

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA METAGENÔMICA PARA PROSPECÇÃO
DE GENES ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DE ANTIBIÓTICOS**

Viviane Schuch

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA METAGENÔMICA PARA PROSPECÇÃO
DE GENES ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DE ANTIBIÓTICOS**

Viviane Schuch

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2007

S384c Schuch, Viviane
Construção de bibliotecas metagenômicas para prospecção de genes envolvidos na biossíntese de antibióticos / Viviane Schuch – – Jaboticabal, 2007
v, 58 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007
Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
Banca examinadora: Vanderlei Rodrigues e Lucia Maria Carareto Alves

Bibliografia

1. Bibliotecas metagenômicas. 2. Antibióticos. 3. Policetídeos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:576.21

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

VIVIANE SCHUCH - nascida em 9 de novembro de 1976 em São Paulo – SP. Em 1995, ingressou no curso de Ciências Biológicas da UNICAMP – SP, e em 1997 o curso foi transferido para a USP – SP. Concluiu o Bacharelado em 2001 e a Licenciatura em 2002. Neste período lecionou Ciências para alunos da 5ª e 6ª séries do ensino público em Paulínia – SP, trabalhou como Técnica do Laboratório de Microbiologia da Clariant S.A. e como Técnica do Laboratório Didático de Ciências e Biologia do Colégio Visconde de Porto Seguro Unidade I, ambos em São Paulo. Em 2004, mudou-se para a cidade de Jaboticabal e iniciou os trabalhos no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da FCAVJ – UNESP, sob supervisão da Prof. Dr. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos. Em 2005, ingressou no curso de mestrado em Microbiologia Agropecuária, cujos resultados estão descritos nesta dissertação.

“Há mais coisas entre o céu e a terra, do que pode supor a nossa vã filosofia”

William Shakespeare

*Aos meus pais, Edward Robert Schuch e Flora Schuch, pela
oportunidade que me foi dada.*

*Ao meu companheiro, Nelson Henriques Fernandes Filho, pelo
carinho e compreensão.*

*A minha professora, Dr^a Eliana Gertrudes de Macedo Lemos,
pelo incentivo científico constante.*

*Aos meus irmãos, Cristiano e Guilherme, meus avós Enio e Vera
e a minha tia Vera Lúcia, pelo apoio incondicional.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A FAPESP, CNPq e CAPES, pelo auxílio financeiro;

a Prof^a Dr^a Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pela confiança em mim depositada;

a Prof^a Dr^a Lucia Maria Carareto Alves, pelos conselhos, profissionalismo, amizade, correções do artigo científico e pela participação na banca examinadora da dissertação de mestrado;

ao Professor Dr. Vanderlei Rodrigues, pela participação na banca examinadora da dissertação de mestrado;

ao Prof. Dr. João Martins Pizzauro Junior, pelos conselhos e correções do artigo científico;

ao Prof. Dr. Gabriel Padilla, pelos conselhos científicos e por ter gentilmente cedido DNA da linhagem *Streptomyces avermitilis*;

aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, pela acolhida e amizade;

ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, pela oportunidade que me foi dada;

a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal e a todos os professores que participaram da minha formação;

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	3
UNIDADES	4
RESUMO E PALAVRAS CHAVE	5
ABSTRACT AND KEYWORDS	6
I- INTRODUÇÃO	7
II- REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1- Metabólitos secundários: aspectos gerais	9
2.2- Policetídeos: bioquímica e genética de produção	10
2.3- Pesquisa de novas drogas	11
2.4- O solo como fonte de diversidade microbiana	11
2.5- Análise molecular da diversidade microbiana do solo	13
2.6- Metagenômica	14
2.7- Metagenoma e policetídeos	16
3- MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1- Coleta de amostras de solo	18
3.2- Extração de DNA do solo por lise direta	18
3.3- Extração do DNA do solo com utilização de FastDNA [®] SPIN Kit for soil	19
3.4- Quantificação do DNA em gel de agarose	20
3.5- Quantificação do DNA no Biofotometro	21
3.6- Reparo das extremidades dos fragmentos	21

3.7- Seleção do tamanho dos insertos	21
3.8- Eluição dos fragmentos reparados do gel	22
3.9- Clonagem dos insertos em vetor cosmídeo	23
3.10- Reação de Ligação	24
3.11- Reação de empacotamento	24
3.12- Estocagem das células EPI100-T1 ^R	24
3.13- Preparo do inoculo de células EPI100-T1 ^R	25
3.14- Infecção das células EPI100-T1 ^R	25
3.15- Coleta e estoque dos clones	26
3.16- Cultivo dos clones bacterianos e extração do DNA cosmidial	26
3.17- Quantificação do DNA cosmidial	27
3.18- Análises de restrição do DNA cosmidial	27
3.19- Obtenção de DNA cosmidial de pools de 96 clones	28
3.20- Amplificação, por PCR, da região do DNA correspondente ao gene <i>pks</i>	28
3.21- Reação de seqüenciamento dos produtos de PCR	29
3.22- Análise das seqüências geradas	29
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1- Escolha do solo	31
4.2- Extração de DNA metagenômico	31
4.3- Construção da biblioteca metagenômica	33
4.4- Prospecção, por PCR, do gene <i>pks</i> na biblioteca metagenômica	42
5- CONCLUSÃO	48
6- BIBLIOGRAFIA	49

ABREVIATURAS

DNA – ácido desoxiribonucleico

DNase – desoxiribonuclease

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

p/v – peso por volume

pH – $\log [H^+]$

RNA - ácido ribonucleico

RNase – ribonuclease

SDS – lauril sulfato de sódio

TAE – solução tampão Tris-acetato-EDTA

TBE – solução tampão Tris-ácido bórico-EDTA

TE – solução tampão Tris-EDTA

Tris – Tris[hidroximetil]aminometano

v/v – volume por volume

PCR – reação da polimerase em cadeia

UNIDADES

g – aceleração da gravidade

g – grama

kb – kilobase

L – litro

M – molar

mg – miligrama

mL – mililitro

mM – milimolar

μg – micrograma

μL – microlitro

μM – micromolar

ng – nanogramas

pb – pares de bases

kb - kilobases

U – unidades

V - Volt

CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS PARA PROSPECÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DE ANTIBIÓTICOS

RESUMO - Metabólitos secundários são compostos bioativos, com grande importância para a indústria farmacêutica e agropecuária, produzidos por certos grupos de microrganismos e plantas. Os policetídeos, que são sintetizados por complexos enzimáticos denominados policetídeos sintases (PKSs), desatacam-se entre os metabólitos secundários conhecidos e compõe a estrutura química básica de vários antibióticos. Todos os genes envolvidos na biossíntese de um policetídeo se encontram agrupados fisicamente no cromossomo, e contém genes que são altamente conservados, comumente chamados de pks mínima. Os métodos tradicionais para pesquisa de novas drogas, que envolvem o cultivo de microrganismos isolados do solo, não são mais tão promissores, devido à alta taxa de redescoberta de antibióticos já conhecidos, que chega a 99,9%, e à pequena parcela de microrganismos do solo que são cultiváveis pelas técnicas padrões de cultivo, cerca de 1%. A Metagenômica é uma abordagem promissora que permite acessar o genoma desses organismos incultiváveis, pois consiste na extração de DNA diretamente do ambiente e construção de uma biblioteca com este genoma misto. Neste trabalho descrevemos a construção de uma biblioteca feita com DNA de alto peso molecular isolado diretamente de solo coletado sob arboreto de eucaliptos no Estado de São Paulo, Brasil. A biblioteca possui 9.320 clones e foi construída em vetor cosmídeo, com insertos de tamanho variando entre 30 e 45kb. Digestões com diferentes enzimas de restrição do DNA cosmidial de clones escolhidos ao acaso permitiram visualizar claras diferenças no padrão de bandejamento entre os clones, bem como possibilitaram a determinação do tamanho médio dos insertos. A avaliação inicial da presença de genes envolvidos na biossíntese antibióticos sintetizados pelo sistema enzimático PKS do tipo I foi realizada através da amplificação por PCR dos clones da biblioteca utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores degenerados específicos. Foram prospectados 4.320 clones e os resultados sugerem grande diversidade desses genes. Os produtos de PCR obtidos foram seqüenciados para confirmação da identidade do gene amplificado.

Palavras-Chave: antibióticos, biblioteca metagenômica, metabólitos secundários, metagenoma, PKS tipo I, policetídeos

CONSTRUCTION OF METAGENOMIC LIBRARIES AND PROSPECTION OF GENES INVOLVED IN THE ANTIBIOTIC BIOSYNTHESIS

ABSTRACT - Secondary metabolites are bioactive compounds with great importance in the pharmaceutical and agriculture industries, produced by a few groups of microorganisms and plants. The polyketides that are synthesized by enzymatic complexes, denominated polyketides synthases, stand out among the secondary known metabolites, which are part of the main structure of many antibiotics. All genes involved in the biosynthesis of antibiotics are found as clusters in the chromosome. The traditional methods for the research of new drugs that are made from microorganisms cultures isolated from the soil are not so promising, due to the high rate of rediscovery of already known species, reaching 99.9%. The other small piece of microorganisms are culturable by standard culture methods, reaching 1% maximum. Metagenomics is a promising approach that allows the access to genome of these organisms that are not culturable, as it is carried out by DNA extraction directly from the environment and construction of a mixed genomic library. In this work, we describe the construction of a library made from high molecular weight DNA isolated directly from the soil underneath a pine forest in the State of São Paulo, Brazil. The library shows 9,320 clones and it was constructed in a cosmid vector, with insert size ranging from 30 to 45 kb. Digestion with different restriction enzymes of cosmidial DNA randomly chosen allowed to visualize evident differences in the restriction fragments among the clones, as does the possibility to determine the average insert size. The initial evaluation of the presence of genes involved in the biosynthesis of antibiotics synthesized by the enzymatic system PKS of kind I, was accomplished by the PCR amplification of clones from the library using specific primers. We studied 4,320 clones and the results suggest a great variety of these genes. The PCR products obtained were sequenced for the determination of identity of the amplified gene.

Keywords: metagenome, antibiotic, metagenomic library, secondary metabolites, PKS type I, polyketides

I- INTRODUÇÃO

A estrutura da comunidade microbiana do planeta é altamente complexa e diversa, e esta complexidade representa um desafio para a ciência e biotecnologia. A microbiota natural desempenha papel fundamental na manutenção dos processos biogeoquímicos e representa um enorme reservatório biológico e genético que pode ser explorado para a recuperação de novos genes, vias metabólicas inteiras e seus produtos.

Nos últimos 50 anos, produtos derivados do metabolismo secundário microbiano têm sido utilizados para fins médicos, industriais e agrícolas, e incluem antibióticos, drogas anticancerígenas, compostos antifúngicos, agentes imunossupressivos, inibidores enzimáticos, agentes antiparasíticos, herbicidas, inseticidas e promotores de crescimento. A maioria desses compostos são produtos naturais obtidos a partir de microrganismos habitantes do solo. Dentre os metabólitos secundários conhecidos podemos destacar os policetídeos, que representam uma família de substâncias que possuem uma via biossintética comum e compõem a estrutura química básica de vários antibióticos.

Historicamente, estudos sobre a diversidade microbiana e a descoberta de metabólitos secundários têm se apoiado na suposição de que pelo cultivo a maioria dos microrganismos de uma amostra é identificada. Até meados da década de 90, a diversidade taxonômica e genômica de microrganismos eram avaliadas principalmente através da caracterização fenotípica e/ou genotípica de organismos isolados e cultivados em laboratório. Pesquisas realizadas nos últimos 15 anos têm mostrado que a verdadeira extensão da diversidade microbiana é ainda desconhecida, devendo exceder, em muito, as estimativas prévias.

Os métodos tradicionais de isolamento são falhos ao representar a diversidade microbiana existente natureza porque somente uma pequena parcela de microrganismos do solo é cultivável pelas técnicas padrões, cerca de 1%. O acesso molecular individual aos tipos de bactérias existentes na natureza tem sido baseado principalmente na clonagem e determinação das seqüências de genes 16S rRNA amplificados a partir de DNA derivado do solo. Ambos os métodos, baseado em cultivo ou cultivo-independente, apóiam o estabelecido de que os solos representam um dos mais diversos habitats para microrganismos.

Essas descobertas proporcionaram base científica para o desenvolvimento de novas abordagens de acesso ao potencial metabólico dos microrganismos do solo sem a necessidade de cultivá-los. A

Metagenômica, ou análise genômica da comunidade de microrganismos de um determinado habitat por técnicas independentes de cultivo, se consolida como uma estratégia interessante e promissora que permite o acesso ao potencial genético e bioquímico destes microrganismos, e possibilita o desenvolvimento de novos compostos bioativos. Essa abordagem consiste na extração de DNA diretamente do ambiente e construção de uma biblioteca com este genoma misto, para posterior clonagem e expressão de genes de interesse em vetores de expressão.

A proposta geral deste trabalho foi a construção de uma biblioteca metagenômica de solo e a prospecção de genes envolvidos na biossíntese de compostos sintetizados pelo sistema PKS. Novos genes envolvidos na biossíntese de antibióticos serão futuramente usados em experimentos de clonagem, biossíntese combinatória e expressão heteróloga, para obtenção de organismos geneticamente modificados produtores de antibióticos.

II- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Metabólitos secundários: aspectos gerais

Metabólitos secundários são produtos naturais com baixo peso molecular produzidos por certos grupos de microrganismos e plantas. Geralmente são ativos contra outros microrganismos em baixas concentrações, e devem sua atividade antibiótica à habilidade de inibir processos metabólicos primários essenciais. Eles são secundários porque são produtos de um metabolismo que não é essencial para a sobrevivência da célula produtora, mas sua produção provavelmente confere vantagens competitivas (MARTIN & DEMAINE, 1980).

Por cerca de meio século, metabólitos secundários produzidos por microrganismos tem sido a principal fonte de medicamentos para o tratamento de doenças infecciosas e tumores. Muitos dos produtos naturais com importantes aplicações na medicina e agricultura são produzidos por um grupo de bactérias gram-positivas filamentosas de solo, da ordem *Actinomycetales*, das quais o gênero *Streptomyces* é o mais conhecido (DEMAINE & FANG, 1995). Este gênero tem habilidade de sintetizar substâncias com estrutura química muito diversa, que incluem uma enorme variedade de antibióticos. Dos 12.000 antibióticos conhecidos em 1995, 55% eram produzidos por actinomicetos do gênero *Streptomyces*, 11% por outros actinomicetos, 12% por bactérias não filamentosas como mixobactérias e 22% eram produzidos por fungos filamentosos (STROHL, 1997).

Dentre os metabólitos secundários podemos destacar os policetídeos, que são substâncias que possuem uma via biossintética comum, e compõem a estrutura química básica de vários antibióticos (tetraciclina e eritromicina), parasiticidas (avermectinas), imunomoduladores (FK506), agentes antitumorais (antraciclinas), agentes antifúngicos (candididina e anfotericina), antiolesterolêmicas (lovastatina) entre outros (VINNING, 1980). Existem descritas cerca de 10.000 moléculas de policetídeos, das quais uma grande quantidade é utilizada pela indústria farmacêutica, que obtém acima de US\$ 8 bilhões ao ano com vendas dessas moléculas (DEMAINE, 2000).

2.2- Policetídeos: bioquímica e genética de produção

Policetídeos são produtos naturais que contêm múltiplas funções β -hidroxicetona ou β -hidroxialdeído ($-H_2C(=O)CH_2CH(OH)CH_2C(=O)-$). As policetídeos sintases (PKSs) são complexos enzimáticos que catalisam a montagem do esqueleto carbônico dos policetídeos a partir de ésteres graxos de coenzima A, provenientes de ácidos graxos de cadeia curta como acetato, propionato e butirato. As ácido graxo sintases (FAS), que sintetizam os lipídios que desempenham grande variedade de funções celulares essenciais, são homólogas as PKSs, mas estas cumprem uma rotina biossintética muito mais complexa, e estão presentes apenas em grupos taxonômicos restritos (HOPWOOD, 2004).

Tanto os policetídeos como os ácidos graxos são derivados de acetil-CoA ou outros acil-CoA, porém, nos policetídeos, mais de um tipo de monômero pode ser utilizado para construir cadeias aromáticas ou reduzidas com tamanhos variados. Nos ácidos graxos apenas grupos com dois carbonos são assimilados a partir do malonil-CoA para formar moléculas saturadas com tamanho de cadeia entre 16 e 20 carbonos (HUTCHINSON & FUJII, 1995).

Assim como para ácidos graxos, o complexo de enzimas responsáveis pela síntese dos policetídeos também é dividido em duas famílias. As PKSs do tipo I, também chamada de PKS modular, são grandes proteínas multifuncionais com vários módulos enzimáticos, onde o número de módulos determina o tamanho total do anel formado, pois cada módulo contém os sítios ativos necessários para catalisar um ciclo de extensão da cadeia policetídica, com as subseqüentes modificações nos respectivos produtos de condensação. As PKSs do tipo II são compostas por várias enzimas monofuncionais interativas, responsáveis pela síntese dos policetídeos aromáticos que não requerem extensos ciclos de redução e desidratação. As moléculas produzidas por PKSs do tipo II são normalmente glicosiladas, e as alterações no padrão destas glicosilações geram uma diversidade adicional a este grupo (HOPWOOD, 1997).

Todos os genes biossintéticos necessários para a síntese de um determinado antibiótico a partir de metabólitos primários ocorrem em agrupamentos gênicos ("clusters") que ocupam entre 15 e 120 kb. Os agrupamentos gênicos biossintéticos estão geralmente localizados no cromossomo bacteriano e em alguns casos em plasmídeos (MARTIN & LIRAS, 1989). Eles contêm, além dos genes estruturais que codificam todas as enzimas da via metabólica secundária, genes que conferem auto-resistência ao antibiótico produzido e genes reguladores, que coordenam a expressão dos outros genes do agrupamento gênico

(FERNANDEZ-MORENO *et al.*, 1991). A primeira demonstração disto foi a clonagem do agrupamento gênico biossintético inteiro do policetídeo actinorodina, que estava contido num fragmento de 35Kb de DNA cromossomal do produtor, *Streptomyces coelicolor* A3(2), e sua expressão na linhagem não produtora e sensível a actinorodina *S. parvulus*, que produziu actinorodina e tornou-se resistente (MALPARTIDA & HOPWOOD, 1984). Através de experimentos de nocaute de genes, complementação dos mutantes bloqueados e expressão heteróloga, muitos agrupamentos gênicos biossintéticos foram estudados em detalhes, levando ao isolamento e caracterização de vias biossintéticas inteiras (HUTCHINSON, 1997).

Os agrupamentos gênicos biossintéticos das PKSs contém genes que são altamente conservados e muitas vezes organizados de forma similar no cromossomo. Esses genes são comumente chamados de pks mínima e codificam: β -cetoacil sintase (KS), fator de alongação de cadeia (CLF) e proteína carreadora de acilas (ACP) (HOPWOOD, 1997).

2.3- Pesquisa de novas drogas

Desde a descoberta da estreptomicina na década de 50, produzida por um actinomiceto isolado do solo, microbiologistas e farmacêuticos do mundo inteiro passaram a investir grandes esforços no cultivo de diversos microrganismos para pesquisar novas linhagens capazes de sintetizar antibióticos. A busca por novos antibióticos levou as companhias farmacêuticas a isolarem dezenas de milhares de linhagens produtoras, e ainda hoje microrganismos cultiváveis de solo representam a principal fonte de antibióticos e outros compostos ativos.

Entretanto, os métodos tradicionais para pesquisa de novas drogas que envolvem o cultivo de microrganismos isolados do solo não são mais tão promissores, devido principalmente à alta taxa de redescoberta de antibióticos já conhecidos, que chega a 99.9% (ZAEHNER & FIELDLER, 1995).

2.4- O solo como fonte de diversidade microbiana

O solo constitui-se, indubitavelmente, em um dos principais reservatórios de carbono orgânico da Terra e em um dos mais importantes habitats para microrganismos, principalmente procariotos. A

abundância do carbono procariótico e outros elementos sugerem que cerca de metade do protoplasma vivo da Terra seja de origem microbiana (WHITMAN *et al.*, 1998). Devido à vasta diversidade, às grandes populações e à longa história evolutiva, os microrganismos vêm contribuindo fortemente para riqueza e a complexidade das interações entre os organismos do solo, incluindo desde simbioses altamente específicas a mutualismos difusos (BEARE *et al.*, 1995). Tais organismos são componentes essenciais no processo de decomposição do solo, no qual resíduos de plantas e animais são degradados em matéria orgânica, liberando nutrientes na cadeia alimentar.

O número de microrganismos e suas biomassas coletivas variam dentro e entre os diferentes tipos e condições de solos, sendo o grupo das bactérias mais numeroso (WHITMAN *et al.*, 1998). Evidências demonstram que os microrganismos são filogeneticamente mais diversos que o obtido pelas análises de seqüências de linhagens cultivadas (HUGENHOLTZ, 1996; PACE, 1996). A ampla ocorrência de partículas virais infecciosas, mutações, plasmídeos e outros elementos genéticos móveis e seus papéis nos processos de transdução, transformação e conjugação, permitem concluir que ecossistemas microbianos são comunidades geneticamente abertas (TERZAGHI & O'HARA, 1990) e com enorme potencial de aquisição de diversidade genética (WHITMAN *et al.*, 1998).

Até recentemente, através de técnicas de cultivo puro, os microrganismos puderam ser estudados individualmente e caracterizados principalmente por critérios nutricionais. Entretanto, a abordagem do cultivo limitou seriamente a avaliação taxonômica e filogenética como estimativa da diversidade microbiana, devido à falha de cultivo da maioria dos microrganismos pelos métodos convencionais (PACE, 1997). Nesse contexto, vários meios de cultura, seletivos ou não, foram utilizados para enumerar e isolar microrganismos do solo e da rizosfera com influência dos mesmos nos graus de diversidade genética obtidos (SORHEIM *et al.*, 1989; BUYER, 1995; TABACCHIONI *et al.*, 2000). Entretanto, ferramentas moleculares e tecnologias baseadas em seqüências gênicas vêm reduzindo essas limitações e revelando nova perspectiva sobre a diversidade microbiana. Estes progressos mostraram que a diversidade genética de microrganismos na natureza é muito maior que a refletida nas coleções e bancos de linhagens, porque apenas uma pequena parcela dos microrganismos, em torno de 1%, são cultiváveis em laboratório pelas técnicas padrões de cultivo (AMANN *et al.*, 1995).

A caracterização dos microrganismos não-cultiváveis, utilizando-se de métodos moleculares e análises filogenéticas a partir de seqüências de DNA é, portanto, uma nova abordagem para identificar e conhecer suas distribuições e funções no meio ambiente. Esses novos métodos de detecção de

microrganismos, sem necessidade de cultivá-los, certamente contribuirão para inferências inéditas sobre o significado dos mesmos nos solos.

2.5- Análise molecular da diversidade microbiana do solo

O conceito de clonagem de DNA extraído diretamente do ambiente foi inicialmente sugerido por PACE *et al.* (1986) e primeiramente executado por SCHIMIDT *et al.* (1991). A partir da década de 80, um grande número de metodologias moleculares baseadas no estudo de DNA vem sendo desenvolvido para análise da diversidade microbiana dos solos (AMANN *et al.*, 1995; ZHOU *et al.*, 1996; BORNEMAN *et al.*, 1997; CULLEN *et al.*, 1998; DUARTE *et al.*, 1998).

A partir de quantidades pequenas de solo, os procedimentos de extração e purificação de DNA permitem análise de múltiplas amostras com eficiências próximas de 80%, tornando-as, também, muito rápidas (ZHOU *et al.*, 1996; KUSKE *et al.*, 1998; OGRAM, 2000). Através de reassociação cinética do DNA extraído de comunidades bacterianas, TORSVIK *et al.* (1990a, 1990b) encontraram valores acima de 10 mil espécies em apenas um grama de solo sob floresta, muitas das quais nunca haviam sido cultivadas em laboratório. RITZ & GRIFFITHS (1994), através de hibridização do DNA total extraído de diferentes solos, e sob diversas condições, verificaram diferentes padrões de diversidade genética entre os mesmos. O acesso molecular individual das espécies de bactérias existentes no solo tem-se baseado na amplificação e clonagem do gene correspondente à porção 16S rRNA (AMANN *et al.*, 1995; BORNEMAN *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 1996; KUSKE *et al.*, 1997; GELSOMINO *et al.*, 1999). A análise da comunidade total de DNA de uma amostra constitui-se em uma medida de sua heterogeneidade, inferindo-se para a diversidade microbiana presente na mesma.

Coletivamente, os genomas da microbiota total encontrada na natureza são denominados **metagenoma** (HANDELSMAN *et al.*, 1998), sendo que tal estratégia acessa muito mais informação genética que os procedimentos baseados em cultivo. Esta abordagem tem sua origem nos genomas de eucariotos (RONDON *et al.*, 1999a). Através de clonagem e análise de grandes segmentos de DNA microbiano do solo, pode-se avaliar, com mais detalhes, a fisiologia e a função dos microrganismos na natureza. No solo, estudos envolvendo as seqüências 16S rDNA ribossomal com análises metagenômicas, se constituiriam nos primeiros passos para a ligação da fisiologia e função de sua microflora total

(RONDON *et al.*, 1999b).

Visto que a ampla diversidade microbiana do solo constitui-se de um enorme “pool” genético e biológico que pode ser explorado para a descoberta de novos genes, vias metabólicas inteiras e seus produtos (COWAN, 2000), a metagenômica oferece, assim, um caminho para acessar mais completamente a diversidade microbiana total de um solo. Este acesso permite examinar a genômica dos membros de sua microflora, mesmo sem meios de cultivo de muitos dos organismos presentes.

2.6- Metagenômica

A metodologia de construção de bibliotecas genômicas, que envolve a geração e clonagem de fragmentos de DNA de alto peso molecular em vetores apropriados, e a prospecção de genes de interesse, tem sido utilizada exaustivamente por mais de três décadas. A clonagem de DNA metagenômico, entretanto, foi pela primeira vez reportada na metade da década de 90, com a construção de uma biblioteca de metagenoma marinho (STEIN *et al.*, 1996). Nos últimos três anos, observou-se um progresso significativo na metagenômica, que começam a proporcionar um entendimento substancial das funções da comunidade microbiana natural (WARD *et al.*, 2006).

A Metagenômica permite acessar genes de bactérias incultiváveis, pois se baseia na análise genômica de uma comunidade de microrganismos sem a necessidade de cultivo em laboratório. Como esquematizado na figura 1, a técnica consiste na extração de DNA diretamente do ambiente e construção de uma biblioteca com este genoma misto, para posterior clonagem e expressão de genes de interesse biotecnológico em vetores de expressão (KNIGHT *et al.*, 2003). Ao contrário da biblioteca de genes amplificados da 16S rRNA, essa biblioteca é construída com o DNA total extraído do solo, e oferece a oportunidade de recuperação de genes desconhecidos que estão diretamente envolvidos na biossíntese de antibióticos. Nos últimos anos observa-se um progresso significativo na metagenômica, com a produção de bibliotecas que proporcionam um entendimento substancial das funções da comunidade microbiana natural.

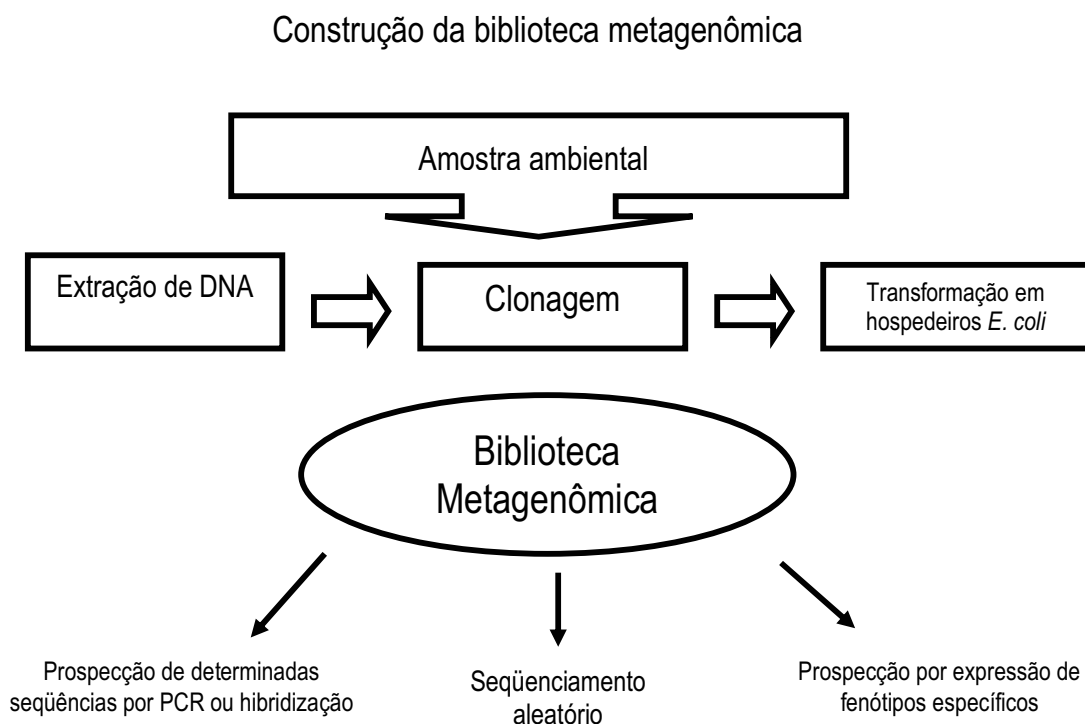


Figura 1. Metagenômica envolve a construção de uma biblioteca de uma população microbiana de um ambiente e análise das funções e seqüências contidas na biblioteca (adaptado de RIESENFELD *et al.*, 2003).

A Metagenômica tem sido utilizada com sucesso vários estudos: para análises filogenéticas, para o estudo de genes específicos (VOGET *et al.*, 2003; STREIT *et al.*, 2004; FERRER *et al.*, 2005), para determinação de vias biossintéticas complexas (BRADY *et al.*, 2001; GILLESPIE *et al.*, 2002; COURTOIS *et al.*, 2003; LIM *et al.*, 2005) ou para a descrição do metabolismo de bactérias desconhecidas (TYSON *et al.*, 2004). Além disso, essa metodologia pode ser utilizada para estudo de comunidades microbianas contidas em diversas amostras específicas como as que constituem biofilmes ou consórcio de bactérias contidas em culturas de enriquecimento (ENTCHEVA *et al.*, 2001; KNIETSCH *et al.*, 2003).

Muitos ambientes são foco da metagenômica, incluindo solos (RONDON *et al.*, 2000; COURTOIS *et al.*, 2003), cavidade oral (DIAZ-TORRES *et al.*, 2003), rumem (FERRER *et al.*, 2005), habitats aquáticos (KIM & FUERST, 2006), entre outros. Em diferentes tipos de amostras, diferentes estratégias podem ser

utilizadas para obtenção do DNA metagenômico. Para a utilização em técnicas de clonagem, é necessário que o DNA extraído seja de alta qualidade, puro e não fragmentado.

Em DNAs obtidos a partir de solo, a contaminação com ácidos húmicos, os quais são extraídos juntamente com o DNA, inibe as reações bioquímicas das etapas posteriores (BURGMANN *et al.*, 2001). A obtenção de DNA do ambiente tem sido realizada tanto pela extração direta do DNA do solo, como de pré-isolados (mas não cultivados) de bactéria. O DNA obtido pelas duas técnicas apresenta variações qualitativas e quantitativas, mas não apresenta variações filogenéticas significativas (COURTOIS *et al.*, 2001).

Estratégias diferentes para a construção de bibliotecas metagenômicas variam conforme a intenção do estudo. Bibliotecas que contem grandes insertos de DNA ambiental são construídas principalmente em vetores cosmídeos (COURTOIS *et al.*, 2003), fosmídeos (GINOLHAC *et al.*, 2004) e cromossomos artificiais bacterianos (BAC) (RONDON *et al.*, 2000), que permitem identificação e exploração de vias biossintéticas complexas. Outros vetores foram desenvolvidos para estudo e expressão de vias biossintéticas complexas, como o ESAC, que além de comportarem grandes fragmentos de DNA, são estáveis em *E. coli* e capazes de integrar-se no genoma de *Streptomyces* para expressão (DONADIO *et al.*, 2002). Vetores alto número de cópias que aceitam insertos pequenos também são utilizados pela facilidade de obtenção de DNA plasmidial suficiente para análises baseadas em sequência (TYSON *et al.*, 2004).

A pesquisa de genes de interesse na biblioteca metagenômica pode ser feita de diversas formas. Tipicamente, essa pesquisa envolve amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores de síntese degenerados ou hibridização com uma sonda para o gene de interesse biotecnológico. O sequenciamento de todos os clones da biblioteca e posterior análise genômica (BREIHTHART, 2002) ou a análise da expressão de DNA heterólogo dos clones da biblioteca (DONADIO *et al.*, 2002) são técnicas eficientes, porém caras e muito trabalhosas.

2.7- Metagenoma e policetídeos

Como os agrupamentos gênicos biossintéticos das PKSs possuem uma região altamente conservada, chamada de PKS mínima, a amplificação por PCR ou hibridação com sondas são abordagens

promissoras.

MALPARTIDA & HOPWOOD (1986) deduziram a provável porção do DNA que codifica a policetídeo cetosintase (KS) e cetoreductase (KR) dentro do "cluster" biossintético da actinorodina e então estes fragmentos de DNA (que carregavam os genes *actI* e *actIII*) foram usados como sondas de hibridização no DNA de outras espécies produtoras. Eles verificaram que de forma geral havia correlação entre a produção de policetídeos e o sinal positivo na hibridação com os fragmentos *actI* e *actIII* (MALPARTIDA *et al.*, 1987).

Um grande número genes foi isolado desta forma, mas nem sempre os resultados de hibridação com sondas heterólogas levam ao isolamento de genes biossintéticos, ora porque não ocorre a hibridação, ora porque ocorre hibridação com genes de biossíntese de pigmentos de esporos, que também são compostos policetídeos.

Outra abordagem é a construção de oligonucleotídeos iniciadores de síntese degenerados para amplificação por PCR de fragmentos da região da PKS mínima, usando como molde DNA o próprio DNA metagenômico a ser pesquisado. Uma vantagem deste tipo de prospecção é que não depende da expressão de genes clonados nos hospedeiros (DANIEL, 2004). Uma desvantagem é a limitação à descoberta de genes em famílias previamente descritas. (HANDELSMAN, 2005). Esta abordagem é mais adequada para prospecção em pequena escala, visto que os clones são pesquisados de forma manual.

Macroarranjos e microarranjos podem ser poderosas ferramentas para o estudo da expressão gênica em larga escala, visto que já são utilizadas para a descoberta de genes e mapeamento de DNA genômico (SEBAT *et al.*, 2003; BARSALOBRES-CAVALLARI *et al.*, 2006). Recentemente, formatos de microarranjos têm sido desenvolvidos e avaliados para detecção de genes e análises da comunidade microbiana em ambientes complexos. Esses estudos indicam que tecnologias baseadas em microarranjos genômicos possuem grande especificidade, sensibilidade e potencial quantitativo, tornando-se uma ferramenta paralela de alto rendimento para detecção de genes em amostras ambientais (Wu *et al.* 2001; Zhou *et al.* 2002; Zhou *et al.* 2003).

A metagenômica representa um novo desafio na era genômica, e os estudos iniciais apenas confirmam o enorme potencial desta abordagem. Porém, a metodologia ainda requer aperfeiçoamentos e validações, para prospecção de extensas bibliotecas em larga escala.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos, quando não especificados pelo fornecedor dos Kits ou reagentes utilizados neste trabalho, foram baseados em SAMBROOK *et al.* (1989). Tais técnicas não oferecem risco para o meio ambiente e saúde humana, encaixando-se nos padrões de biossegurança (NB-1).

3.1- Coleta de amostras de solo

Amostras de solo foram coletadas em uma área pertencente ao Campus da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV-UNESP - Jaboticabal (SP), sob arboreto de eucalipto plantados em fevereiro de 1969, que não sofreu nenhum trato cultural desde então. Foram coletadas vinte amostras simples ao acaso em zigue-zague e com profundidade de 0-20 cm, abrangendo toda a área. As amostras foram reunidas e homogeneizadas resultando em uma amostra composta. Posteriormente, foram conduzidas ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), no Departamento de Tecnologia, no mesmo Campus e no mesmo dia foi realizada a extração do DNA metagenômico.

3.2- Extração de DNA do solo por lise direta

A extração de DNA de solo por lise direta foi realizada utilizando-se o método descrito a seguir, adaptado de SAMBROOK *et al.* 1989 com modificações. Um grama de solo foi ressuspenso em 1 mL de TE [Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0] com lisozima concentração final de 10 mg/mL. As amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 37°C por um período de duas horas. Em seguida, foi adicionado 10 mL de tampão de extração [10 mM Tris, 100 mM EDTA, 20 µg/mL de RNase, 0,5% (p/v) SDS, pH 8.0]. A suspensão foi homogeneizada novamente e incubada a 37°C por uma hora. Após esse período, foi adicionado proteinase K para uma concentração final de 100 µg/mL, e as amostras foram incubadas a 50°C por três horas. Após os tratamentos enzimáticos, a suspensão de solo foi centrifugada a 3220 g a temperatura ambiente por 20 minutos, o sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo

limpo. Um volume de Fenol equilibrado com Tris 0,5 M pH 8.0 foi adicionado e os tubos foram gentilmente agitados até a formação de uma suspensão. As duas fases foram separadas por centrifugação a 3220 *g* por 15 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um tubo limpo e esse procedimento foi repetido mais uma vez. Após isso, foi adicionado um volume de Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico na proporção de [25:24:1], e a mesma centrifugação descrita acima foi realizada duas vezes. Finalmente, foi adicionado à fase aquosa um volume de Clorofórmio/Álcool Isoamílico na proporção [24:1], e o mesmo procedimento descrito acima foi realizado mais duas vezes. A fase aquosa foi transferida para um tubo limpo e o DNA foi precipitado pela adição de 0,2 volumes de Acetato de Amônia 10 M e dois volumes de etanol absoluto. Os tubos foram mantidos à temperatura de 20°C negativos durante a noite e após isso centrifugadas a 3220 *g* por 30 minutos a 4°C. Os tubos foram lavados duas vezes com etanol 70% (v/v), e o DNA precipitado foi coletado por centrifugação a 3220 *g* por 10 minutos a 4°C. O etanol 70% foi removido tanto quanto possível, os tubos foram deixados para secar a temperatura ambiente sem que este secasse completamente e o DNA foi ressuspensionado em 500 µL de água deionizada filtrada e autoclavada.

O DNA metagenômico extraído do solo foi analisado por eletroforese de campo pulsado em gel de agarose para “pulse field” 1% (p/v). A eletroforese foi realizada em uma cuba modelo CHEF MAPPER 3 (BIO-RAD) e conduzida em tampão TEB 0,5X (Tris 44.5 mM, Ácido Bórico 44.5 mM e EDTA 1,25 mM, pH 8,3), a 6 V por 20 horas. Foram usados como padrões de peso molecular os seguintes marcadores: 1 kb “plus” DNA “ladder” (Promega), T7 “control” DNA (Epicentre) de 36 kb e DNA de fago lambda digerido com *EcoRI* e *HindIII* (Promega). O gel foi corado em solução de brometo de etídio 5 µg/mL por uma hora, banhado em água destilada por 5 minutos e visualizado sob luz UV. A imagem foi documentada em um aparelho fotodocumentador (Bio Rad – Gel Doc 1000), através do “software” Quantity OneR (Bio RadTM, Hercules, CA, USA).

3.3- Extração do DNA do solo com utilização de FastDNA® SPIN Kit for soil

A extração do DNA das amostras de solo foi realizada com a utilização do FastDNA® SPIN Kit for soil (BIO 101-Quantum Biotechnologies), de acordo com as instruções do fabricante, descritas a seguir. O método consiste em lisar os microrganismos presentes nas amostras, colocando-se 500 mg de solo em

tubos com sílica e adicionando-se 978 μL de tampão de fosfato de sódio (pH 8,0) e 122 mL de tampão MT. A suspensão com o solo foi agitada vigorosamente pelo FastPrepR FP120 (BIO 101 – SAVANT) a velocidade de 5.5 m/s e, posteriormente, o tubo foi centrifugado a 14.000 g, por 1 minuto, a temperatura ambiente.

O sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo estéril e a ele foram adicionados 250 μL de uma solução de precipitação de proteínas, misturando-se cuidadosamente a amostra por inversão por 10 vezes. Em seguida, a solução foi centrifugada a 14.000 g, por 5 minutos, a 25°C para precipitação do sedimento formado. O sobrenadante foi coletado, transferido para outro tubo estéril e a ele adicionado 1 mL do Binding Matrix Superior. A amostra foi misturada por inversão durante 2 minutos e, posteriormente, o tubo foi deixado em repouso por 3 minutos, a temperatura ambiente. Deste tubo foram removidos 500 μL do sobrenadante e o restante foi misturado em um agitador de tubos. Todo o volume desta solução foi transferido para um tubo com filtro e este foi centrifugado a 14.000 g, por 1 minuto, a temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e, novamente, repetiu-se à centrifugação por 1 minuto. Adicionaram-se 500 μL de solução de lavagem de sais e etanol nomeada de SEWS-M ao filtro e este foi centrifugado a 14.000 g, por 3 minutos, a temperatura ambiente, para precipitação dos fragmentos de DNA. O tubo com o filtro foi seco por centrifugação em um aparelho liofilizador por 10 minutos (Hetovac), para melhor evaporação do etanol no precipitado. O DNA foi eluído adicionando-se no filtro 50 μL da solução DES contendo água estéril ausente de DNase, e centrifugado a 14.000 g, por 2 minutos, a temperatura ambiente. No final, as amostras foram mantidas a 20°C negativos.

3.4- Quantificação do DNA em gel de agarose

A quantificação foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A eletroforese foi realizada em uma cuba modelo Horizon 11-14 com uma alíquota de 3 μL de DNA adicionada de 3 μL de tampão de carregamento [0,025% (p/v) de azul de bromofenol e 50% de glicerol v/v] e conduzida em tampão TEB 1X [Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3], a 100 V. Foi aplicado no gel um plasmídeo pGEM (Applied Biosystems) de concentração conhecida (50 ng/ μL) em diferentes volumes para comparar a intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídio.

A visualização do DNA foi realizada sob luz UV e a imagem foi documentada em um aparelho fotodocumentador (Bio Rad – Gel Doc 1000), através do “software” Quantity OneR (Bio Rad™, Hercules, CA, USA).

3.5- Quantificação do DNA no Biofotometro

O aparelho foi ajustado para leitura de fita dupla de DNA, este foi zerado com uma amostra de água MILLI-Q filtrada. Posteriormente, foram lidas no biofotômetro (Eppendorf) soluções contendo 45 µl de água MILLI-Q filtrada e 5 µl do DNA a ser quantificado.

3.6- Reparo das extremidades dos fragmentos para clonagem em vetor cosmídeo

A reação de reparo das extremidades do DNA metagenômico, obtido de amostras de solo de arboreto de eucalipto com o FastDNA[®] SPIN Kit for soil, foi realizada para que este pudesse ser ligado ao vetor. Como o vetor está aberto no sítio de restrição da enzima *Sma*I, cujo corte gera extremidade abrupta fez-se necessário realizar o reparo das extremidades do inserto.

Para cada amostra contendo até 15 µg de DNA metagenômico, em um volume de 52 µL, foram acrescentados 8 µL de 10X “end repair buffer” (Epicentre), 8 µL de uma mistura de dNTPs, 8 µL de ATP 10 mM e 4 µL de “end repair enzyme” (Epicentre). A reação foi mantida a temperatura ambiente por 45 minutos e em seguida a 75°C, por 20 minutos, para inativação das enzimas. Os tubos foram estocados a 4°C até serem utilizados.

3.7- Seleção do tamanho dos insertos

Uma vez que os fragmentos de DNA metagenômico foram reparados, os mesmos foram

submetidos à eletroforese em gel de agarose para separação das bandas e posterior recuperação dos insertos de tamanho desejado.

A seleção do tamanho do DNA foi feita através de eletroforese preparativa em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1% (p/v), isento de brometo de etídio. A cuba de eletroforese foi previamente descontaminada com hipoclorito 4% (v/v).

Uma alíquota de 20 µL de DNA metagenômico foi aplicada no gel e ao lado 100 ng do marcador de 36 Kb T7 “control” DNA (Epicentre). Pulou-se uma canaleta e na próxima foi aplicado todo o DNA. A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 1X [40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA] isento de brometo de etídio, a voltagem constante 30 V por 8 horas.

Após a eletroforese descrita, foi realizado um corte vertical no gel de agarose resultando duas porções de gel, uma contendo os insertos a serem recuperados e outra com o marcador e a amostra comparativa para corar. A porção do gel que continha o marcador foi corada com brometo de etídio e observada sob um transiluminador. O padrão de bandejamento serviu como guia para obtenção dos insertos na porção não corada do gel, colocando-se as duas partes do gel lado a lado. A região do gel contendo insertos de tamanho desejado foi marcada e cortada com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo depositada em tubos eppendorfs de 1,5 mL, aproximadamente 400 mg de gel/tubo. Os pedaços de agarose que continham o DNA de tamanho selecionado foram armazenados a 4°C até o momento do uso. O restante do gel foi corado, visualizado em luz UV e documentado em fotodocumentador (Bio Rad – Gel Doc 1000), através do “software” Quantity OneR (Bio Rad™, Hercules, CA, USA). Foram realizados experimentos para recuperação de fragmentos de DNA entre 20 e 45 Kb, aproximadamente.

3.8- Eluição dos fragmentos reparados do gel

Os tubos contendo os fragmentos de gel de agarose foram incubados em banho a 65°C durante 15 minutos. Cada amostra teve seu volume igualado a 500µL, completando o volume com tampão TE (10:1) pH 8,0, quando necessário. O tampão da enzima gelase (10 µL) e a enzima gelase (3µL) (Epicentre) foram adicionados aos tubos, que foram agitados e centrifugados rapidamente. As amostras foram incubadas em banho-maria a 45°C por 1 hora. Em seguida, a reação foi transferida para banho-maria a 70°C por 15 minutos para inativação da enzima. Igual volume de acetato de amônio 5 M foi adicionado, e em seguida o

material foi centrifugado a 14.000 g por 10 minutos para precipitação do material insolúvel.

Cuidadosamente, foram transferidos 95% (v/v) do sobrenadante para um tubo novo. O DNA foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto, incubação de 20 minutos em ultrafreezer (-80°C) e recuperado por centrifugação a 14.000 g por 30 minutos a 4°C. Em seguida, foi lavado com 1 mL de etanol 70% (v/v) e centrifugado 14.000 g por 15 minutos a 4°C. O DNA precipitado foi ressuspendido num volume total de 40 µL e quantificado em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL). A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1X, a voltagem constante de 90 V por 1 hora.

3.9- Clonagem dos insertos em vetor cosmídeo

Para a construção da biblioteca metagenômica foi utilizado o vetor pWEB-TNC™ (Epicentre), que possui 5.812 pares de bases (Figura 2). O vetor é fornecido pronto para uso, linearizado no sítio de restrição único da enzima *Sma*I e desfosforilado.

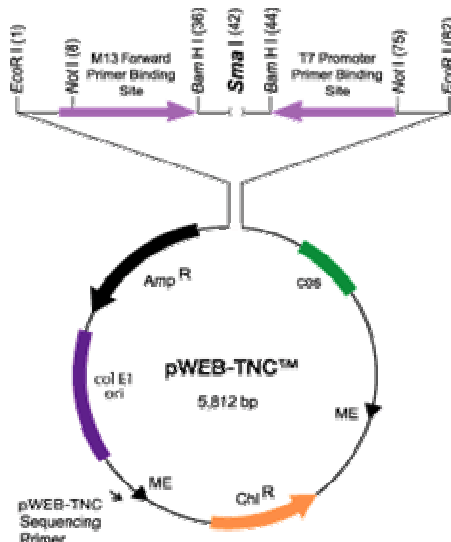


Figura 2: Esquema ilustrativo apresentando características do vetor pWEB-TNC™ (Epicentre)

3.10- Reação de Ligação

A ligação foi efetuada mantendo uma relação de concentração de insertos de DNA metagenômico com DNA vetor na proporção [1:10].

A reação foi executada em um volume de 20 μ L contendo 2 μ L de inserto DNA metagenômico ($\pm 0,2 \mu$ g, ± 30 Kb), 1 μ L de vetor pWEB-TNC, 2 μ L de tampão “fast-link ligation buffer” 10X (Epicentre), 1 μ L de ATP 10 mM, 1 μ L da enzima “fast link DNA ligase” (Epicentre) e 13 μ L de H₂O Milli-Q estéril. A reação foi mantida a temperatura ambiente (25°C) por 3 horas e depois a 70°C por 10 minutos para inativação da enzima. Os cosmídeos ligados ao inserto foram armazenados a 20°C negativos.

3.11- Reação de empacotamento

Um tubo de extrato de empacotamento (Epicentre) com 50 μ L foi retirado do freezer 80°C negativos, e colocado no gelo. Em cada tubo contendo os cosmídeos ligados ao inserto foi adicionado 25 μ L de extrato de empacotamento. As amostras foram agitadas cuidadosamente, centrifugadas rapidamente, e depois incubadas em banho-maria a 30°C por 90 minutos. Passado esse período, foram adicionados mais 25 μ L de extrato de empacotamento em cada tubo e as amostras foram novamente incubadas a 30°C por mais 90 minutos. Em seguida foi adicionado 500 μ L de tampão de diluição de fagos [10mM Tris-HCl (pH 8,3), 100mM NaCl, 10mM MgCl₂] e 25 μ L de clorofórmio. Os tubos foram agitados por inversão e estocados a 4°C.

3.12- Estocagem das células EPI100-T1^R

Colônias isoladas foram obtidas a partir de um estoque de células EPI-100 providas com o CopyControl Fosmid Library Production kit (Epicentre), através do cultivo em placas de petri com meio de cultura LB suplementado com 10 mM MgSO₄. Para reativação das células, 50 mL de caldo LB suplementado foi inoculado com uma colônia isolada, e as células foram cultivadas durante a noite a 37°C

com agitação de 300 rpm. Na sequência, 50 mL de caldo LB suplementado foi inoculado com 5 mL das células cultivadas durante a noite e cultivado sob a mesma agitação e período a 37°C. Após o crescimento, adicionou-se dentro do fluxo laminar 850 µL da cultura em tubos de estoque de células contendo 150 µL de glicerina-USP autoclavados. Os tubos foram agitados e congelados rapidamente com nitrogênio líquido, e em seguida estocados em freezer 80°C negativos.

3.13- Preparo do inóculo de células EPI100-T1^R

Colônias isoladas foram obtidas através do cultivo dos estoques em placas de petri com meio de cultura LB suplementado com 10 mM MgSO₄. No dia anterior a realização da reação de empacotamento, foram inoculados 50 mL de caldo LB suplementado com uma colônia isolada de células EPI100-T1^R. No dia da reação de empacotamento, 50 mL de caldo LB suplementado foi inoculado com 5 mL das células cultivadas por 12 horas e cultivado sob a mesma agitação a 37°C até atingir a densidade ótica a 600nm entre 0,8 e 1,0. A densidade ótica foi determinada no Biophotometer (Eppendorf). As amostras foram mantidas a 4°C até o momento do uso.

3.14- Infecção das células EPI100-T1^R

Cada 10 µL da solução com os cosmídeos empacotados foi misturado, em condições estéreis, a uma alíquota de 100 µL de células EPI100-T1^R do inóculo preparado. Os tubos foram gentilmente agitados e incubados em estufa a 37°C por 20 minutos sem agitação. Após esse período, os 110 µL de cada um dos tubos foi aplicado em placas de petri contendo meio de cultura LB com ampicilina (70µg/mL). As placas foram incubadas durante a noite em estufa a 37°C. Como controle positivo, células EPI100-T1^R sem vetor foram cultivadas em meio sem antibiótico, e como controle negativo as células EPI100-T1^R sem vetor foram plaqueadas em meio contendo antibiótico.

3.15- Coleta e estoque dos clones

Os clones transformados foram repicados com palitos de madeira esterilizados para placas estéreis de poliestireno (96 “well assay plate”, 250 μ L) contendo 125 μ L de meio Circle Grow (BIO-101) acrescido de 70 μ g/mL de ampicilina. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. por 24 horas. Após esse período, foram adicionados 125 μ L de solução de glicerol 40% (v/v). Estas placas constituem o estoque de clones das bibliotecas metagenômicas e estão estocadas à 80°C negativos.

3.16- Cultivo dos clones bacterianos e extração do DNA cosmidial

DNA cosmidial de clones individuais foi obtido pelo método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.* 1989). Para extração em tubos eppendorf, o método foi realizado sem modificações. Para extração em placas de cultivo de 96 poços, os clones da biblioteca foram inoculados em triplicatas utilizando-se um replicador, em 1,2 mL de meio LB suplementado com 70 μ g/mL de ampicilina. As suspensões foram incubadas com agitação de 230 rpm, 37°C, por 24 horas. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3220 g, o sedimento foi ressuscitado em 200 μ L de solução GTE [Glicose 50 mM; Tris-HCl 23 mM (pH 8,0); EDTA 10 mM] e as amostras das triplicatas foram reunidas numa só placa de cultivo, que foi submetida à extração.

Repetiu-se a centrifugação anterior e as células foram ressuscitadas em 85 μ L de solução de GTE contendo de 5 μ g de ribonuclease A. Um volume de 60 μ L de cada amostra foi transferido para microplacas de polipropileno de fundo “U”. Acrescentou-se 60 μ L de solução de lise [NaOH 0,2N / SDS 1% (p/v)], procedendo-se uma incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, e 60 μ L de KOAc 3M, repetindo-se o período de incubação anterior. Após uma breve centrifugação para concentrar o material no fundo da placa e retirar bolhas, as placas foram incubadas por 30 minutos a 90°C. As placas foram resfriadas em gelo por 5 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 3320 g, a 20°C. Todo o volume, cerca de 165 μ L, de cada poço foi transferido para placas Millipore providas de filtro e acopladas em placas de polipropileno novas. Este conjunto foi centrifugado por 10 minutos a 3220 g, a 20°C. Ao material filtrado foram adicionados 110 μ L de isopropanol absoluto gelado. Após selar as placas com adesivos resistentes

a álcool, as mesmas foram invertidas 10 vezes, para misturar a amostra, e centrifugadas a 3220 *g* por 45 minutos, a 20°C. O sobrenadante foi descartado e o DNA cosmidial precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 70% (v/v) gelado. As placas foram centrifugadas por 10 minutos nas mesmas condições de rotação e temperatura já descritas. Após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado e o resíduo secou em temperatura ambiente por 60 minutos. O DNA foi ressuspenso em 30 µL de água Milli-Q esterilizada e, armazenado a -20°C.

3.17- Quantificação do DNA cosmidial

Uma alíquota de 3 µL de DNA adicionada de 2 µL de tampão de carregamento [0,025% (p/v) de azul de bromofenol e 50% (v/v) de glicerol], foi aplicada a um gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE contendo brometo de etídio. Um DNA plasmidial pGEM (Applied Biosystems) de concentração conhecida (50ng/µL), foi aplicado em diferentes volumes para comparar a intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídio e calcular a concentração do DNA das amostras.

A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1X, acrescido de brometo de etídio (0,5 µg/mL) durante 2 horas, a 70V constante. O DNA cosmidial foi visualizado sob luz UV e documentado através de um sistema de documentação de géis (Gel Doc, Bio –Rad).

3.18- Análises de restrição do DNA cosmidial

Clones escolhidos ao acaso foram utilizados em análises de restrição. Para digestão com a enzima *BamH* I (Promega), em tubos de 1,5 mL foram adicionados 15 µL de DNA cosmidial, 2 µL de 10X tampão E (Promega), 1 µL da enzima de restrição *BamH* I (20 U/µL), completando-se o volume com água destilada estéril para 20 µL. O material foi incubado a 37°C por 1 hora.

Para digestão com a enzima *Not* I (Promega), em tubos de 1,5 mL foram adicionados 10 µL de DNA cosmidial, 2 µL de 10X tampão E (Promega), 0,5 µL da enzima de restrição *Not* I (10 U/µL), completando-se o volume com água destilada estéril para 20 µL. O material foi incubado a 37°C por 1

hora.

Para digestão com a enzima *Hind* III (Promega), em tubos de 1,5 mL foram adicionados 15 µL de DNA cosmidial, 2 µL de 10X tampão E (Promega), 0,5 µL da enzima de restrição *Hind* III (20 U/µL), completando-se o volume com água destilada estéril para 20 µL. O material foi incubado a 37°C por 1 hora.

As digestões foram analisadas por eletroforese de campo pulsado em gel de agarose para “pulse field” 1% (p/v). A eletroforese foi realizada em uma cuba modelo Chef Mapper 3 (Bio-Rad) e conduzida em tampão TEB 0,5X [Tris 44,5mM, Ácido Bórico 44,5mM e EDTA 1,25mM, pH 8,3], a 6 V por 20 horas. Foram usados como padrões de tamanho molecular os seguintes marcadores: 1Kb “plus” DNA “ladder” (Life Technologies), T7 “control” DNA (Epicentre) de 36 Kb, marcador 8 – 48 Kb (Bio-Rad) e Lambda *Eco*R I + *Hind* III (Promega).

O tamanho aproximado dos cosmídeos e seus respectivos insertos de DNA metagenômico foram estimados pelo software DNA frag versão 3.03 (SCHAFER & SEDEROFF, 1981). O perfil eletroforético da análise da restrição pela enzima *Hind* III foi utilizado para que esta estimativa fosse feita.

3.19- Obtenção de DNA cosmidial de pools de 96 clones

A obtenção de DNA de pools de 96 clones foi realizada para prospecção por PCR de genes de PKS tipo I. Cada placa da biblioteca foi cultivada em placas de cultivo de bactérias (“mega-titer plates”, 96 poços) contendo cada 1 mL de meio LB suplementado com 70 µg/mL de ampicilina, a 37°C, 230 rpm por 22h. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas, o sedimento foi ressuspensionado em 200 µL de solução GTE, os 96 clones foram reunidos e essa amostra composta foi submetida à extração do DNA cosmidial utilizando o Miniprep Wizard Plus kit (Promega).

3.20- Amplificação, por PCR, da região do DNA correspondente ao gene pks.

Para amplificação por PCR, DNA cosmidial (100 a 500 ng) de cada pool foi usado como molde. A prospecção de genes envolvidos na biossíntese de antibióticos foi realizada utilizando dois pares de

primers degenerados complementares a regiões altamente conservadas de genes pks tipo I de actinomicetos, conforme descrito anteriormente (COURTOIS *et al.*, 2003). A reação de PCR continha 200 μ M de deoxinucleosídeo trifosfatos, 2.5 mM $MgCl_2$, 7% dimetil sulfoxido, tampão Invitrogen, 0.4 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador de síntese degenerado, e 2.5 U of Taq DNA polimerase (Invitrogen). A reação de amplificação foi conduzida em termociclador com os seguintes ciclos: 15 minutos de denaturação inicial a 95°C, 30 ciclos de: 1 minuto de denaturação a 95°C, 1 minuto de hibridização a 65°C para o primeiro ciclo e 62°C para os ciclos restantes, 1 minuto de elongação a 72°C, e 10 minutos de extensão a 72°C.

As placas correspondentes aos pools cuja amplificação se mostraram positivas foram submetidos a uma nova extração de DNA cosmidial individual pelo método de lise alcalina, descrito anteriormente. Foi realizada nova reação de PCR, conforme descrito anteriormente, para seleção dos clones com amplificação positiva. Os produtos de PCR foram purificados com o kit GFX (Amersham) para determinação da sua sequência.

3.21- Reação de seqüenciamento dos produtos de PCR.

As reações foram efetuadas em um volume final de 10 μ L contendo 100 ng do produto de PCR purificado, 0,2 μ L de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores de síntese “forward” ou “reverse” utilizados anteriormente, 2 μ L de “Big Dye” (Big Dye TM Terminator Cycle Sequencing Ready Reactions - Perkin Elmer Biosystems) e 2 μ L de tampão de reação. Após a amplificação, as amostras foram precipitadas, lavadas, e submetidas ao seqüenciamento automático de DNA utilizando o aparelho de seqüenciamento automático ABI Prism 377 (Perkin-Elmer Corporation).

3.22- Análise das seqüências geradas utilizando ferramentas de bioinformática.

Os dados brutos dos eletroferogramas de seqüências de DNA foram analisados pelo programa PhredPhrap (EWING *et al.*, 1998; EWING e GREEN, 1998) e Consed (GORDON *et al.* 1998). Valores de phred acima de 20 foram considerados de alta qualidade. As seqüências FASTA foram submetidas ao

GenBank do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), através do programa BLASTX, para comparação com seqüências homólogas de nucleotídeos depositadas no banco de dados.

IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Escolha do solo

A escolha do solo a ser utilizado para a construção da biblioteca metagenômica, em vetor cosmídeo, foi feita baseando-se na diversidade microbiana apresentada por alguns tipos de solo que foram analisados. As análises foram feitas tendo como referência estudos sobre comunidades bacterianas dos solos. Tais estudos foram realizados a partir de DNA metagenômico e PCR com oligonucleotídeos iniciadores para a região 16S rDNA, propiciando assim, a identificação de diversas comunidades bacterianas não cultiváveis do solo. Neste contexto, o solo sob arboreto de eucalipto foi escolhido por apresentar a maior diversidade bacteriana quando comparado a amostras de solo sob floresta nativa (SILVEIRA *et al.*, 2006) e amostras de solo cultivado (PEREIRA *et al.*, 2006).

4.2- Extração de DNA metagenômico

O êxito na geração de bibliotecas metagenômicas complexas e recuperação de genes funcionais é dependente da obtenção de DNA ambiental de alto peso molecular. A fragmentação é um problema significativo porque, para que a amostra obtida represente todo o genoma microbiano do ambiente escolhido, é necessária uma extração vigorosa, (COWAN *et al.*, 2005). Por outro lado, poucas bibliotecas metagenômicas construídas até hoje contêm insertos maiores que 40 kb (RIESENFELD *et al.*, 2004).

Testes preliminares para escolha do método de extração de DNA de amostras de solo foram realizados. O teste de extração sem a utilização de kit comercial foi realizado através de lise direta do solo, conforme metodologia descrita em Materiais e Métodos. A solução de DNA obtida foi submetida a eletroforese de campo pulsado em gel de agarose, e os resultados podem se visualizados na figura 3.

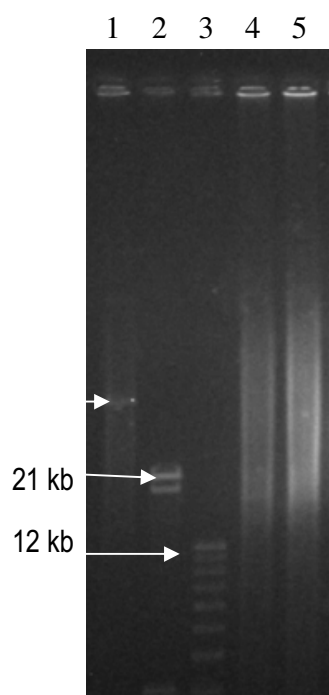


Figura 3: Perfil eletroforético de campo pulsado em gel de agarose 1% da solução de DNA obtida pelo método de lise direta. (1) 36 Kb T7 control DNA. (2) DNA de fago lambda digerido com *EcoRI* + *HindIII*, (3) 1 kb DNA"plus" "ladder", (4) e (5) DNA metagenômico.

O DNA metagenômico obtido por lise direta apresentou fragmentos com tamanho variando entre 15 e 45 kb aproximadamente, como mostra a figura 3. A co-extração de ácidos húmicos e fulvicos ficou evidente, pois a solução obtida possuía coloração marrom. ZHOU *et al.* (1996), divide o problema de recuperação de DNA metagenômico em duas partes: lise das células e extração do DNA bruto, e purificação deste DNA. Dependendo do tipo de solo pode-se obter vantagem na combinação de diferentes métodos de lise e purificação.

Para a construção da biblioteca metagenômica, optou-se por fazer a extração de DNA utilizando o FastDNA® SPIN Kit for Soil, pela praticidade e maior eficiência no processo de extração. Uma amostra de solo sob arboreto de eucalipto foi coletada na FCAV campus de Jaboticabal e procedeu-se a extração de DNA no mesmo dia. Foram feitas quatro extrações, ressuspensas num volume total de 200 µL de água estéril livre de DNase. O DNA foi analisado no biofotômetro para determinação da concentração de DNA e

grau de pureza da amostra através de leitura no comprimento de onda 260 nm e análise da relação 260/280 nm, respectivamente. A solução possuía 326 ng/μL de DNA e grau de pureza adequado, pois o valor obtido na análise da relação 260/280 nm foi 1,9.

A determinação do tamanho dos fragmentos foi através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Uma alíquota de DNA adicionada de tampão de carregamento foi aplicada no gel com marcadores de tamanho e massa (figura 4). Apesar desta análise não permitir uma determinação precisa da concentração da amostra, ficou claro que uma parte do DNA obtido possuía peso molecular adequado para clonagem em vetor cosmídeos.

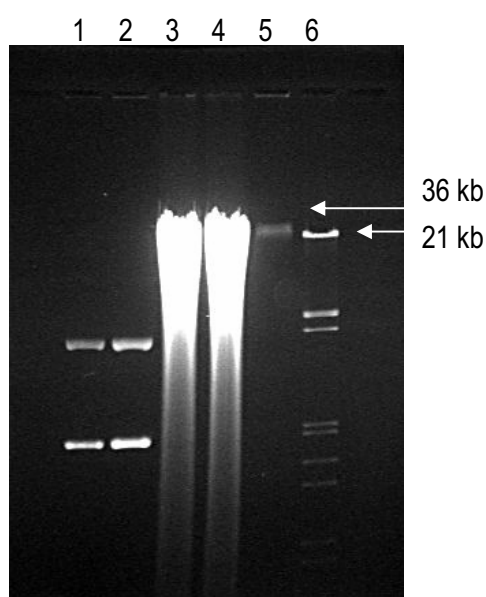


Figura 4. Perfil Eletroforético em gel de agarose 0,8% de amostras da solução de DNA ambiental. (1) e (2) plasmídeo pGem 100 ng e 200 ng respectivamente. (3) e (4) alíquota do DNA ambiental obtido. (5) 36 Kb T7 “control” DNA. (6) DNA de fago lambda digerido com *EcoR* I + *Hind* III.

4.3- Construção da biblioteca metagenômica

Para a construção da biblioteca metagenômica de solo sob arboreto de eucalipto foi utilizado o vetor pWEB-TNC™, que possui 5.812 pb. O vetor é fornecido pronto para uso, linearizado no sítio de restrição único da enzima *Sma*I e desfosforilado. Entre as características específicas deste vetor, podemos

citar: possui pares de sítios para as enzimas *BamH* I, *EcoR* I e *Not* I flanqueando o sítio *Sma* I, para excisão e mapeamento do inserto de DNA; origem de replicação Col E1 para crescimento em *E. coli*; resistência a ampicilina, sítio *cos* de bacteriófago lambda para empacotamento e sítio para ligação dos oligonucleotídeos M13 “forward” e T7 “promoter” flanqueando o sítio de clonagem.

A utilização de cosmídeos para construção de bibliotecas metagenômicas se justifica por ser capaz de receber grandes insertos de DNA, que se constitui um fator importante na abordagem metagenômica. A capacidade de clonar grandes fragmentos de DNA permite que operons funcionais possam ser prospectados, com a possibilidade de recuperação de vias biossintéticas inteiras (COWAN et al., 2005).

A reação de reparo das extremidades do DNA metagenômico foi necessária para que este pudesse ser ligado ao vetor. Uma combinação das enzimas T4 DNA polimerase (bacteriófago T4) e Klenow DNA polimerase (*E. coli*) foi utilizada para o preenchimento de terminais nos fragmentos de DNA, através da incorporação de nucleotídeos complementares livres em terminais 3' da dupla fita de DNA. Adicionalmente, a atividade exonucleásica 3'→5' da T4 DNA polimerase degrada extremidades protuberantes nos terminais 3'. A enzima fosfatase alcalina remove grupos 5'-P dos fragmentos de DNA, preparando os insertos para clonagem através de ligação em vetores correspondentes. A reação de desfosforilação foi realizada diretamente no tubo contendo a reação de reparo “blunt-end”.

Uma vez que os fragmentos de DNA metagenômico foram reparados e modificados, os mesmos foram submetidos à eletroforese preparativa ilustrado na figura 5. A região do gel contendo insertos de tamanho entre 20 e 45 kb foi marcada e cortada, e os bloquinhos de agarose foram depositados em tubos eppendorfs de 1,5 ml, aproximadamente 400mg de gel/tubo. O restante do gel foi corado, visualizado em luz UV e documentado em fotodocumentador (figura 5).

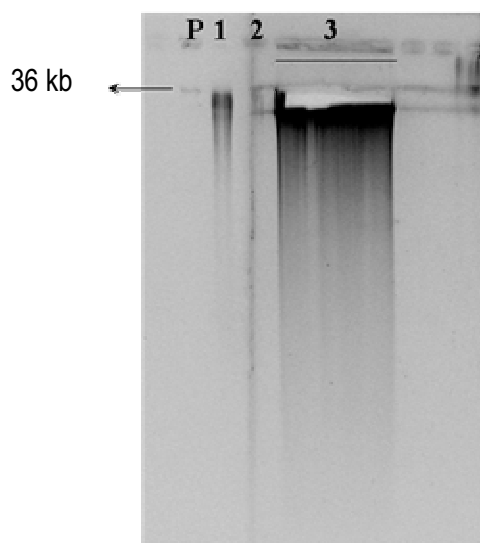


Figura 5. Perfil da eletroforese preparativa em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1% (p/v). Canaletas: (P) 100 ng do marcador de 36 Kb T7 “control” DNA (EPICENTRE), (1) 20 μ L de DNA metagenômico, (2) canaleta vazia, (3) DNA metagenômico.

Os fragmentos de agarose retirados do gel foram fundidos e digeridos com a enzima gelase. O DNA foi precipitado com etanol e ressuspendidos em 40 μ L de água Milli-Q esterilizada. Uma alíquota de 2 μ L de DNA foi utilizada para quantificação em gel de agarose 1% (Figura 6). Por comparação da intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídio entre concentrações conhecidas (50 ng/ μ L) em diferentes volumes do plasmídeo pGEM, aqui utilizado como marcador de massa, foi estimado que a amostra de DNA estava com uma concentração aproximada de 100 ng/ μ L.

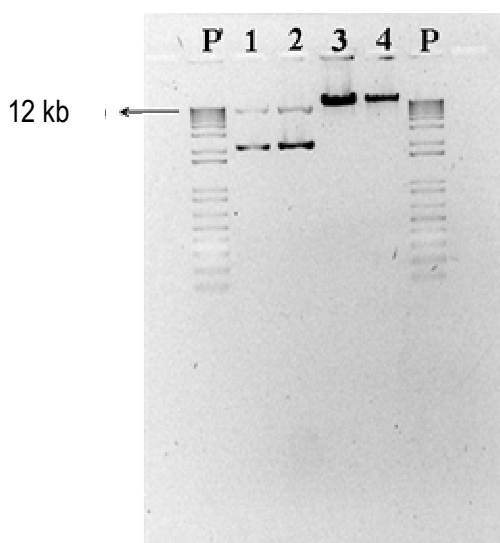


Figura 6. Perfil eletroforético da quantificação do DNA metagenômico eluído do gel. (P) 1 Kb “plus” DNA “ladder”, (1) 50 ng de pGEM, (2) 100ng de pGEM, (3) 2 µL de DNA metagenômico, (4) 100 ng do marcador de 36 Kb.

Após a quantificação do DNA metagenômico eluído do gel preparativo para seleção de tamanho dos insertos a serem clonados, efetuou-se a ligação dos insertos no vetor cosmídeo. Foi então realizada a reação de empacotamento do vetor nos fagos providos com o kit, e estes foram utilizados para infectar as células EPI100-T1^R crescidas anteriormente. As células foram cultivadas durante a noite, em meio de cultura sólido, contendo antibiótico para seleção dos transformantes.

Foram coletados 9320 clones, armazenados em placas (96 “wells”) contendo meio de cultura com antibiótico, e estes foram estocados em freezer –80°C. Foram então realizadas sucessivas extrações de DNA cosmidial de diversas placas da biblioteca escolhidas ao acaso.

A obtenção de DNA cosmidial em quantidade e qualidade suficientes representou um desafio, pelo vetor se manter em baixo número de cópias nas células. Quando conduzido em larga escala, em placas de 96 amostras, foi necessário aumentar a amostra celular inicial. As placas foram inoculadas em triplicatas, e ao final da incubação estas foram reunidas através de centrifugações. Desta forma, foi obtido DNA em concentrações adequadas para as reações de PCR, mas nem sempre suficientes para análises de restrição, subclonagem ou seqüenciamento das extremidades dos cosmídeos (figura 7). Bons resultados foram obtidos quando o método da lise alcalina foi conduzido em tubos individuais (figura 8).

O isolamento e quantificação do DNA cosmidial foi verificado em gel de agarose 0,8%. Um padrão de bandejamento com uma sutil diferença de alturas confirma a entrada do inserto nos cosmídeos bem como sua manutenção no hospedeiro, *E. coli* EPI-100. O tamanho do DNA cosmidial, cujas bandas aparecem bem acima da maior banda do marcador utilizado (12 Kb), também confirma a entrada de insertos no vetor. A diferença no padrão de bandejamento é sutil porque a metodologia escolhida para obtenção do perfil eletroforético não oferece resolução para uma melhor separação de DNA com este tamanho (Figura 7).

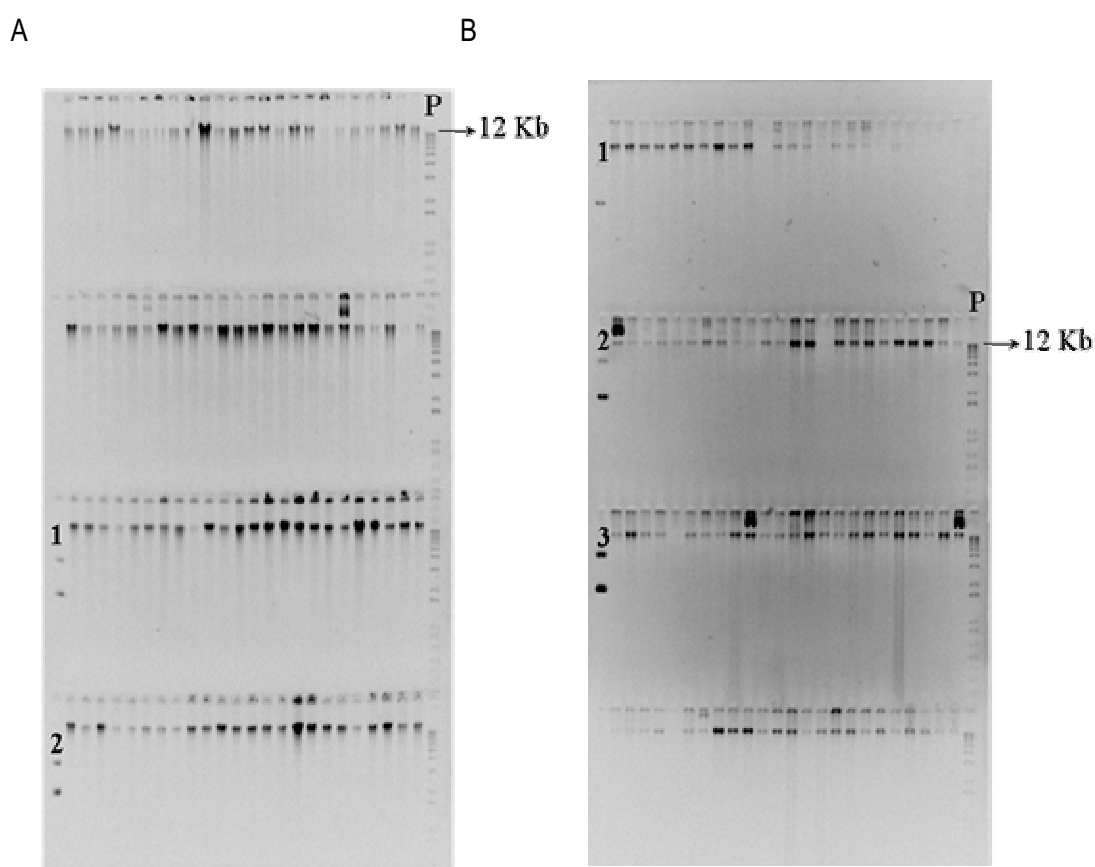


Figura 7. Análise do DNA cosmidial recombinante isolados em placas de 96 amostras de clones da biblioteca de DNA metagenômico, em gel de agarose 0,8% (p/v). A diferença de altura das bandas entre os diferentes clones denota a ligação de insertos de diferentes tamanhos. Foi aplicado 3 μ L de DNA cosmidial. A: (P) 1 Kb “plus” DNA “ladder”, (1) 50 ng de pGEM, (2) 150 ng de pGEM. B: (P) 1 Kb “plus” DNA “ladder”, (1) 50 ng de pGEM, (2) 100 ng de pGEM, (3) 200 ng de pGEM.

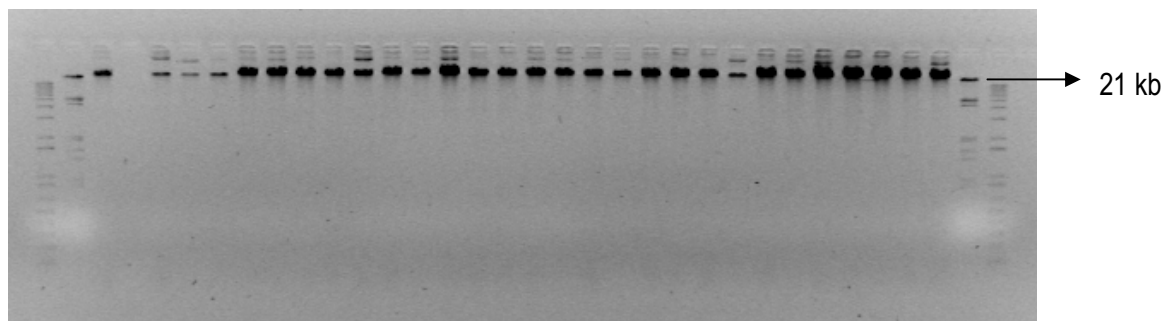


Figura 8. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% do DNA cosmidial de 30 clones da placa 37.

Para extração de DNA cosmidial dos pools, optou-se pela utilização de um kit comercial que apresentou bons resultados quando a finalidade era a utilização em reações de PCR (figura 9).



Figura 9. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% do DNA cosmidial de pools de 96 clones obtido com a utilização do kit Wizard Miniprep Plus (Promega).

Foram selecionados clones ao acaso para análises de restrição com as enzimas de restrição *BamH* I, *Not* I e *Hind* III (Figura 10, 11, 12 e 13).

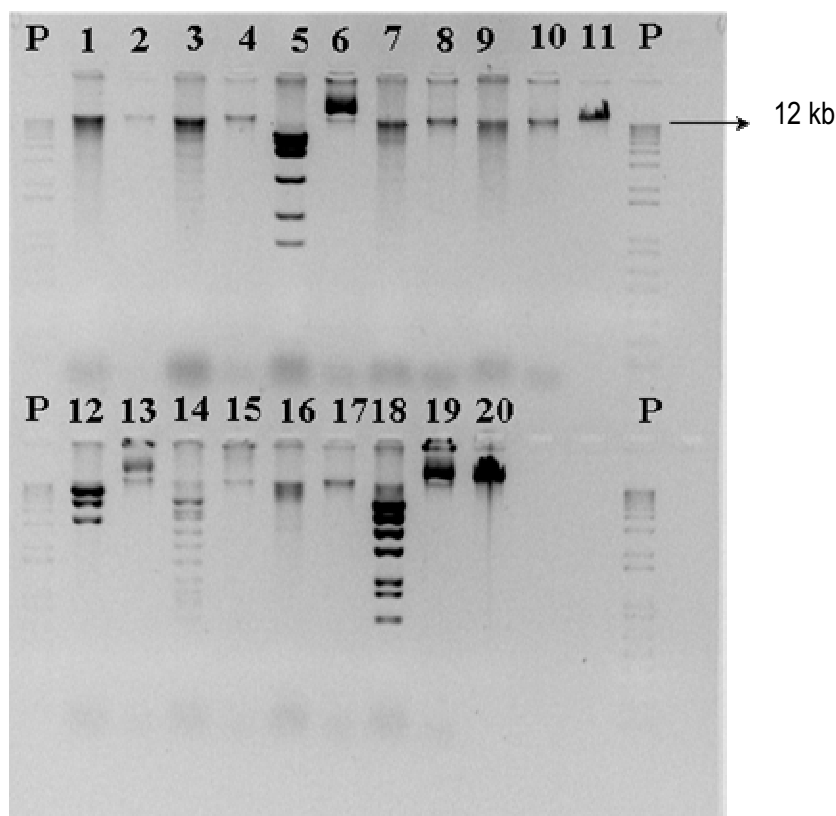


Figura 10. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% (p/v) da digestão enzimática com *BamH* I de clones escolhidos ao acaso. (P) 1 Kb “plus” DNA “ladder”, (1) (3) (5) (7) (9) (12) (14) (16) e (18): DNA cosmidial digerido; (2) (4) (6) (8) (10) (13) (15) (17) (18) clones DNA cosmidial íntegro, (10) e (20): marcador 36 kb.

O gel mostrado na figura 10, obtido por eletroforese comum, não apresenta resolução suficiente para separação de bandas de DNA visando determinação do tamanho dos insertos. Para melhor visualização do padrão de restrição dos clones da biblioteca digeridos com a enzima *BamH* I, foram feitas análises por eletroforese de campo pulsado. Nas figuras 11 e 12 está mostrado o perfil eletroforético, em eletroforese de campo pulsado, do DNA de clones da biblioteca escolhidos ao acaso digeridos com as enzimas *BamH* I, *Not* I e *Hind* III. Algumas bandas provavelmente saíram do gel e assim ajustes no tempo e programa de corrida foram necessários para uma perfeita visualização do perfil eletroforético.

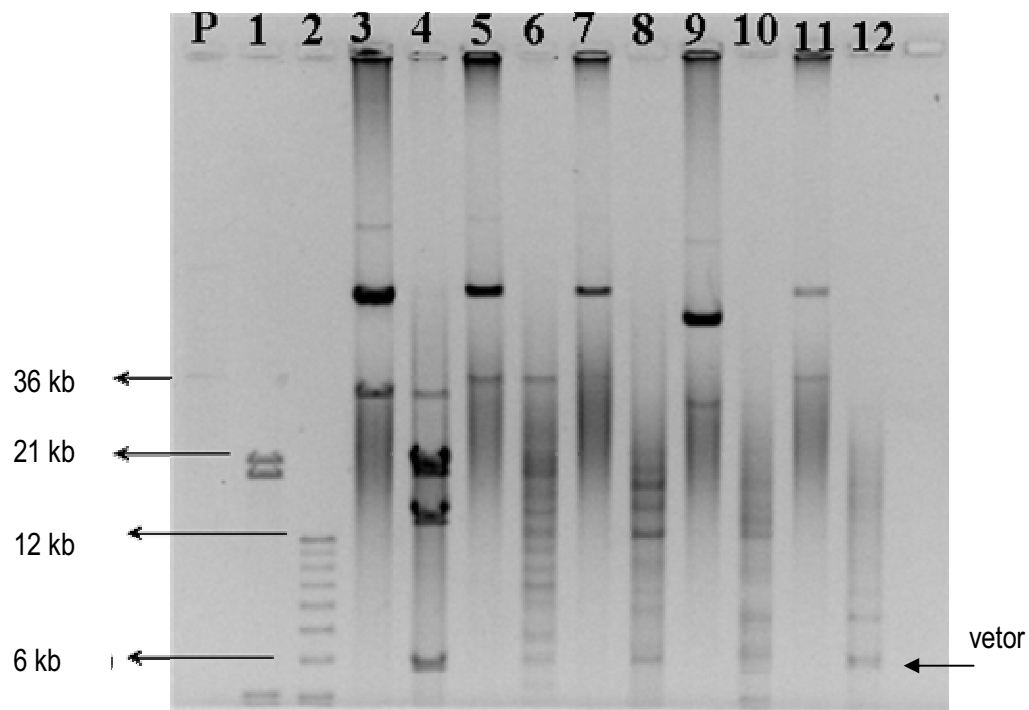


Figura 11. Perfil eletroforético de campo pulsado em gel de agarose 1% da digestão enzimática com *BamH* I de clones da placa 36. (P) 36 Kb, (1) Lambda digerido com *EcoR*I e *Hind*III, (2) 1 Kb “plus” DNA “ladder”, (3) (5) (7) (9) (11) DNA cosmidial integro, (4) (6) (8) (10) (12) DNA cosmidial digerido.

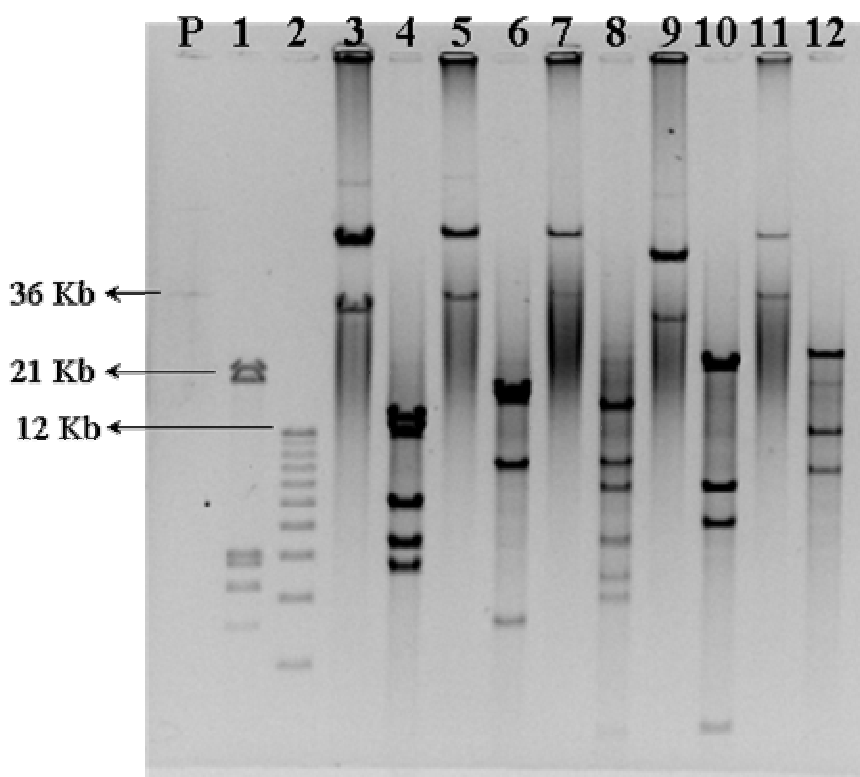


Figura 12. Perfil eletroforético de campo pulsado em gel de agarose 1% (p/v) da digestão enzimática de cosmídeos de clones da placa 36 com *Hind* III. (P) 36 Kb T7 control DNA; (1) Lambda *EcoR* I + *Hind* III; (2) 1 Kb *plus DNA ladder*; (3), (5), (7), (9) (11) clones E05, C06, D10, C10 e F12 íntegros; (4), (6), (8), (10) (12) clones E05, C06, D10, C10 e F12 digeridos.

As digestões enzimáticas mostram-se satisfatórias para visualizar diferenças entre os clones da biblioteca metagenômica de solo sob arboreto de eucalipto. Pela análise dos três géis apresentados acima é possível afirmar que a biblioteca metagenômica não se constitui de clones repetitivos, pois percebe-se uma notável diferenças nos padrões de restrição gerados para cada clone, com o uso de diferentes enzimas de restrição. Na restrição realizada com a enzima *BamH* I, descrita na figura 11, houve a liberação do inserto de DNA metagenômico clonado em vetor cosmídeo (a enzima *BamH* I flanqueia o sítio de clonagem do vetor). Neste ensaio pode-se perceber que todos os clones que tiveram seu DNA cosmidial digerido apresentam uma banda na altura de 6 Kb (figura 11), indicando assim a presença do vetor cosmídeo, que possui 5812 pares de bases (figura 2). Pelas análises de restrição e através do

programa DNA Frag foi possível determinar o tamanho médio dos insertos, 38.375 kb.

4.4- Prospecção, por PCR, do gene *pks* na biblioteca metagenômica

Em todos os casos onde genes responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários bacterianos e fúngicos foram clonados e seqüenciados, as regiões biossintéticas, regulatórias e de resistência estão fisicamente unidas. Diferentes agrupamentos gênicos biossintéticos podem ter tamanho que varia entre 20 kb e 100 kb mais ou menos (PETTIT, 2004).

A biblioteca foi prospectada quanto à presença de genes de biossíntese de antibióticos policetídeos sintetizados pelo complexo enzimático PKS do tipo I. A existência de regiões altamente conservadas, flanqueando o sítio ativo do domínio da β -cetoacil sintase, permite que seqüências de oligonucleotídeos iniciadores de síntese degenerados sejam utilizadas para amplificação por PCR de genes homólogos.

A prospecção de genes de *pks* tipo I pelo método de PCR aproveita a vantagem destes clusters biossintéticos possuírem seqüências altamente conservadas, permitindo uma rápida amplificação e conseqüente localização dos clones que contem estes genes. Outra vantagem deste tipo de prospecção é que não depende da expressão de genes clonados nos hospedeiros (DANIEL, 2004). Uma desvantagem é a limitação à descoberta de genes em famílias previamente descritas. (HANDELSMAN, 2005). Esta abordagem é mais adequada para prospecção em pequena escala, visto que os clones são pesquisados de forma manual.

A seqüência dos dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores de síntese utilizados foram retirados do artigo de COURTOIS *et al* (2003). As condições de PCR utilizadas foram as mesmas descritas no artigo, porém optou-se em utilizar os dois conjuntos de oligonucleotídeos juntos numa mesma reação, visto que eles possuem seqüências muito parecidas e bases degeneradas em posições diferentes.

O DNA de *Streptomyces avermitilis*, gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. Gabriel Padilla, coordenador do Laboratório de Genética de *Streptomyces* do ICB – USP – SP, foi utilizado para validação das condições de PCR e controle positivo das reações de prospecção.

O DNA cosmidial de 4320 clones foi extraído em 45 pools de 96 clones e submetidos a reações de PCR utilizando os dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores de síntese. As figuras 13, 14, 15 e 16

mostram os géis de prospecção por PCR nos pools de DNA cosmidial de clones da biblioteca.

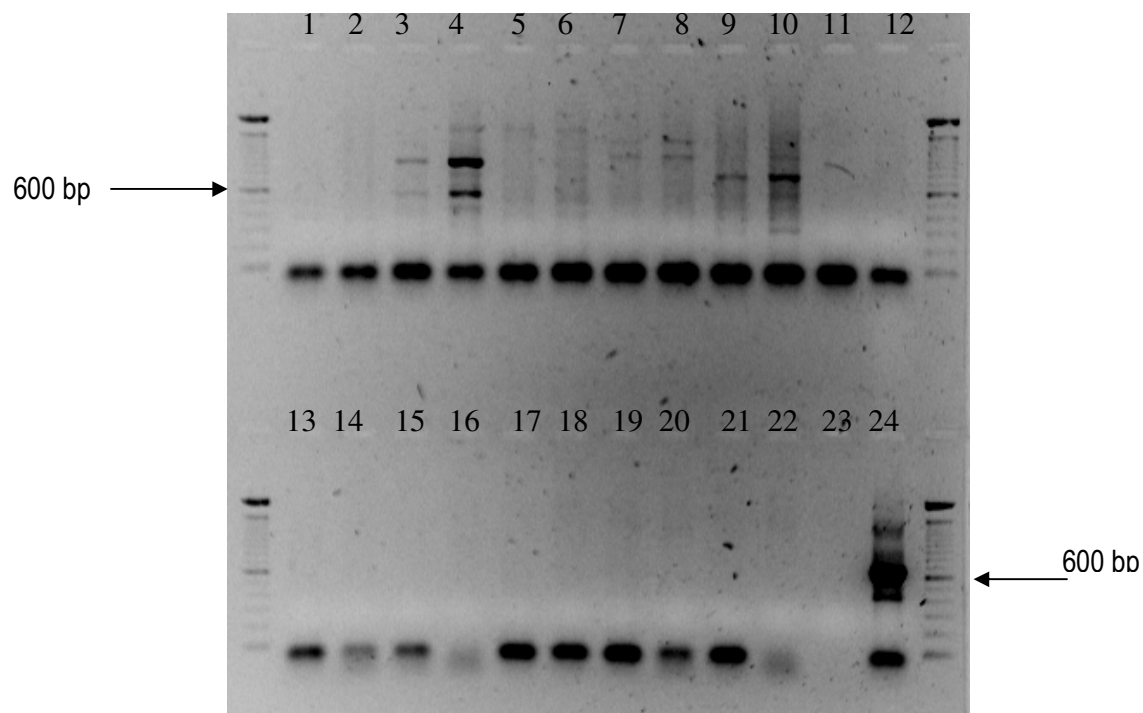


Figura 13. Perfil eletroforético da amplificação por PCR dos pools 1-11 em gel de agarose 1,5%. O marcador de tamanho utilizado foi o 100 bp DNA "ladder". (1) e (2) pool 1, (3) e (4) pool 2, (5) e (6) pool 3, (7) e (8) pool 4, (9) e (10) pool 5, (11) e (12) pool 6, (13) e (14) pool 7, (15) e (16) pool 8, (17) e (18) pool 9, (19) e (20) pool 10, (21) e (22), pool 11, (23) controle negativo da reação, (24) controle positivo da reação.

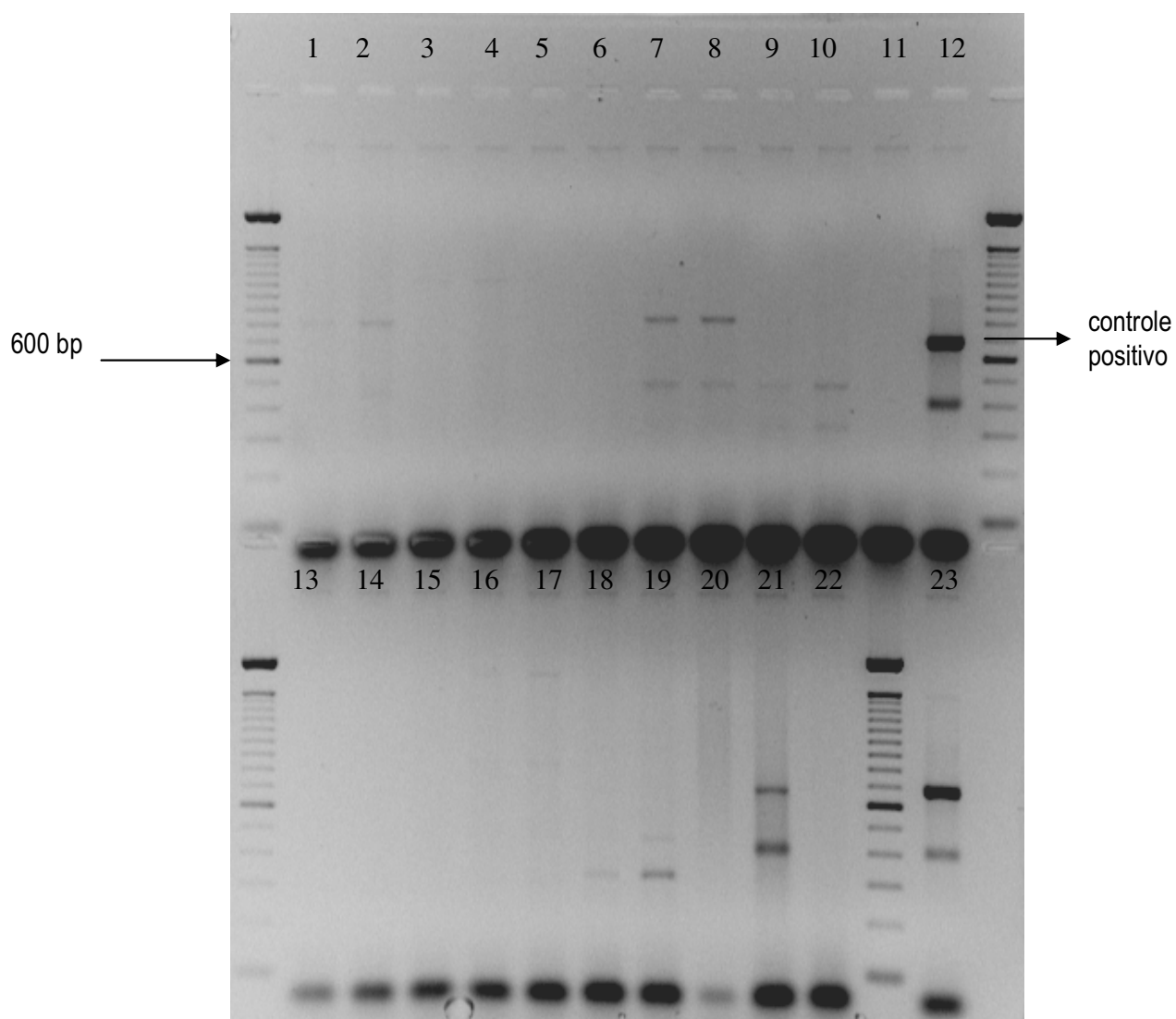


Figura 14. Perfil eletroforético da amplificação por PCR dos pools 12-20 em gel de agarose 1,5%. O marcador de tamanho utilizado foi o 100 bp DNA ladder. (1) e (2) pool 12, (3) e (4) pool 13, (5) e (6) pool 14, (7) e (8) pool 15, (9) e (10) pool 16, (11) e (13) pool 17, (14) e (15) pool 18, (16) e (17) pool 19, (18) e (19) pool 20, (20) e (21) DNA de solo de eucalipto (22) controle negativo da reação, (12) e (23) controle positivo da reação.

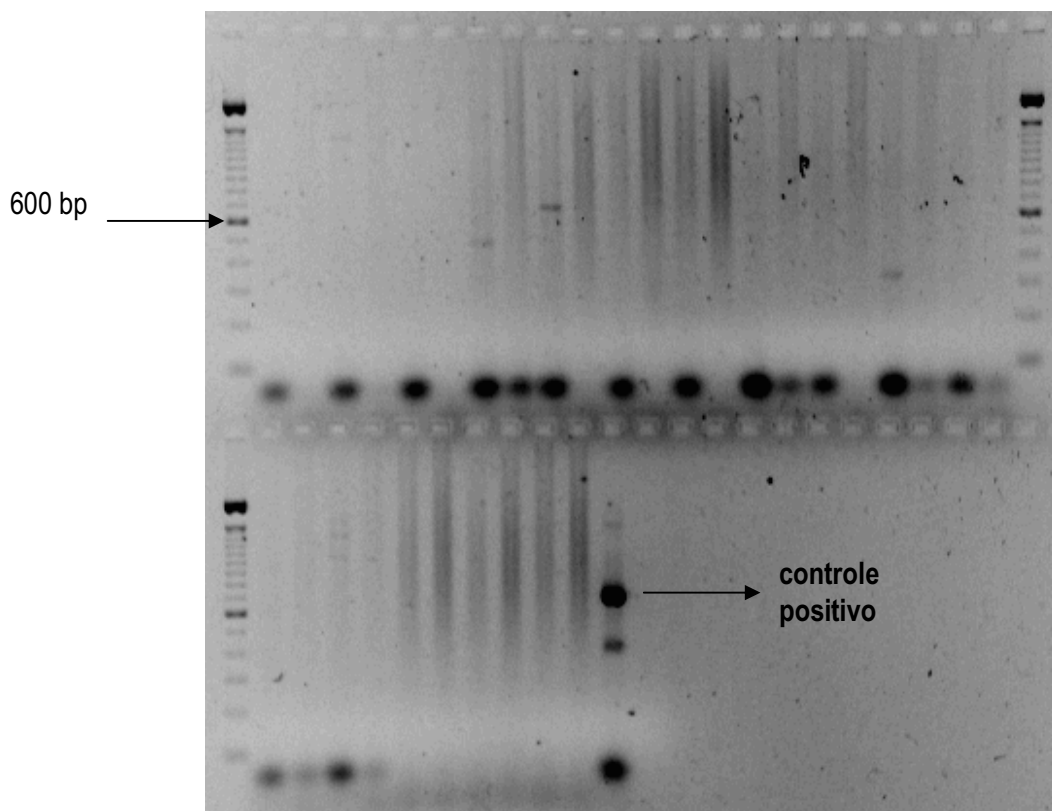


Figura 15. Perfil eletroforético da amplificação por PCR dos pools 21-33 em gel de agarose 1,0%. O marcador de tamanho utilizado foi o 100 bp DNA ladder.

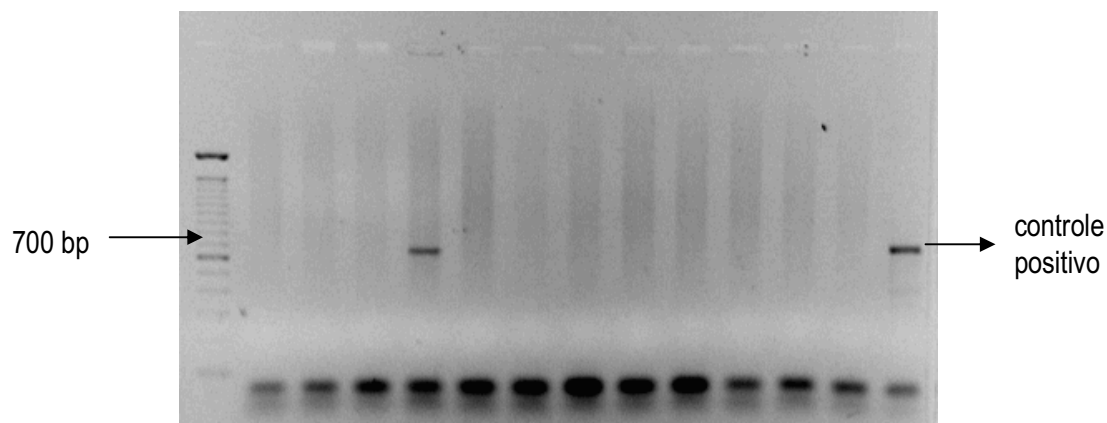


Figura 16. Perfil eletroforético da amplificação por PCR dos pools 34-45 em gel de agarose 1,0%. O marcador de tamanho utilizado foi o 100 bp DNA "ladder".

Dentre os 45 pools prospectados, 15 apresentaram alguma amplificação positiva, e os produtos possuíam tamanhos diferentes. Os clones que compunham os pools cuja amplificação foi positiva foram submetidos a uma nova extração de DNA cosmidial individual, e foi realizada nova reação de PCR, conforme descrito anteriormente, para isolamento dos clones com amplificação positiva. Foram identificados 5 clones individuais que apresentam amplificação positiva para o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores de síntese degenerados utilizados nas reações (figuras 17 e 18).

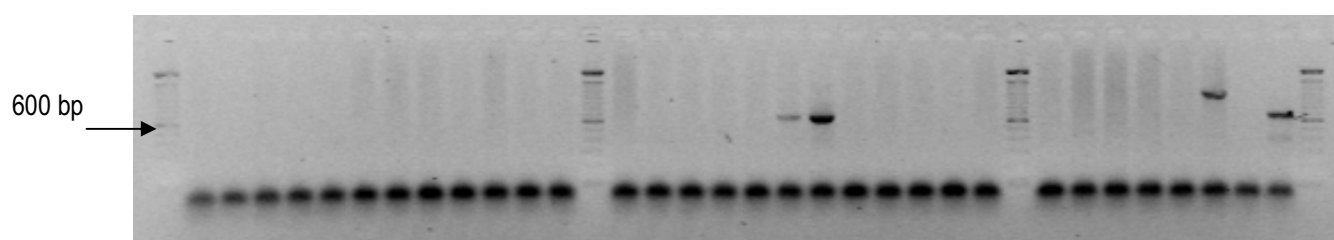


Figura 17. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,0% da amplificação por PCR de clones da placa 37. O marcador de tamanho utilizado foi o 100 bp DNA "ladder"

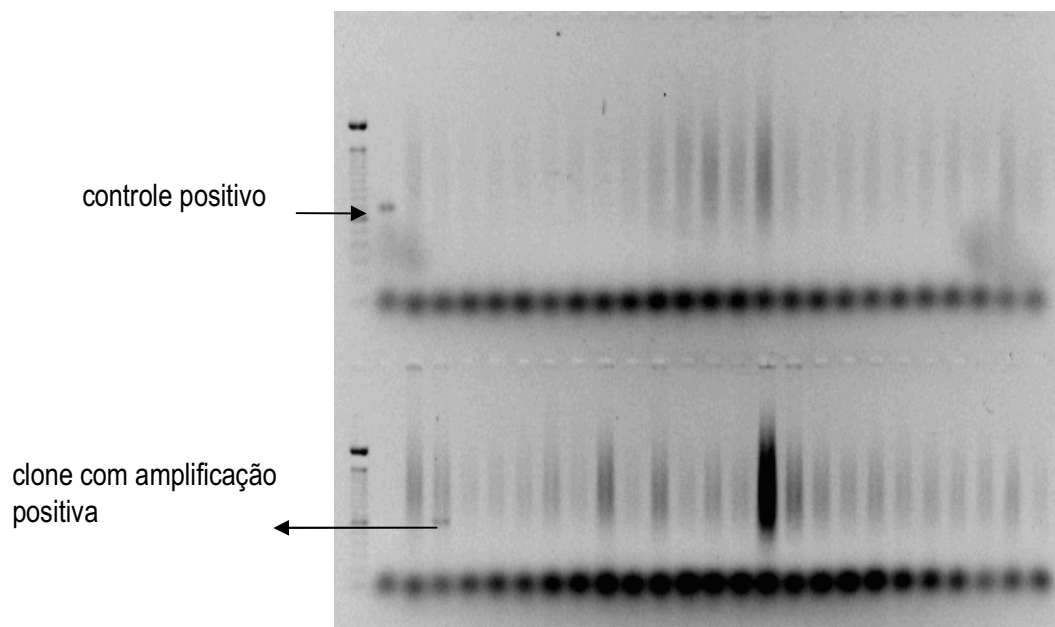


Figura 18. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,0% da amplificação por PCR de clones da placa 2. O marcador de tamanho utilizado foi o 100 bp DNA “ladder”.

Os cinco produtos de PCR obtidos, bem como o do controle positivo, foram purificados e seqüenciados, e suas seqüências foram comparadas com as existentes no banco de dados GenBank do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), através da ferramenta BLASTX.

Um dos amplicons obtidos apresentou similaridade com gene de sintetase ácido lipóico (41% de similaridade com seqüências das proteobactérias *Sigmatella aurantica* e *Myxococcus xanthus*), um cofator essencial para muitas enzimas metabólicas essenciais. Os outros quatro não apresentaram nenhuma similaridade significativa. O produto de PCR do controle positivo apresentou alinhamento significativo com seqüências de genes de policetideo sintase modular de organismos pertencentes a classe dos Actinomicetos, principalmente *Streptomyces*, como era esperado.

V- CONCLUSÃO

A metagenômica representa um novo desafio na era genômica, e os estudos iniciais apenas confirmam o enorme potencial desta abordagem. Porém, a metodologia ainda requer aperfeiçoamentos e validações. Neste trabalho de mestrado foi desenvolvida uma metodologia simples que permite obtenção de DNA metagenômico com tamanho suficiente para clonagem em vetor cosmídeo. A utilização do vetor cosmídeo é uma boa opção para clonagem de DNA ambiental porque comporta grandes insertos e é eficiente para a identificação rápida de possíveis genes e/ou produtos gênicos de interesse biotecnológico.

As análises dos resultados permitiram as seguintes conclusões:

1. O método de extração de solo utilizado neste trabalho foi eficiente em extrair DNA metagenômico de alto peso molecular.
2. A biblioteca metagenômica construída em vetor cosmídeo constitui-se de uma biblioteca randômica, apresentando assim, diversidade entre seus clones;
3. A prospecção da biblioteca metagenômica através do uso da técnica de PCR mostrou ser um método eficiente e possibilitou a identificação de clones cujos insertos possuem o gene *pks*, ou parte dele.

VI- BIBLIOGRAFIA

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143-169, 1995.

BARSALOBRES-CAVALLARI, C.; DE ROSA JÚNIOR, V.; NOGUEIRA, F.; FERRO, J.; DI MAURO, S.; MENOSSE, M.; ULIAN, E.; SILVA-FILHO, M. A novel system for large-scale gene expression analysis: bacterial colonies array. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 963-969, 2006.

BEARE, M. H.; COLEMAN, D.C.; CROSSLEY, D.A.; HENDRIX, P.F.; ODUM, E.P. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. **Plant Soil**, Missouri, v. 170, p. 5-22, 1995.

BORNEMAN, J.; SKROCH, P.W.; OSULLIVAN, K.M.; PALUS, J.A.; RUMJANEK, N.G.; JANSEN, J.L.; NIENHUIS, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 6, p. 935-943, 1996.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 7, p. 2647-2653, 1997.

BRADY, S.F.; CHAO, C.J.; HANDELSMAN, J.; CLARDY, J. Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. **Organic Letters**, Columbus, v. 3, p. 1981-1984, 2001

BREITHART, M.; SALAMON, P.; ANDRESEN, B.; MAHAFFY, J.M.; SEGALL, A.M.; MEAD, D.; AZAM, F.; ROHWER, F. Genomic analysis of uncultured marine microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 14250-14255, 2002.

BURGMANN, H.; PESARO, M.; WIDMER, F.; ZEYER, J. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 45, p. 7-20, 2001.

BUYER, S. A soil and rhizosphere microorganism isolation and enumeration medium that inhibits *Bacillus mycoides*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1839-1842, 1995.

COURTOIS, S.; FROSTEGARD, P.; GORANSSON, P.; DEPRET, G.; JEANNIN, P.; SIMONET, P. Quantification of bacterial subgroups in soil: comparisson of DNA extrated directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. **Environmental Microbiology**, London, v.3, p.431-439, 2001.

COURTOIS, S., et al. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v.69, n.1, p. 49-55, 2003.

COWAN, D.; MEYER, Q.; STAFFORD, W.; MUYANGA, S.; CAMERON, R.; WITTER, P. Metagenomic gene discovery: past, present and future. **Trends in Biotechnology**, London, v. 23, n. 6, p. 321-329, 2005.

CULLEN, D.W.; HIRSCH, P.R. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, n .8/9, p. 983-993, 1998.

DANIEL R. The soil metagenome - a rich resource for the discovery of novel natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 199-204, 2004.

DEMAIN, A.L. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 499-454, 2000.

DEMAIN, A.L.; FANG, A. Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. **Actinomycetologia**, v. 9, p. 98-117, 1995.

DIAZ-TORRES, M.L. et al, Novel Tetracycline Resistance Determinant from the Oral Metagenome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p.1430–1432, 2003.

DONADIO, S., MONCIARDINI, P., ALDUINA, R., MAZZA, P., CHIOCHINI, C., CAVALETTI, L., SOSIO, M., PUGLIA, A.M. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v.99, p.187-198, 2002.

DUARTE, F.G.; ROSADO, A.S.; SELDIN, L.; KEIJZER-WOLTERS, A.C.; VAN ELSAS, J. D. Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the indigenous bacterial community. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.32, p.21-29, 1998.

ENTCHEVA, P.; LIEBL, W.; JOHANN, A.; HARTSCH, T; STREIT, W.R. Direct Cloning from Enrichment Cultures, a Reliable Strategy for Isolation of Complete Operons and Genes from Microbial Consortia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 89-99, 2001.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILIER, L.D.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 175-185, 1998.

FERNANDEZ-MORENO, M. A.; CABALLERO, J. L.; HOPWOOD, D. A.; MALPARTIDA, F. The act cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the bldA tRNA gene of *Streptomyces*. **Cell**, v. 66, p. 769-80, 1991.

FERRER, M; GOLYSHINA, O.V.; CHERNIKOVA, T.N.; KHACHANE, A.N.; REYES-DUARTE, D; DOS SANTOS, V.A.P.M.; STROMPL, C.; ELBOROUGH, K.; JARVIS, G.; NEEF, A.; YAKIMOV, M.M.; TIMMIS, K.N.; GOLYSHIN, P.N. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. **Environmental Microbiology**, London, v. 7, n. 12, p. 1996–2010, 2005.

GELSOMINO, A; KEIJZER-WOLTERS, A.C.; CACCO, G.;VAN ELSAS, J.D. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 38, p 1-15, 1999.

GILLESPIE, D.E.; BRADY, S.F.; BETTERMANN, A.D.; CIANCOTTO, N.P.; LILES, M.R.; RONDON, M.R.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M.; HANDELSMAN, J. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4301-4306, 2002.

GINOLHAC, A.; JARRIN, C.; GILLET, B.; ROBE, P.; PUJIC, P.; TUPHILE, K.; BERTRAND, H.; VOGEL, T.M.; PERRIERE, G.; SIMONET, P.; NALIN, R. Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, v. 9, p. 5522-5527, 2004.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A Graphical Tool For Sequence Finishing. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 195-202, 1998.

HANDELSMAN, J.; RONDON M.R.; BRADY S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 5, p. R245-249, 1998.

HANDELSMAN, J. Sorting out metagenomes. **Nature Biotechnology**, London, v. 23, n. 1, p. 38-39, 2005.

HOPWOOD, D.A. Genetic Contributions to Understanding Polyketide Syntases. **Chemical Reviews**, Columbus, v. 97, p. 2465-2497, 1997.

HOPWOOD, D.A., Cracking the polyketide code. **Plos Biology**, California, v. 2, p. 166-169, 2004.

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnology**, London, v. 14, p. 190-197, 1996.

HUTCHINSON, C. R. Biosynthetic Studies of Daunorubicin and Tetracenomycin C, **Chemical Reviews**, Columbus, v. 97, p. 2525-2535, 1997.

HUTCHINSON, C.R.; FUJII, I. Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics. **Annual Review of Microbiology** v. 49, p.201-38, 1995.

KIM, T.K.; FUERST, J.A. Diversity of polyketide synthase genes from bacteria associated with the marine sponge *Pseudoceratina clavata*: culture-dependent and culture-independent approaches. **Environmental Microbiology**, London, v. 8, n. 8, p. 1460-1470, 2006.

KNIETSCH, A et al Construction and Screening of Metagenomic Libraries Derived from Enrichment Cultures: Generation of a Gene Bank for Genes Conferring Alcohol Oxidoreductase Activity on *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1408-1416, 2003.

KNIGHT, V.; SANGIER, J.J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 446-458, 2003.

KUSKE, C. R.; BANTON, K.L.; ADORADA, D.L.; STARK, P.C.; HILL, K.K.; JACKSON, P.J. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection for microbial cells and spores in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, Washington, v. 64, n. 7, p. 2463-2472, 1998.

LEE, S. Y.; BOLLINGER, J.; BEZDICEK, D.; OGRAM, A. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 3787-3793, 1996.

LIM, H.K.; CHUNG, E.J.; KIM, J.C.; CHOI, G.J.; JANG, K.S.; CHUNG, Y.R.; CHO, K.Y.; LEE, S.W. Characterization of a Forest Soil Metagenome Clone That Confers Indirubin and Indigo Production on *Escherichia coli*, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 7768–7777, 2005.

MALPARTIDA F.; HOPWOOD, D. A. Molecular cloning of whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. **Nature**, London, v. 309, p. 462-464, 1984.

MALPARTIDA, F.; HALLAM, S.E.; KIESES, H.M.; MOTAMED, H.; HUTCHINSON, C.R.; BUTLER, M.J.; SUGDEN, D.A.; WARREN, M.; MCKILLOP, C.; BAILEY, C.R.; HUMPHREYS, G.O.; HOPWOOD, D.A. Homology Between *Streptomyces* Genes Coding for Synthesis of Different Polyketides Used to Clone Antibiotic Biosynthetic Genes. **Nature**, London, v. 325, p. 818-821, 1987.

MALPARTIDA, F.; HOPWOOD, D.A. Physical and genetic characterization of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Molecular and General Genetics** v. 205, n. 1, p. 66-73, 1986.

MARTIN, J. F.; LIRAS, P. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. **Annual Review of Microbiology** v. 43, p. 173-206, 1989.

MARTIN, J.F.; DEMAIN, A.L. Control of antibiotic biosynthesis. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 44, p. 231-251, 1980.

OGRAM, A. Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, p. 1499-1504, 2000.

PACE N.R.; STAHL D.A.; LANE D.J.; OLSEN G.J. The analysis of natural populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology** v.9, p.1–55, 1986.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, New York, v. 276, p. 734-740, 1997.

PEREIRA, R.M.; SILVEIRA, E.L.; SCAQUITTO, D.C.; PEDRINHO, E.A.N.; VAL-MORAES, S.P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 439-447, 2006.

RIESENFELD, C.S.; SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. **Annual Review of Genetics**, v. 38, p.525-552, 2004.

RITZ, K.; GRIFFITHS, B. S. Potential application of a community hybridization technique for assessing changes in the population structure of soil microbial communities. **Soil Biology Biochemistry**, Amsterdam, v. 26, n. 8, p. 963-971, 1994.

RONDON, M.R.; RAFFAEL, S.J.; GOODMAN, R.M.; HANDELSMAN, J. Toward functional genomics in bacteria: analysis of gene expression in *Escherichia coli* from a bacterial artificial chromosome library of *Bacillus cereus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 11, p. 6451-6455, 1999.

RONDON, M.R.; GOODMAN, R.M.; HANDELSMAN, J. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity, **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 403-409, 1999.

RONDON, M.R., AUGUST, P.R., BETTERMANN, A.D., BRADY, S.F., GROSSMAN, T.H., LILES, M.R., LOIACONO, K.A., LYNCH, B.A., MACNEIL, I.A., MINOR, C., TIONG, C.L., GILMAN, M., OSBURNE, M.S., CLARDY, J., HANDELSMAN, J., GOODMAN, R.M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 6, p. 2541-2547, 2000.

SAMBROOK, J.; MANIATS, T.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SCHAFFER, H.E.; SEDEROFF, R.R. Improved estimation of dna fragments lengths from agarose gels. **Analytical Biochemistry**, v. 115, p. 113-122, 1981.

SCHMIDT, T.M.; DELONG E.F.; PACE, N.R. Analysis of a marine picoplankton community by 16s rRNA gene cloning and sequencing. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 4371–4378, 1991.

SEBAT, J.L.; COLWELL, S.F.; CRAWFORD, R.L. Metagenomic profiling: microarray analysis of an environmental genomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 4927-4934, 2003.

SILVEIRA, E.L.; PEREIRA, R.M.; SCAQUITTO, D.C.; PEDRINHO, E.A.N.; VAL-MORAES, S.P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 10, p. 1507-1516, 2006.

SORHEIM, R.; TORSVIK, V.L.; GOKSOYR, J. Phenotypical divergences between populations of soil bacteria isolated on different media. **Microbial Ecology**, New York, v. 17, p. 181-192, 1989.

STEIN, J.L., MARSH, T.L., WU, K.Y., SHIZUYA, H., DELONG, E.F. Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 591–599, 1996.

STREIT, W.; DANIEL, R.; JAEGER, K.E. Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 15, p. 285–290, 2004.

STROHL, W.R. **Industrial antibiotics: today and the future**. In: Strohl WR (ed) *Biothechnology of antibiotics*, 2nd edn. Marcel Dekker, New York, pp1-47, 1997.

TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; CANTALE, C.; DALMASTRI, C. Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. **Microbial Ecology**, New York, v. 40, p. 169-176, 2000.

TERZAGHI, E.; O'HARA, M. Microbial plasticity. The relevance to microbial ecology. **Advances in Microbial Ecology**, v.11, p.431-460, 1990.

TORSVIK, V.L.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 782-787, 1990a.

TORSVIK, V.L.; SALTE, K.; SORHEIM, R.; GOKSOYR, J. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 776-781, 1990b.

TYSON, G.W., CHAPMAN, J., HUGENHOLTZ, P., ALLEN, E.E., RAM, R.J., RICHARDSON, P.M., SOLOVYEV, V.V., RUBIN, E.M., ROKHSAR, D.S., BANFIELD, J.F. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. **Nature**, London, v. 428, p. 37-43, 2004.

VINING, L.C. Functions of Secondary Metabolites. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 395-42, 1990.

VOGET, S.; LEGGEWIE, C.; UESBECK, A.; RAASCH, C.; JAEGER, K.E.; STREIT, W.R. Prospecting for Novel Biocatalysts in a Soil Metagenome. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 10, p. 6235–6242, 2003.

WARD, N. New directions and interactions in metagenomics research. **FEMS Microbiology Ecology**, v.55, p.331–338, 2006.

WHITMAN, W. B. et al. Prokaryotes: The unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America**, Washington, v.95, p.6578-6583, 1998.

ZAEHNER, H., FIELDLER, H.P. The need for new antibiotics: possible ways forward, p 67-84. in N.J.Russel (ed). **Fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trends**. Cambridge University Press, Cambridge, England, 1995.

ZHOU, J. et al. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.316-322, 1996.