 µL de Gentamicina 4 %.

4.1.4 Caracterização Microscópica

Colônias isoladas obtidas através do método anterior foram coradas através do método de coloração de Gram (Tripathi e Sapro, 2023) e observadas através de um microscópio Óptico Zeiss Primostar para a análise da morfologia celular.

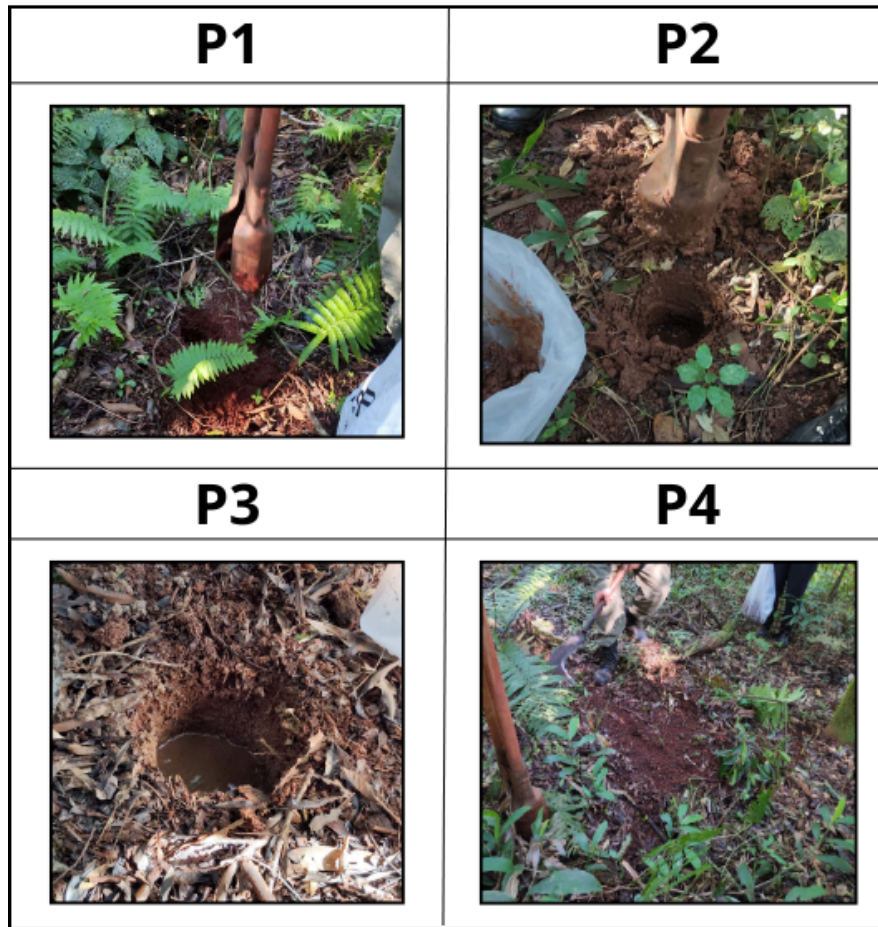
4.2 PROJETO OFICIAL

Após aplicação do Projeto Piloto, a metodologia foi adaptada e realizada como a seguir.

4.2.1 Coleta de Amostras do Solo

Assim como no piloto, as amostras compostas do solo de profundidade aeróbica foram coletadas do Parque Nacional do Iguaçu em 2 de julho de 2024. Para o projeto final, foram selecionados quatro diferentes pontos com diferentes tipos de solo e diferentes níveis de conservação ambiental. O ponto de coleta P1 (coordenadas 25°37'30.0"S 54°28'22.8"W), localizado próximo à Trilha da Canafístula, corresponde a uma área antropicamente impactada no passado. A região, em processo de regeneração, apresenta evidências de antigas construções, solo exposto, alta incidência solar e espessa camada de serrapilheira. A amostra P2 (25°37'15.6"S 54°28'12.0"W) foi coletada na trilha da antiga represa, localizada no interior do PNI. Essa área úmida, com acúmulo de água e vegetação aberta, indica um ambiente com características hídricas distintas das demais áreas amostradas. O ponto P3 (25°35'45.6"S 54°23'34.8"W), localizado no final da Trilha do Poço Preto, próximo ao Rio Iguaçu, caracteriza-se por uma planície sujeita a inundações periódicas. A vegetação densa e a baixa frequência humana indicam um ambiente com menor perturbação antrópica. A alta umidade e os eventos de inundação podem favorecer um elevado turnover de espécies e processos de seleção natural. O ponto P4 (25°37'30.0"S 54°28'33.6"W), localizado próximo à base da Polícia Ambiental e à estrada das Cataratas, apresenta condições áridas e sofre com o intenso tráfego e a invasão da espécie de planta exótica *Tradescantia zebrina*. Registros visuais e um mapa detalhado podem ser conferidos nas figuras 5 e 6.

Figura 5 - Pontos de coleta(P), do 1 ao 4.



Fonte: Autoria própria.

Figura 6 - Mapa evidenciando os pontos de coleta.



Fonte: Cedido por Quémili Simone Clementina Brand(2024), feito através do software Quantum Geographic Information System (QGIS).

4.2.2 Enriquecimento das amostras

Para o enriquecimento, 5% p/v das amostras foram inoculadas no meio nomeado Arq L, modificado a partir de Stieglmeier *et al* (2014), preparado com *Artificial Fresh Water*, do inglês, Água Fresca Artificial (AFM): 1 g de NaCl, 0,40 g de MgCl₂ x 6 H₂O, 0,10 g de CaCl₂ x 2 H₂O, 0,20 g de KH₂PO₄, 0,50 g de KCl, 0,05 g de Na₂SO₄ e 1L de água ultrapura,. O meio Arq L é composto por: 1 mL de solução de 7,5 mM de FeNaEDTA; 2 mL de solução tampão 1 M NaHCO₃; 10 mL de solução tampão HEPES (ácido hidroxietil piperazineetanesulfônico) 1M pH 7.5; 2 mL de solução de 1M de NH₄Cl; 1mL de solução de 1M de Piruvato de Sódio e, por fim, 1 mL de solução de oligoelementos para *Nitrososphaera* spp. (composta por 8,00 mL de HCl , 30,00 mg de H₃BO₃, 100 mg de MnCl₂ x 4 H₂O, 190,00 mg de CoCl₂ x 6 H₂O, 24,00 mg de NiCl₂ x 6 H₂O, 2,00 mg de CuCl₂ x 2 H₂O, 144,00 mg de ZnSO₄ x 7 H₂O, 36,00 mg de Na₂MoO₄ x 2 H₂O em 1L de água ultrapura) completando o volume para 1 L com AFM e o pH ajustado para 7,5. Todas as vidrarias e utensílios metálicos utilizados durante todo o procedimento de cultivo foram lavados com detergente Extran 20%, seguidos com lavagem de HCl 0,1 M e três vezes enxaguados com água destilada. Os enriquecimentos foram incubados em triplicata em estufa a 37 °C por até 21 dias.

4.2.3 Isolamento e Cultivo em Meio Sólido

O meio sólido, Arq S, foi preparado adicionando 14 g/L de agarose ao meio AFW-base antes da autoclavagem, seguido dos mesmos passos indicados para o meio Arq L, com exceção dos antibióticos, que foram adicionados diretamente ao meio antes da solidificação, sendo as quantidades: 5 mL de Nistatina à 10.000 UI/mL, 5 mL de Ampicilina 10% e 2,5 mL de Canamicina 5%, 5 mL de Gentamicina 4% e 1,7 mg de Cloridrato de Clindamicina. Após sete, 14 e 21 dias de incubação dos enriquecimentos, 100 µL foram inoculados no meio sólido Arq S, e as placas foram mantidas a 37° C em estufa até terem um crescimento adequado. O crescimento das colônias foi monitorado constantemente e as colônias foram transferidas para novas placas sucessivamente até a obtenção de colônias puras. As colônias puras obtidas foram caracterizadas microscopicamente através da coloração de Gram.

4.2.4 Purificação e Preservação

Os isolados foram analisados para a determinação das morfoespécies, fotodocumentados e preservados pelo método de criopreservação (criotubos com glicerol 20% e mantidos a -80°C), na CCMIBA, Coleção de Cultura de Micro-organismos de Importância Biotecnológica e Ambiental da UNILA.

4.2.5 Caracterização Molecular

Placas com colônias puras foram raspadas para a extração de DNA com auxílio de água ultrapura estéril. Após a obtenção, as células foram centrifugadas a 12000 rpm por cinco minutos, o pellet foi mantido para a próxima etapa e o sobrenadante foi descartado.

4.2.5.1 *Extração do DNA*

As células foram transferidas para tubos tipo eppendorf estéreis, contendo 472 μL de Tampão TE (Tris-HCl 25 mM, pH 8; EDTA 10 mM) e, em seguida, foram adicionados a cada tubo 3 μL de Proteinase K (20 mg/mL), 5 μL de RNase (10 mg/mL) e 15 μL de SDS 20%, sendo os sistemas incubados a 37°C por 1 h. Após esse período foi adicionado 500 μL de clorofanel (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, V 25:24:1) a cada tubo, os quais foram agitados por várias vezes e então centrifugados a 7000 rpm por 3 min. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, ao qual foram adicionados 500 μL de clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico, V 24:1).

Os tubos foram então agitados e centrifugados sob as mesmas condições, sendo a fase aquosa transferida para um novo tubo ao qual foi adicionado NaCl para a concentração final de 0,3 M e 2,5 V de Etanol 100%, a fim de promover a precipitação do DNA. Os tubos foram incubados a -20°C por uma noite e então submetidos à centrifugação de 7000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 500 μL de etanol 70%, sendo os tubos novamente centrifugados,

sob as mesmas condições (Costa, 2018). O sobrenadante foi descartado e o sedimento seco à temperatura ambiente. O DNA foi então ressuspenso em volumes de 50 µL de água ultrapura. A qualidade e concentração dos DNAs extraídos foram avaliadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific), seguindo os procedimentos recomendados pelo fabricante para determinação da concentração e pureza do material genético.

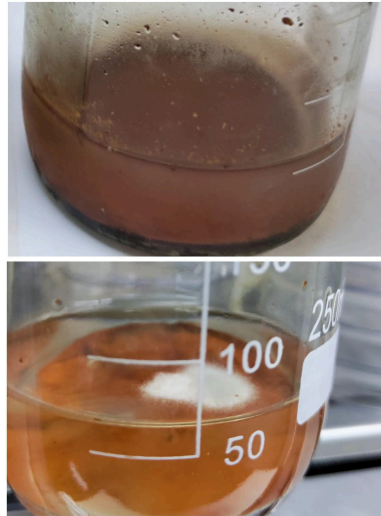
4.2.5.2 Ensaio de PCR e sequenciamento

O DNA extraído foi amplificado empregando-se dois pares de iniciadores, um direcionados ao gene de rRNA 16S específicos para o domínio Archaea, 109F e 915R (Whitehead e Cotta, 1999) e outros específicos para o gene de rRNA 16S do Domínio Bacteria, 27F e 1492R (Weisburg *et al.*, 1991). Os ensaios de PCR foram realizados no termociclador de acordo com as especificações da *Taq* DNA polimerase. A eficiência da amplificação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% e o tamanho dos fragmentos gerados foi avaliado com o auxílio do marcador de massa molecular 1kb Plus DNA ladder. O produto da reação de PCR foi enviado para sequenciamento do tipo Sanger na empresa ATCgene, de acordo com o protocolo específico da empresa.

4.2.5.3 Análises de bioinformática

Após limpeza das sequências com o auxílio do programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), as sequências de qualidade foram então comparadas com sequências de DNA depositadas no banco de dados do NCBI (US National Center of Biotechnology Information), através da ferramenta BLAST, a fim de confirmar que consistem em fragmentos do gene de rRNA 16S de Archaea ou Bacteria. Utilizando as sequências do gene de rRNA 16S, foi construída uma árvore filogenética incluindo as sequências do banco de dados do NCBI por meio da ferramenta BLAST com alto grau de identidade. A árvore foi confeccionada empregando-se o programa MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2011), pelo método de *Neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987), com teste de bootstrap de 1000 repetições (Felsenstein, 1985).

Figura 8 - Crescimento indesejado nos enriquecimentos.



Fonte: Aatoria própria.

Considerando o tempo que os microrganismos oxidadores de amônia demoram para crescer, esses surgimentos foram caracterizados como indesejados e não-causados pelos alvos. Assim, ao enriquecimento do projeto oficial, foi adicionado nistatina para evitar o crescimento fúngico e sua turbidez foi rigorosamente acompanhada. A turbidez e a aparência de massas fúngicas não foram um problema no enriquecimento final, indicando que os meios estavam dentro do esperado.

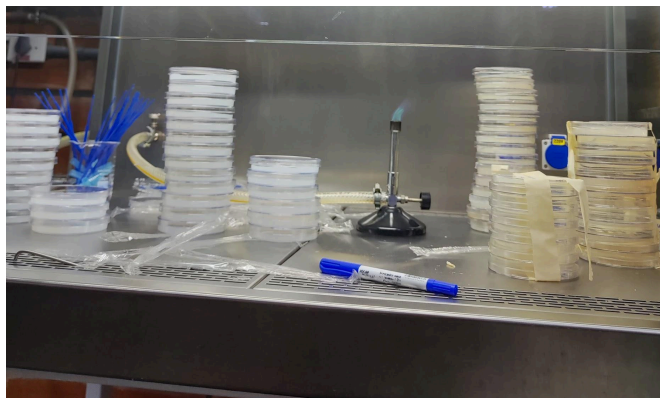
5.2 COLETA, MEIOS DE CULTURA E ISOLAMENTO

Um diferencial do meio sólido utilizado em comparação aos isolamentos microbianos mais utilizados foi a adição de agarose no lugar do ágar. Ambos são agentes gelificantes, mas o ágar é sugerido como sendo a causa para a inibição de diversas bactérias e arqueas, impedindo um cultivo em meio sólido (Klein *et al*, 2022). A adição dos antibióticos também reduz a diversidade bacteriana, favorecendo o crescimento de bactérias multirresistentes e de arqueas, que não são afetadas pela maioria dos antibióticos conhecidos.

As modificações do meio permitiram o cultivo em meio sólido e mostrou eficiência ao isolar unidades formadoras de colônias (UFCs) separáveis mesmo após mais de uma semana de crescimento. Ainda mais notável, a diversidade total diminuiu

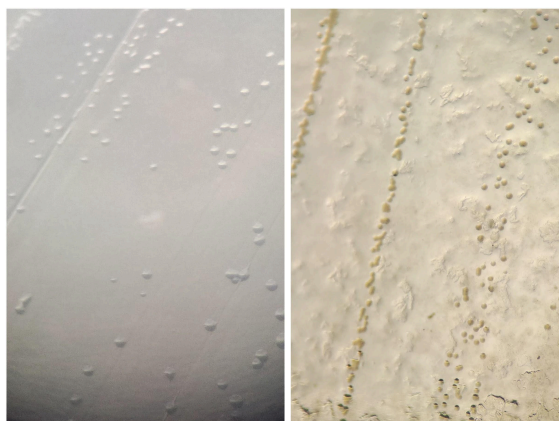
drasticamente conforme as semanas do meio líquido se passavam. Isso indica que a amônia, única fonte de nitrogênio do meio, foi consumida dentro do período esperado (aproximadamente 10-14 dias) e os microrganismos ali presentes não puderam crescer sem a amônia, como visto nos crescimentos da tabela. Porém, um problema inesperado foi a degradação do meio, que inviabilizou qualquer cultivo a longo prazo. As modificações feitas para acelerar o crescimento dos microrganismos e permitir o cultivo em meio sólido criaram novos tipos de interação que fizeram o meio perder seu aspecto original em qualquer temperatura após um certo período de tempo. Para testar o limite que o meio poderia ficar viável, placas de petri com o meio Arq S foram analisadas em quatro situações diferentes: Estéreis na geladeira (4°C), estéreis em temperatura ambiente, inoculadas em 30 °C e inoculadas em 37° C. Em todos os casos, o meio apresentou uma leve coloração amarelada ao redor da segunda semana, contrastando com seu branco translúcido normal, com a cor intensificando até o meio visualmente ficar com um aspecto de esfarelado (figuras 9 e 10).

Figura 9 - Comparação de placas novas (à esquerda) com placas antigas (à direita) durante um repique.



Fonte: A autoria própria.

Figura 10 - Visão através de estereomicroscópio de um meio ativo com uma semana (à esquerda) e um meio degradado (à direita).

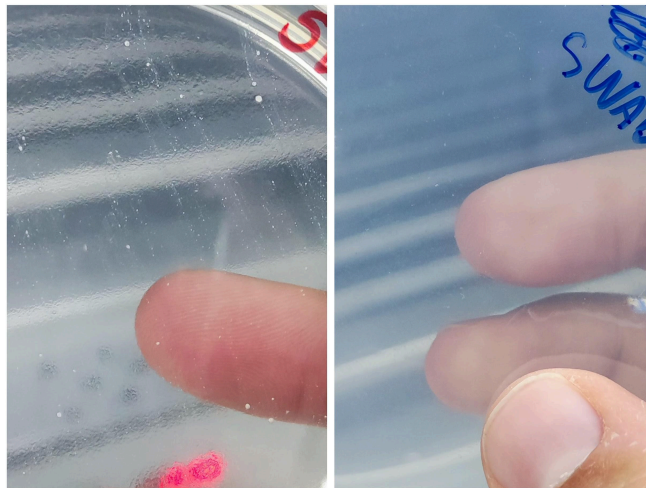


Fonte: A autoria própria.

Placas com crescimento que foram postas na geladeira atingiram o aspecto esfarelado no mesmo período de tempo. O crescimento da maioria dos microrganismos tornava-se aparentemente suspenso após o meio atingir esse ponto, impedindo que crescessem por mais de três semanas. A maioria dos microrganismos repicados a partir de meios que se desfaziam falharam em crescer ou apresentaram um crescimento muito lento e não resistiram aos repiques seguintes. Curiosamente, o meio resistiu por muito mais tempo em duas situações: uma placa com fungo resistente à nistatina que foi repicado após surgir em uma placa derivada de um dos enriquecimentos, onde o meio resistiu por quase um mês em 37°C, mesmo após o fungo parar de crescer, e um conjunto de placas com UFCs semelhantes entre si que ficaram em 37° C durante mais de um mês sem demonstrar qualquer sinal de degradação. O efeito do calor também foi anotado. Ao ser autoclavado, o meio alterava sua coloração para uma cor dourada intensa. Ao tentar suplementar o meio enquanto ele ainda estava muito quente, ele atingia o aspecto amarelado ao esfriar e as placas se tornavam esfareladas. Ao tentar suplementar em temperatura amena e depois fundir após solidificação, o meio também se degradava da mesma forma. A temperatura exata não foi testada devido à falta de instrumentos para tal, mas considerou-se utilizar os seguintes procedimentos: aguardar o meio esfriar ao ponto de ser tolerável encostar nele com as mãos nuas e adicionar primeiramente os suplementos autoclaváveis, seguido dos esterilizados por filtração e, por fim, os antibióticos, acompanhado de imediato plaqueamento antes da solidificação. Um guia detalhado para a realização do meio foi criado como material suplementar em formato de Procedimento Operacional Padrão (Apêndice A) para utilização na CCMIBA.

Para testar a especificidade do meio Arq S, dois testes adicionais foram realizados: Inoculação de uma amostra da boca através de um swab e a abertura da placa em ambiente não-estéril para testar o crescimento de contaminação, sem a adição de antibióticos. Ao abrir a placa, nenhuma UFC foi notada mesmo após um mês e um esporo fúngico cresceu muito lentamente, atingindo um máximo de 1 mm². A amostra da boca foi também inoculada em meio Czapek, consideravelmente resistente à microrganismos de amostras humanas, e a comparação pode ser visualizada na figura 11.

Figura 11 - Comparação de crescimento de amostra da boca em meio Czapek após 24 horas (à esquerda), mostrando crescimento notável, com meio Arq S após 48 horas (à direita), sem qualquer indício de crescimento.

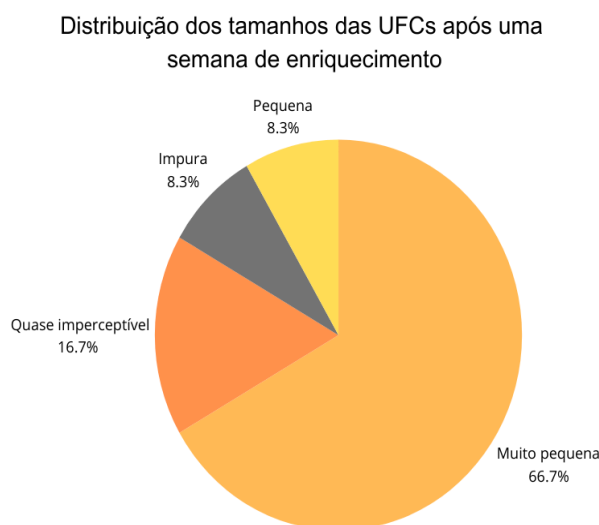


Fonte: A autoria própria.

5.3 PURIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS E MORFOLOGIA CELULAR

As quatro amostras de solo resultaram em 14 enriquecimentos em meio líquido (sendo 2 controles negativos). Conforme a metodologia, cada enriquecimento foi plaqueado até a obtenção de culturas isoladas. Após uma semana de enriquecimento, todas as placas apresentaram resultado positivo após inoculação. Dessas placas, culturas aparentemente puras foram anotadas em relação ao seu tamanho após uma semana de crescimento. Os dados do resultado do cultivo da primeira semana foram sintetizados nos gráficos presentes na figura 11.

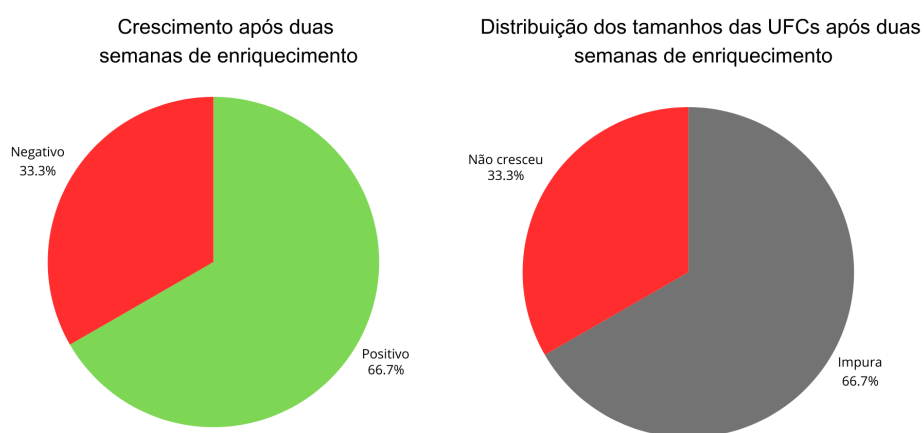
Figura 12 - Síntese dos resultados obtidos a partir da primeira semana do enriquecimento.



Fonte: Autoria própria.

Nas placas incubadas por duas semanas de enriquecimento, houve uma queda considerável no crescimento, e nenhuma cultura aparentemente pura foi imediatamente obtida. Além disso, foi notada a presença de fungos tanto no enriquecimento da amostra obtida a partir do ponto 2 quanto das placas provenientes do mesmo ponto. A rica diversidade microbiana encontrada nas placas sugere uma dinâmica complexa. A presença inicial de uma grande população de organismos oxidadores de amônia provavelmente contribuiu para a redução dos níveis desse composto, que é tóxico para muitos microrganismos. Com a diminuição da amônia, outros microrganismos, que podem ter estado dormentes ou em baixa densidade no início do experimento, encontraram condições favoráveis para crescer. Esses organismos podem então ter crescido utilizando os oxidadores de amônia como fonte de alimento. Considerando e apoiando a possibilidade do segundo caso, diversas colônias não conseguiram crescer após repique em placas novas, indicando que não eram capazes de utilizar a amônia como fonte de nitrogênio. Para afirmar, kits para analisar a quantidade de nitrito (o produto da oxidação da amônia) no meio poderiam ser utilizados, porém não estavam disponíveis na época no laboratório. Por fim, os dados do resultado do cultivo da segunda semana foram sintetizados nos gráficos presentes na figura 13.

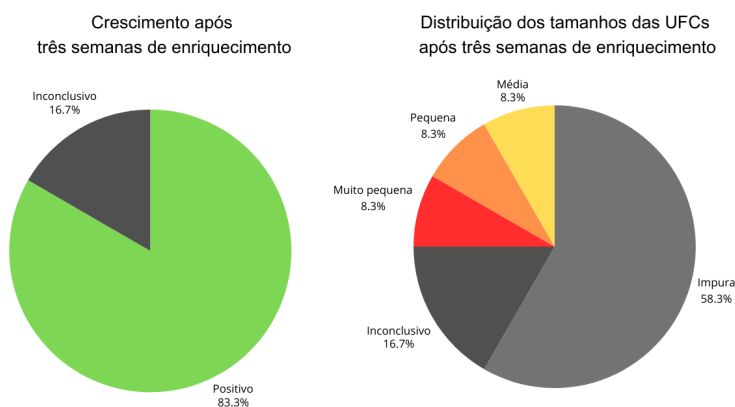
Figura 13 - Síntese dos resultados obtidos a partir da segunda semana do enriquecimento.



Fonte: Autoria própria.

Após três semanas de enriquecimento, o crescimento voltou a ser positivo, com uma única placa possuindo características de difícil distinção entre artefatos e UFCs consideravelmente pequenas. Tentativas de repicar as supostas UFCs em outras placas falharam. Várias placas da terceira semana estavam contaminadas com fungo que cobriam fortemente as UFCs, dificultando e, em alguns casos, impossibilitando a purificação. Considerando que a amônia já teria acabado há mais de uma semana no meio se existissem organismos oxidadores de amônia presentes, o resultado foi dentro do esperado. Os dados dessa última semana de enriquecimento foram sintetizados nos gráficos presentes na figura 14.

Figura 14 - Síntese dos resultados obtidos a partir da segunda semana do enriquecimento.

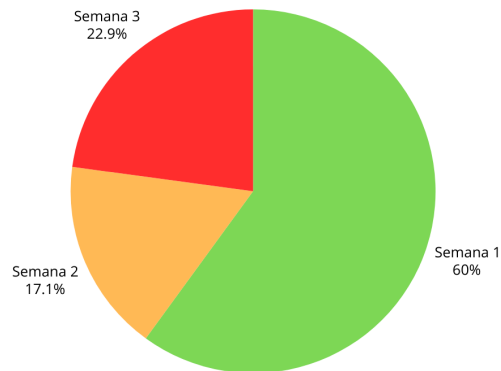


Fonte: Autoria própria.

Seguindo o esperado para o enriquecimento, a primeira semana de cultivo resultou em uma quantidade muito maior de isolados do que as semanas seguintes. No entanto, o crescimento insuficiente de algumas colônias antes da degradação do meio pode ter influenciado os resultados obtidos. As placas que apresentaram crescimento insatisfatório foram submetidas a repiques contínuos para testes em meio líquido. No entanto, o tempo necessário para esse processo superou consideravelmente o disponível para este trabalho, exigindo esforços adicionais para viabilizar um crescimento satisfatório dos organismos presentes nas placas mencionadas. A distribuição das placas com culturas aparentemente puras em relação à semana de enriquecimento do qual foram obtidas, considerando os repiques realizados, foram sintetizadas na figura 15.

Figura 15 - Distribuição da quantidade de placas totais com culturas puras.

Quantidades de placas isoladas em relação à semana de cultivo

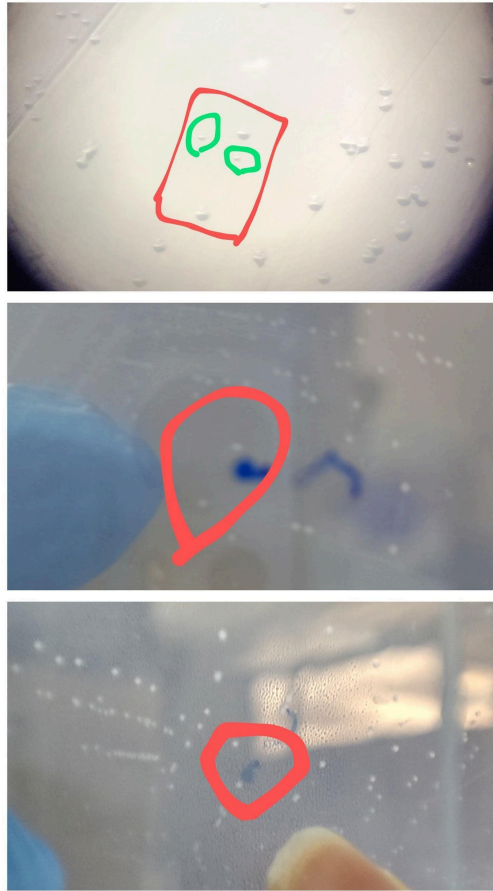


Fonte: A autoria própria.

Uma análise precisa da morfologia de colônia foi inviabilizada devido às peculiaridades dos meios e as cores das colônias observadas. Ademais, algumas colônias eram, surpreendentemente, invisíveis a olho nu (figura 16), sendo observáveis apenas sob estereomicroscópio. Porém, a visão no estereomicroscópio em si era dificultada pelo aspecto do meio, que se tornava muito diferente de acordo com a incidência da luz (figura 17). Devido a essas dificuldades, prosseguiu-se para a caracterização das células.

Figura 16 - Colônias invisíveis a olho nu visualizadas em estereomicroscópio (marcação em verde;

imagem superior) em comparação à visão nu em diferentes níveis focais de um aparelho celular (centro e inferior).



Fonte: Autorial própria.

Figura 17 - Diferentes aspectos da placa inoculada de acordo com a incidência de luz, com exemplos de colônias marcadas em vermelho.

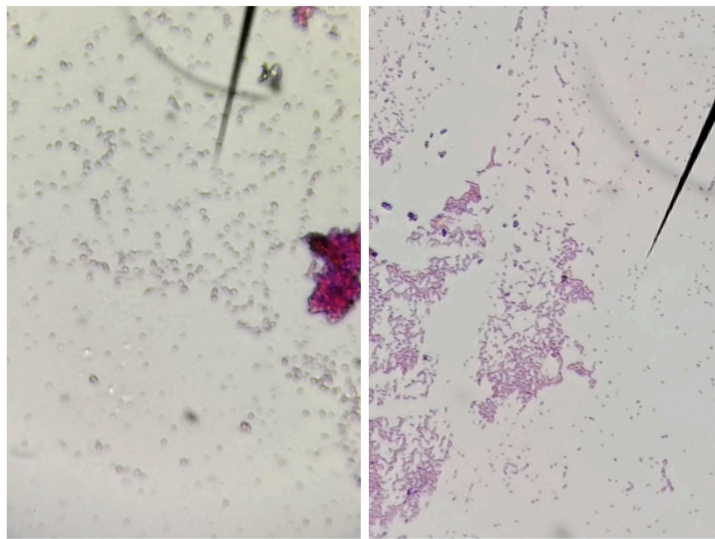


Fonte: Autorial própria.

Após seleção dos isolados que seriam preservadas e posteriormente

sequenciadas, foi realizado a coloração de Gram, onde o resultado foi avaliado com base na opinião de três diferentes usuários do laboratório (sendo ao menos um professor) para chegar em relação a um consenso em relação ao tipo de Gram e a morfologia celular (figura 18).

Figura 18 - Exemplos de morfologia celular e coloração de gram (inconclusivo à esquerda e positivo à direita), mostrando células muito pequenas de difícil certeza do formato, às vezes sendo possível identificar (coco à esquerda) após magnificação através de lente telemacro de aparelho celular em conjunto com distorção focal.



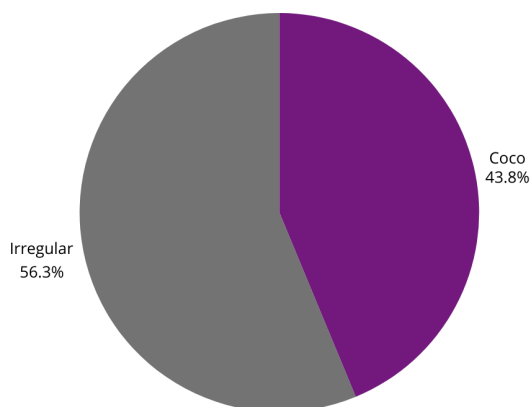
Fonte: A autoria própria.

A vasta maioria das células analisadas eram muito pequenas para uma avaliação com o microscópio (óptico, aumento de 400x e 1000x quando usando óleo de imersão) disponível, dificultando a caracterização das células, que pareciam, em maioria, irregulares (figura 19).

Figura 19 - Resultado da morfologia celular das placas analisadas, mostrando que a maioria das células

analisadas possuíam um aspecto de difícil compreensão.

Distribuição da morfologia celular



Fonte: A autoria própria.

A coloração de Gram em si foi inconclusiva em metade dos casos analisados, mostrando células muito pouco coradas, mesmo após repetir o processo. A coloração de Gram é um método considerado atualmente muito sensível a diversas condições da cultura, como tempo de cultivo (Wilhelm *et al*, 2015). Em adição, não é um método recomendado para identificação de arqueas, assim como pode indicar resultados ambíguos ou inconclusivos para diversos tipos de bactérias (Beveridge & Schultze-Lam, 1996), principalmente aquelas ainda não isoladas e/ou com características incomuns na parede celular.

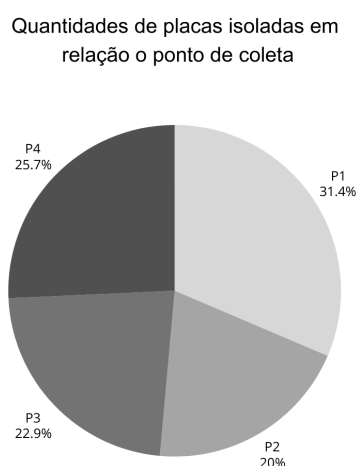
Finalizadas as purificações e a caracterização morfológica, prosseguiu-se com a realização de cópias para preservação e extração do DNA dos isolados.

5.4 PRESERVAÇÃO, EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO GENÉTICO.

Com base nas características analisadas nas placas, foram selecionadas um total de 16 isolados puros para serem preservados e inicialmente um total de cinco para análise inicial da diversidade. Um problema recorrente durante o experimento foi a fragilidade do meio sólido, o que inviabilizou a extração e/ou preservação de qualquer placa que não estivesse em estado perfeito; em outras palavras, o meio se desfazia mais facilmente a cada dia que se passava durante tentativas de raspagem das colônias nas

placas, o que inviabilizou o procedimento em algumas placas que provavelmente seriam consideradas aptas caso o agente gelificante fosse ágar ou em um meio que não degrada depois do período visualizado. Dos quatro pontos de coleta, o ponto 1 obteve a maior quantidade de placas com colônias isoladas (11 placas), seguido do ponto 4 (nove placas), ponto 3 (oito placas) e, por fim, ponto 2 (7 placas) (figura 20).

Figura 20 - Distribuição dos isolados em relação ao ponto de coleta.



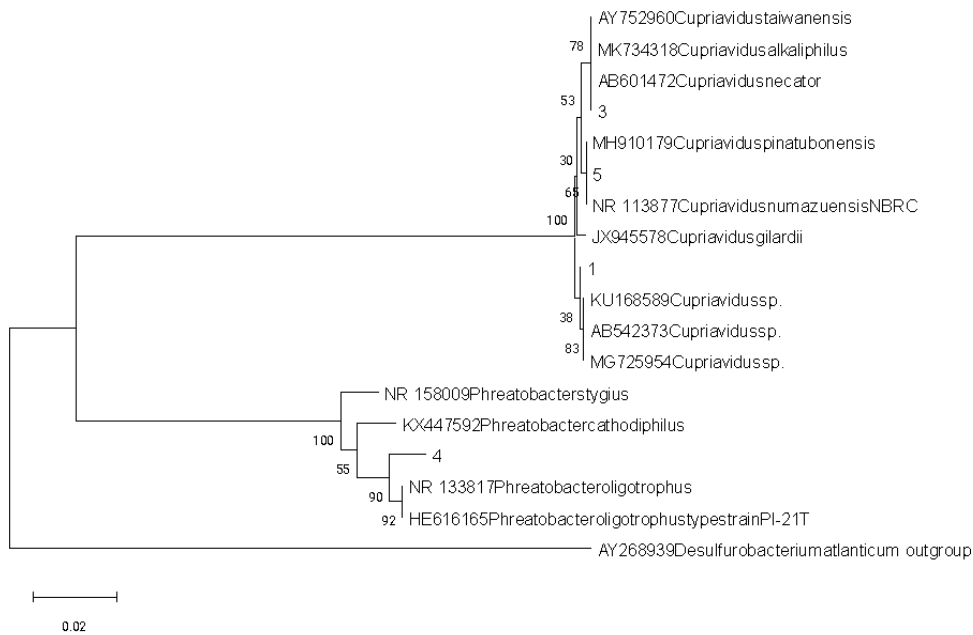
Fonte: Autoria própria.

Há representantes de todos os pontos preservados, mas apenas representantes dos pontos 1 e 4 puderam ter o DNA extraído, nesta etapa, e foram sequenciados. De acordo com a figura 19, é possível identificar que não houve uma diferença significativa em relação aos isolados e os pontos de coleta, mas o ponto 1 se destacou em relação aos outros. É possível que o impacto das ações humanas nos dois pontos de coleta citados tenha alterado fortemente o ciclo do nitrogênio no solo, criando um nicho diferente dos pontos 2 e 3, que são mais preservados.

Em relação ao sequenciamento, um dos isolados, que recebeu o código 2, não pôde ser analisado devido provavelmente a uma contaminação do DNA extraído, os outros quatro isolados obtiveram sequências com alta qualidade permitindo a identificação. Após avaliação da similaridade no Blast, uma árvore filogenética foi realizada com os isolados sequenciados (figura 21) para caracterizar os microrganismos em nível de gênero e os resultados foram sintetizados na tabela 2.

Figura 21 - Árvore filogenética (neighbor-joining, Kimura 2-parâmetros) baseada em sequências do gene 16S rRNA comparando as sequências dos isolados com sequências obtidas (Genbank) pela análise de

ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico (BLAST). Os valores de porcentagem de bootstrap de 1.000 réplicas estão localizados nos nós da árvore.



Fonte: Autoria Própria

Tabela 2 - Identificação dos isolados com base na análise de similaridade (Blast) do *contig* 16S no banco de dados Genbank

Código	% Similaridade	Nome	Acesso NCBI	Ponto de coleta/Semana de enriquecimento	ID final
1	99.17	<i>Cupriavidus</i> sp.	KU168589	Ponto 1/1a Semana	<i>Cupriavidus</i> sp.
	99.16	<i>Cupriavidus gilardii</i>	JX945578		
	99.16	<i>Cupriavidus gilardii</i>	CP130340		
3	100	<i>Cupriavidus oxalaticus</i>	CP069809	Ponto 1/2a Semana	<i>Cupriavidus</i> sp.
	100	<i>Cupriavidus</i> sp.	KP743999		
	100	<i>Cupriavidus necator</i>	AB601472		

	100	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	AY752960		
	100	<i>Cupriavidus alkaliphilus</i>	MK734318		
4	98.07	<i>Phreatobacter oligotrophus</i>	NR_133817	Ponto 4/2a Semana	<i>Phreatobacter</i> sp.
	96.59	<i>Phreatobacter cathodiphilus</i>	KX447592		
	95	<i>Phreatobacter stygius</i>	NR_158009		
	96	Bacterium enrichment culture clone B12	KC491167		
5	99.85	<i>Cupriavidus</i> sp.	HQ438080	Ponto 4/2a Semana	<i>Cupriavidus</i> sp.
	99.85	<i>Cupriavidus necator</i>	CP002878		
	99.85	<i>Cupriavidus pinatubonensis</i>	MH910179		
	99.85	<i>Cupriavidus numazuensis</i>	NR_113877		

Fonte: Autoria Própria.

Todas as amostras sequenciadas do ponto 1 resultaram como parte do gênero de bactéria *Cupriavidus*, filo Pseudomonadota (sin. Proteobacteria). O isolamento do gênero *Cupriavidus* foi um resultado surpreendente, pois, apesar de já ter sido associado com fixação de nitrogênio (transformação de nitrogênio livre em amônia) por Krisle *et al.* (2012), nunca foi relacionado com oxidação de amônia (transformação de amônia em, majoritariamente nitrato). Neste sentido, cabe destacar que todas as placas selecionadas para preservação e extração passaram por ao menos dois repiques adicionais a partir de uma colônia e houve um aumento considerável na velocidade de crescimento em cada novo repique, indicando que os mesmos não estavam simplesmente crescendo por reserva energética em um meio pobre para eles, mas sim que conseguiam se adaptar plenamente ao meio. Assim, eles necessariamente usavam a amônia como fonte de nitrogênio. Apesar de inesperado para o experimento, o gênero

Cupriavidus é conhecido por possuir diversas espécies com os mais diversos metabolismos oxidativos (Venning *et al*, 2017).

Considerando também a árvore filogenética, é possível que ambos os isolados de *Cupriavidus* obtidos sejam novas espécies, cabendo análises de bioinformática mais detalhadas, incluindo especialmente todos os gêneros de *Cupriavidus* na filogenia e, caso a suspeita seja confirmada, avaliar o sequenciamento de outras regiões do genoma, bem como a hibridização do DNA. O gênero *Cupriavidus* também possui amplo potencial biotecnológico, como na produção de poli(3-hidroxi-butirato) (Dalcanton *et al*, 2010), o que garante um futuro promissor para os microrganismos obtidos e uma possibilidade de entender sua função ecológica no solo do Parque Nacional do Iguaçu, além de servir como indicador de algumas características do solo do Parque, já que o gênero também é associado com metais pesados.

As amostras do ponto 4 resultaram em dois diferentes gêneros: *Phreatobacter* (isolado 4) e *Cupriavidus* (isolado 5). O gênero *Phreatobacter*, filo Pseudomonadota (sin. Proteobacteria) só possui três espécies cultivadas: *Phreatobacter oligotrophus*, *Phreatobacter cathodiphilus* e *Phreatobacter stygius*. O gênero tem a peculiaridade de ser muito distante de outros táxons, criando a necessidade da criação da família Phreatobacteraceae para adequar o gênero (Hordt *et al*, 2020). A primeira espécie descoberta, *P. oligotrophus*, foi isolada a partir de água ultrapura de uma usina na Hungria e amplamente descrita bioquimicamente (Toth *et al*, 2014). As espécies seguintes, *P. stygius* e *P. cathodiphilus*, foram descobertas, respectivamente, de pedaços de madeira provenientes de uma caverna de lava isolada e do catodo de uma célula de combustível microbiana (Lee *et al*, 2017; Kim *et al*, 2018). A grande diferença do espécime obtido, em relação às espécies identificadas e os ambientes vastamente diferentes entre todas as espécies, também indica a possibilidade de uma nova espécie dentro do gênero. O achado, então, abre novos horizontes para a caracterização do gênero e inúmeras possibilidades de identificação de seu papel ecológico na natureza.

Uma possibilidade para a falha no sequenciamento do isolado 2 é a contaminação, indicando que as culturas não estavam puras e algum outro microrganismo crescia simultaneamente no meio. Essa possibilidade pode ser explicada pela dificuldade de diferenciação das colônias invisíveis a olho nu, como indicado anteriormente. Colônias de arqueas com tamanhos ínfimos, crescendo em conjunto com culturas aparentemente puras, já foram retratadas anteriormente como sendo responsáveis pela dificuldade de

obter colônias puras de algumas arqueas já conhecidas em meio líquido, o que dificultava a separação (Rafiq *et al*, 2023). Considerando a característica sólida do meio aqui utilizado, essas colônias poderiam ser separadas. Porém, isso iria requerer uma utilização incomum de microscópio óptico em fluxo laminar e ferramentas muito pequenas. Independente da contaminação ser decorrente do motivo citado ou não, é válida a realização do procedimento em tentativas futuras utilizando o mesmo meio ou semelhante.

Dentre os quatro isolados, nenhum representante do domínio Archaea foi encontrado. O isolamento e cultivo de arqueas é excepcionalmente difícil. Tentativas de isolamento de arqueas oxidadoras de amônias obtiveram resultados positivos anteriormente a partir do meio original do qual o utilizado foi adaptado. Porém, em todos os casos os experimentos requerem uso de diversos antibióticos para impedir a proliferação de bactérias, muitas vezes caros e/ou de difícil obtenção, aliado a vários meses de experimento (Hu *et al*, 2021). Mesmo assim, resultados negativos já foram observados mesmo que o procedimento estivesse aliado a uma diversidade de antibióticos e a amostra garantidamente tivesse arqueas. As AOA em específico apresentam uma sensibilidade significativa a fatores ambientais como pH, salinidade e luz, além de, às vezes, apresentarem mixotrofia obrigatória, exigindo fontes de carbono orgânico e inorgânico, o que aumenta a complexidade de seu cultivo e crescimento em ambientes laboratoriais (Qin *et al*, 2014).

Além disso, algumas AOA produzem peróxido de hidrogênio (H_2O_2) durante a oxidação da amônia, o que é tóxico para o seu crescimento. A ausência de genes de catalase nos AOA exige mecanismos externos de desintoxicação, como a cocultura com bactérias ou a adição de removedores químicos (Kim *et al*, 2016). Utilizar unicamente metodologias tão direcionadas a um grupo, porém, poderia ter limitado os resultados obtidos e as bactérias isoladas poderiam não ter sido encontradas. Utilizar diversas abordagens simultâneas teria exponenciado a dificuldade dos experimentos, inviabilizando sua realização no tempo recomendado. No entanto, novos estudos com o material preservado devem ser realizados ao longo do tempo para confirmar a diversidade observada, assim como análises ambientais relacionadas à diversidade, ao ciclo do nitrogênio e ao solo do Parque Nacional do Iguaçu.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meio de cultivo sólido tendo como base agarose demonstrou-se efetivo para o isolamento de microrganismos de alto interesse, resultando em quatro linhagens de bactérias de alto interesse biotecnológico devido ao seu potencial inexplorado e frequência rara. Ademais, diversos outros espécimes preservados podem ter a mesma característica promissora dos sequenciados. O projeto, porém, revelou que o procedimento ainda não é perfeito: há a necessidade de utilização de outros testes bioquímicos e outros tipos de coloração para a caracterização dos microrganismos, já que a coloração de Gram foi ineficiente. Alternativamente, outros tipos de microscopia, como contraste de fase ou varredura eletrônica, podem ser utilizados para melhor caracterização morfológica dos obtidos. Modificações no procedimento para permitir cultivo de microrganismos que ainda crescem lentamente nessas condições também se fazem necessário, para que então possam ser preservados e identificados mais facilmente.

Visando trabalhos futuros, espera-se que os procedimentos aqui desenvolvidos e os isolados disponíveis agora na CCMIBA contribuam para um melhor entendimento da ecologia do solo do PNI e tenham seus potenciais biotecnológicos explorados.

REFERÊNCIAS

Weisburg, W. G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A.; Lane, D. J. **16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study**. Journal of Bacteriology, 1991, v. 173, n. 2, p. 697-703.

Felsenstein, J. **Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap**. Evolution, 1985, v. 39, p. 783-791.

Saitou, N.; Nei, M. **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees**. Molecular Biology and Evolution, 1987, v. 4, n. 4, p. 406-425.

Whitehead, T.R; Cotta, M.A. **Phylogenetic diversity of methanogenic archaea in swine waste storage pits**. FEMS Microbiology Letters, 1999, v. 179, p. 223-226.

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. **MEGA5: molecular evolutionary genetics analyses using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods**. Molecular Biology and Evolution, 2011, v. 28, p. 2731-2739.

COSTA, Mélodi Maciel da. **Caracterização de Archaea cultivadas a partir de amostras de um aquário de água doce**. Brasília: Universidade de Brasília, 2018. 72 f.

Wellman CH, Gray J. **The microfossil record of early land plants**. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 2000, v. 355, n.1398, p.717-31; discussion 731-2. doi: 10.1098/rstb.2000.0612. PMID: 10905606; PMCID: PMC1692785.

Tischner, R. **Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants.** *Plant, Cell & Environment*, 2000, v. 23, p. 1005-1024. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00595.x>

Wagner, S. C. **Biological Nitrogen Fixation.** *Nature Education Knowledge*, 2011, v. 3, n. 10, p.15. Disponível em: <<http://www.nature.com/scitable/knowledge/library/biological-nitrogen-fixation-23570419>>

Maloof, A. C. *et al.* **The earliest Cambrian record of animals and ocean geochemical change.** *Geological Society of America Bulletin*, 2010, v. 122, n. 11-12, p. 1731–1774. doi:10.1130/b30346.

Kuypers, M., Marchant, H. & Kartal, B. **The microbial nitrogen-cycling network.** *Nature Reviews Microbiology*, 2018, v.16, p. 263-276. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>

Spang, A. *et al.* **Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes.** *Nature*, 2015, v. 521, n. 7551, p. 173-179. doi: 10.1038/nature14447. PMID: 25945739; PMCID: PMC4444528.

Prosser, J. I.; Nicol, G. W. **Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment.** *Environmental Microbiology*, 2008, v. 10, p. 2931-2941. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01775.x>

Leininger, S. *et al.* **Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils.** *Nature*, 2006, v. 442, p. 806–809. <https://doi.org/10.1038/nature04983>

Simon, H. M. *et al.* **Cultivation of Mesophilic Soil Crenarchaeotes in Enrichment Cultures from Plant Roots.** *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, v. 71, p. 4751-4760. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4751-4760.2005>

Stieglmeier, M. *et al.* . ***Nitrososphaera viennensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum Thaumarchaeota.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, v. 64, n. 8, p. 2738-2752. doi: 10.1099/ijs.0.063172-0. PMID: 24907263; PMCID: PMC4129164.

Brochier-Armanet, C. *et al.*] **Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota.** Nature Reviews Microbiology, 2008, v. 6, p. 245–252. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1852>

Könneke, M. *et al.* **Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon.** Nature. 2005, v. 437, p. 543–546. <https://doi.org/10.1038/nature03911>

Könneke, M. *et al.* **Ammonia-oxidizing archaea use the most energy-efficient aerobic pathway for CO₂ fixation.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, v. 111, n. 22, p. 8239-44. doi: 10.1073/pnas.1402028111. PMID: 24843170; PMCID: PMC4050595.

Hatzenpichler, R. **Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea.** Applied and Environmental Microbiology, 2012, v.78, n.21, p.7501-10. doi: 10.1128/AEM.01960-12. PMID: 22923400; PMCID: PMC3485721.

Caranto, J. D.; Lancaster, K. M. **Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017, v. 114, n. 31, p. 8217–8222. doi: 10.1073/pnas.1704504114. Erratum in: Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018, v.115, n.35, p. E8325. PMID: 28716929; PMCID: PMC5547625.

González-Cabaleiro, R.; Curtis, T. P.; Ofiteiru, I. D. **Bioenergetics analysis of ammonia-oxidizing bacteria and the estimation of their maximum growth yield.**

Water Research, 2019, v. 154, p. 238-245. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.01.054>.

Soliman, M.; Eldyasti, A. **Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB): opportunities and applications—a review**. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2018, v.17, p. 285–321. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9463-4>.

Purkhold, U. *et al.* **Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys**. Applied and Environmental Microbiology, 2000, v. 66, n. 12, p. 5368-82. doi: 10.1128/AEM.66.12.5368-5382.2000. PMID: 11097916; PMCID: PMC92470.

Woese, C, R. *et al.* **Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990, v. 87, n. 12, p. 4576-9. doi: 10.1073/pnas.87.12.4576. PMID: 2112744; PMCID: PMC54159.

Staley, J. T. **The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept**. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 2006, v.361, n. 1475, p. 1899-909. doi: 10.1098/rstb.2006.1914. PMID: 17062409; PMCID: PMC1857736.

Pace, N. **Time for a change**. Nature, 2006, v. 441, p. 289. <https://doi.org/10.1038/441289a>.

Stoeckenius, W. **Walsby's square bacterium: fine structure of an orthogonal prokaryote**. Journal of Bacteriology, 1981, v. 148, n. 1, p. 352-60. doi: 10.1128/jb.148.1.352-360.1981. PMID: 7287626; PMCID: PMC216199.

Moissl-Eichinger, C. *et al.* **Archaea Are Interactive Components of Complex Microbiomes**. Trends in Microbiology, 2018, v. 26, n. 1, p. 70 - 85.

Koga, Y.; Nishihara, M.; Morii, H.; Akagawa-Matsushita, M. **Ether polar lipids of**

methanogenic bacteria: structures, comparative aspects, and biosyntheses. Microbiology Reviews, 1993, v. 57, n.1, p. 164-82. doi: 10.1128/mr.57.1.164-182.1993. PMID: 8464404; PMCID: PMC372904.

McGrath, C. Highlight: **Unraveling the Origins of LUCA and LECA on the Tree of Life.** Genome Biology and Evolution, 2022, v. 14, n. 6, p. evac072. doi: 10.1093/gbe/evac072. PMCID: PMC9168435.

Ohbayashi, T. *et al.* **Diversity of the Hydroxylamine Oxidoreductase (HAO) Gene and Its Enzyme Active Site in Agricultural Field Soils.** Microbes and Environments, 2023, v. 38, n. 4, p. ME23068. doi: 10.1264/jsme2.ME23068. PMID: 38092410; PMCID: PMC10728637.

DeLong, E. F. **Everything in moderation: archaea as 'non-extremophiles'.** Current Opinion in Genetics & Development, 1998, v. 8, n.6, p. 649-54. doi: 10.1016/s0959-437x(98)80032-4. PMID: 9914204.

Hoshino, T.; Inagaki, F. **Abundance and distribution of Archaea in the subseafloor sedimentary biosphere.** The ISME Journal, 2019, v. 13, p. 227–231. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0253-3>.

Hu, H.; Natarajan, V. P.; Wang, F. **Towards enriching and isolation of uncultivated archaea from marine sediments using a refined combination of conventional microbial cultivation methods.** Marine Life Science & Technology, 2021, v. 3, p. 231–242. <https://doi.org/10.1007/s42995-021-00092-0>.

Sun, Y. *et al.* **Perspectives on Cultivation Strategies of Archaea.** Microbial Ecology,

2020, v. 79, p. 770–784. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01422-7>.

Xie, R. *et al.* **Expanding Asgard members in the domain of Archaea sheds new light on the origin of eukaryotes.** *Science China Life Sciences*, 2022, v. 65, p. 818–829. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-1969-6>.

Amoozegar, M. A. *et al.* **Halophiles and Their Vast Potential in Biofuel Production.** *Frontiers in Microbiology*, 2019, v. 10, p.1895. doi: 10.3389/fmicb.2019.01895. PMID: 31507545; PMCID: PMC6714587.

Kasirajan, L.; Maupin-Furlow, J. A. **Halophilic archaea and their potential to generate renewable fuels and chemicals.** *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, v. 118, n. 3, p. 1066-1090. doi: 10.1002/bit.27639. PMID: 33241850; PMCID: PMC7897274.

Martin, W.; Baross, J.; Kelley, D.; Russell, M. J. **Hydrothermal vents and the origin of life.** In: *Nature Reviews Microbiology*, 2008, v. 6, n. 11, p. 805–814. doi:10.1038/nrmicro1991

Pfeifer, K. *et al.* **Archaea Biotechnology.** In: *Biotechnology Advances*, 2021, v. 47, p. 107668. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107668>.

Littlechild, J. A. **Enzymes from Extreme Environments and Their Industrial Applications.** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2015, v. 3, p 161. doi:10.3389/fbioe.2015.00161

Wächtershäuser, G. **Before enzymes and templates: theory of surface metabolism.**

Microbiology Reviews, 1988, v. 52, n. 4, p. 452-484. doi: 10.1128/mr.52.4.452-484.1988. PMID: 3070320; PMCID: PMC373159.

Briggs D. E., Fortey R. A. **The early radiation and relationships of the major arthropod groups.** Science. 1989 Oct 13;246(4927):241-3. doi: 10.1126/science.246.4927.241. PMID: 17839017.

Rothman D. H.; Fournier G. P.; French K. L.; Alm E. J.; Boyle E. A.; Cao C., Summons R. E. **Methanogenic burst in the end-Permian carbon cycle.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Apr 15;111(15):5462-7. doi: 10.1073/pnas.1318106111. Epub 2014 Mar 31. PMID: 24706773; PMCID: PMC3992638.

Vajrala, N.; Martens-Habbena, W.; Sayavedra-Soto, L.A.; Schauer, A.; Bottomley, P.J.; Stahl, D. **Hydroxylamine as an intermediate in ammonia oxidation by globally abundant marine archaea.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, v. 110, n. 3, p. 1006-11. doi: 10.1073/pnas.1214272110. Epub 2012 Dec 31. PMID: 23277575; PMCID: PMC3549078.

Callier, V. **Mitochondria and the origin of eukaryotes.** Knowable Magazine, 2022. doi:10.1146/knowable-060822-2.

Walker, C. B., De La Torre, J. R., Klotz, M. G., Urakawa, H., Pinel, N., Arp, D. J., Brochier-Armanet, C., Chain, P. S., Chan, P. P., Gollabgir, A., Hemp, J., Hügler, M., Karr, E. A., Könneke, M., Shin, M., Lawton, T. J., Lowe, T., Martens-Habben W., Sayavedra-Soto, L. A., Lang, D., Sievert, S. M., Rosenzweig, A. C., Manning, G., & Stahl, D. A. 2010. **Nitrosopumilus maritimus genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(19), 8818–8823.

doi:10.1073/pnas.0913533107. PMC: 2889351. PMID: 20421470.

Zahran, H. 1999. **Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate.** Disponível em: <https://doi.org/10.1128/membr.63.4.968-989.1999>

DeLong, E. F. 1992. **Archaea in coastal marine environments.** Proc Natl Acad Sci U S A. Disponível em: doi: 10.1073/pnas.89.12.5685. PMID: 1608980; PMCID: PMC49357.

SpeciesLink network[Internet], 2024. Disponível em: specieslink.net/search

Ren, M., Zhang, Z., Wang, X., Zhou, Z., Chen, D., Zeng, H., Zhao, S., Chen, L., Hu, Y., Zhang, C., Liang, Y., She, Q., Zhang, Y., & Peng, N. (2018). **Diversity and Contributions to Nitrogen Cycling and Carbon Fixation of Soil Salinity Shaped Microbial Communities in Tarim Basin.** Frontiers in Microbiology, 9. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00431>.

Li, L., Zhao, C., Chen, Q., Liu, T., Li, L., Liu, X., & Wang, X. (2022). **Study on Microbial Community Structure and Soil Nitrogen Accumulation in Greenhouse Vegetable Fields with Different Planting Years.** Agronomy. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy12081911>.

Philippot, L., Spor, A., Hénault, C., Bru, D., Bizouard, F., Jones, C., Sarr, A., & Maron, P. (2013). **Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil.** The ISME Journal

Hug, L., Baker, B., Anantharaman, K. et al. (2016). **A new view of the tree of life.** Nat Microbiol 1, Disponível em: . <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>

Gupta A, Saha A, Sar P. (2021). **Thermoplasmata and Nitrososphaeria as dominant archaeal members in acid mine drainage sediment of Malanjkhand Copper Project, India.** Arch Microbiol. Disponível em: doi: 10.1007/s00203-020-02130-4.

Saghaï, A., Banjeree, S., Degrune, F., Edlinger, A., García-Palacios, P., Garland, G., van der Heijden, M.G.A., Herzog, C., Maestre, F.T., Pescador, D.S., Philippot, L., Rillig, M.C., Romdhane, S. and Hallin, S. (2022), **Diversity of archaea and niche preferences among putative ammonia-oxidizing Nitrososphaeria dominating across European arable soils.** Environ Microbiol, 24: 341-356. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15830>

Kowalchuk GA, Stephen JR. (2001). **Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology.** Annu Rev Microbiol. Disponível em: doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.485. PMID: 11544365.

Wu, G., Geng, J., Xu, K., & Ren, H. (2021). **Removal of pharmaceuticals by ammonia oxidizers during nitrification.** Applied Microbiology and Biotechnology, Disponível em: doi:10.1007/s00253-020-11032-w

Vicentin, R. P., Santos, J. V. dos, Labory, C. R. G., Costa, A. M. da, Moreira, F. M. de S., & Alves, E. (2018). **Tolerance to and Accumulation of Cadmium, Copper, and Zinc by Cupriavidus necator.** Revista Brasileira de Ciência Do Solo, 42(0). Disponível em: doi:10.1590/18069657rbc20170080

Curtis TP, Sloan WT, Scannell JW. (2002). **Estimating prokaryotic diversity and its limits.** Disponível em: doi: 10.1073/pnas.142680199. Epub 2002 Jul 3. PMID: 12097644; PMCID: PMC124953.

Velastegui E, Quezada J, Guerrero K, Altamirano C, Martinez JA, Berrios J, Fickers P. (2023) **Is heterogeneity in large-scale bioreactors a real problem in recombinant protein synthesis by Pichia pastoris? Appl Microbiol Biotechnol.** Disponível em: doi: 10.1007/s00253-023-12434-2. Epub 2023 Feb 27. PMID: 36843194.

Tripathi N, Sapra A. (2023) **Gram Staining.** StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>

Timothy Klein, Lianna Poghosyan, J Elaine Barclay, J Colin Murrell, Matthew I Hutchings, Laura E Lehtovirta-Morley, (2022). **Cultivation of ammonia-oxidizing archaea on solid**

medium, FEMS Microbiology Letters, Volume 369, Issue 1, Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnac029>

Wilhelm, M., Sheffield, J., Gh., M., Wu, Y., Spahr, C., Gonella, G., Xu, B., & Dai, H. (2015). **Gram's Stain Does Not Cross the Bacterial Cytoplasmic Membrane.** ACS chemical biology, 10 7, 1711-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00042>.

Beveridge, T., & Schultze-Lam, S. (1996). **The response of selected members of the archaea to the gram stain.** Microbiology, 142 (Pt 10), 2887-95 . Disponível em: <https://doi.org/10.1099/13500872-142-10-2887>.

Venningsen NB, Damgaard M, Rasmussen M, Pérez-Pantoja D, Nybroe O, Nicolaisen MH. (2017) **Cupriavidus pinatubonensis AEO106 deals with copper-induced oxidative stress before engaging in biodegradation of the herbicide 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid.** BMC Microbiol. Disponível em: doi: 10.1186/s12866-017-1119-y. PMID: 29084513; PMCID: PMC5663122.

Dalcanton, F., Ienczak, J. L., Fiorese, M. L., & Aragão, G. M. F. de. (2010). **Produção de poli(3-hidroxibutirato) por Cupriavidus Necator em meio hidrolisado de amido de arroz com suplementação de óleo de soja em diferentes temperaturas.** Química Nova, 33(3), 552–556. Disponível em: doi:10.1590/s0100-40422010000300011

Kim SJ, Ahn JH, Heo J, Cho H, Weon HY, Hong SB, Kim JS, Kwon SW. (2018) **Phreatobacter cathodiphilus sp. nov., isolated from a cathode of a microbial fuel cell.**

Toth EM, Vengring A, Homonnay ZG, Keki Z, Sproer C, Borsodi AK, Marialigeti K, Schumann (2014) **P. Phreatobacter oligotrophus gen. nov., sp. nov., an alphaproteobacterium isolated from ultrapure water of the water purification system of a power plant.** Int J Syst Evol Microbiol 2014; 64:839-845.

Lee SD, Joung Y, Cho JC. (2017). **Phreatobacter stygius sp. nov., isolated from pieces of wood in a lava cave and emended description of the genus Phreatobacter.** Int J Syst Evol Microbiol 2017; 67:3296-3300.

Hordt A, Lopez MG, Meier-Kolthoff JP, Schleuning M, Weinhold LM, Tindall BJ, Gronow S, Kyrpides NC, Woyke T, Goker M. (2020). **Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria.** *Front Microbiol*; 11:468.

Rafiq M, Hassan N, Rehman M, Hayat M, Nadeem G, Hassan F, Iqbal N, Ali H, Zada S, Kang Y, Sajjad W, Jamal M. (2023) **Challenges and Approaches of Culturing the Unculturable Archaea.** Disponível em: doi: 10.3390/biology12121499. PMID: 38132325; PMCID: PMC10740628.

Qin, W., Amin, S., Martens-Habbena, W., Walker, C., Urakawa, H., Devol, A., Ingalls, A., Moffett, J., Armbrust, E., & Stahl, D. (2014). **Marine ammonia-oxidizing archaeal isolates display obligate mixotrophy and wide ecotypic variation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 12504 - 12509. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1324115111>.

Kim, J., Park, S., Damsté, J., Schouten, S., Rijpstra, W., Jung, M., Kim, S., Gwak, J., Hong, H., Si, O., Lee, S., Madsen, E., & Rhee, S. (2016). **Hydrogen peroxide detoxification is a key mechanism for growth of ammonia-oxidizing archaea.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 7888 - 7893. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1605501113>.

Christopher M. Jones, Blaž Stres, Magnus Rosenquist, Sara Hallin, (2008) **Phylogenetic Analysis of Nitrite, Nitric Oxide, and Nitrous Oxide Respiratory Enzymes Reveal a Complex Evolutionary History for Denitrification,** *Molecular Biology and Evolution*, Volume 25, Issue 9. 1955–1966, <https://doi.org/10.1093/molbev/msn146>

da Silva K, Florentino LA, da Silva KB, de Brandt E, Vandamme P, de Souza Moreira FM. (2012) **Cupriavidus necator isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species.** *Syst Appl Microbiol*. Disponível em: [doi:10.1016/j.syapm.2011.10.005](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.10.005). Epub 2012 Feb 22. PMID: 22361568.

Koops H-P, Pommerening-Röser A. (2001) **Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species.** FEMS Microbiol Ecol 37:1–9

Dongxu Wang, Jingni Zhang, Wenkai Han, Peike Wu, Liangwei Deng, Wenguo Wang. (2024). **Ammonia oxidizing bacteria (AOB) denitrification and bacterial denitrification as the main culprit of high N₂O emission in SBR with low C/N ratio wastewater,** *Journal of Environmental Management*, Volume 369, 2024, 122357 ,ISSN 0301-4797, Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.122357>.

Geets J, Boon N, Verstraete W. (2006). **Strategies of aerobic ammonia-oxidizing bacteria for coping with nutrient and oxygen fluctuations: strategies of AOB for coping with nutrient and oxygen fluctuations.** FEMS Microbiol Ecol 58:1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00170.x>

Soliman, M., Eldyasti, A. (2018). **Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB): opportunities and applications—a review.** *Rev Environ Sci Biotechnol* 17, 285–321 (2018). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9463-4>

Purkhold U, Pommerening-Röser A, Juretschko S, Schmid MC, Koops H-P, Wagner M (2000) **Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys.** *Appl Environ Microbiol* 66:5368–5382.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Procedimento Operacional Padrão Desenvolvido para o cultivo.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP

Cultivo e Isolamento de Procariotos Oxidadores de Amônia
Experimento: Preparo de meios
Responsável: Samuel dos Santos Ribeiro

1. Materiais

- Balança Analítica;
- Capela de exaustão;
- Fluxo Laminar
- Bico de Bunsen;
- Fita de pH ou pHmetro;
- Espátula;
- Vidros de relógio;
- Micropipeta 100-1000 μL ;
- Micropipeta 20-200 μL ;
- Ponteiras;
- Frascos Schott
- Placas de Petri;
- Caneta Pilot
- Pisseta.
- Fita para autoclave.
- Bomba de filtração a vácuo

2. Reagentes

1. Clorofòrmio
2. Tris(hidroximetil)aminom etano
3. EDTA
4. RNase
5. Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)
6. Fenol
7. Álcool Iso-amílico
8. NaCl
9. Etanol Absoluto
10. Etanol 70%
11. NaOH
12. HEPES
13. NaFeEDTA
14. NaHCO₃
15. NaCl
16. MgCl₂
17. CaCl₂
18. KH₂PO₄
19. KCl
20. Na₂SO₄
21. Biotina
22. Piridoxina cloridrato
23. Riboflavina
24. Ácido nicotínico
25. Vitamina B5
26. Vitamina B12
27. Ácido fólico
28. Ácido paraminobenzóico
29. Cloreto de colina
30. Nistatina
31. Ampicilina
32. Canamicina
33. Cloridrato de Clindamicina
34. Gentamicina 4%
35. Água destilada
36. Água ultrapura

3. Lavagem de materiais

3.1 Preparo de solução HCl 0,1 M

Solução HCl 0,1M	Quantidade em g ou mL ou concentração em g/L
HCl 37%	16,5 mL
Água destilada	1983,5 mL

- Utilize o EPI disponível para manuseio de ácidos fortes.
- Na capela de exaustão, transfira pequenas porções de HCl 37% para um béquer e depois para uma proveta com gradação possível de 16,5 mL
- Transfira o conteúdo para um béquer com 600mL de água destilada
- Complete até 2000 mL.

Obs: Não há necessidade de rigidez na molaridade da solução. Por isso, não é necessário ser extremamente preciso.

3.2 Preparo de solução Extran 20%

Solução Extran 20 %	Quantidade em g ou mL ou concentração em g/L
Extran	200 mL
Água destilada	800 mL

- Dilua o Extran na água e reserve em um frasco rígido.

3.3 Lavagem

- Limpe vigorosamente o que for utilizar com uma esponja que deverá ser utilizada apenas para esse tipo de lavagem.
- Enxágue com a solução de HCl 0,1 M
- Enxágue 3 vezes com água destilada
- Deixe secar numa estufa, com exceção de vidrarias volumétricas, e mantenha isolado de possíveis sujeiras.

4. Preparo de soluções estoque

4.1 Soluções de antibiótico

4.1.1 Solução de Ampicilina

Ampicilina 10% p/v	Quantidade em g ou mL ou concentração em g/L
Ampicilina	25 mg
Água ultrapura	250 mL

- Pese, transfira para um béquer com a água e mexa bem com um bastão de vidro.
- Filtre a solução com uma membrana de 0,22 μm e guarde na geladeira.

4.1.2 Solução de Canamicina

Canamicina 5% p/v	Quantidade em g ou mL ou concentração em g/L
Canamicina	12,5 mg
Água ultrapura	250 mL

- Pese, transfira para um béquer com a água e mexa bem com um bastão de vidro.
- Filtre a solução com uma membrana de 0,22 μm e guarde na geladeira.

4.2 Solução vitamínica

Solução vitamínica	Quantidade em mg ou mL ou concentração em g/L
Água ultrapura	100 mL
Biotina	2 mg
Piridoxina Cloridrato	10 mg
Riboflavina	5 mg
Ácido Nicotínico	5 mg
Vitamina B5	5 mg
Vitamina B12	0,1 mg
Ácido Fólico	2 mg
Ácido paraminobenzóico	5 mg
Cloreto de Colina	200 mg

- Pese cuidadosa e rapidamente cada uma das vitaminas para evitar exposição à luz
- transfira para um béquer com a água e mexa bem com um bastão de vidro
- Filtre a solução com uma membrana de 0,22 μm e guarde na geladeira envolvendo o frasco em papel alumínio ou semelhante para evitar exposição à luz.

4.3 Tampão HEPES

Tampão HEPES	Quantidade em g ou mL ou concentração em g/L
NaOH	2,4 g
HEPES	23,8 g
Água ultrapura	60 mL

- Dissolva o NaOH na água
- Adicione o HEPES
- Ajuste o pH para 7,5, evitando alterar em excesso o volume
- Adicione água ultrapura até 100 mL.
- Autoclave e guarde na geladeira após esfriar.

4.4 Solução Piruvato de sódio 1M

Solução Piruvato de sódio 1M	Quantidade em g ou mL ou concentração em g/L
Piruvato de sódio	5,5 g
Água ultrapura	50 mL

- Pese, transfira para um béquer com a água e mexa bem com um bastão de vidro.
- Filtre a solução com uma membrana de 0,22 μm e guarde na geladeira.

4.5 NaFeEDTA 7.5 mM

Solução Piruvato de sódio 1M	Quantidade em g ou mL ou concentração em g/L
NaFeEDTA (EDTA férrico sódico)	275 mg
Água ultrapura	50 mL

- Pese, transfira para um béquer com a água e mexa bem com um bastão de vidro.

- Filtre a solução com uma membrana de 0,22 μm e guarde na geladeira envolvendo o frasco em papel alumínio ou semelhante para evitar exposição à luz.

-

4.6 Solução de oligoelementos

Solução de oligoelementos	Quantidade em mg ou mL ou concentração em g/L
Água ultrapura	250 mL
HCl	2 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	10 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	5 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	5 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	5 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	2 mg

- Pese, transfira para um béquer com a água e mexa bem com um bastão de vidro.
- Filtre a solução com uma membrana de 0,22 μm e guarde na geladeira envolvendo o frasco em papel alumínio ou semelhante para evitar exposição à luz.

4.7 Solução de NH₄Cl 1M

Solução NH ₄ Cl 1M	Quantidade em g ou mL ou concentração em g/L
NH ₄ Cl	2,67 g
Água ultrapura	50 mL

- Pese, transfira para um béquer com a água e mexa bem com um bastão de vidro.
- Autoclave e guarde na geladeira.

4.8 Solução de NaHCO₃ 1M

Solução de NaHCO ₃ 1M	Quantidade em g ou mL ou concentração em g/L
NaHCO ₃	4,2 g

Água ultrapura	50 mL
----------------	-------

- Pese, transfira para um béquer com a água e mexa bem com um bastão de vidro.
- Filtre a solução com uma membrana de 0,22 μm e guarde na geladeira.

5. Preparo de enriquecimento

5.1 Meio de Água Fresca Artificial (Fresh Water Medium - FWM)

FWM	Quantidade em g ou mL ou concentração em g/L
Água ultrapura	1000 mL
NaCl	1 g
MgCl ₂ x 4 H ₂ O	0,4 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,5 g
Na ₂ SO ₄	0,05 g

- Pese, transfira para um béquer com a água e mexa bem com um bastão de vidro.
- Autoclave e cheque se está livre de precipitações.
- Espere esfriar e guarde

5.2 Meio Arq L

Arq L	Quantidade em g ou mL ou concentração em g/L
FWM	1000 mL
Solução de oligoelementos	1 mL
Solução NaFeEDTA	1 mL
Solução NaHCO ₃	2 mL
Tampão HEPES	10 mL
Solução NH ₄ Cl	2 mL

Solução Piruvato de Sódio	1 mL
Solução Vitamínica	1 mL
Nistatina 100.000 UI	5 mL

- Adicione as soluções estéreis ao FWM autoclavado.

Obs.: Não é possível guardar esse meio. Prepare o mais próximo possível do uso.

6. Preparo de meio sólido

6.1 Meio Arq S

Arq S	Quantidade em g ou mL ou concentração em g/L
FWM	1000 mL
Agarose	14 g
Solução de oligoelementos	1 mL
Solução NaFeEDTA	1 mL
Solução NaHCO ₃	2 mL
Tampão HEPES	10 mL
Solução NH ₄ Cl	2 mL
Solução Piruvato de Sódio	1 mL
Solução Vitamínica	1 mL
Nistatina 100.000 UI	5 mL
Solução de Ampicilina 10 %	5 mL
Solução de Canamicina 10 %	2,5 mL
Cloridrato de Clindamicina	1,7 mg
Gentamicina 4%	5 mL

- Adicione a agarose ao FWM e autoclave.

- Adicione os componentes restantes rapidamente antes de solidificar, tomando cuidado para não estar quente demais para degradar os componentes, mas também sem deixar solidificar.
- Despeje em placas de petri, preenchendo cerca de $\frac{2}{3}$ do volume da placa.

Obs.: Não é possível guardar esse meio. Prepare o mais próximo possível do uso. Caso solidifique antes de finalizar o processo, deixe dissolver lentamente em banho-maria, evitando temperaturas altas.