



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica
submetido para avaliação no Edital:
04/2022

Isolamento de *Chlamydomonas reinhardtii* do ambiente de solo e água doce

Palavras-chave do projeto: *Chlamydomonas reinhardtii*, microalga, cultivo microbiano, isolamento de microalga

Área do conhecimento do projeto: Ciências Biológicas / Microbiologia Aplicada

Isolamento de *Chlamydomonas reinhardtii* do ambiente de solo e água doce

Resumo

A microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* se tornou um modelo muito utilizado para se compreender a fisiologia básica de plantas e biotecnologia de algas. Além do interesse em novas cepas da espécie para posteriores estudos de transformação genética e cultivo para obtenção de biomassa com conteúdo de alto valor agregado, este projeto também é parte de um projeto maior de colaboração internacional para isolamento de *C. reinhardtii* ao redor do planeta, e sequenciamento para descoberta da biodiversidade e de novos genes e suas funções. Desta forma, o objetivo deste projeto é isolar a microalga *C. reinhardtii* de solo e água doce, e comparar o crescimento das cepas em condições controladas em escala laboratorial. Primeiramente será realizada coleta, em seguida, em laboratório, através de técnicas básicas de microbiologia será realizado o isolamento de cepas utilizando meio de cultivo apropriado, com posterior amplificação de genes específicos para confirmação, seguido da última etapa de cultivo das cepas isoladas para comparação. Os resultados serão divulgados no evento de iniciação científica da Universidade, através de pôster, que conterá imagens coletadas, e dados numéricos de contagens e acompanhamento de cultivos.

Introdução contextualizando o projeto

A microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* é a mais utilizada de seu gênero em laboratórios de pesquisa, e seus estudos possibilitaram avanços na fisiologia básica de plantas e biotecnologia de algas. A espécie é um ótimo modelo laboratorial para se compreender processos celulares como a fotossíntese, estrutura e função de microalgas verdes unicelulares. Isso se deve a características como rápido crescimento, possibilidade de crescer no escuro em meio contendo acetato com a manutenção do seu aparato fotossintético funcional, além dos cílios móveis semelhantes aos dos mamíferos (SASSO, 2018).

A *C. reinhardtii* usa a fotossíntese como fonte de energia, mas também pode crescer na ausência de luz, com o acetato como fonte alternativa de carbono. A maior parte de suas cepas mutantes e tipos selvagens podem suportar temperaturas na faixa de 15-35 °C (HARRIS, 2009). Seu crescimento é rápido sob condições ótimas, podendo duplicar-se a cada 8 horas (HARRIS, 2001).

A *C. reinhardtii* se reproduz sexuada e assexuadamente e pode ter seus gametas identificados por genes no locus do tipo de acasalamento (MT) e genes adicionais em autossomos que são envolvidos no processo. Cada meiose origina quatro produtos haplóides, dois herdam um grupo de ligação (LG) VI carregando o MT+ e dois herdam um LG VI carregando o MT-, no qual cada produto se divide por mitose, produzindo clones de células vegetativas (HARRIS, 2001). A fusão entre os gametas + e - produz um zigoto, no qual na privação de nitrogênio induz a expressão de um conjunto de genes

específicos, dando início a formação de uma parede celular específica que confere resistência ao zigoto, permitindo a sobrevivência em condições adversas (GOODENOUGH, 2007). A identificação de cepas MT positivas e negativas e a possibilidade de cruzamento entre elas, nos permite estudar a espécie de forma mais profunda, além de utilizar destas características para a obtenção de células sem parede para estudos biotecnológicos, como por exemplo, a transformação genética em laboratório de pesquisa.

C. reinhardtii pode ser encontrada em quase todos os ecossistemas, desde solos e água doce até em oceanos e neve. As condições ambientais diferem nesses habitats, o que requer dos organismos, adaptações e estratégias distintas para a sobrevivência. A compreensão dessas diferenças auxilia na seleção de características desejáveis que podem ser aprofundadas através de investigações em laboratórios de pesquisa. Várias características de microalgas, como crescimento e síntese de lipídios, podem ser melhoradas por meio da engenharia genética. Cepas de sucesso foram desenvolvidas com melhores resultados no crescimento, eficiência fotossintética, teor de lipídio, eficiência de utilização de CO₂ e heterotrofia (SHIN, 2017).

Isolar e caracterizar estirpes naturalmente modificadas e/ou adaptadas a determinadas condições pode ser uma estratégia para superar algumas limitações na engenharia genética e aplicação de organismos geneticamente modificados, além de estudos de cultivo para obtenção de biomassa e compostos de interesse (SHIN, 2017). Adicionalmente, este projeto é parte de um projeto maior de colaboração internacional para isolamento de *C. reinhardtii* de diversos continentes e países, e sequenciamento das cepas para descoberta da biodiversidade e de novos genes e suas funções.

Breve descrição dos objetivos e metas

Isolar a espécie de microalga *Chlamydomonas reinhardtii* de solo e água doce, e comparar o crescimento das cepas em condições controladas em escala laboratorial.

Para isto, objetivos específicos serão coletar solo e água para o isolamento da microalga, isolar e crescer colônias, extrair o DNA e realizar o PCR para identificação da microalga, e, finalizar com o cultivo das cepas obtidas que será acompanhado através de curvas de crescimento.

Metodologia

A. Coleta do material e incubação

A coleta do material será realizada em um local suficientemente distante do laboratório para evitar a contaminação por cepas de laboratório, e evitar o solo excessivamente seco. As coordenadas GPS, hora da coleta e tipo de solo serão registradas, junto com uma foto do local e do ambiente.

A amostra será coletada em dois tubos de centrífuga estéreis de 50 mL com tampa de rosca.

Após medir o pH do solo, aproximadamente 7-10mL de solo será despejado em um tubo estéril, um volume igual de TAP (Tris-Acetate-Phosphate, GORMAN and LEVINE, 1965) será adicionado e o tubo agitado, para misturar o solo e o meio. O tubo será incubado em um pequeno ângulo sob intensidade luminosa de 60 μmol de fótons / m^2s , a 25°C por 4-7 dias.

A documentação de permissão para coleta, estudos e transporte está sendo elaborada para a realização deste trabalho e será, em momento oportuno, registrada conforme a regulamentação.

B. Crescimento da microalga

Quando for observada a coloração verde no tubo, indicando crescimento microalgal, 50uL do conteúdo será espalhado em uma placa de ágar TAP 1,5%. Posteriormente, as placas deverão ser incubadas sob intensidade luminosa de 60 $\mu\text{E.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por 4-7 dias.

C. Isolamento da colônia e Extração de DNA

As colônias serão colocadas em placas de cultura de 96 poços contendo 200uL de meio TAP.

Uma suspensão de Chelex (5% p/v) será preparada, misturando a resina quelante Chelex-100 (Biorad) com água livre de nuclease, e alíquotas de 55 μL serão dispensadas em tubos de centrifuga Eppendorf.

Colônias de algas verdes (cerca de 1 mm de diâmetro) da placa de ágar serão selecionadas e dispensadas individualmente em tubos com a pasta Chelex. Algumas células residuais serão deixadas na placa de ágar após a colheita, elas também podem ser utilizadas para cultivar uma cultura mais tarde, então a posição da(s) colônia(s) colhida(s) na placa será marcada.

O tubo de centrifuga será vortexado com chelex-100 e a colônia selecionada por 20 segundos, centrifugado a 7000g por 1 min e incubado a 100°C por 10 min. Após o procedimento, o tubo será resfriado em gelo por 1 min e voltará para o vortex por 10 segundos, depois será centrifugado a 14000g por 1 min e por fim, transferido o sobrenadante para um novo tubo, que será usado para PCR. O DNA pode ser armazenado a -20°C por algumas semanas.

D. PCR para identificação da microalga

A identificação da microalga será feita através da amplificação de genes da espécie, com uso de primers específicos para o *rbcL* nas seguintes condições: 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação 94° por 30 segundos, anelamento a 55°C por 40 s, extensão a 72°C por 1 minuto e 15 segundos, depois um alongamento final a 72°C por 5 minutos. As bandas serão visualizadas em um gel de agarose a 1%.

E. Cultivo

Após a confirmação das amplificações, as cepas serão cultivadas em líquido conforme descrito na etapa B, para recuperar e limpar as cepas. As culturas serão

verificadas em microscópio óptico para observar: forma, motilidade, número de flagelos (melhor visível em contraste de fase após fixação com glutaraldeído a 1%), e observado a presença e os tipos de microrganismos não-algas.

Deve-se subclonar em uma placa TAP sob intensidade luminosa de 60 μmol de fótons/ m^2s . Nesta fase, serão feitos repiques, utilizando placas com antibióticos (penicilina G, 300 $\mu\text{g/ml}$ ou Ampicilina; 40 $\mu\text{g/ml}$ carbendazim para remover fungos), para obtenção de culturas axênicas.

Colônias em líquido serão escolhidas e verificadas novamente ao microscópio. Será executado um PCR específico para diferenciação de cepas + e -, em condições semelhantes às mencionadas no tópico anterior, entretanto com diferentes pares de primers. Após, as cepas serão colocadas para crescimento em placa com meio de cultivo TAP.

Após a obtenção das cepas serão realizados experimentos em erlenmeyer contendo 100mL de volume de trabalho em shaker rotativo nas seguintes condições: 25°C, 110 r.p.m, a intensidade luminosa será quantificada com o fotômetro LI-250A (LI-COR, Lincoln, NE, USA) para padronização de intensidade luminosa de 60 μmol de fótons / m^2s . A concentração celular inicial será de 5×10^4 células/mL (Ferreira-Camargo et al. 2015).

Métodos analíticos para os cultivos realizados em shaker: o pH será quantificado diariamente em potenciômetro modelo 710-A (Orion, USA); a concentração celular será medida através de contagem celular com uso de câmara de Neubauer e microscópio óptico; proteínas totais serão quantificadas de acordo com Lowry (LOWRY, 1951). Após a obtenção dos resultados, serão obtidas as curvas de pH e crescimento microbiano para comparação entre as cepas obtidas.

Descrição da viabilidade da execução do projeto

Este projeto será desenvolvido em laboratório, equipado com recursos provenientes de projeto de auxílio da FAPESP e com colaboração internacional. O laboratório apresenta todos os equipamentos e reagentes necessários para a completa realização deste projeto, e experiência em técnicas de microbiologia e no cultivo de microalgas.

Cronograma

Tabela 1 – Cronograma de atividades previstas

Atividades	Mês											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Atualização Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Coleta da amostra e incubação		X	X	X	X							
Crescimento da colônia de microalga			X	X	X	X						
Isolamento da colônia e extração de DNA				X	X	X	X					

PCR para identificação da microalga					X	X	X	X				
Cultivo						X	X	X	X			
Análise dos resultados							X	X	X	X		
Elaboração de pôster e relatório								X	X	X	X	X

Referências

SASSO, S.; STIBOR, H.; MITTAG, M.; GROSSMAN, A. R. The natural history of model organisms: from molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature. *eLife*. Vol. 7, 2018.

SHIN, S. E. et al. Isolation, phenotypic characterization and genome wide analysis of a *Chlamydomonas reinhardtii* strain naturally modified under laboratory conditions: towards enhanced microalgal biomass and lipid production for biofuels. *Biotechnol Biofuels*. Vol. 10, 2017.

GOODENOUGH, U.; LIN, H.; LEE, J-H. Sex determination in *Chlamydomonas*. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Vol. 18, p. 350-361, 2007.

HARRIS, E. H. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. Vol. 52, p. 363-406, 2001.

HARRIS, E. H. The *Chlamydomonas* Sourcebook: introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use, Oxford, *Academic Press*, 2009.

MAHAN, K. M.; ODORN O. W.; HERRIN D. L. Controlling fungal contamination in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *BioTechniques*. Vol. 39, p. 457-458, 2018.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. Vol. 193, p. 265-275, 1951.

GORMAN, D. S.; LEVINE, R. P. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 54, p. 1665-1669, 1965.