

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Daniela Fernandes Gorziza

CARACTERIZAÇÃO DA BACTÉRIA *Anoxybacillus sp.* PC2

Porto Alegre, 2014.

Daniela Fernandes Gorziza

CARACTERIZAÇÃO DA BACTÉRIA *Anoxybacillus sp.* PC2

Trabalho de conclusão de curso submetido ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Alexandre José Macedo

Porto Alegre, 2014.

Daniela Fernandes Gorziza

CARACTERIZAÇÃO DA BACTÉRIA *Anoxybacillus sp.* PC2

Trabalho de conclusão de curso submetido ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Data de aprovação:

Dra. Karine Rigon Zimmer

FURG

Dra. Danielle da Silva Trentin

UFRGS

Dr. Alexandre José Macedo

FACFAR / UFRGS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Alexandre Macedo, pela orientação, ensinamentos e críticas que ajudaram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do laboratório, especialmente a Sharon, pelo auxílio nos experimentos.

Aos professores e funcionários da UFRGS que contribuíram com empréstimos de equipamentos e materiais.

À minha família, principalmente à minha mãe por sempre me apoiar e investir em meus estudos.

Aos meus colegas da biologia, pela amizade ao longo desses anos de curso.

Ao pessoal dos laboratórios (LAPEP, FEPAM, IGP) onde fiz iniciação científica e estágio durante a graduação, que de uma maneira ou de outra contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

RESUMO

Caracterização da bactéria *Anoxybacillus* sp. PC2

Anoxybacillus sp. PC2 é uma bactéria proveniente de uma amostra de solo da Caatinga, um bioma exclusivamente brasileiro. *Anoxybacillus* sp. PC2 pertence à família Bacillaceae que apresenta como principais características ser Gram-positiva, ter forma de bastonete, produzir esporos, ser aeróbio ou anaeróbio facultativo. São produtores de enzimas com interesses industriais, como as xilanases e as celulases lignocelulolíticas. Bactérias do gênero *Anoxybacillus* são termófilas. Apresenta, em sua maior parte, temperatura ótima de crescimento num intervalo entre 50 °C e 65 °C. São alcalino-tolerantes e, na sua maioria, crescem em pH neutro. O objetivo desse trabalho é caracterizar a cepa *Anoxybacillus* sp. PC2, visando classificá-la como uma nova espécie. Foram realizadas curvas de crescimento para identificar o pH e a temperatura ótima, ensaios bioquímicos, extração, purificação e sequenciamento do gene 16S rRNA, testes para anaerobiose e verificação de produção de esporos. Foi possível observar crescimento bacteriano num intervalo de pH entre 6,0 e 8,0 e num intervalo de 45 °C e 60 °C. O pH ótimo ficou entre 6,0 e 7,0 e a temperatura ótima é igual ou acima a 60 °C. Os resultados também demonstraram que *Anoxybacillus* sp. PC2 é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio facultativo, produtor de esporos, fermenta açúcares, é capaz de hidrolisar a uréia, não apresenta motilidade nem é capaz de descarboxilar a lisina. Em relação ao sequenciamento do gene 16S rRNA, a cepa apresentou similaridade de 98% com *Anoxybacillus tepidamans*, porém diferiu em algumas características bioquímicas. Por esses motivos, *Anoxybacillus* sp. PC2 possivelmente é uma nova espécie.

Palavras-chave: *Anoxybacillus*, 16S rRNA, Caatinga.

ABSTRACT

Characterization of bacteria *Anoxybacillus* sp. PC2

Anoxybacillus sp. PC2 is an isolated from a soil sample from Caatinga, exclusively Brazilian biome. *Anoxybacillus* sp. PC2 belongs to the family Bacillaceae that has some main features: being Gram-positive, rod-shaped, produce spores, being aerobic or anaerobic optional. Produce enzymes with industrial interests such as xylanases and cellulases lignocellulolytic. Bacteria of the genus *Anoxybacillus* are thermophilic. In the most part, present optimum growth temperature between 50 °C and 65 °C. Alkali-tolerant and in the most part grow at neutral pH. The objective of this work is to characterize the strain *Anoxybacillus* sp. PC2, aiming to describe it as a new species. Growth curves were performed to identify optimum temperature and pH, biochemical assays, extraction, purification and sequencing of gene 16S rRNA, verification tests for anaerobiosis and spores production. Bacterial growth was observed in the pH range 6,0 to 8,0 and in a range of 45 °C to 60 °C. The optimum pH was between 6,0 and 7,0 and the optimum temperature is up to or equal to 60 °C. The results also showed that *Anoxybacillus* sp. PC2 is a Gram-positive rod, facultative anaerobic, spore-producer, utilizes glucose, sucrose and lactose, makes urea hydrolysis, has no motility and do not make lysine decarboxylation. Regarding the 16S rRNA gene sequencing, the strain showed 98% similarity with *Anoxybacillus tepidamans* but differ in some biochemical characteristics. For these reasons, *Anoxybacillus* sp. PC2 is possibly a new species.

Keywords: *Anoxybacillus*, 16S rRNA, Caatinga.

1 – INTRODUÇÃO	9
1.1 - Família Bacillaceae	9
1.2 - Gênero <i>Anoxybacillus</i>	9
1.3 - <i>Anoxybacillus</i> sp. PC2	10
1.4 - Bactérias termófilas.....	10
1.5 - Potencial biotecnológico	10
1.6 - Objetivos.....	11
1.7 - Objetivos Específicos	11
2 - METODOLOGIA	13
2.1 - Local de trabalho	13
2.2 – Isolado	13
2.3 - Experimento para anaerobiose.....	13
2.4 - Provas bioquímicas	14
2.5 - Curva de crescimento.....	14
2.6 - Avaliação do pH ótimo.....	14
2.7 - Avaliação da temperatura ótima	15
2.8 – Produção, coloração e visualização de esporos.....	15
2.9 - Extração de DNA	16
2.10 - Amplificação, purificação e sequenciamento do gene 16S rRNA.....	16
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
3.1 – Isolado	18
3.2 - Experimento para Anaerobiose	18
3.3 - Testes Bioquímicos	19
3.4 - pH ótimo	19
3.5 - Temperatura ótima	20
3.6 - Produção de esporos.....	21
3.7 - Amplificação, Purificação e Sequenciamento do gene 16S rRNA.....	22

4 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - Família Bacillaceae

A Bacillaceae é representada por bactérias Gram-positivas em forma de bastonetes e caracterizam-se, em sua maior parte, por produzirem esporos em meios adversos. São micro-organismos aeróbios e anaeróbios facultativos, alguns apresentam flagelos. Segundo o *UniPort Taxonomy*, a família consiste num total de mais de 25 mil micro-organismos (até junho de 2014), incluindo espécies descritas, subespécies e cepas ainda não descritas adequadamente. Alguns micro-organismos dessa família são produtores de um grande número de enzimas com importantes aplicações industriais, como as xilanases (Nagar et al., 2010) e as celulases lignocelulolíticas (Ibrahim et al., 2007).

1.2 - Gênero *Anoxybacillus*

No ano de 2000, Pikuta e colaboradores isolaram uma nova cepa anaeróbia proveniente de esterco animal. Neste estudo, *Anoxybacillus* foi sugerido como um novo gênero dentro da família Bacillaceae. Apesar da denominação *Anoxybacillus*, os membros deste gênero não são estritamente anaeróbios (Pikuta et al. 2009).

Bactérias do gênero *Anoxybacillus* são bacilos Gram-positivos, termófilos, anaeróbios facultativos e são isolados principalmente de fontes termais, estrume e alimentos processados (Pikuta E, et al. 2000, Gul R, et al. 2008, Saw JH, et al. 2008). Várias enzimas, tais como a xilanase e α -amilase, são produzidas por este gênero (Goh et al., 2013). As espécies de *Anoxybacillus*, em sua maior parte, possuem temperatura ótima de crescimento no intervalo entre 50 °C e 65 °C, com exceção da cepa TBS-6 que tem temperatura ótima de 37 °C (Paul et al. 2012). São alcalino-tolerantes e, na sua maioria, são capazes de crescer em pH neutro, uma exceção é *Anoxybacillus amylolyticus*, cujo pH ótimo é de 5,6 (Poli et al. 2006).

1.3 - *Anoxybacillus* sp. PC2

Anoxybacillus sp. PC2 é um isolado proveniente de uma amostra de solo da Caatinga. A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro, assim o patrimônio biológico desse bioma não é encontrado em nenhum outro lugar do mundo além do Nordeste do Brasil. O clima é semiárido, a temperatura média anual da região é de 27,5 ° C (Alves et al., 2011), a umidade é baixa e a precipitação média anual é de 250-500 mm (Basso et al., 2005). Os solos são férteis, bem drenados e oxigenados (Basso et al., 2005). A Caatinga ocupa uma área de cerca de 844.453 quilômetros quadrados, o equivalente a 11% do território nacional. Ela engloba os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais (<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>).

1.4 - Bactérias termófilas

Bactérias termófilas, como *Anoxybacillus*, são produtoras de enzimas termoestáveis. Essas enzimas sofrem desnaturação irreversível apenas em altas temperaturas. Além disso, também possuem estabilidade em condições extremas como pHs altos e baixos, baixas concentrações de água, solventes orgânicos e agentes desnaturantes. Por apresentar essas características, essas enzimas tornam-se úteis a diversas aplicações (Bruins, et al., 2001).

1.5 - Potencial biotecnológico

O gênero de *Anoxybacillus* produz xilanases. O interesse na produção dessas enzimas deve-se às suas inúmeras aplicações na indústria, tais como o biobranqueamento (Dwivedi et al., 2010) e, principalmente, a conversão de materiais lignocelulósicos em substratos fermentáveis para a produção de biocombustíveis econômicos e sustentáveis (Nagar et al. 2010).

Anoxybacillus sp. PC2 é produtor de queratinase (Reis, V. S. 2014), podendo fazer a conversão da queratina em hidrolisados proteicos. As queratinases podem ser usadas na bioconversão de resíduos de queratina em rações, fertilizantes e filmes (Brandelli et al., 2010).

1.6 - Objetivos

Identificar as principais características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas da bactéria denominada PC2, visando classificar uma nova espécie de *Anoxybacillus*.

1.7 - Objetivos Específicos

- Determinar a temperatura e o pH ótimo da bactéria *Anoxybacillus* sp. PC2 através da curva de crescimento;
- Verificar a produção de esporos, submetendo o isolado a um meio de cultura pobre em nutrientes;
- Definir se o oxigênio é essencial para o crescimento de *Anoxybacillus* sp. PC2, com o auxílio do teste para anaerobiose;
- Classificar os dados moleculares;
- Avaliar a utilização de açúcares com o ensaio TSI ("*Triple Sugar Iron*");

- Constatar a presença / ausência das enzimas urease e lisina descarboxilase utilizando os testes bioquímicos para hidrólise da uréia e a descarboxilação da lisina (LIA);
- Verificar a presença de flagelo através do ensaio bioquímico para motilidade.

2 - METODOLOGIA

2.1 - Local de trabalho

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas – Departamento de Produção de Matéria-Prima – Centro de Biotecnologia da UFRGS, entre março e junho de 2014.

2.2 – Isolado

Neste trabalho, foi utilizado 1 (um) micro-organismo pertencente a coleção do laboratório, previamente de uma amostra de solo do bioma Caatinga (Brasil). Esse micro-organismo estava preservado em leite desnatado com 15% de glicerol (v/v) a -20 °C. O isolado é produtor de queratinase, demonstrando ser um micro-organismo com características potencialmente úteis para aplicações biotecnológicas e industriais, que fazem uso da hidrólise de queratina (Reis, V. S. 2014). A bactéria foi semeada em agar leite, incubada a temperatura de 60 °C por um período de 24 horas e submetida a coloração de Gram. Após, foi visualizada em microscópio óptico com aumento de 1000x. A cepa foi repicada semanalmente.

2.3 - Experimento para anaerobiose

Utilizou-se o kit Anaerocult® A, reagente que fornece condições anaeróbicas em jarra de anaerobiose, conforme instruções de uso do fabricante.

2.4 - Provas bioquímicas

Foram realizados os seguintes testes bioquímicos: hidrólise da uréia, motilidade, tríplice açúcar ferro (TSI) e descarboxilação de lisina (LIA). Os meios de cultura utilizados foram concedidos pelo Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

2.5 - Curva de crescimento

O isolado foi transferido para frasco de Erlenmayer de 250 mL, contendo 30 mL de meio Luria - Bertani (LB). O inóculo, realizado em triplicata, foi incubado à temperatura de 60 °C com agitação (180 r.p.m.) por 16 horas. Após esse período de incubação, foi lida a absorbância em aparelho de espectrofotômetro a 600 nanômetros (nm). Usou-se o meio de cultivo LB como branco. O inóculo foi ajustado, com meio LB, para O.D. de 0,1. Uma alíquota de 4 mL do inóculo ajustado (O.D. 0,1) foi transferida para um frasco de 50 mL, contendo 36 mL de meio LB. Foi executada a primeira leitura, tempo zero, em espectrofotômetro a 600 nm e 2 mL dessa suspensão bacteriana foram distribuídos para 16 tubos de ensaio com tampa, previamente esterilizados por autoclave. Esse procedimento foi feito para cada um dos três inóculos. Os 48 tubos de ensaio, contendo a suspensão bacteriana, foram mantidos em agitação (220 r.p.m) à temperatura de 60 °C por um período de 16 horas. Para o acompanhamento do crescimento bacteriano, a cada hora realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm. A cada leitura, usou-se um tubo de ensaio de cada triplicata, após o mesmo era descartado. Em todas as leituras foi subtraído o valor da absorbância do caldo LB, usado como branco.

2.6 - Avaliação do pH ótimo

Para estimar o pH ótimo foram realizadas curvas de crescimento bacteriano. Foram testados pHs de 5,0 a 10,0. Para ajuste do pH 5,0 foi usado tampão citrato 50

mM. Para os meios de cultura ajustados com pHs 6,0 e 7,0 utilizou-se tampão fosfato de potássio 50 mM e os meios com pHs acima de 8,0 foram ajustados com tampão borato 50 mM. Os valores dos pHs dos meios de cultura foram verificados com pHmetro antes e após a esterilização desses. Todos os experimentos para a identificação do pH ótimo foram realizados na temperatura de 60 °C.

2.7 - Avaliação da temperatura ótima

Para identificar a temperatura ótima de crescimento da bactéria *Anoxybacillus* sp. PC2 utilizou-se meio de cultura LB líquido preparados com tampão fosfato de potássio 50 mM, ajustado em pH 7,0. Foram realizadas curvas de crescimento nas temperaturas de 55 °C e 60 °C. Também foi verificado o crescimento bacteriano nas temperaturas de 45 °C e 50 °C.

2.8 – Produção, coloração e visualização de esporos

A produção de esporos foi testada com meio nutriente (Oxoid, Reino Unido) 0,7%, suplementado com 0,1% de $MnSO_4$ (Schäffer et al., 2004). O isolado foi inoculado nesse meio de cultura pobre em nutrientes, incubado a temperatura de 60 °C e mantido em agitação por um período de 48 horas.

Os esporos foram submetidos à coloração de Wirtz-Conklin. O esfregaço bacteriano foi fixado em lâmina e coberto com papel filtro, que foi saturado com verde de malaquita. A lâmina foi submetida à chama por 2 a 3 minutos. Após esfriar, lavou-se em água corrente. O esfregaço foi coberto com safranina durante 30 segundos, seguido de lavagem em água corrente. Ao secar, foi visualizada em microscópio óptico com aumento de 1000x.

2.9 - Extração de DNA

A bactéria foi semeada em ágar leite, a temperatura de 60 °C durante 24 horas e ressuspensa em 500 µL de PBS. Adicionou-se 300 µL de solução de lise (Tris HCl 20 mM pH 8, EDTA 2 mM, Triton 1%, SDS 3%). Agitou-se em vórtex por 5 minutos na velocidade máxima e o tubo foi incubado a 70 °C por 5 minutos. Agitou-se em vórtex por 2 minutos na velocidade máxima e incubada no ultrafreezer. A amostra foi centrifugada e foi coletado o sobrenadante. Adicionou-se um volume equivalente de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (50% - 48% - 2%) e foi misturado com vórtex durante 3 minutos na velocidade máxima. Centrifugou-se na temperatura de 4 °C, durante 5 minutos a 12000 r.p.m e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. O DNA (fase aquosa) foi precipitado com etanol 96% e NaCl 5M nas seguintes proporções: para cada 1000 µL de amostra coloca-se 40 µL de NaCl 5M e 2075µL de etanol 96%. Misturou-se manualmente. Centrifugou-se a 2500/g em 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão, o resíduo de etanol secou a temperatura ambiente. O pellet foi ressuspensa com Tris EDTA 10 mM pH 8.0. O DNA extraído foi armazenado em temperatura entre 4 °C a – 20 °C.

2.10 - Amplificação, purificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

A bactéria foi caracterizada por sequenciamento do gene 16S rRNA. O gene 16S rRNA foi amplificado a partir do DNA purificado, por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os seguintes primers: 27F, 518R, 1087R, 357F, 945F e 1492R. A amplificação por PCR foi realizada com 50 ng de DNA extraído de uma mistura contendo 50 µL, 0,2 pM de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP, 5 µL de 10X tampão PCR (Invitrogen), 1,25 U de platina ® Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1,5 µL de uma solução 50 mM de MgCl₂ (Invitrogen). A amplificação foi submetida às seguintes condições: desnaturação inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos consistindo de desnaturação a 94 °C durante 30 segundos, emparelhamento durante 30 segundos a 55 °C, e extensão a 72 °C durante 2 min. A amplificação foi completada por incubação durante 5 minutos a 72 °C para permitir a extensão completa dos produtos de PCR.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit de AxyPrep PCR Clean-up (Axygen Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante e sequenciado usando o sequenciador de DNA ABI PRISM 3130xl™ (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências de banco de dados acessíveis no site do NCBI ([Http://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), utilizando a ferramenta BLAST.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Isolado

Depois de semear a bactéria em ágar leite e cultivá-la a 60°C por 24 horas, verificou-se que as colônias apresentam forma circular e coloração amarelada. A coloração de Gram e a visualização microscópica mostrou que a bactéria é um bacilo Gram positivo.

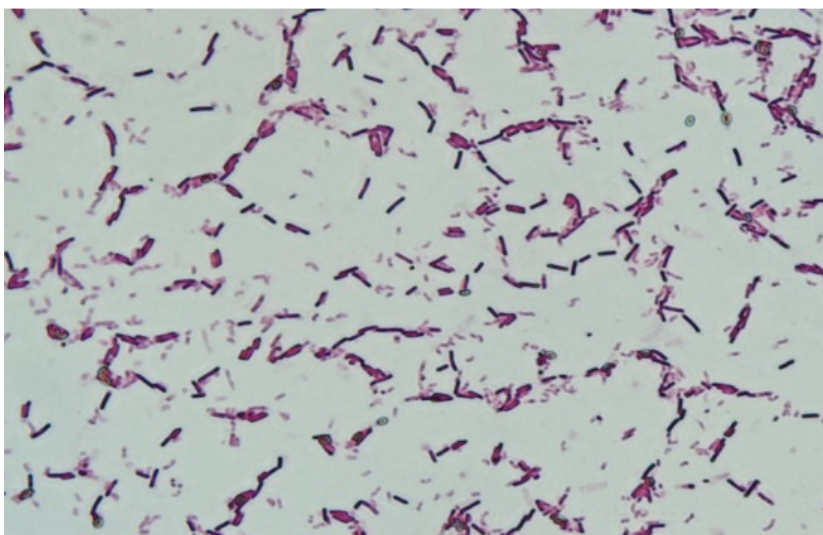


Figura 1. Coloração de Gram da bactéria *Anoxybacillus* sp. PC2.

Visualização microscópica (Olympus BX 51) com aumento de 1000x.

3.2 - Experimento para Anaerobiose

A bactéria cresceu tanto na ausência como na presença de oxigênio, por isso tratar-se de um micro-organismo anaeróbio facultativo.

3.3 - Testes Bioquímicos

A cepa *Anoxybacillus sp.* PC2 apresentou resultado positivo no ensaio de TSI. A fermentação dos açúcares foi visível através da mudança de coloração de todo o meio, passando de vermelho (cor original) para amarelo, devido à acidificação resultante (Tabela 1).

O isolado também demonstrou a habilidade em decompor a uréia em duas moléculas de amônia pela ação da enzima urease. Esse resultado foi verificado com o aparecimento da cor pink no meio de cultura (Tabela 1).

No teste para LIA, a bactéria não demonstrou capacidade em descarboxilar a lisina. O meio de cultura apresentou cor amarelada, não púrpura (Tabela 1).

A motilidade não foi observada, a bactéria cresceu somente na linha de picada, indicando a ausência de flagelo (Tabela 1).

Tabela 1. Ensaio bioquímicos realizados com a cepa *Anoxybacillus sp.* PC2.

Teste bioquímico	Resultado
Tríplice açúcar ferro (TSI)	
Glicose	+
Sacarose	+
Lactose	+
Motilidade	-
Descarboxilação da lisina (LDC)	-
Hidrólise da uréia	+
+ presença de fermentação e ação enzimática	
- ausência de fermentação e ação enzimática	

3.4 - pH ótimo

Foi possível observar o crescimento bacteriano num intervalo de pH entre 6,0 e 8,0, na temperatura fixa de 60 °C. As curvas de crescimento mostraram-se

bastante semelhantes nos pHs 6,0 e 7,0, enquanto no pH 8,0 a curva de crescimento apresenta uma fase lag mais longa e sua fase exponencial é mais baixa (Figura 2). Conforme os resultados obtidos a bactéria *Anoxybacillus sp.* PC2 possivelmente tem seu pH ótimo entre 6,0 e 7,0.

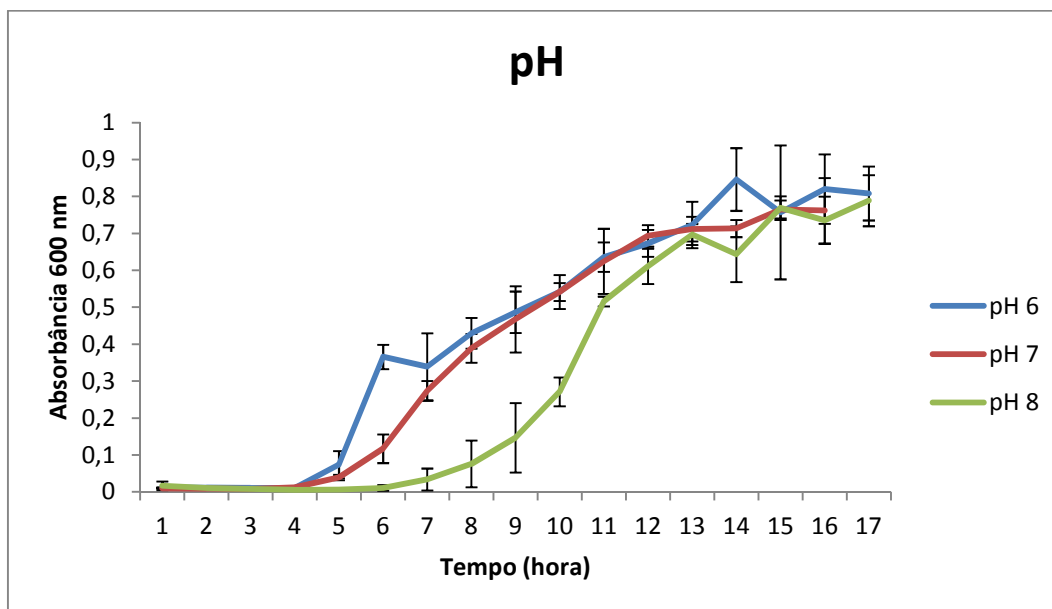


Figura 2. Curva do crescimento bacteriano nos pHs 6,0 - 7,0 e 8,0.

3.5 - Temperatura ótima

O micro-organismo não apresentou crescimento na temperatura de 45 °C, crescendo a partir de 50 °C, utilizando pH fixo de 7,0. Na temperatura de 60 °C o isolado apresentou a fase lag mais curta seguida de uma fase logarítmica mais alta em comparação a curva de crescimento na temperatura de 55 °C (Figura 3). Esses resultados demonstram que na temperatura de 55 °C as células levam mais tempo para iniciar sua multiplicação e após iniciar a divisão celular a velocidade foi mais baixa comparando com a curva demonstrada à 60 °C. Apesar de 60 °C apresentar melhor curva de crescimento em relação a 55 °C não se pode afirmar que essa seja sua temperatura ótima, pois não foram realizados testes com temperaturas mais elevadas, visto que o aparelho disponível para o experimento não disponibiliza temperatura superior.

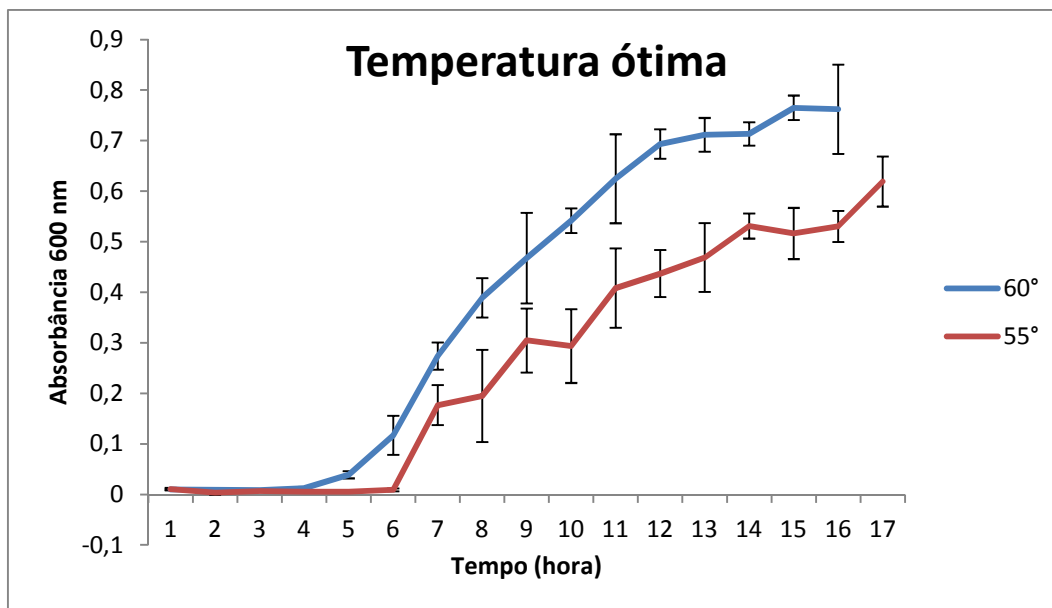


Figura 3. Curva do crescimento da cepa PC2 nas temperaturas de 55 °C e 60 °C.

3.6 - Produção de esporos

Após ser submetida à incubação em meio de cultivo pobre em nutrientes, a bactéria produziu esporos centrais como demonstrado pela análise microscópica das células após a coloração de Wirtz-Conklin.

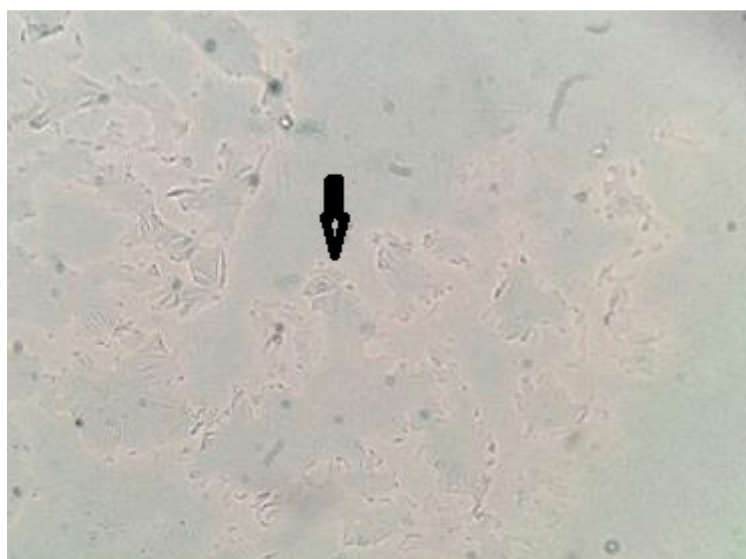


Figura 2. Visualização microscópica (Medilux MDL-150-BAI), A = 1000X, de esporos centrais e células rompidas de *Anoxybacillus* sp. PC2.

3.7 - Amplificação, Purificação e Sequenciamento do gene 16S rRNA

A sequência do gene 16S rRNA foi comparada, com a utilização da ferramenta BLAST, no banco de dado do NCBI. Apresentando 98% de similaridade com *Anoxybacillus tepidamans*.

A análise filogenética do gene 16S rRNA realizada a seguir, comparou a sequência de 1419 nucleotídeos obtida para o isolado *Anoxybacillus* sp. PC2 com sequências de cepas tipo e referência mais relacionadas (Figura 4). O resultado mostra o isolado *Anoxybacillus* sp. PC2 em um ramo independente dentro do gênero *Anoxybacillus*, que por sua vez aparece filogeneticamente separado do gênero *Geobacillus*. A árvore filogenética confirma que o isolado *Anoxybacillus* sp. PC2 está mais próximo filogeneticamente da espécie *Anoxybacillus tepidamans* do que das demais espécies analisadas (Reis, V.S. 2014).

Apesar dessa similaridade, essas bactérias diferem em algumas características bioquímicas. *Anoxybacillus tepidamans* apresenta flagelo e não hidrolisa a uréia (Schäffer *et al.*, 2004), enquanto esses resultados não se repetem com *Anoxybacillus* sp. PC2. Essas diferenças somadas com os resultados da filogenia abrem a possibilidade de *Anoxybacillus* sp. PC2 não pertencer à espécie de *Anoxybacillus tepidamans*, e sim de ser uma nova espécie.

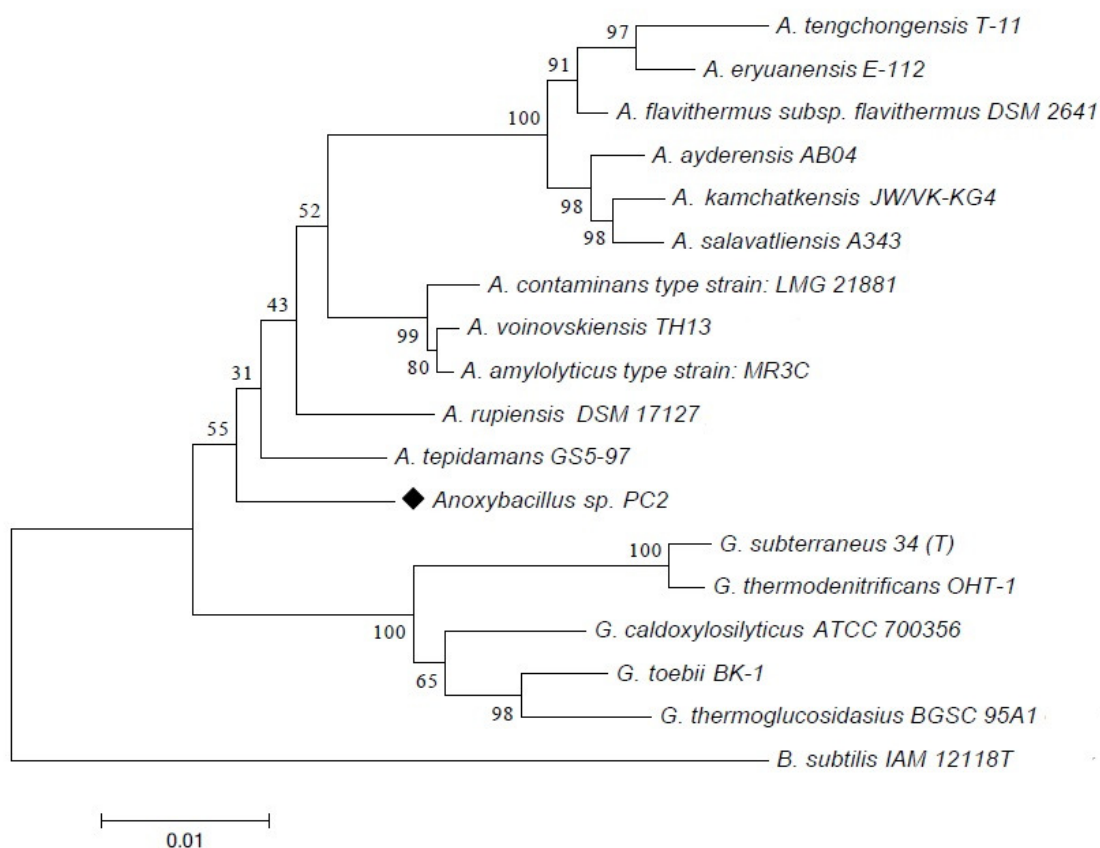


Figura 4: Posição filogenética do *Anoxybacillus* sp. PC2 com outras espécies validamente descritas baseada em sequências 16S rRNA. *Bacillus subtilis* foi utilizado como representante de um grupo externo. A árvore filogenética foi construída utilizando o método “neighbourjoining”. O percentual de replicatas nas quais os táxons associados se agrupam no teste bootstrap (1000 replicatas) é mostrado ao lado dos nodos dos ramos (Reis, V.S. 2014).

4 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Anoxybacillus sp. PC2 é um bacilo termófilo, Gram-positivo, anaeróbio facultativo, produtor de esporos. Sua temperatura ótima de crescimento deve ser acima ou igual a 60 °C e seu pH ótimo está entre 6,0 e 7,0. *Anoxybacillus* sp. PC2 fermenta açúcares (glicose, sacarose e lactose) e hidrolisa a uréia. Não possui flagelo, nem descarboxila a lisina. Quanto ao sequenciamento, existe uma grande similaridade (98%) com *A. tepidamans*, porém difere desse em algumas características bioquímicas. Enquanto *Anoxybacillus* sp. PC2 faz a hidrólise da uréia e não possui flagelo, *A. tepidamans* apresenta resultados opostos (Tabela 2). Somando essas diferenças bioquímicas com os resultados filogenéticos, existe uma grande possibilidade de *Anoxybacillus* sp. PC2 ser uma nova espécie, além de se tratar de um isolado proveniente de uma amostra de solo da Caatinga, um bioma exclusivamente brasileiro. Entretanto, outros ensaios (tolerância a NaCl, utilização de diferentes fontes de carbono, hidrólise da caseína e do amido, etc.) devem ser realizados para confirmar essa hipótese.

Tabela 2. Comparação de características bioquímicas da cepa *Anoxybacillus* sp. PC2 e *Anoxybacillus tepidamans* segundo Schäffer *et al.*,2004.

Características	<i>A. sp PC2</i>	<i>A. tepidamans</i>
Fermentação		
Glicose	+	+
Sacarose	+	+
Lactose	+	+
Enzimas		
Urease	+	-
Motilidade	-	+

+ presença de fermentação / ação enzimática / motilidade
- ausência de fermentação / ação enzimática / motilidade

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, W.F., Mota, A.S., Lima, R.A.A., Bellezoni, R., Vasconcellos, A. Termites as bioindicators of habitat quality in the Caatinga, Brazil: is there agreement between structural habitat variables and the sampled assemblages? **Neotropical Entomology**, 40 (2011), pp. 39–46.

Basso, L.A., Silva, L.H., Fett-Neto A.G., Azevedo, W.F., Moreira, I., Palma, S. de, M.S., Calixto, J.B., Astolfi Filho, S., Santos, R.R., Soares, M.B., Santos, D.S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100 (2005), pp. 475–506.

Brandelli, A.; Daroit, D. J. & Riffel, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, 85: 1735-1750, 2010.

Bruins, M. E.; Janssen, A. E. M. & Boom, R. M. Thermozyms and their applications: A review of recent literature and patents. **Appl Biochem Biotech**, 90: 155-186, 2001.

Dwivedi P, Vivekanand V, Pareek N, Sharma A, Singh RP. Bleach enhancement of mixed wood pulp by xylanase-laccase concoction derived through co-culture strategy. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 2010;160(1):255–268.

Goh, K.M., Kahar, U.M., Chai, Y.Y., Chong, C.S., Chai, K.P., et al. Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*. **Appl Microbiol Biotechnol** (2013); 97: 1475–1488.

Gul-Guven, R., Guven, K., Poli, A., Nicolaus, B., *Anoxybacillus kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* subsp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Batman. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 2008; 54:327–334.

Ibrahim, A.S.S., El-diwany, A.I., Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of

the crude enzyme. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**. 2007;1:473–478.

Nagar, S., Gupta, V.K., Kumar, D., Kumar, L., Kuhad, R.C., Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 2010;37(1):71–83.

Paul, S.C., Jain, P., Mitra, J., Dutta, S., Bhattacharya, P., Bal, B., Bhanttacharya, D., Gupta, S.D., Pal, S. Induction of Cr(VI) reduction activity in a *Anoxybacillus* strain under heat stress: a biochemical and proteomic study. **FEMS Microbiol Lett** (2012) 331:70-80.

Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., et al. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol** (2000) 50: 2109–2117.

Poli, A., Esposito, E., Lama, L., Orlando, P., Nicolaus, G., De Appolonia, F., Gambacorta, A., Nicolaus, B. *Anoxybacillus amylolyticus* sp. nov., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from Mount Rittmann (Antarctica). **Syst Appl Microbiol** (2006) 29:300-307.

Reis, V.S., Queratinase da bactéria termófila *Anoxybacillus* sp.PC2: Produção, purificação parcial e caracterização. 2014. 68 f. Dissertação de mestrado. Centro de biotecnologia. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. 2014.

Saw, J.H., et al.. Encapsulated in silica: genome, proteome and physiology of the thermophilic bacterium *Anoxybacillus flavithermus* WK1. **Genome Biol.** (2008) 9:R161.

Schäffer, C.; FRANCK, W.; SCHEBERL, A.; KOSMA, P.; MCDERMOTT, T, R. & MESSNER, P. Classification of isolates from locations in Austria and Yellowstone National Park as *Geobacillus tepidamans* sp. nov.. **Int J Syst Evol Microbiol**. 54: 2361- 2368, (2004).