

Karen Cristina Massini

**Bioprospecção de Genes Biossintéticos de
Policetídeos em DNA Metagenômico
de Solo de Mata Atlântica**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutora em
Ciências (Microbiologia).

São Paulo

2009

Karen Cristina Massini

**Bioprospecção de Genes Biossintéticos de
Policetídeos em DNA Metagenômico
de Solo de Mata Atlântica**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutora em
Ciências (Microbiologia).

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Padilla

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Massini, Karen Cristina.

Bioprospecção de genes biossintéticos de policetídeos em DNA metagenômico de solo de Mata Atlântica / Karen Cristina Massini. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Gabriel Padilla.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Biologia Molecular de *Streptomyces*.

Versão do título para o inglês: Polyketide biosynthetic gene bioprospection in metagenomic DNA from Atlantic Forest soil .

Descritores: 1. Metagenoma 2. Policetídeos 3. Bioprospecção 4. Biodiversidade 5. Actinobactéria I. Padilla, Gabriel II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0190/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karen Cristina Massini.

Título da Tese: Bioprospecção de genes biossintéticos de policetídeos em DNA metagenômico de solo de Mata Atlântica.

Orientador(a): Gabriel Padilla.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Os primeiros passos de nossas vidas são amparados por
nossos pais e os passos seguintes por seus ensinamentos!

Dedico esta Tese à minha mãe e meu pai *in memoriam*
e a toda a minha família pelo apoio incondicional

Ao meu marido pelo incentivo
e apoio constante.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gabriel Padilla pela orientação, incentivo e amizade. Obrigada por contribuir para minha formação científica.

Aos amigos do Laboratório de *Streptomyces*, Juan, Fabiana, Erick, Márcia, Renata, Leonardo, pelo apoio para a realização deste trabalho, pelos bons momentos, enfim, pela amizade ao longo desses anos. A todos os amigos que passaram pelo laboratório e que tornaram esse tempo de pesquisa prazeroso e descontraído.

Aos Professores Luiziana e Gregório pelo auxílio e disponibilidade de seus laboratórios. A Lydía do Instituto de Química pelas análises cromatográficas.

Aos amigos do Laboratório de genética e Laboratório de fisiologia de bactéria pela amizade e conversas descontraídas no corredor e podem ter certeza que não esquecerei as festinhas (churrasco na casa do Juan).

Um agradecimento especial aos amigos, Kátia, Balan, Leandro, Andrés, Cristiane, Sileine, Charote, Carolina, Cleide, Sandra, Brian, pelo apoio, amizade e incentivo.

A todos os funcionários do setor de Genética e Microbiologia.

Aos funcionários da biblioteca pela revisão das normas deste trabalho.

As minhas amigas de longa data cuja amizade foi e sempre será fundamental.

Também agradeço à minha mãe Magda e meus irmãos, Luiz e Kátia, por me darem suporte e incentivo para realizar os meus sonhos. Aos meus queridos sobrinhos, Daniel, Gabriele, Guilherme e Adriana, que sempre torceram por mim. Ao meu maridão, Sandro, pela paciência e imenso carinho.

Obrigada por tudo!

“O papel dos infinitivamente pequenos é infinitivamente grande”

(Louis Paster)

RESUMO

Massini KC. Bioprospecção de genes biossintéticos de policetídeos em DNA metagenômico de solo de Mata Atlântica [Tese (doutorado)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

A Mata Atlântica brasileira é apontada como um dos mais importantes refúgios da biodiversidade em todo o planeta. Este bioma é extremamente importante sob o aspecto da riqueza de espécies vegetais e animais na sua composição e interações, porém ainda pouco conhecido e explorado sob o ponto de vista microbiológico. Um grama de solo pode conter cerca de 10 bilhões de micro-organismos de diferentes espécies. A maioria dos micro-organismos presentes nos solos não é de fácil cultivo em laboratório (somente 0.1-10% são recuperados), sendo necessária a utilização de novas técnicas para superar este problema. Muitos micro-organismos presentes no solo tem grande importância biotecnológica por produzirem compostos bioativos. O filo *Actinobacteria* é abundante em solos e de grande importância econômica, tendo em vista que a maioria dos antibióticos comercializados é produzido por membros deste grupo. Porém a biodiversidade microbiana da Mata Atlântica, bem como, o seu potencial biotecnológico não tem sido plenamente estudado. Poucos trabalhos mostram produtos do metabolismo microbiano com potencial em uso em indústrias e mostram menos ainda antimicrobianos produzidos por isolados bacterianos desta região. Dentro deste contexto, o presente trabalho buscou em duas alternativas metodológicas como a técnica independente de cultivo, o metagenoma, verificar a presença de genes de uma importante via biossintética os policetídeos sintases e com a técnica dependente de cultivo, selecionar prováveis bactérias produtoras de composto bioativos. O metagenoma propõe fazer uma análise do DNA total de amostras do solo, visando conhecer a informação gênica destes compostos na complexa diversidade microbiana. Desta forma, várias abordagens foram empregadas para conseguir um DNA de alto peso molecular e de qualidade suficiente para construir bibliotecas metagenômicas, e procurar nestas, genes das vias de síntese dos policetídeos (PKS) tipo I e tipo II, que ficam agrupados em clusters que variam de tamanho entre 20 a 100 kb. Foi otimizado um método de extração de DNA do solo e conseguimos obter um DNA de aproximadamente 50kb, que foi amplificado por PCR utilizando *primers* para regiões conservadas dos genes policetídeos sintases tipo I e II (acetosintase α) de Actinomicetos. Os fragmentos obtidos, PKS I e PKS II, com tamanho entre 600pb a 700pb, foram clonados, construído-se duas bibliotecas metagenômicas (KSI e KS II). Os clones foram sequenciados e analisados em uma árvore filogenética. A análise filogenética de genes policetídeos tipo I demonstrou similaridade com estes genes de diversas divisões de bactérias, revelando a presença de prováveis genes novos não apenas relacionados a via de PKS I, como também aos genes de PKS I híbridos com peptídeos não ribossomais. Em complemento a filogenia de policetídeos tipo II apresentou uma similaridade com genes de *Actinobacteria*, formando um grupo que também está relacionados a presença de prováveis genes novos de importantes famílias de antibióticos. Através do cultivo utilizando meio seletivo para o crescimento de bactérias “não cultivadas”, sete isolados foram selecionados para verificar quanto à produção de metabólitos secundários. Os isolados apresentaram atividade antibacteriana e/ou antifúngica.

Palavra-chave: Metagenoma; Bioprospecção; Policetídeos sintases; DNA do solo; *Actinobacteria*; Biodiversidade.

ABSTRACT

Massini KC. Polyketide biosynthetic gene bioprospection in metagenome DNA from Atlantic Forest [Ph. D. Thesis] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

The Brazilian Atlantic Forest is considered as one of the most important reservoir of biodiversity in the planet. This biome is extremely important for its richness of plant and animal species but although with their composition and interactions poorly known and unexplored from a microbiological perspective. One gram of soil can contain near 10 billion microorganisms of different species. The majority of the soil microorganisms is not cultivable in laboratory (only 0.1-10% are recovered), being necessary to use new techniques to overcome this problem. Many of the soil microorganisms are biotechnologically important for the production of bioactive compounds. The *Actinobacteria* phylum is abundant in soil and important economically due to the capacity of synthesize many antibiotics. Nevertheless, the Atlantic Forest microbial biodiversity has not been properly study. Few works show microbial metabolic products with potential use in industries and, still less, antimicrobials isolated from this biome. The present work searched two new methodological alternatives: one culture independent, the metagenome, to verify the presence of polyketide synthases biosynthetic genes; and the second, the culture dependent, to select potential bacteria producers of bioactive compounds. The metagenome intend the total DNA analysis of a sample, focusing in to know the genetic information of the complex microbial diversity. Several approaches were used in order to obtain DNA of high molecular weight and quality to construct metagenomic libraries and search for polyketide synthases (PKS) genes types I and II, that usually are organized in clusters of 30 to 100 kb. A DNA extraction method was optimized obtaining DNA of approximately 50 kb, and used for the detection of PKS genes by PCR approaches using primers based in polyketide synthases type I and II (ketosynthase α) conserved regions of Actinomycetes. The PKS I and PKSII amplicons (600-700 bp) were cloned and two metagenomic libraries were obtained (KS I and KS II). The clones were sequenced and analyzed in a phylogenetic tree. Phylogenetic analysis of PKS I genes reveled high similarities with genes of several divisions of bacterias pointing the presence of provable new genes related with the synthesis of polyketides produzrd by PKS I and hybrid PKS with non ribosomal peptides (NRPs). Polyketide type I genes showed similarity with *Streptomyces* and “uncultured bacteria”. The analysis of polyketide II genes showed high similarity with genes of *Actinobacteria* gruped in two main groups, one of them with possible new genes related with the production of important antibiotics. Using selective medium for “uncultured bacteria”, seven isolates were obtained being studied taxonomically and tested for the production of secondary metabolites with antibacterial and antifungal activities.

Keywords: Metagenome; Bioprospection; Polyketide synhtase; DNA soil; Actinobacteria; Biodiversity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Representação cartográfica da abrangência dos seis biomas continentais brasileiros _____	21
FIGURA 2. Representação esquemática de uma colônia de um actinomiceto _____	25
FIGURA 3. Vias do metabolismo secundário _____	27
FIGURA 4. Exemplos de estruturas dos metabólitos secundários policetídeos _____	31
FIGURA 5. Representação do cluster gênico da síntese da eritromicina (PKS I) _____	35
FIGURA 6. Via biossintética de produção do policetônico actinorodina em <i>Streptomyces coelicolor</i> _____	38
FIGURA 7. Organização do cluster biossintético PKS tipo II _____	39
FIGURE 8. Biossíntese PKS e FAS _____	42
FIGURA 9. Representação esquemática da relação filogenética entre FAS e PKS _____	43
FIGURA 10. Técnicas utilizadas para obter informação da biblioteca genômica gerada pelo metagenoma _____	45
FIGURA 11. Abordagens metodológicas utilizadas para analisar o dna metagenômico _____	47
FIGURA 12. Fluxograma das principais estratégias utilizadas no presente trabalho _____	51
FIGURA 13. Sequências e sítios de anelamento dos primers degenerados no cluster de PKS mínima para PKS tipo II de <i>Streptomyces</i> _____	57
FIGURA 14. Produção diária de CO ₂ na amostra de solo armazenada a - 20°C _____	65
FIGURA 15. Extração e amplificação por pcr do dna ambiental _____	67
FIGURA 16. Amplificação do DNA metagenômico pela técnica de PCR com primers para PKS I e PKS II _____	70
FIGURA 17. Análise filogenética das sequências dos genes de PKS tipo I _____	73
FIGURA 18. Primeiro grupo (a) da árvore filogenética (actinobactéria) _____	74
FIGURA 19. Subgrupo do segundo agrupamento (b) da árvore filogenética _____	76
FIGURA 20. Subgrupo do segundo agrupamento (b) da árvore filogenética _____	77
FIGURA 21. Subgrupo (b) da árvore filogenética _____	79
FIGURA 22. Análise filogenética das sequências dos genes de PKS tipo II _____	82
FIGURA 23. Antagonismo das bactérias isoladas do solo. _____	89
FIGURA 24. Análise do extrato intracelular do isolado IS-A por CLAE _____	92
FIGURA 25. Análise do extrato extracelular do isolado IS-A por CLAE _____	93

FIGURA 26. Análise do extrato do isolado IS-O extracelular _____	94
FIGURA 27. Análise do extrato intracelular do isolado IS-O _____	95
FIGURA 28. Espectro de massas no modo “electrospray” positivo referente ao pico em 17,82 min do CLAE da figura (a figura do HPLC) do isolado IS-A extracelular. _____	96
FIGURA 29. Espectro de massas no modo “electrospray” positivo do composto eluído em 26,10 min no CLAE da isolado IS-A intracelular. _____	97
FIGURA 24. Amplificação do gene 16S rDNA dos isolados do solo. _____	98

QUADRO 1. Alinhamento parcial do gene cetosintase do clone KSI-6. _____	75
QUADRO 2. Alinhamento entre o clone KSI-8 e os genes cetosintase de <i>S.cellulosum</i> . _____	76
QUADRO 3. Alinhamento do gene cetosintase do clone KSI-5 com <i>N. Puntiforme</i> _____	77
QUADRO 4. Alinhamento do gene cetosintase do clone KSI-7 _____	80
QUADRO 5. Alinhamento do gene cetosintase dos clones KSI-24 e KSI-25 com o gene <i>nosB</i> de <i>Nostoc sp.</i> _____	80
QUADRO 6. Anotação do clone 7.5 com indicação da homologia ao gene <i>cosB</i> _____	84
QUADRO 7. Alinhamento do clone KB 5.4 com a sequência referência. _____	84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Análise de genomas por filo _____	
TABELA 2. Identificação de genes utilizando diversas técnicas de metagenoma _____	48
TABELA 3. Métodos utilizados para extração e purificação de DNA de solo de Mata Atlântica _____	53
TABELA 4. Sequências dos primers degenerados utilizados para a amplificação do gene KS de PKS tipo I _____	56
TABELA 5. Sequências dos primers degenerados utilizados para a amplificação do gene KS α de PKS tipo II _____	57
TABELA 6. Microorganismos utilizados como controle para as amplificações de genes biossintéticos de policetônicos PKS I e PKS II _____	57
TABELA 7. Formulação do caldo R5 modificado _____	61
TABELA 8. Número provável de propágulos por grama de solo. _____	65
TABELA 9. Análise da biodiversidade das sequências de proteínas correspondentes aos genes PKS I _____	72
TABELA 10. Similaridade dos clones obtidos com o banco de dados Genbank _____	81
TABELA 11. Teste de suscetibilidade dos isolados do solo aos agentes antimicrobianos _____	87
TABELA 12. Teste bioquímico dos isolados do solo. _____	87
TABELA 13. Inibição do crescimento de micro-organismos testes _____	88
TABELA 14. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos intracelular dos isolados do solo _____	90
TABELA 15. Medidas das frações (Rfs) dos extratos visualizados em lâmpada U.V _____	91

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ACP - proteína carregadora do grupo acil

AT - acil transferase

BAC - cromossomo artificial bacteriano

DH - desidratase

ER - enoil redutase

FAS - sintase de ácidos graxos

MT - metiltransferase

NAD - dinucleotídeos adenina nicotinamida

NCBI – *National Center of Biotechnology Information*

NRPS - sintase de policetídeo não ribossomal

ORF - *open reading frame*

KS - cetosintase

KS α - cetosintase subunidade α

KS β - cetosintase subunidade β

PKS - policetídeo sintase

TE - tioesterase

SUMÁRIO

1 Introdução	14
2 Revisão Bibliográfica	19
2.1 Diversidade Microbiana do Solo	19
2.2 Metabolismo Microbiano e Vias Metabólicas	26
2.2.1 Vias Biossintéticas dos Policetídeos	30
2.2.2 Evolução dos genes PKS.....	41
2.2.3 Prospecção Biotecnológica do Metagenoma	44
3 Objetivo	50
4 Delineamento Experimental	51
5 Material e Métodos	52
5.1 Amostra de solo	52
5.2 Extração de DNA total das amostras de solo.....	52
5.3 Amplificação dos fragmentos de DNA do solo com primers para o gene que codifica para cetosintase das vias de PKS tipo I e tipo II	55
5.4 Construção da biblioteca metagenômica pKS I e PKS II	58
5.5 Sequenciamento e análise filogenética dos genes PKS I e PKS II.....	59
5.6 Isolamento de Bactérias do Solo.....	59
5.6.1 Extração de Metabólitos Intracelular e Extracelular das Bactérias Isoladas do solo	60
5.6.2 Ensaio de Antibiograma Utilizando os Extratos Metabólicos das Bactérias do Solo	62
5.6.3 Ensaio de Antagonismo com as bactérias isoladas do solo.....	62
5.6.4 Análise dos extratos brutos em CCD	63
5.6.5 Análise dos extratos por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência).....	63

5.6.6 Análise dos extratos por CLAE/EM (Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas)	63
5.6.7 Análise molecular das bactérias do solo através do gene rDNA 16S	64
6 Resultados e Discussão	65
6.1 Análise Independente de Cltivo: bioprospecção.....	65
6.2.1 Isolamento de bactérias do solo.....	86
6.2.2 Identificação dos isolados do solo	97
7 Perspectivas.....	100
8 Conclusões.....	101
Referências Bibliográficas	102

1 Introdução

A diversificação ambiental na Mata Atlântica propiciou uma evolução de um complexo biótico de natureza vegetal e animal altamente rico. É por isso que este bioma é considerado um dos mais ricos em termos de diversidade biológica do Planeta, porém pouco explorado. Devido seu alto nível de endemismo das espécies e a constante redução de habitats foi considerada um dos prioritários “hotspots” para a conservação da biodiversidade mundial (Myers *et al.*, 2000). Muitos micro-organismos presentes no solo tem grande importância biotecnológica por produzirem compostos bioativos. A biodiversidade microbiana do solo mesmo sendo pouco conhecida é responsável pela produção de centenas de substâncias como enzimas, antibióticos, entre outros. Tornando-se cada vez maior o interesse por micro-organismos como fonte potencial na produção desses compostos naturais. A dificuldade encontrada em estudar a diversidade em ambientes como o solo está no cultivo destes micro-organismos. Desde os primeiros processos de isolamento de micro-organismos do solo no início do século XX, têm-se desenvolvido novas técnicas genéticas para a identificação da comunidade microbiana. Somente, de 0,1 a 10% dos micro-organismos do solo, são recuperados e cultivados em laboratório (Torsviki, 1980). Isto pode ser explicado pela presença de espécies ainda não conhecidas no ambiente, para as quais as condições de cultivo aplicadas não são adequadas, também pela presença de organismos que entraram num estado metabólico e fisiológico não-cultivável, ou ainda pela diferença no ciclo de vida dos componentes de um bioma específico. Assim, a escolha do meio de cultura é uma etapa crítica nas avaliações quantitativas, visto que somente parte das populações é contabilizada em função da diversidade nutricional apresentada pelos micro-organismos. Têm sido estabelecidos diversos protocolos para cultivo de micro-organismos “não-cultiváveis” muitos deles com sucesso, mas de qualquer forma não conseguem acessar a extensa biodiversidade. Várias técnicas genéticas tem sido aprimoradas para permitir o acesso a estes micro-organismos não-cultiváveis, através da extração do DNA total de amostras do solo. Desta forma, é possível realizar estudos das alterações da comunidade microbiana num meio ambiente específico. Também, realizar agrupamentos taxonômicos baseados na filogenia que permitem identificar genes funcionais específicos e, podem fornecer respostas sobre questões, como por exemplo, os mecanismos de conjugação, transformação e transdução; e

principalmente, permitem a identificação de genes importantes para a síntese de novos compostos bioativos.

Apesar do pouco conhecimento existente sobre a biodiversidade do solo, a produção industrial de importantes antibióticos como as tetraciclina, eritromicina, vancomicina, cefalosporinas, rifamicinas e diferentes β -lactâmicos a partir de micro-organismos do solo é bem desenvolvida (Osborne *et al.*, 2000). Motivo pelo qual, faz com que o solo seja apontado ainda como o mais promissor ambiente para estudos de bioprospecção (Lorenz *et al.*, 2002). Contudo, o número de linhagens utilizadas em biotecnologia e o número de produtos naturais bioativos microbianos obtidos são relativamente limitados. Nas últimas décadas devido ao uso irracional de medicamentos (antibacterianos e/ou antifúngicos) tem levado ao aumento de cepas microbianas multiresistentes, estimulando novas pesquisas na descoberta de novos fármacos. Dentre os compostos do metabolismo secundários, presentes em organismos procariontes e eucariontes, a classe dos policetídeos tem-se destacado pela sua ampla atividade biológica, sendo um dos alvos preferenciais para estudo de bioprospecção.

O metagenoma é uma técnica independente de cultivo que tem se destacado como uma alternativa viável e inovadora em estudos de bioprospecção de ambientes como os solos para a triagem de genes biossintéticos importantes. Esta técnica consiste na construção e seleção de bibliotecas de DNA ambiental, possibilitando o acesso mais global aos micro-organismos presentes no ambiente contribuindo, assim, para a pesquisa de novas moléculas bioativas para utilização industrial, médica e ambiental (Rondon *et al.*, 2000; Lämle *et al.*, 2006). Esta técnica pode ser utilizada para analisar de genomas coletivos em diversos ambientes (Kim *et al.*, 2008; Purohit e Singh, 2009).

Podemos verificar na literatura, que a biodiversidade de genes relacionados às vias biossintéticas em especial à dos policetídeos sintases, são em geral pobremente amostrados em estudos que utilizam métodos independentes de cultivo utilizando como amostra solo de região com clima tropical. Essa abordagem metodológica juntamente com as ferramentas de bioinformática e biologia molecular permite a prospecção *in silico* de informações a partir de dados genômicos em bases de dados e a análise de micro-organismos sem a necessidade de isolamento e cultivo a partir da clonagem direta de DNA de amostras ambientais. Com isso, é possível a caracterização e descoberta de novos genes, enzimas, metabólitos bioativos e fármacos associados à rica diversidade de organismos ainda não-cultivados, bem como, o desenvolvimento de novas estratégias de seleção de novos produtos alvos e ensaios a partir do conhecimento da genômica e expressão gênica de organismos diversos.

Devido à estrutura dos domínios das enzimas policetídeos sintases que consistem de um ou mais polipeptídeos com multidomínios com seus respectivos sítios ativos, o qual dependendo da natureza dos constituintes destes sítios catalíticos, estas megasintases geram uma variedade e complexidade de estruturas químicas. Considerando-se a grande diversidade estrutural destes compostos na natureza, podemos esperar que a diversidade destas enzimas seja significativa. O nosso maior interesse é estudar a presença de novos genes correspondente a essas vias que geram uma diversidade de produtos de interesse biotecnológico, utilizando a técnica independente de cultivo, o metagenoma. No presente estudo utilizamos esta técnica para verificar a biodiversidade de genes catabólicos ativos no metabolismo secundário dos micro-organismos como uma estratégia para identificação de novas sequências em amostras ambientais, contribuindo para o conhecimento a cerca da diversidade de genes importantes para a produção de compostos naturais em solo de Mata Atlântica. Para se obter o DNA metagenômico os protocolos para a extração e amplificação do DNA ambiental foram otimizados e conseguimos obter um DNA com alto peso molecular. Desta forma, foi realizada uma análise do DNA ambiental pela técnica do PCR utilizando *primers* para regiões conservadas de genes já caracterizados. Estes genes codificam para regiões complementares as enzimas policetídeos sintases ($KS\alpha$) da via dos policetídeos do tipo I e II. Os fragmentos amplificados para os genes que codificam para as enzimas policetídeos sintases tipo I e II foram clonados gerando duas bibliotecas metagenômicas. Alguns clones tiveram suas sequências analisadas em relação às sequências depositadas no Genbank para formação da árvore filogenética. O emprego de *primers* degenerados para o estudo da diversidade de genes catabólicos foi eficiente, revelando a presença de diversos genes de interesse biotecnológico evidenciando que estudos de diversidade em ambiente como o solo pode contribuir e muito na busca de novos produtores de compostos bioativos.

Devido à elevada diversidade da microbiota do solo somados aos nossos estudos sobre a diversidade de genes que codificam às policetídeos sintases buscou-se isolar micro-organismos com potencial de produzir esses compostos. Para este objetivo utilizamos algumas técnicas que visam à seleção de organismos ainda não identificados resultando na identificação de sete bactérias potenciais produtoras de compostos bioativos devido sua atividade antifúngica e/ou antibacteriana. Neste sentido buscamos estudar os genes metabólicos para a via de síntese dos policetídeos tanto em espécies isoladas do solo como no DNA ambiental extraído do solo de Mata Atlântica.

O diversificado número de espécies bacterianas presentes no solo, que sintetizam antibióticos policetídeos, aliado ao pouco que se conhece sobre a microbiota real do solo, por si já justifica esse trabalho. Os genes de policetídeos sintases I e II descobertos neste trabalho abrem perspectivas para buscar os *clusters* gênicos numa biblioteca metagênômica em BAC. Esses genes podem ser utilizados como sondas moleculares para hibridar na biblioteca e, assim, elucidar a via biossintética para compreensão do mecanismo de síntese dos policetídeos, bem como, produção de novos compostos através de técnicas como, por exemplo, a biossíntese combinatorial.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Diversidade Microbiana do Solo

O solo é um ecossistema complexo e, do ponto de vista físico, é composto de material mineral (argila, sílica e areia), poros cheios de ar ou água e matéria orgânica (ácidos húmicos, ligninas, hemicelulose e celulose, amido, pectina, lignina, lipídeos, etc.). Este é um componente ativo importante delimitado por três frações: a primeira, um componente macroscópico composto de restos de plantas e animais em diferentes estágios de decomposição; a segunda reúne vários compostos orgânicos como, proteínas, carboidratos e aminoácidos, derivados de resíduos de vegetais e animais; a terceira compreende um material escuro, um composto aromático e polimérico, denominado húmus, relativamente resistente à degradação (Melo e Azevedo, 1997). O solo é amplamente habitado por populações microscópicas de bactérias, fungos, protozoários, algas e populações macroscópicas, tais como, anelídeos e artrópodes formando uma complexa teia de comunidade alimentar. A microbiota do solo tem um papel importante nos processos de nitrificação, desnitrificação e mineralização do carbono. Nos processos de reciclagem os fungos são efetivos, tendo a capacidade de degradar polissacarídeos, tais como celulose, hemicelulose, lignina, amina, quitina e glicogênio. Por outro lado, as bactérias são efetivas na degradação de produtos solúveis (Racke, 1990). Em termos de fluxo energético os micro-organismos são os principais responsáveis pela mineralização dos nutrientes, cerca de 90%, tornando-os disponíveis na solução do solo (Lavelle, 2000).

Stenberg (1999) enfatiza que nenhum indicador individual pode quantificar e descrever todos os aspectos da qualidade do solo, já que deve haver uma relação entre todos os seus atributos. Assim, um número mínimo de indicadores deve ser selecionado. Os critérios para a seleção de indicadores relacionam-se com a sua utilidade em definir os processos do ecossistema. Estes integram as propriedades físicas, químicas e biológicas, além dos fatores como poluição, manejo e variação climática. Estas variações podem contribuir para o decréscimo da diversidade microbiana, devido à extinção de espécies não adaptadas ao

estresse imposto. Entretanto, pode favorecer o aumento de uma espécie particular mais adaptada a esse estresse. Desta forma, a diversidade microbiana tem figurado como um importante indicador da qualidade do solo. Em um agroecossistema com alto teor de matéria orgânica tende a manter sua população microbiana mais estável ao longo do ano, provavelmente pela riqueza de nichos ecológicos e pela heterogeneidade das fontes de carbono (Grayston *et al.*, 2001).

A biodiversidade do solo pode ser definida como abundância da vida, indicada pela variedade da biota e inter-parentesco dos processos bioquímicos do solo. O estudo da diversidade microbiológica do solo pode auxiliar na identificação de alterações ambientais associadas a distúrbios, pela ação antrópica, além de contribuir para a compreensão sobre os recursos genéticos disponíveis, sua distribuição sobre a Terra e aumentar o nosso conhecimento sobre o papel funcional dessa diversidade (Kennedy e Smith, 1995).

O bioma continental brasileiro de maior extensão, a Amazônia, e o de menor extensão, o Pantanal, ocupam juntos mais de metade do Brasil: o Bioma Amazônia, com 49,29%, e o Bioma Pantanal, com 1,76% do território brasileiro. Mapeados pela primeira vez, os seis biomas continentais brasileiros - Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa - são apresentados no Mapa de Biomas do Brasil (mapa revisado em 2003), resultado da parceria entre o IBGE e o Ministério do Meio Ambiente (MMA) (Figura 1).

No país ocorrem dois grandes conjuntos vegetacionais: um florestal, que ocupa mais de 60% do território nacional, e outro campestre. As formações florestais são constituídas: 1) Florestas Ombrófilas (em que não falta umidade durante o ano) que abrangem as matas pluviais montanas, submontanas, de baixada e Florestas Costeiras em terras baixas e solos arenosos; 2) as Florestas Ombrófilas Mistas, que correspondem às matas sulinas com predominâncias de araucárias e lauráceas; e 3) as Florestas Estacionais e Semidecíduas, que abrangem as matas subtropicais dos estados do Sul e as matas decíduas do Nordeste (em que falta umidade num período do ano) situadas tanto na região amazônica quanto nas áreas extra-amazônicas, mais precisamente na Mata Atlântica. Na Mata Atlântica predominam as Florestas Estacionais Semidecíduas (em que 20 a 50 % das árvores perdem as folhas no período seco do ano), e as Florestas Ombrófilas densas e mistas (com araucária). Em ambos os conjuntos florestais ocorrem, em menor proporção, as florestas estacionais decíduas (em que mais de 50% das árvores perdem folhas no período seco). As temperaturas médias variam de 14-21 °C, chegando a uma temperatura máxima de 35 °C e mínima de 1 °C

embora, no Sul, possa cair até $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Atualmente restam apenas cerca de 7% da cobertura original da floresta da Mata Atlântica, tendo sido inclusive identificada como a quinta área mais ameaçada e rica em espécies endêmicas do mundo (Câmara, 2005). A Serra do Mar abriga os principais remanescentes da Mata Atlântica que recobre a costa leste brasileira, desde o Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul.

A Mata Atlântica brasileira é um dos 25 centros de biodiversidade reconhecido no mundo. Estes centros são áreas que perderam pelo menos 70% de sua cobertura vegetal original, mas que, juntas, abrigam mais de 60% de todas as espécies terrestres do planeta (Myers *et al.*, 2000).

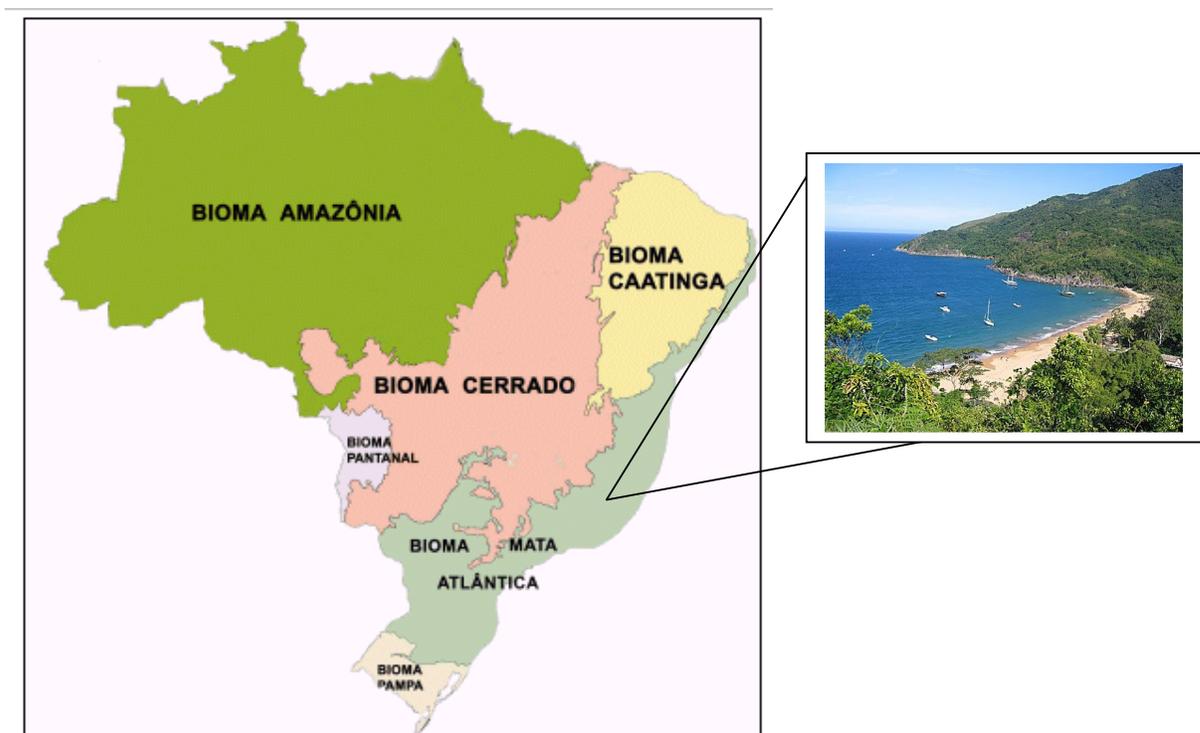


Figura 1. Representação cartográfica da abrangência dos seis biomas continentais brasileiros (Fonte: www.ibge.gov.br). A foto ao lado evidencia a região de Ilha Bela município de São Sebastião, estado de São Paulo, local da coleta para o estudo de bioprospecção.

Segundo dados do IBAMA (<http://www.ibama.gov.br/>) na Mata Atlântica existem 1.361 espécies da fauna brasileira, com 261 espécies de mamíferos, 620 de aves, 200 de répteis e 280 de anfíbios, sendo que 567 espécies só ocorrem nesse bioma. Possui, ainda, cerca de 20 mil espécies de plantas vasculares, das quais 8 mil delas só ocorrem na Mata Atlântica. No sul da Bahia foi identificada a maior diversidade de plantas lenhosas do

mundo, sendo registradas 454 espécies em um único hectare. Já o Ministério do Meio Ambiente relaciona 20 mil espécies de plantas, 250 de mamíferos, 1020 de aves, 197 de répteis e 340 de anfíbios. Quanto aos invertebrados já foram catalogadas mais de 990.000 espécies. O que esses dados apresentam em comum é uma lacuna em relação à biodiversidade microbiológica presente na Mata Atlântica. As bactérias e Arqueas representam dois terços da vida no planeta e, no entanto, menos de 1% das espécies são conhecidas. Grande parte desta diversidade está nas comunidades microbianas do solo que até pouco tempo atrás eram inacessíveis aos pesquisadores.

O solo sustenta uma diversidade de micro-organismos que ainda não foi totalmente explorada. Estimativas apontam que em apenas uma única grama de solo existam de 2000 a 8,3 milhões de bactérias (Gans *et al.*, 2005; Schloss & Handelsman, 2006), sendo que uma parcela significativa corresponde a bactérias não cultivadas. Até recentemente, a detecção e identificação de micro-organismos em amostras ambientais era baseada em técnicas de plaqueamento e cultivo em meios seletivos e/ou não-seletivos e, métodos de observação direta em microscópio (Torvisk *et al.*, 2002). Os micro-organismos que conseguem crescer em meios artificiais não são necessariamente metabólica ou numericamente dominantes no meio natural de onde foram retirados, havendo uma forte seleção em função da habilidade dos micro-organismos em se desenvolverem em meios com altas concentrações de nutrientes e geralmente em condições aeróbias (Hugenholtz, 2002; Myuzer e Ramsing, 1995). Entretanto, considerando-se que todos os meios de culturas são seletivos para os diversos grupos de micro-organismos e que nem todos podem ser recuperados do ambiente, as contagens de células viáveis raramente são quantitativas e representativas da diversidade de organismos em uma amostra. No caso de comunidades microbianas que degradam compostos tóxicos e xenobióticos, as interações físicas e químicas entre as espécies podem levar ao estabelecimento de comunidades microbianas mistas estáveis, representando uma variedade de habilidades catabólicas interdependentes. Neste contexto, tornam-se evidentes as limitações impostas pelos estudos de culturas puras em cultivo de laboratório. Métodos para contagem direta de células ao microscópio não dependem do cultivo de micro-organismos e, conseqüentemente, são mais adequados para uma análise quantitativa de comunidades microbianas em amostras ambientais. Por outro lado, estes métodos são pouco discriminatórios e, portanto, não são adequados para o estudo da estrutura e distribuição de populações ou comunidades microbianas (Pickup, 1991).

A complexidade genômica que é recuperada por técnicas de cultura no laboratório é

inferior a 40 genomas (Torsvik e Ovreas, 2002). Isto representa uma informação incompleta em relação à complexidade genômica da biota no solo, não fornecendo detalhes sobre a variabilidade funcional e diversidade taxonômica.

Os micro-organismos tem evoluído a 4 bilhões de anos e em virtude a essa trajetória evolutiva e da necessidade de adaptação aos mais distintos ambientes, acumularam uma impressionante diversidade genética, que excede, em muito, a diversidade de organismos eucarióticos (Ward, 1998).

Uma nova perspectiva surgiu com o advento da biologia molecular, que tem permitido interpretar mais facilmente a diversidade estrutural e funcional dos micro-organismos nos solos. Vários métodos têm surgido para caracterizar a comunidade microbiana, incluindo os micro-organismos não-cultiváveis, produzindo sequências de novas linhagens filogenéticas, através da utilização do DNA genômico extraído diretamente de amostras ambientais.

A diversidade microbiana estrutural vem atualmente sendo estudada através de métodos que se baseiam na investigação de parte da sequência do DNA ambiental, notadamente o gene 16S rDNA (assinaturas moleculares) em bactérias, e 18S rDNA para fungos, que é amplificado por PCR e posteriormente caracterizado através da clonagem e sequenciamento ou então analisado por eletroforese, por meio das técnicas de Ardra, T-RFLP, RAPD, RISA, DGGE/TGGE e SSCP, obtendo-se um perfil da comunidade microbiana. Este tipo de análise tem-se tornado muito popular para auxiliar a identificação de bactérias nãoconhecidas (Elsas e Smalla, 1995; Derakshani *et al.*, 2001; Torsvik e Ovreas, 2002). O gene rDNA 16S é rotineiramente aplicado, por ser uma molécula com propriedades adequadas, uma vez que: (i) está presente em todas as bactérias, (ii) apresenta tanto regiões conservadas, como regiões variáveis, o que torna possível o desenho de *primers* e sondas com diferentes níveis de especificidade, (iii) sua sequência tem informação suficiente para realização de análises de inferência filogenética, e (iv) um grande número de sequências já se encontram disponíveis em bases de dados de livre acesso (Muyzer, 2000).

Os solos de florestas tropicais possuem ecossistemas riquíssimos e exploráveis em termos de diversidade devido à rica e complexa interação entre o meio ambiente, fauna, flora e microbita. Conseqüentemente, a diversidade de genomas proCarióticos em solos de floresta, estimada ao redor de 6.000 genomas por cm^3 , é maior que a observada em solos utilizados para fins agrícolas, estimada entre 140-350 genomas cm^{-3} , ou para pastagens, entre 3500-8800 genomas cm^{-3} (Ovreas e Torsvik, 1998; Torvisk, *et al.*, 1998).

A Mata Atlântica brasileira possui uma grande diversidade, juntamente com as florestas Amazônica e Cerrado, mas dados sobre a biodiversidade presente na Mata Atlântica são preliminares e para poucos grupos microbianos (Moreira *et al.*, 1993; Attili, 1994). A maioria dos estudos sobre a diversidade tem sido em solo de pastagens, agricultura (Duineveld *et al.*, 2001; LaMontagne *et al.*, 2003; Diallo *et al.*, 2004) e em solos de florestas temperadas (Axelrood *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2002; Hackl *et al.*, 2004) e poucos são os estudos que caracterizaram a diversidade de bactérias de solos de florestas tropicais. Estudos recentes tem identificado a microbiota de solo de Mata Atlântica, utilizando a técnica de sequenciamento de genes 16S rDNA, verificando a predominância dos seguintes táxons: *Streptomyces* sp. (26,5 %); *Bacillus* sp. (10,3 %), *Brevibacillus* sp. e *B. pumilus* (8,8 % cada um); *Paenibacillus* sp. (7,35 %); *S. venezuelae* e *S. viridobrunneus* (5,9 %); e *B. agri* e *P. larvae* (4,4 %), Alfa-Proteobacteria (4,4 %); Acidobacteria (2,95 %), Gama-Proteobacteria (1,5 % cada) e bactérias não-cultivadas e não-classificadas (7,35 %) (Andrielle, 2008). A abundância de espécies como *Streptomyces* e *Bacillus*, e outras bactérias Gram-positivas relacionadas, tal como *Paenibacillus* e *Brevibacillus*, tem como nicho ecológico principal os solos (Madigan *et al.*, 2004). Neste ambiente desempenham atividades metabólicas fundamentais, incluindo a degradação e reciclagem de matéria orgânica, pois ambos os gêneros são saprófitos e liberam enzimas extracelulares para a degradação de compostos orgânicos presentes neste ambiente. Sendo esperado encontrar esses gêneros em ambientes como florestas naturais (Andrielle, 2008).

A versatilidade bioquímica e diversidade de bactérias representam uma enorme variedade de genes que são ainda desconhecidos. Muitas funções gênicas estão sendo descobertas, particularmente, para remediação ambiental e propósitos industriais. Assim, o uso de bactérias abre diversas áreas de exploração biotecnológicas, que dita à necessidade em tentar isolar novas linhagens ou espécies microbianas do solo, bem como, estudar seu metabolismo.

Os produtos naturais são responsáveis direta ou indiretamente, por cerca de 40% de todos os fármacos disponíveis na terapêutica moderna (Calixto, 2001)

O gênero *Streptomyces*, abundante em solos, tem merecido destaque em estudos de bioprospecção, devido a sua versatilidade na produção de diversos produtos naturais de ampla atividade biológica. São bactérias Gram-positivas filamentosas que formam pseudo-micélios e apresentam um ciclo de vida complexo (Hodgson, 2000). São bactérias que podem desenvolver micélio superficial e submerso, por vezes fragmentável, com hifas de 0,5 a 2,0

µm de diâmetro, fato que as levou a serem inicialmente classificadas como fungos. Muitas apresentam ainda a formação de esporos aéreos, conídios, dispostos em cadeia ou em esporângios (Figura 2). A natureza pleomórfica destas bactérias também contribui para a manutenção da estrutura dos solos, assim como, ocorre com as hifas de fungos. De fato, a capacidade de suprimir o crescimento de outros micro-organismos, pela produção de metabólitos secundários, é uma grande vantagem para a sobrevivência destas espécies nos solos, em virtude da extrema competição por recursos limitados que ocorrem em decorrência da abundância de micro-organismos neste ambiente (Osburne *et al.*, 2000). Ainda, diferentes compostos orgânicos presentes nos solos são degradados por *Streptomyces*, incluindo lignina, compostos húmicos, queratina, pectina e amido (Hodgson, 2000; Madigan *et al.*, 2004).

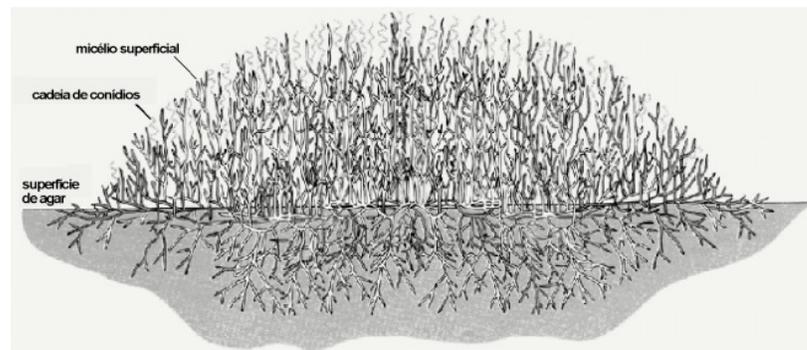


Figura 2. Representação esquemática de uma colônia de um Actinomiceto na qual se evidenciam: o micélio submerso, o micélio superficial e as cadeias de conídios.

Outro gênero de bactéria como os *Bacillus* também são efetivos na produção de uma ampla variedade de antimicrobianos não se restringindo apenas a produção de enzimas (amido, celulose, hemicelulose e xilana) (Yilmaz *et al.*, 2006). A família pseudomonadaceae produz diversos compostos bioativos, como por exemplo, o antibiótico ferrazina (Campbell, *et al.*, 1993).

Dentre os compostos do metabolismo secundários, presentes em organismos procarótiocs e eucarióticos, a classe dos policetídeos tem-se destacado pela diversidade de moléculas com ampla atividade biológica. O processo de busca e descoberta de produtos naturais a partir de micro-organismos vem sofrendo alterações nos modelos desencadeados pelos avanços da biologia molecular, genômica, metagenômica e bioinformática (Bull, 2000).

A exploração da diversidade metabólica, fisiológica e genética dos micro-organismos, resultou, nos últimos 50 anos, numa ampla gama de compostos bioativos de aplicação na medicina, indústria e agricultura (Rondon *et al.*, 1999; Gillespie *et al.*, 2002; Rodriguez-

Valera, 2004).

A busca pela biodiversidade e bioprospecção de novos micro-organismos tornou-se um dos principais focos da era biotecnológica, onde a utilização destes organismos na busca de soluções vem crescendo, não apenas pela sua extraordinária capacidade em produzir uma grande variedade de metabólitos, mas também pela sua adaptabilidade genética.

2.2 Metabolismo Microbiano e Vias Metabólicas

As atividades metabólicas associadas ao crescimento celular compõem o metabolismo primário, onde os metabólitos produzidos são principalmente enzimas, ácidos orgânicos, etanol, entre outros. No, entanto, a síntese de metabólitos secundários, não essenciais ao crescimento celular, é produzida no final ou durante a fase estacionária podendo ser sintetizado via ribossomal ou não-ribossomal (Kleinkauf e Von Döhren, 1996).

A diversidade microbiana do solo permite fazer uma ampla análise de vários genes (metagenoma) de diversas vias do metabolismo secundário, importantes, envolvidas na produção de compostos bioativos. Os metabólitos secundários são sintetizados por micro-organismos e plantas, através de uma via complexa com múltiplos passos, envolvendo reações enzimáticas e não enzimáticas (Figura 3). Nos micro-organismos, a capacidade de produzir metabólitos secundários está relacionada com a taxa de crescimento vegetativo (formação de conídios e esporos). A taxa máxima de produção de antibióticos e outros metabólitos secundários (pigmentos, alcalóides, micotoxinas, inibidores de enzimas e outros) tem sido observada, quando há uma diminuição de quantidades de nutrientes no meio, e quando ocorre uma invasão ou defesa. Este fenômeno foi chamado de “regulação catabólica” (Demain, 1992). Isto pode ser uma reação fase-dependente na biossíntese de muitas drogas.

Uma variedade de condições estressantes no meio ambiente pode contribuir para a produção de metabólitos secundários, como: temperatura, pH, radiação e concentração de oxigênio. Durante o processo de adaptação, devido à falta de nutriente no meio, ocorre a produção de metabólitos e conseqüentemente acúmulos de intermediários metabólitos (precursores) que induzem a produção de drogas (Demain, 1992). Os precursores em excesso, podem ser excretados para o meio ou convertidos em produtos que são metabolizados.

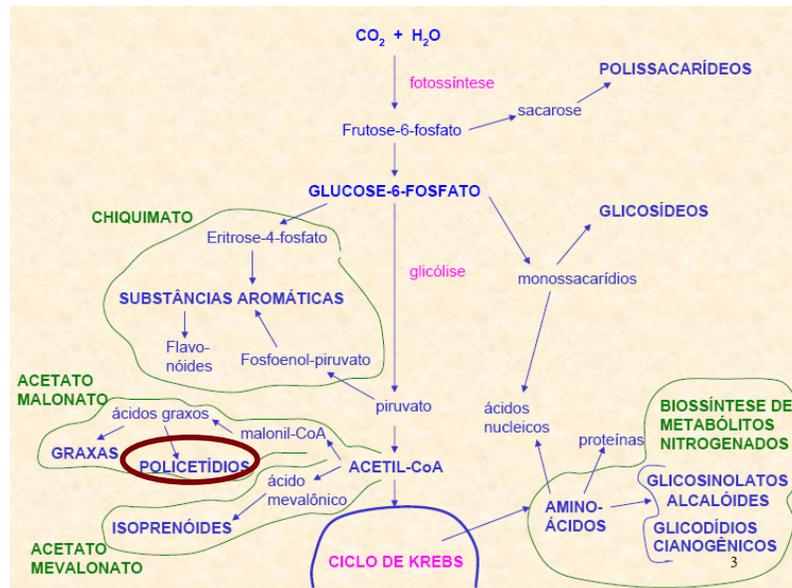


Figura 3. Vias do Metabolismo Secundário.

A produção de metabólitos tem muitas funções exógenas e endógenas, como: (i) proteção contra organismos competidores; (ii) regulação nos processos de comensalismo, simbiose e antagonismo; (iii) proteção contra radiações nocivas (luz ultravioleta); (iv) detoxificação; (v) regulação endógena de sinais para a morfogênese e transferência de material genético; (vi) formação de um biosistema como sinalização interespecífica entre micro-organismos, plantas e animais; (vii) fornece material para a construção da parede celular; (viii) produção de feromônios; (ix) fornece suplemento de reserva que não está acessível para outros micro-organismos; (x) produção de compostos inibidores do crescimento de organismos competidores (Kleinkauf e Döhren, 1997).

A biossíntese dos metabólitos secundários envolve uma interação entre atividade enzimática e formação de proteínas complexas (Von Döhren *et al.*, 1997). A estrutura das enzimas envolvidas na biossíntese desses metabólitos é caracterizada pelo arranjo modular, encontrando-se de forma correspondente, blocos de sequências repetidas nos genes que as codificam (Etchegaray *et al.*, 2004).

Os genes responsáveis pela biossíntese de antibióticos encontram-se agrupados em “clusters” (agrupamento gênico), que ocupam entre 15 a 100 kb, nesta região gênica encontram-se também os genes reguladores e de resistência ao antibiótico (Hutchinson, 1998). São conhecidos apenas dois antibióticos que possuem genes biossintéticos que não estão localizados no cromossomo e, sim em plasmídeos, são eles: metilomicina (Kinashi, 1987) e lancacidina (Hayakawa, 1979).

Os fatores de transcrição, codificados por genes que não estão presentes no cluster biossintético, podem regular a produção de metabólitos secundários. Esses genes regulam múltiplos processos biológicos e geralmente respondem a estímulos ambientais, como pH, temperatura e nutrição, como por exemplo, o AreA um regulador do metabolismo de nitrogênio que auxilia na produção de fumonisinas B1 em *Fusarium verticillioides* (Kim *et al.*, 2008).

O metabolismo secundário torna-se interessante devido à produção de uma variedade de compostos de interesse comercial (antibiótico, antifúngicos, imunossupressores, antitumorais, inibidores de enzimas, toxinas, pigmentos, entre outros) os quais são moléculas orgânicas complexas produzidas por uma cadeia de reação enzimática.

O significado biológico da produção de antibióticos e seu mecanismo de expressão gênica no micro-organismo produtor ainda não é muito claro, embora do ponto de vista ecológico a produção destes compostos está relacionado à sobrevivência do micro-organismo na natureza. Tanto quanto se sabe, os micro-organismos produtores de antibióticos distribuem-se por três grupos de organismos formadores de esporos: fungos filamentosos (ex. *Penicillium chrysogenum*), bactérias formadoras de endósporos (ex. *Bacillus subtilis*) e bactérias Actinomicetos (ex. *Streptomyces griseus*).

São numerosos os exemplos de antibióticos atualmente em uso produzidos pelo gênero *Streptomyces* (Actinomiceto) e que possuem uma genética e bioquímica bem caracterizada, como é o caso de linhagens de *S. griseus* que metabolizam a estreptomicina, estreptidina, candimicina e outros. Já foram descritos mais de 25 clusters gênicos que codificam para biossíntese, regulação e transporte de antibióticos (Egan *et al.* 1998). Dois genomas de *Streptomyces* já foram sequenciados, o de *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002) produtor de actinorrudina e *S. avermitilis* (Ikeda *et al.*, 2003) produtor de avermectina.

Streptomyces é um dos gêneros de micro-organismo mais abundante no solo, de fácil isolamento e de grande importância econômica, tendo em vista que cerca de 70% dos antibióticos comercializados são produzidos por esse gênero (Chater, 1989; Egan *et al.*, 1998). Desta forma, há um enorme interesse sobre este gênero devido à vasta gama de metabólitos secundários produzidos pelas diversas espécies, tais como: antibióticos, antitumorais, anti-helmínticos, inseticidas, moduladores da resposta imune, inibidores de enzimas, surfactantes e outros compostos naturais (Vinning, 1990).

Os micro-organismos que produzem antimicrobianos úteis também estão entre os gêneros *Bacillus*, *Penicillium* e *Cephalosporium*. Ambos os processos, biossintéticos e o

mecanismo de resistência podem ser transmitidos entre várias espécies e gêneros heterogêneos. Um exemplo disto, a produção de giberelina e ácido jasmônico, exclusivamente em plantas, tem sido encontradas em muitos micro-organismos. A transferência lateral de genes biossintéticos bacterianos, em seu habitat natural, têm sido verificado em análises comparativas de sequências 16S rRNA e sequências do gene que confere resistência a estreptomicina, *strA*, e observou -se a transferência desse gene em seis isolados de *Streptomyces* (Egan, 1998). Este é um processo interessante que evidencia a variabilidade genética em relação à produção de antibiótico, aumentando as chances de encontrar novos produtos bioativos. Entretanto, chama a atenção para um problema que vêm aumentando que é o processo de resistência adquirida aos antibióticos.

Os Actinomicetos são uma fonte excepcional na produção de metabólitos secundários, sendo responsável por mais da metade de todos os antibióticos descoberto até a data (Berdy, 2005). Fato que incentivou grupos de pesquisas a explorar as sequências do genoma de *Streptomyces coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002) e *Streptomyces avermitilis* (Omura *et al.*, 2001), os quais revelaram informações sobre os clusters biossintéticos, demonstrando que, o mesmo táxon estudado tem potencial para produção de novos metabólitos. Dados genômicos juntamente com as ferramentas de bioinformática tem sido utilizados não somente para prever a estrutura química dos metabólitos anteriormente observados, mas também para desenvolver métodos de fermentação para aumentar a sua produção (Lautru *et al.*, 2005; Gross *et al.*, 2007; McAlpine *et al.*, 2005). Estes métodos possuem um potencial para eliminar a redundância de isolamento de compostos previamente descritos permitindo estudos detalhados de fermentação ou experimentos moleculares através da clonagem focalizando linhagens com alta probabilidade em produzir compostos com novas estruturas químicas.

Uma classe de metabólitos secundários em destaque e bastante estudada em Actinomicetos são os policetídeos (PK), que possuem uma ampla atividade biológica por produzirem diversas estruturas de substâncias naturais e um mesmo produtor é capaz de produzir mais de um composto policetídeo. Este filo constitui um enorme grupo de bactérias com 5 subclasses e 14 subordens, exibindo uma diversidade quanto a sua fisiologia e morfologia (Boone, 2001; Gao *et al.*, 2006). Os compostos policetídeos possuem diversas atividades farmacológicas importantes como potentes antibióticos, antitumorais, antifúngicos, agentes imunossuppressores, antifúngicos, antivirais (Yadav *et al.*, 2003; Das e Khosla, 2008).

Os policetídeos são uma grande família de produtos naturais encontrados em

bactérias, fungos e plantas, e incluem muitos medicamentos importantes clinicamente, como a tetraciclina, daunorrubicina, eritromicina, rapamicina e lovastatina. Grande parte da investigação sobre a biossíntese dos policetídeos é devido a diversos fatores: a) o seu potencial biológico onde esses compostos produzem uma infinidade de substâncias com uma ampla atividade; b) pelo seu enorme valor comercial; c) o interesse em estudar a estrutura destas moléculas que fornecem dados sobre a reatividade catalítica das enzimas policetídeos sintases (PKS), bem como, elucidar seu mecanismo molecular de interação proteína-proteína; d) pela versatilidade e receptividade destas enzimas PKS que permitem a geração de novos compostos, tornando difícil o acesso a estas substâncias, como por exemplo, através da biossíntese combinatorial (Shen, 2003).

2.2.1 Vias Biossintéticas dos Policetídeos

Os policetídeos constituem uma grande classe de metabólitos secundários, apresentando uma das maiores diversidades estruturais entre os produtos naturais (Figura 4). A maioria desses compostos está ativa em diversos sistemas biológicos. Portanto, a busca de policetídeos em micro-organismos em ambiente pouco explorado vem sendo apontada como uma boa estratégia para pesquisas de substâncias bioativas.

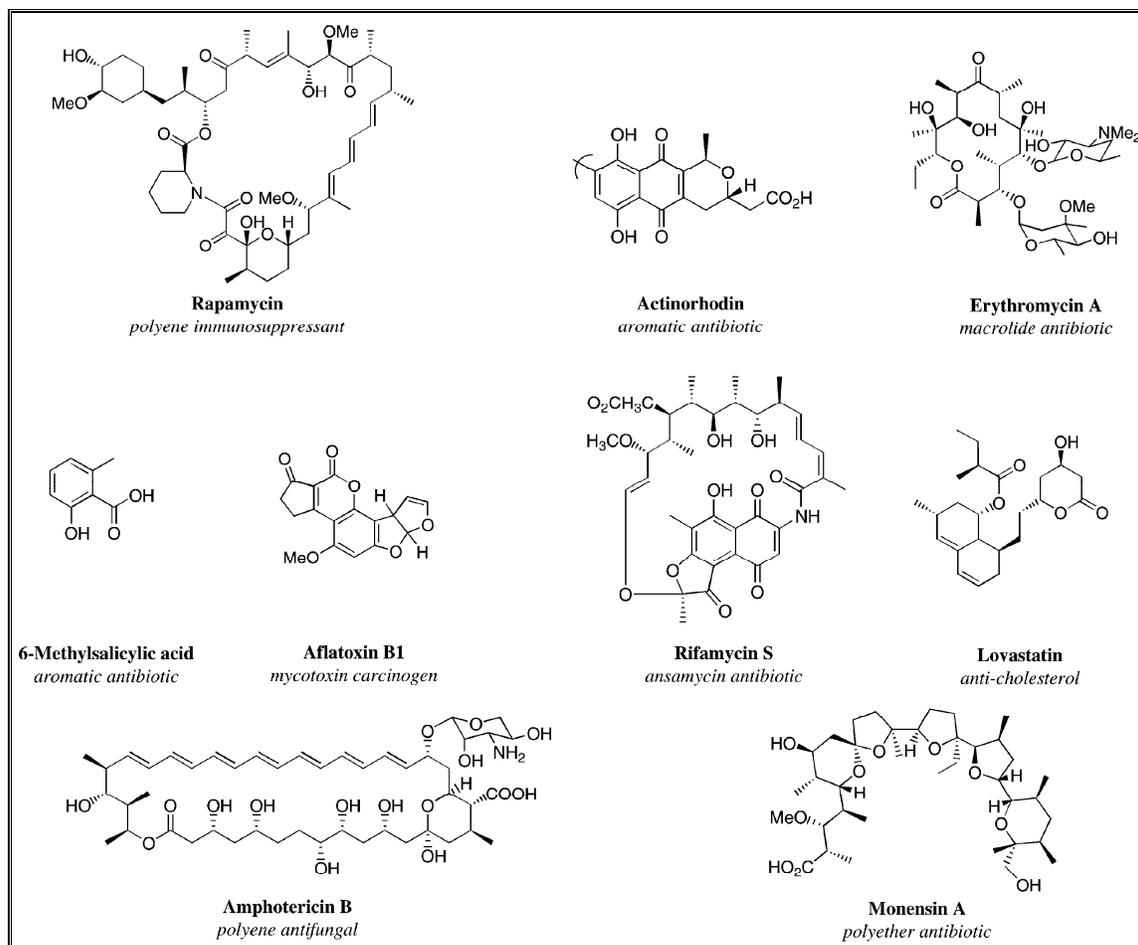


Figura 4. Exemplos de estruturas dos metabólitos secundários policetídeos (Staunton e Weissman, 2001).

Cerca de 570 genomas já foram sequenciados (Benson *et al.*, 2008) contribuindo para o entendimento e busca de novos genes biossintéticos. Uma grande quantidade de genes envolvidos na síntese de produtos naturais tem sua estrutura definida sendo possível prever a especificidade do substrato através de ferramentas *in silico* (Yadav, *et al.*, 2003), onde é possível definir as regiões dos domínios das enzimas nas vias biossintéticas.

Tem sido observado que a distribuição dos genes policetídeos nos genomas bacterianos não é proporcional ao tamanho do genoma tendo uma distribuição desigual entre os táxons (Tabela 1). Postula-se que os genes policetídeos são raros ou ausentes em genomas menores de 3 Mb e, acima de 5 Mb parece haver uma correlação linear entre o tamanho do genoma e o conteúdo de genes PKS. Evidente que mais sequências dos genomas devem ser obtidas antes que possamos entender qualquer correlação entre o tamanho do genoma e

o conteúdo de genes PKS (Donadio *et al.*, 2007).

Tabela 1. Análise de genomas por Filo.

Filo	Genoma ^a	Tamanho ^b	Genes PKS ^c	Densidade ^d
Actinobacteria	18	70 044365	452991	1.940
Aquificae	1	1 590791	0	0.000
Bacteroides	5	11 776893	2628	0.035
Chlamidiae	9	11 601785	0	0.000
Chlorobi	1	2 154946	0	0.000
Cyanobacteria	8	26 666055	51 826	0.583
Deinococcus	2	5 411638	0	0.000
Firmicutes	63	1 58832396	133511	0.251
Fusobacteria	1	21 74500	0	0.000
Planctomycetes	1	7 145576	11 197	0.470
α-Proteobacteria	25	77 768614	39 940	0.154
β-Proteobacteria	13	59 473882	236438	1.193
γ-Proteobacteria	59	247 393752	540 029	0.655
δ-Proteobacteria	4	15 226925	0	0.000
ϵ-Proteobacteria	6	10 640511	0	0.000
Spirillum	6	15 806532	0	0.000
Thermotogae	6	1 860725	0	0.000
Total	223	737 569 886	1 468 560	0.597

^aQuantidade de genomas sequenciados; ^bTamanho do genoma (pb); ^cTamanho dos genes policetídeos; ^d Porcentagem de genes policetídeos obtidos, dividindo o tamanho dos genes pelo o tamanho do genoma.

Fonte: Donadio *et al.*, 2007.

A síntese dos policetídeos é dividida em três grupos de acordo com os arranjos dos domínios das sintases, tipo I, II e III, neste trabalho focalizamos somente as vias biossintéticas dos policetídeos tipo I e tipo II. Os policetídeos são uma grande família de produtos naturais medicinalmente importantes, com síntese similar a via dos ácidos graxos, que são formadas através da condensação de unidades de aciltioester como a malonil-CoA e metilmalonil-CoA. O esqueleto de carbono é sintetizado devido a vários passos de condensação descarboxilativa de pequenas ácidos carboxílicos tioesteres, utilizando um coordenado grupo de sítios ativos (Yadav *et al.*, 2003).

A molécula policetídica na sua síntese inicial é composta de uma cadeia aglicona (sem açúcares) constituindo o esqueleto policetídico sintetizado a partir de precursores como

o acil-coA após vários ciclos de condensação e posterior redução dos grupos ceto e a outra parte da molécula podem conter vários açúcares derivados de glicose 1-fosfato. Desta forma, pequenas moléculas acil são adicionadas na cadeia em crescimento e são modificadas. Esta via forma diversas estruturas com diferentes atividades biológicas. Conforme a atuação do conjunto dos domínios das poliketídicas sintases (PKS) durante a biossíntese, os poliketídicos podem ser compostos aromáticos polihidroxilados (como a maioria dos pigmentos fúngicos), compostos alifáticos pouco oxigenados (ou poliketídicos parcialmente reduzidos, como a lovastatina) e alifáticos altamente reduzidos (e.g. ácidos graxos) (Shen, 2003; Moss *et al.*, 2004). O entendimento de como esses fatores de expressão gênica atua é um grande desafio.

Os macrolídeos, as antraciclinas, as estatinas, tetraciclinas, os polienos e poliéteres, todos esses grupos de compostos são poliketídicos sintetizados a partir de moléculas precursoras de acil-CoA.

Desde os primeiros relatos sobre PKS I em bactérias em 1990 (Cortes *et al.* 1990, Donadio *et al.*, 1991), PKS tipo II em 1984 (Malpartida e Hopwood, 1984; Motamedi e Hutchinson, 1984) e PKS tipo III em 1999 (Funa *et al.*, 1999), tem servido como um paradigma à comunidade científica explicar a complexidade da diversidade estrutural destes compostos e um desafio para produzir compostos sintéticos através das ferramentas biotecnológicas.

O módulo da PKS é sintetizado por um conjunto de enzimas possuindo no mínimo três domínios denominados de PKS mínima: as enzimas, cetosintase ou cetoacil sintase (KS) catalisa a reação de alongação sendo responsável pela condensação descarboxilativa (condensação tipo claisen); aciltransferase (AT) domínio que seleciona e ativa o substrato; proteína carregadora de grupo acil (ACP), transporta o substrato com unidades acil participando da alongação da cadeia, possui uma região com fosfopantenil (PP); outros domínios podem ser encontrados entre os domínios AT e ACP como: ceteredutase (KR); desidratase (DH), enoil redutase (ER) e a metiltransferase (MT) que são capazes de modificar a unidade acil após sua condensação (Shen, 2003; Foestner *et al.*, 2008). Usualmente pode conter outro domínio, o tioesterase (TE) responsável pela ciclização completa da cadeia acil. Normalmente este domínio encontra-se na última posição no último módulo. Neste sentido, a molécula poliketídica pode sofrer modificações pós-síntese, tais, como, metilação, ciclização, alquilação e glicosilação. Estes domínios adicionais geram uma diversidade de estrutura de moléculas. Os domínios apresentam sítios catalíticos distintos

com motivos estruturais conservados importantes para a atividade catalítica. A atividade da PKS está relacionada com a presença de sequências de aminoácidos cisteína presente em ambas PKS I e II (Shen, 2006). Apresentam uma similaridade na estrutura modular dos domínios catalíticos e no mecanismo de montagem linear.

Há dois tipos de PKS I, o modular (normalmente em bactérias), que sintetiza compostos reduzidos, representada pelos compostos: eritromicina, avermectina, rapamicina e sorafeno; PKS I iterativo (fungos) representado pela lovastatina, avilamicina e 6-ácido-metilsalisílico. A compreensão de como o PKS I modular e o iterativo atuam ainda é limitado. No entanto, é evidente que essas vias possuem um potencial em produzirem uma diversidade de estruturas de metabólitos policetídeos e, portanto, é uma importante ferramenta no desenvolvimento de drogas através da biossíntese combinatória, seja pela utilização dos genes conhecidos ou através da descoberta de novos genes. Como uma alternativa metodológica teria a reprogramação da biossíntese, através de mutações, deleções, inserção de módulos, inativação de domínios entre outros experimentos (Staunton e Weissman, 2001; Yadav *et al.*, 2003; Moss *et al.*, 2004). O alvo mais utilizado para estudos de biodiversidade é a enzima KS cujo domínio é conservado entre as espécies.

As policetídeos sintases tipo I modular, são enzimas multifuncionais, que podem atuar de forma sucessiva como um sistema modular único, com numerosos domínios (módulos distintos) com um único sítio ativo, cada módulo é responsável pela adição das unidades de acetiltioester para o alongamento da cadeia β -ceto. Cada domínio é utilizado uma vez durante todo o processo onde cada sítio ativo faz uma reação bioquímica, ou seja, um módulo é responsável por um *round* de extensão da cadeia. Na via biossintética, encontramos vários clusters gênicos de PKS I. Um exemplo, a via de síntese da eritromicina, onde há necessidade da atuação de três genes *ery I*, *ery I* e *ery III*, que codificam para as enzimas DEBS 1, 2 e 3, chamadas de eritromicina sintase. Cada proteína carrega e condensa unidades acil no composto eritromicina (Moss *et al.* 2004; Ginolhac *et al.*, 2005) (Figura 5). Os módulos DEBS 1, DEBS 2 e DEBS 3, com aproximadamente 350kDa cada, possui uma homologia estrutural com a síntese de ácidos graxos de vertebrados, possuindo várias atividade enzimáticas capaz de promover um ciclo de condensação e um certo número de reduções, que variam segundo a posição da molécula que o módulo sintetiza, assim, em posições do macrolídeo que são totalmente reduzidas formando uma ligação alifática (C-C), como nos ácidos graxos. Cada módulo atua em uma etapa de condensação de precursores acil-coA e processa o carbono β especificamente segundo os domínios existentes no módulo.

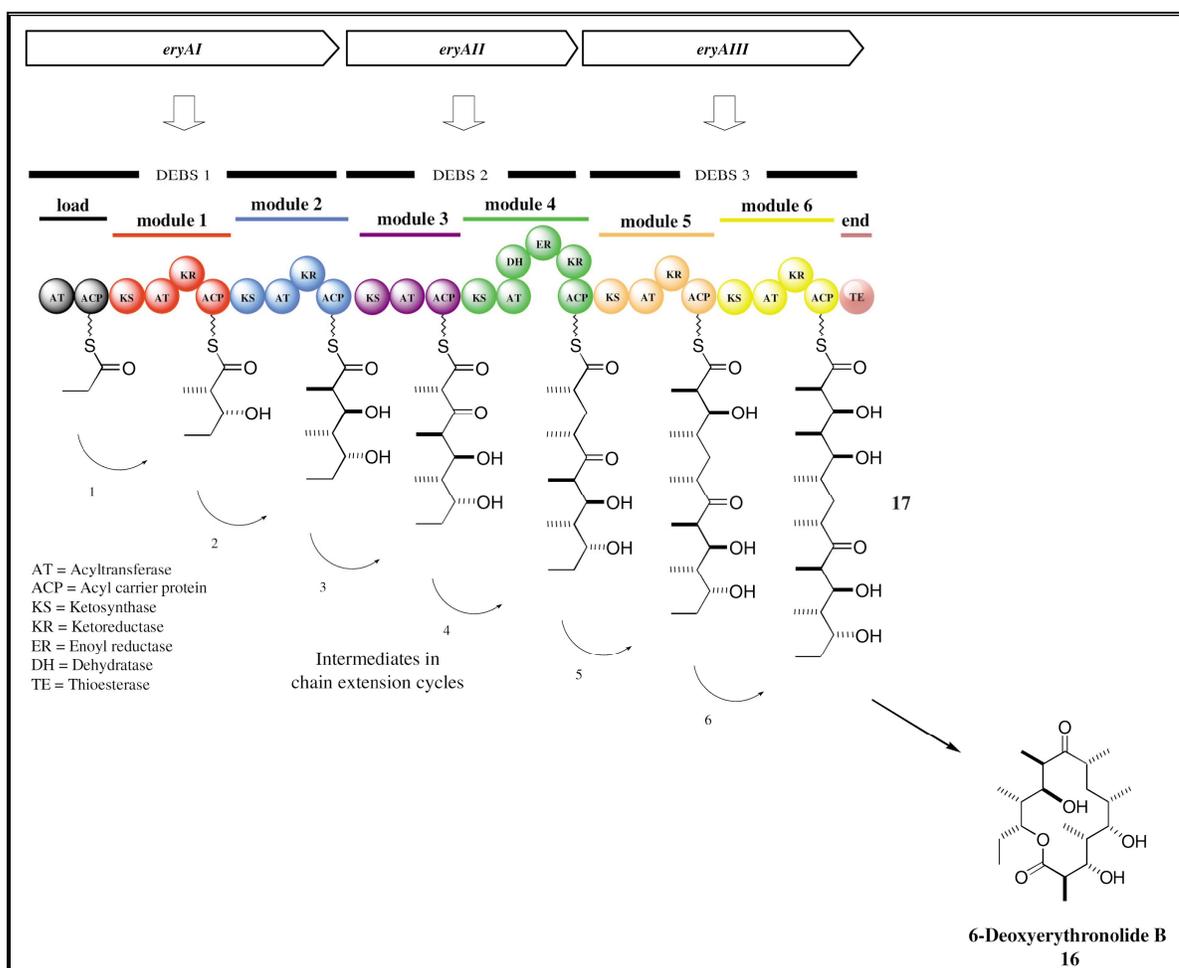


Figura 5. Representação do cluster gênico da síntese da eritromicina (PKS I) (Staunton e Weissman, 2001).

Em geral na via PKS I modular há uma linearidade dos módulos na síntese do produto, baseando-se em análises do produto sintetizado e não nas ORFs. Entretanto, as ORFs podem ser transcritas no mesmo sentido tendo uma linearidade, ou seja, os genes estão na mesma ordem no cromossomo (Moss *et al.* 2004). Dentro deste contexto, a unidade extensora acil em um módulo passa para a KS a *downstream* do módulo com alta fidelidade. Uma característica importante que auxilia no estudo de bioprospecção de novos clusters biossintéticos. Exceto na biossíntese dos compostos avermictina e rapamicina, os genes não estão na mesma ordem no cromossomo, entretanto, os genes estão programados para atuarem de uma forma linear na formação da cadeia policetílica (Schwecke *et al.*, 1995; Ömura *et al.*, 2001).

O sistema PKS I iterativo, utiliza cada sítio ativo do módulo repetidamente para

condensar a cadeia de carbono do acetato ou do malonato (como na síntese da lovastatina) (Hutchinson *et al.*, 2000; Castoe *et al.*, 2007). Na via de síntese do composto policetídeo I, o ácido 6-metilsalicílico (6-MSAS), modelo de estudo deste grupo de moléculas, necessita de quatro unidades cetídicas iniciadoras (uma molécula de acetato e três de malonato). Os domínios de 6-MSAS estão na seguinte posição: KS, MT, DH, KR e ACP. Apesar do mecanismo de síntese não estar totalmente elucidado, na via ocorre em três passos para catalisar a extensão da cadeia em níveis diferentes de redução da cadeia em cada fase. Por exemplo, na primeira fase ocorre a direta condensação do grupo malonato, enquanto na segunda condensação ocorre uma redução e desidratação do recém grupo *ceto* formado; no terceiro ciclo, a cadeia sofre ciclização, desidratação e enolização para formar o composto aromático 6-MSAS. Neste caso não há o domínio tioesterase, um mecanismo para a liberação da molécula tem sido proposto, no final da síntese há participação de unidade ceteno intermediária (Staunton e Weissman, 2001).

Entretanto, devido às definições dos tipos de PKS alguns autores discutem sobre a definição para os compostos sintetizados pelo sistema PKS tipo I. Bechthold e colaboradores (1997) publicaram um trabalho sobre a biossíntese da avilamicina em *Streptomyces viridochromogenes* Tu57. A avilamicina A(2) é um antibiótico oligossacarídeo, que contém uma grupo ácido dicloroisovermínico. O interessante é que em se tratar de uma bactéria o mais sensato seria esperar que, este antibiótico é produzido pelo sistema de PKS II responsável pela síntese de compostos aromáticos. No entanto, quando o cluster gênico da avilamicina foi clonado e os genes sequenciados, o cluster foi claramente identificado como do sistema PKS I iterativo. Isto é, apresentou alta homologia com o ácido metilsalicílico 6-sintase (MSAS) de *Penicillium patulum*. Outros exemplos desta natureza têm desde então, sido descritos.

A ação dessas enzimas PKS em conjunto ou uma expressão diferenciada de alguma delas deve resultar em diferentes classes de policetídeos. Dada a grande importância dos policetídeos, esforços vêm sendo feitos para se conseguir a expressão controlada dos genes que codificam as enzimas PKS. Na natureza, a expressão dos genes PKS é dependente de uma série de fatores ainda pouco conhecidos.

Um número de policetídeos aromáticos é sintetizado pelo sistema PKS II em Actinomicetos presentes em solos. Estes exibem atividades, tais como, anticâncer (ex. doxorubicina), antibacteriana (ex. oxitetraciclina), antifúngica (ex. pradimicina), antiviral (ex. A-74528), antiparasitário (ex. frenolicina), entre outros (O'Hagan, 1991; Das e Khosla,

2008). Os policetídeos sintases tipo II, similar as sintases de ácidos graxos de bactérias e plantas, possuem proteínas conservadas com tamanho que variam de 5 a 50 kDa (Das e Khosla, 2008).

As bactérias que sintetizam policetídeos do sistema PKS tipo II, são compostos por enzimas mono ou bifuncionais responsáveis pela biossíntese dos policetídeos aromáticos que, não requerem extensos ciclos de redução e desidratação. A atividade enzimática para a elongação e processamento da cadeia de policetídeos está presente em polipeptídeos separados (Castoe *et al.*, 2007). A PKS mínima é composta por 3 genes relativamente conservados no cromossomo, que codificam enzimas cetosintases que possuem duas subunidades $KS\alpha$ e $KS\beta$ e a proteína ACP (Figura 6). As subunidades $KS\alpha$ e $KS\beta$ (ou $KS-CLF$) são heterodímeros de β -cetoacil sintases e atuam catalisando as reações de condensação entre o acil tioéster e o crescimento da cadeia carbônica (fator de elongação de cadeia). A proteína ACP por sua vez, age como uma âncora durante a síntese da cadeia e nos passos subsequentes de modificação do esqueleto carbônico. No entanto, a ação das enzimas codificadas pela PKS mínima não é suficiente para a formação do composto final. Para isso são necessários passos subsequentes, onde enzimas como as ciclases, aromatasas e cetoreduases, sintetizam as dobras e ciclizações necessárias para a formação da estrutura policíclica presente nos compostos policetídeos tipo II (Metsa-Ketela *et al.*, 1999). Subunidades adicionais, incluindo cetoreduase, ciclases (CYC) e aromatasas (ARO) definem o padrão do intermediário nascente poli- β -ceto. As enzimas PKS II atuam de uma forma coordenada na formação do esqueleto policetídeo de tamanho variável que como mencionado não é reduzido antes que os ciclos de condensação terminem e a molécula seja liberada pela PKS (Figura 7).

Os policetídeos tipo II são comumente encontrados em Actinomicetes e somente dois exemplares de bactéria gram-negativa são conhecidos (Brachmann *et al.*, 2007 ; Sandmann *et al.*, 2007).

Hopwood e colaboradores (1990) foram pioneiros na descoberta do cluster biossintético do composto Actinorodina produzido por *S. coelicolor*, auxiliando na compreensão de como atua a enzima PKS II.

Uma classe de moléculas policetílicas tipo II amplamente estudadas, são as antraciclínas, os quais possuem um amplo espectro de ação sendo indicadas para o tratamento de diversas neoplasias. O modo de ação destas substâncias é baseado na sua habilidade de se intercalar ao DNA de forma não covalente, impedindo a síntese de DNA e

RNA, além de alterar a membrana e produzirem radicais livres. A teoria que vêm sendo muito estudada é de que essas substâncias atuam impedindo a ação da topoisomerase II. Dentre as antraciclina destaca-se a cosmomicina D, produzida por *S. olindensis* que tem sido estudada por nosso grupo de pesquisa (Furlan *et al*, 2004; Garrido *et al*, 2006). Também se verificou que esta substância intercala no DNA e induz apoptose em células tumorais (Furlan *et al*, 2002 e 2004).

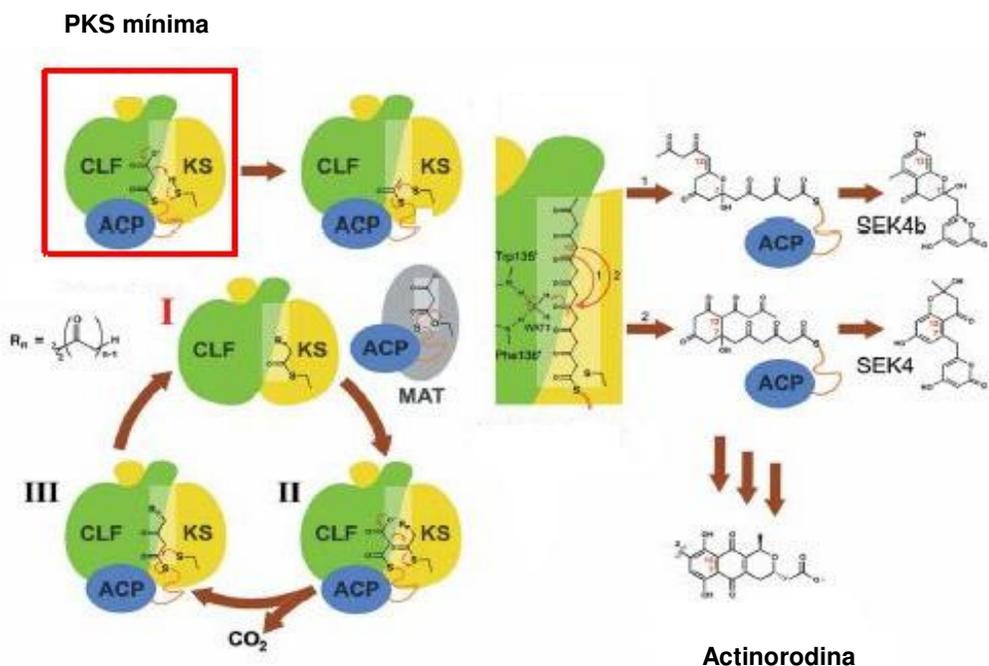


Figura 6. Via biossintética de produção do policetônico actinorodina em *Streptomyces coelicolor*, indicando a atuação da policetídeos sintase (CLF-KS ou KS α e K β) do sistema PKS tipo II. (Keatinge-Clay *et al*, 2004).

O número de novos compostos identificados como antraciclina chega a 2.000, mas apenas 6 são comercializados. Um dos compostos que têm sido mais estudado, devido sua importante atividade quimioterápica, é a doxorubicina. Este composto é análogo a daunorubicina produzida por *S. peucetius*.

Muitos clusters gênicos para o PKS tipo II têm sido caracterizados, tornando possível a expressão combinatória de vários genes de diferentes clusters, gerando metabólitos aromáticos híbridos, processo chamado de biossíntese combinatória (Reeves, 2003). Devido à

complexidade das moléculas e a dificuldade de modificação de sua estrutura, esta técnica permite a formação de um novo produto biossintético natural.

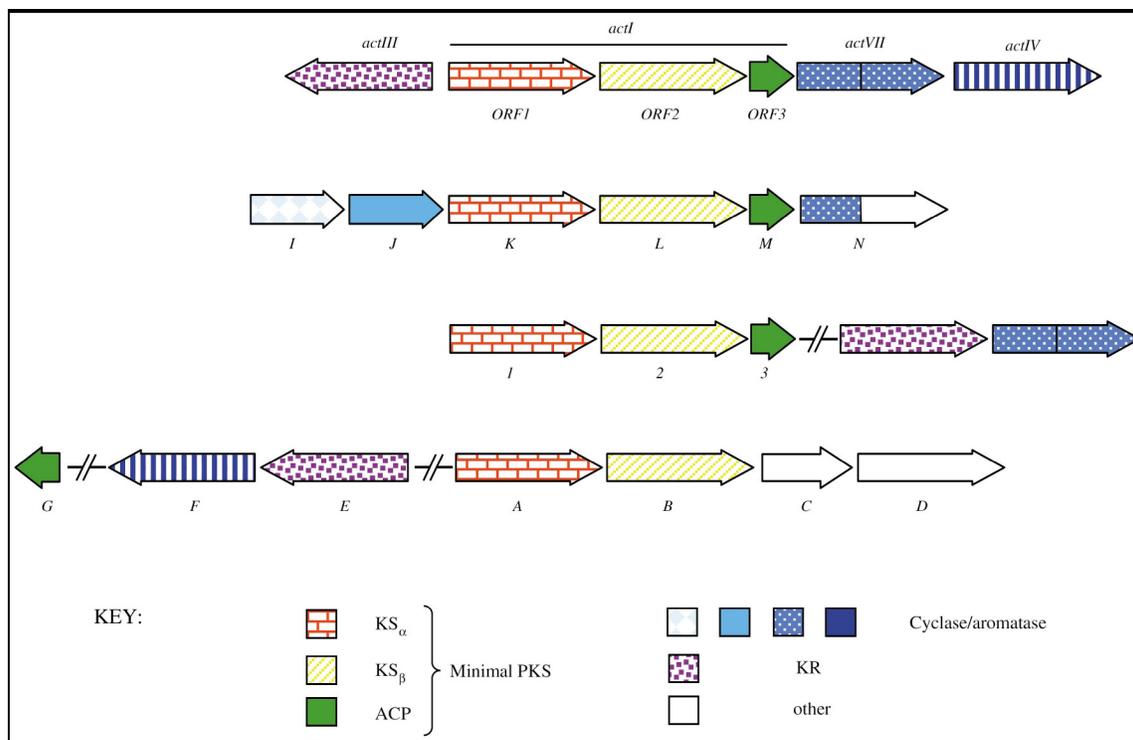


Figura 7. Organização do cluster biossintético PKS tipo II (Staunton e Weissman, 2001).

Já foram caracterizados mais de 500 policetídeos aromáticos em Actinomicetes, entretanto, poucas moléculas possuem estruturas similares. A diversidade das moléculas PKS II é devido à modificação após a formação da cadeia policetídica (pós-PKS) (Moore e Piel, 2001).

O desenho racional de novos produtos policetídeos através da manipulação de clusters biossintéticos tem sido alvo de estudos de vários pesquisadores (McDaniel *et al.*, 1995; Khosla *et al.*, 1996; Ranganathan *et al.*, 1999). A versatilidade funcional das multienzimas modulares tem sido demonstrada em experimentos através da manipulação através da inativação, substituição ou adição de domínios (Yadav *et al.*, 2003). A base para compreender a especificidade na formação da molécula de policetídica está na elucidação das seqüências de aminoácidos dos vários domínios.

Os policetídeos sintases possuem regiões conservadas sendo alvos para screening de novas moléculas.

Atualmente a taxa de descoberta de novos organismos produtores destes compostos tem diminuído. Sendo necessárias novas abordagens para acessar esta biodiversidade de micro-organismos produtores presentes nos solos (Wawrik *et al.*, 2004). Seow e colaboradores (1997) construíram *primers* homólogos a regiões consenso presentes nos genes KS β e ACP de policetônicos tipo II. Analisando os fragmentos clonados, encontraram novas sequências de sintase de policetônicos. Uma estratégia semelhante foi utilizada por Metsa-Ketela e colaboradores (1999), que construíram conjuntos de *primers* degenerados homólogos ao gene KS α de *Streptomyces* de solo para a triagem de micro-organismos produtores de policetônicos.

Courtois e colaboradores (2003) utilizaram *primers* degenerados homólogos a PKS tipo I de policetídeos como sondas moleculares para a triagem de 5000 clones de uma biblioteca metagenômica. Ao final, obteve 11 novas sequências sintases de policetídeos e dois novos compostos policetídeos tipo I.

Kellner e Zak (2009), estudaram a diversidade de genes de PKS tipo I que são transcritos por micro-organismos presentes em amostra de solo de floresta através da extração de RNA ambiental e construção de uma biblioteca de cDNA. Os autores analisaram 20 clones contendo fragmentos do gene PKS I (cetosintase) contendo 663 a 941 pb que foram amplificados com *primers* degenerados desenhados para fungos. Na análise filogenética feita através do alinhamento com sequências de aminoácidos dos genes parciais de PKS I evidenciaram a presença de 22 clones que foram agrupados com fungos produtores de moléculas reduzidas e 2 clones agrupados com grupos de bactérias. Os autores ressaltam que mesmo utilizando *primers* específicos para KS de fungos foi possível amplificar PKS de bactérias. Portanto, está técnica tem sido viável para o estudo da diversidade dos genes de PKS e o uso das sequências obtidas para expressão heteróloga.

Através destes estudos de diversidade de genes policetídeos fornece a possibilidade em postularmos sobre a homologia das sequências e sua origem entre os diversos grupos microbianos.

A síntese de compostos policetídeos é uma via diversificada com ampla atividade biológica estando presente em vários organismos; só este fato gera motivação para entendermos como essas moléculas evoluíram e tem se diversificado na natureza. Um fato bastante intrigante e que tem levado os pesquisadores a postularem uma teoria a cerca do surgimento dos genes biossintéticos, é devido a sua similaridade com a síntese de ácidos graxos, e a presença de genes similares em organismos distintos. Análises sobre a evolução

de PKS microbiano revelaram um processo evolutivo entre PKS e sintases de ácidos graxos (FAS) (Jenke-Kodama e Dittmann, 2009).

2.2.2 Evolução dos genes PKS

Alguns autores têm postulado sobre a evolução da via de PKS, acreditando-se que exista uma conexão entre as via de ácidos graxos (FAS) e PKS. A via de biossíntese de ácidos graxos (FAS) está presente em todos os organismos e, tanto a via de FAS como PKS usam o mesmo núcleo de atividade enzimática (Kodama *et al.*, 2005). O passo inicial de síntese na via de FAS e PKS é muito similar, onde se utilizam unidades acil, como molécula precursora acetil e malonil, muitas vezes é a mesma molécula precursora que é condensada de forma sequencial durante os passos de alongação na cadeia de carbono em crescimento (Figure 8). As diferenças entre PKS (entre as diversas sínteses de policetídeos) e FAS são o número e tipo de precursores acil, a redução dos grupos ceto e o passo final de ciclização (pós-PKS) (Hpwod and Sharman, 1990; Hutchinson e Fujii. 1995; Revill *et al.*, 1996). Kodama e colaboradores (2005) realizaram um estudo filogenético dos domínios KS das vias de FAS e PKS e verificou que as classes de policetídeos sintases são similares a estrutura das FAS de ácidos graxos, havendo uma similaridade das enzimas KS tipo I com as FAS tipo I de fungos e animais, enquanto que as enzimas KS tipo II assemelham-se às FAS tipo II. Análises filogenéticas dos vários tipos de FAS e PKS de diferentes organismos revelam um processo de evolução em conjunto destas duas importantes vias biossintéticas (Figura 8).

O sistema de PKS I modular parece em muitos genomas bacterianos sequenciados, em maior frequência em genomas de *S. avermitilis* e *B. subtilis*. Entretanto, não aparecem nos genomas de Clamídia e Spirochaetales, sendo encontrado nos genomas Firmicutes, Proteobactérias, Cianobactérias e Actinobacteria (Kodama *et al.*, 2005). Em estudos de filogenia revelam uma relação entre os genes de PKS entre diferentes grupos microbianos.

Tem sido relatada a participação de alguns genes do sistema FAS que são homólogos a determinados genes no sistema PKS, como, por exemplo, o gene *fabD* que codifica para a enzima AT do sistema FAS tipo II, este enzima participa na biossíntese dos policetídeos aromáticos actinorhodina em *Streptomyces coelicolor* (Revill *et al.*, 1996) e tetracenomicina em *Streptomyces glaucescens* (Su mMers *et al.*, 1995; Florova *et al.*, 2002). Também enzimas envolvidas na biossíntese do ω -3-ácidos graxos polinsaturados de *Shewanella* são

similares às enzimas de PKS I iterativo, assim como, as enzimas envolvidas na síntese da avilamicina, neocarzinostatina e mixocromide em *Mixobactéria* e *Streptomyces* (Metz *et al.*, 2001; Wenzel *et al.*, 2005).

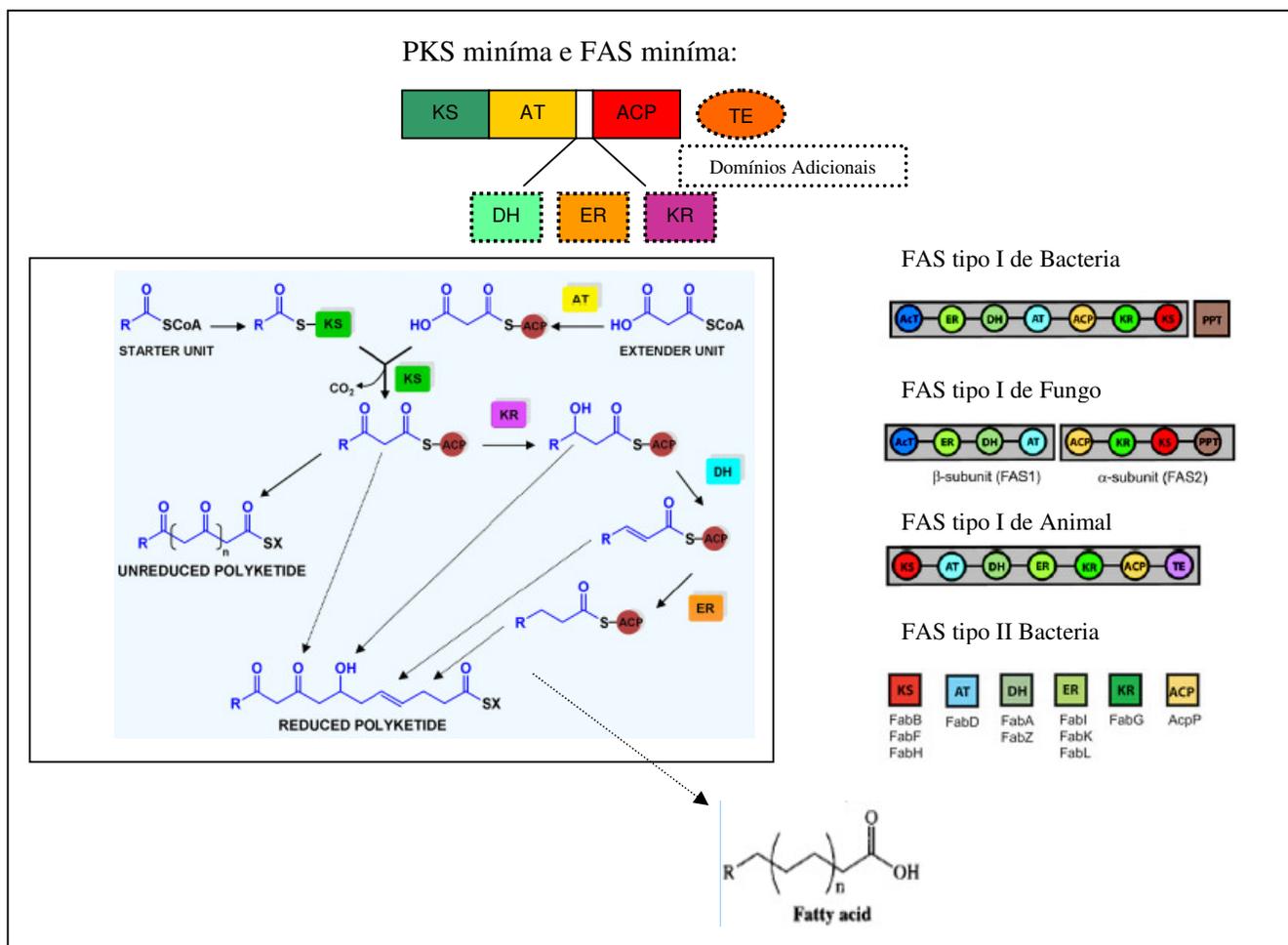


Figure 8. Biossíntese PKS e FAS mostrando as funções das diversas atividades realizadas pelas subunidades ou domínios das policetídeos sintases. O domínio da TE pode estar presente ou não no último módulo da policetídeo sintase. Note-se que esses domínios estão também presentes na típica estrutura dos domínios das sintases de ácidos graxos (FAS). (KS: Ketosynthases; AT: Acil transferase; KR: Cetoreductase; DH: Desidratase; ER: reductase Enoil; TE: Thyoesterase) (Adaptado de Janke-Kodama, 2005).

Em análises filogenéticas dos domínios presentes em FAS e PKS revelam similaridades entre diversas espécies. Alguns autores postulam que há uma única origem comum para a via de FAS e PKS, a hipótese de que uma enzima ancestral tenha evoluído adquirindo novas funções para se tornar mais eficiente. Neste sentido, uma proteína

carregadora de acil, a acil transferase poderia ter dado origem a uma PKS rudimentar. Outra hipótese é de que houve condensação da enzima PKS tipo II dando origem a PKS tipo I multifuncional, sendo esta característica herdada para as células eucarióticas (Hopwood, 1997; Kodama *et al*, 2005; Ridley *et al.*, 2009). Vários eventos genéticos contribuem para diversidade química dos policetídeos tipo I, como mutações, recombinação homóloga, duplicação gênica e transferência horizontal. Todos estes eventos são mecanismos viáveis que contribuem para a diversidade dos PKS multimodular (Ridley, *et al.*, 2009).

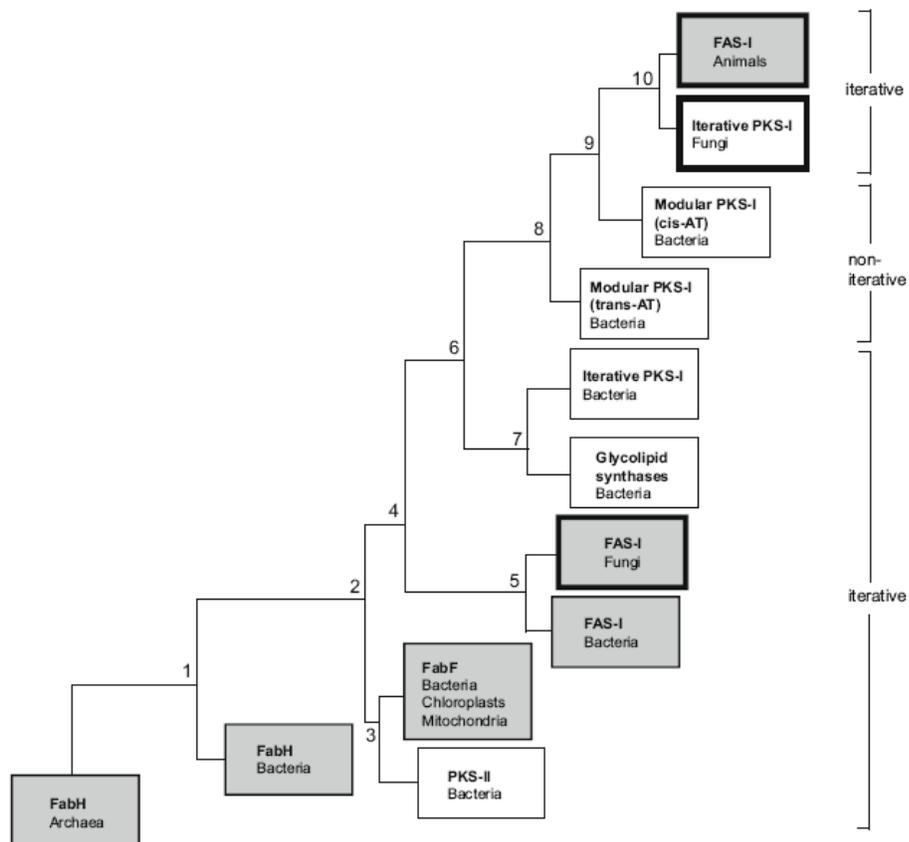


Figura 9. Representação esquemática da relação filogenética entre FAS (em cinza) e PKS (em branco) (Jenke-Kodama e Dittmann, 2009).

2.2.3 Prospecção Biotecnológica do Metagenoma

Está evidente que a natureza, mas precisamente, os solos possuem uma diversidade ainda inexplorada devido à dificuldade em acessar esta biodiversidade, metodologias alternativas tem sido atualmente empregadas para análise da diversidade metabólica destes organismos não cultiváveis. O metagenoma é uma técnica inovadora, mas ainda de difícil aplicabilidade, exigindo esforços de vários grupos de pesquisa para adequar as metodologias que são publicadas.

O metagenoma é uma técnica que visa a análise do genoma da comunidade microbiana do meio ambiente através da análise do DNA ambiental, que compreende cerca de 99% dos organismos que não são cultiváveis em laboratório, cerca de 10^9 células procarionóticas e mais de 2.000 tipos de genomas/g de solo. Com a biblioteca metagenômica gerada com esta técnica podem-se fazer dois tipos de análise para se obter informações sobre o metagenoma, que são: a) análise função-específica, onde a identificação de clones que expressam uma determinada característica é analisada. Esta técnica tem várias limitações durante a expressão, em relação à linhagem hospedeira sendo necessário todo o cluster gênico para a expressão; o tamanho do inserto clonado é primordial, onde bibliotecas com fragmentos de inserção de 2 a 10 kb são construídos em plasmídios ou vetores de expressão lambda e clusters gênicos preferencialmente exigem biblioteca com inserção entre 20 e 40 kb em cosmídios e fosmídios e até 100 a 200 kb em cromossomos artificial bacteriano (vetor BAC). Normalmente a linhagem hospedeira mais utilizada para clonagem *E. coli* pode não conter as sequências promotoras para expressão do gene ambiental, ou seja, o *ocódon usage* dos micro-organismos do ambiente pode ser diferente ao da linhagem hospedeira impedindo a transcrição do gene alvo; b) Outra técnica refere-se a análise sequência-específica, onde se utilizam sequências conservadas do DNA de interesse, através de sondas para hibridação ou produtos de PCR (primers), para analisar a biblioteca genômica e, assim, identificar clones que contenham a sequência de interesse (Figura 10) (Schloss e Handelsman, 2003). Nesta metodologia quanto mais complexa a comunidade estudada mais esforços com sequenciamentos são necessários. Hoje com o surgimento de novas tecnologias, como o pirosequenciamento, é gerada uma maior quantidade de dados genômicos dando uma maior cobertura sobre a diversidade de espécies dentro de uma comunidade. Uma desvantagem da técnica é seu altocusto.

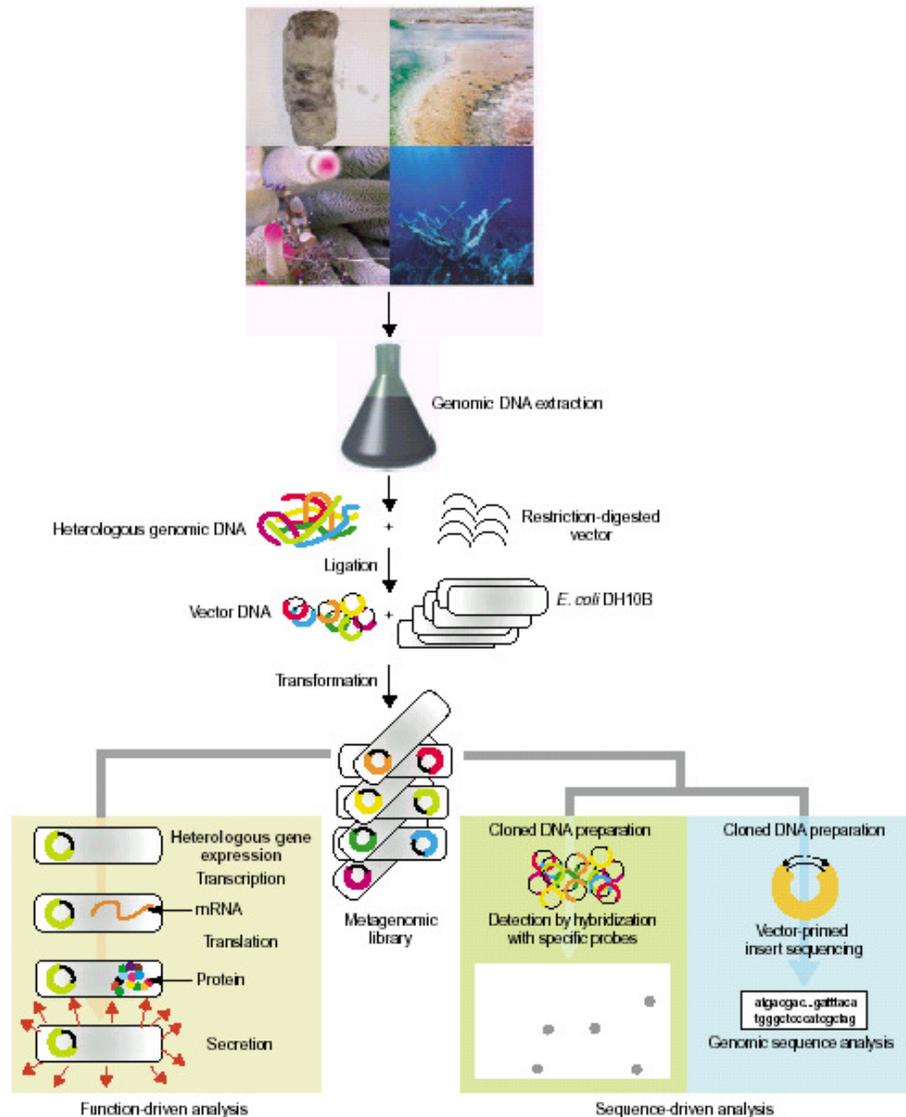


Figura 10. Técnicas utilizadas para obter informação da biblioteca genômica gerada pelo metagenoma (Schloss e Handelsman, 2003).

Devido às limitações e dificuldades com a técnica de análise das bibliotecas metagenômicas, tem sido aplicado outra abordagem como o *screening* direto de genes biossintéticos específicos, como a amplificação do DNA com *primers* e construção de bibliotecas metagenômicas do gene biossintético, fornecendo informações sobre a biodiversidade metabólica em um determinado ambiente. Alguns trabalhos utilizam esta metodologia (Morimoto e Fuji, 2009). Em geral, os produtos obtidos por técnicas baseadas

em PCR são fragmentos parciais de um gene alvo e para obter um gene funcional completo é necessário recuperar regiões de acompanhamento do fragmento parcial. Uma solução é “metagenome walking” (Eschenfeldt *et al.*, 2001; Uchiyama e Watanabe 2006; Yamada *et al.*, 2008), onde são desenhados *primers* para o fragmento alvo que foi parcialmente amplificado (Morimoto e Fuji, 2009).

Por esta razão, um amplo leque de abordagens descritas como a genômica ambiental (metagenoma) tem sido desenvolvidas para estudar as comunidades difíceis de cultivar ou de organismos individuais, apesar de sua complexidade e variabilidade (Ferrer *et al.*, 2008) (Figura 11). Portanto, o termo metagenoma tem sido utilizado amplamente em pesquisa que vão desde análise funcional, identificação de um determinado gene de interesse de um pequeno grupo em um meio ambiente (Tringe *et al.*, 2005) até a descoberta de drogas (PLE ver Schmeisser *et al.*, 2007).

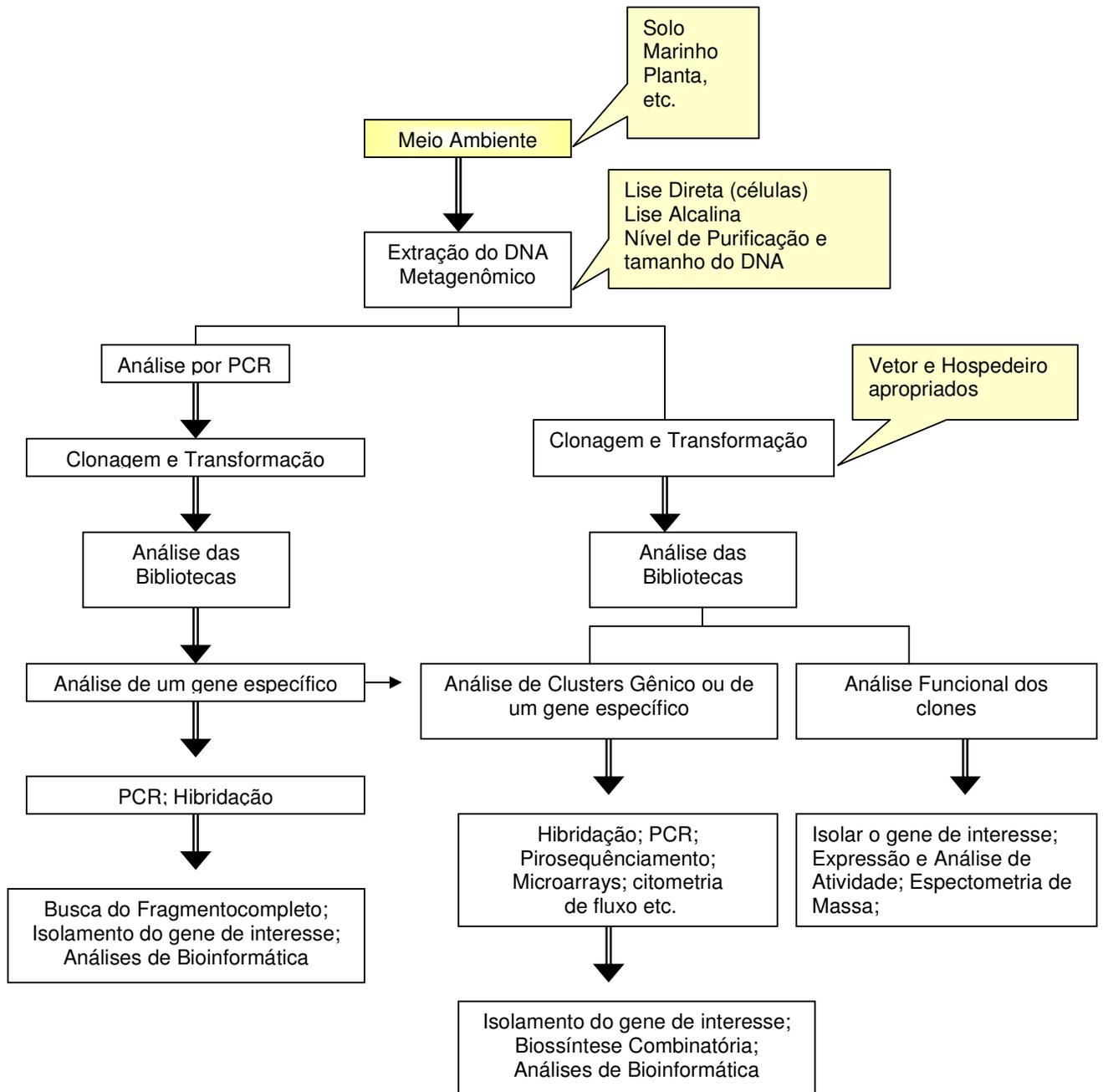


Figura 11. Abordagens metodológicas utilizadas para analisar o DNA metagenômico.

Desde sua introdução, a tecnologia de metagenoma tem identificado um número significativo de novos genes envolvidos em biocatálise e moléculas com alto potencial para aplicação farmacêutica (Streit *et al.*, 2004) (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação de genes utilizando diversas técnicas de metagenoma.

Alvo (gene ou enzima)	DNA metagênomico	Tipo de vetor	Tamanho do inserto	Nº. de Clones	Clones Positivos	Referência
Agarase	Solo	Cosmídio	25-40 kb	1.523	12	Yun <i>et al.</i> , 2004
Amilase	Meio ambiente (Patente 5,958,672)	Lambda	-----	50.000	15	Richardson <i>et al.</i> , 2002
Amilase	Solo da junção de águas subterrâneas	Plasmídio	2-7 kb	30,000	1	Yun <i>et al.</i> , 2004
Celulase	Água de Lago	Lambda	2-10 kb	114.000	4	Rees <i>et al.</i> , 2003
Esterase	Solo	Fosmídio	30-40 kb	60.000	1	Ferrer <i>et al.</i> , 2005
PKS I, NRPS	Solo (lise direta)	Fosmídio	35-40 kb	15.000	5 (PKS I)	Van Elsas <i>et al.</i> , 2008
Atividade antifúngica	Solo	Fosmídio	-----	113.700	1	Chung <i>et al.</i> , 2008

A maior parte dos trabalhos que utilizam a tecnologia de metagenoma tem focado esforços no estudo de um pequeno grupo de enzimas, incluindo lipases, esterases, oxidoredutases, proteases, nitrilases, agarases entre outras (Lorenz *et al.*, 2002; Voget *et al.*, 2003; Streit *et al.*, 2004). Também são conhecidos estudos de metagenoma dirigidos para o isolamento de genes envolvidos na biosíntese de vitaminas (Streit *et al.*, 2004). Foram também encontrados novos genes de resistência a antibióticos e que codificam proteínas de membrana (Schloss *et al.*, 2003). E, finalmente, trabalhos que visam o isolamento ou expressão de genes ou *clusters* biossintéticos de compostos bioativos, dos quais se destacam a descoberta dos antibióticos turbomycin A e B a partir de metagenoma de solo (Gillespie *et al.*, 2002); de um antibacteriano da família indirubina, com propriedades antileucêmicas e inibidores de tirosina-quinases (Osburne *et al.*, 2000) e dois novos compostos de policetídeos da classe dos PKS tipo II (Seow *et al.*, 1997).

Com a técnica do metagenoma antibióticos como indirubina utilizada no tratamento de

leucemias (Lim *et al.*, 2005) e isocianida foram descobertos (Brady e Clardy, 2005). Brady e colaboradores (2004) analisaram sete diferentes solos e dados do metagenoma revelaram 11 clones produzindo o antibiótico N-aciltirosina e estudos sobre as suas sínteses revelaram que dez destes eram novas enzimas.

No entanto, poucas classes de genes biossintéticos de antibióticos, possuem regiões com similaridade suficiente para o desenho de *primers* ou sondas (Schloss *et al.*, 2003). Uma exceção são os genes que codificam as policetídeos sintases (PKSs), presentes nas vias biossintéticas de compostos policetônicos. As PKSs são enzimas modulares que repetem domínios contendo regiões divergentes que possibilitam a síntese das variações estruturais encontradas nesses compostos. (Schloss *et al.*, 2003; Handelsman, 2004).

A arquitetura dos genes que codificam as PKSs contempla regiões altamente conservadas, ideais para a construção de sondas ou *primers* como já descrito em vários artigos na literatura (Seow *et al.*, 1997; Metsa-Ketela *et al.*, 1999; Courtois *et al.*, 2000; Schirmer *et al.*, 2005).

Não há na literatura estudos sobre a diversidade de genes de PKS I e PKS II utilizando abordagens de metagenoma em amostras de solo de Mata Atlântica. Como relatado nesta revisão fica evidente que solos apresentam uma diversidade ainda inexplorável e que as diversas metodologias para analisar o DNA ambiental, como a do metagenoma, é a mais viável para estudos sobre a diversidade e genes metabólicos ainda não conhecidos.

Com o desenvolvimento de novas biotecnologias e ferramentas de bioinformática, a descoberta de genes através das abordagens metagenômicas potencialmente pode contribuir significativamente para a produção de novos compostos bioativos.

A busca de genes para novos anti-microbianos é provavelmente o campo que mais avança na metagenômica. Em síntese, deve-se salientar que no DNA há novas sequências que codificam para novas enzimas, mas que ainda são desconhecidas. Portanto, um dos desafios do metagenoma é relacionar a tecnologia em descobrir novas funções e implementar o processo de produção das enzimas identificadas.

3 Objetivo

Verificar a diversidade de genes das vias dos policetídeos tipo I e tipo II em amostra de solo de Floresta Tropical. Para isso, as seguintes etapas foram necessárias:

- 1.** Adequar as metodologias para extração de DNA ambiental da amostra de solo;
- 2.** Detectar a presença de genes de policetídeos do sistema PKS tipo I e II no DNA metagenômico em uma amostra de solo de Mata Atlântica;
- 3.** Construir as Bibliotecas de PKS I e PKS II e analisar com as sequências depositadas no Genbank e posterior construção de árvore filogenética para bioprospecção metabólica;
- 4.** Isolar e identificar micro-organismos “não cultiváveis”; verificar a produção de compostos bioativos dos isolados.

4 Delineamento Experimental

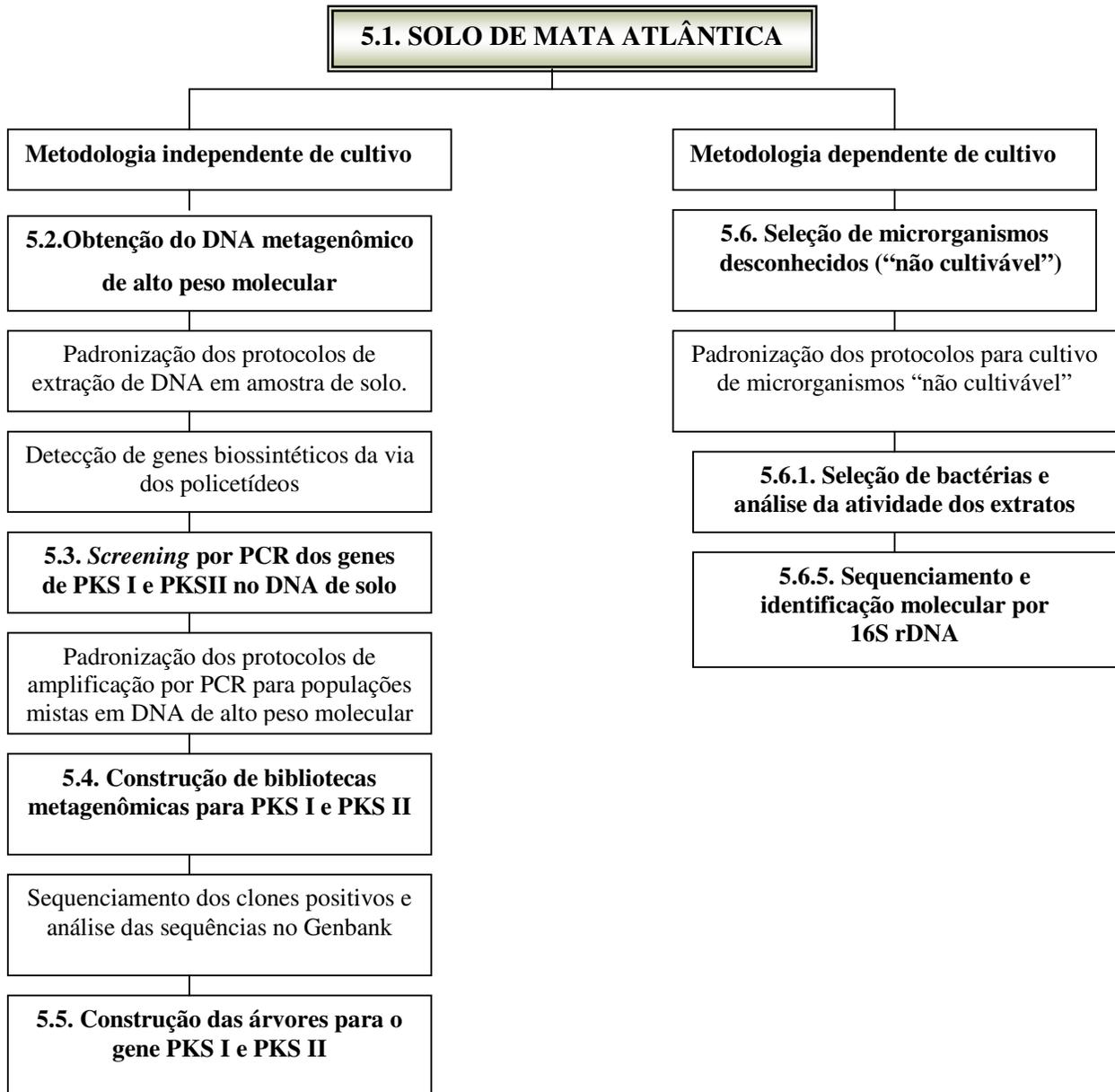


Figura 12. Fluxograma das principais estratégias utilizadas no presente trabalho.

5 Material e Métodos:

5.1 Amostra de solo

As amostras de solo de Mata Atlântica foram coletadas na região da Ilhabela onde a biodiversidade da Mata Atlântica está preservada. Recentemente, Ilhabela e Ubatuba apareceram empatadas em primeiro lugar no ranking dos municípios brasileiros que conservam o maior percentual de vegetação nativa da Mata Atlântica em seus territórios, de acordo com a quinta edição do Atlas dos Municípios da Mata Atlântica, trabalho realizado em parceria pela Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (Inpe). Ambos os municípios, de acordo com o Atlas, contam com 85% de seus territórios cerca de 348,3 e 712,1 km², respectivamente cobertos pela Mata Atlântica, com São Sebastião aparecendo em terceiro lugar no ranking nacional, com a floresta abrangendo 84% de seus 401 km² de território.

Para a coleta foi delimitado no solo um espaço de 2m² e retiradas amostras aprofundando no máximo até 15 cm do solo. Para o armazenamento, o solo foi peneirado para a retirada de fragmentos de vegetação e raízes, sendo armazenada a – 20 °C, para preservação dos microorganismos (Berry *et al.*, 2003).

5.2 Extração de DNA total das amostras de solo:

Este passo foi o mais crítico do projeto. O maior desafio foi estabelecer um protocolo viável para a amostra de solo rica em compostos orgânicos, o que dificulta não só na extração de DNA, mas em sua purificação, já que estes compostos, como por exemplo, os ácidos húmicos podem ser co-extraídos. Foram testados vários protocolos com a finalidade de obter um DNA de alto peso molecular, acima de 40 kb, e sem contaminações como: presença de ácidos húmicos, o que prejudicaria os passos subsequentes de amplificação e clonagem. Para tal finalidade, várias metodologias foram empregadas segundo a literatura, sendo estes utilizados na íntegra e com modificações (Tabela 3).

Tabela 3. Métodos utilizados para extração e purificação de DNA de solo de Mata Atlântica.

	Método de Extração	Resultados da Extração	Método de Purificação	Teste de Amplificação de 16S rDNA ou Digestão com Enzimas de Restrição
1	Utilização de PVPP + Bead-beater vel oC. 4, 30 s, com pérolas de vidro 0,5 mM.	ocorreu extração de DNA de todas as amostras de solo, porém estavam bastante fragmentados (~15 a 20kb)	As amostras apresentaram coloração marrom e não foram purificadas.	As amostras não foram amplificadas.
2	Lisozima + bead-beater: (idem anterior) Bead-beater vel oC. 5, 30 s, pérolas de vidro 1,0 mM.	As amostras de solo que foram utilizadas no método 1, foram utilizadas novamente nessa extração com condições diferentes do bead-bader. ocorreu extração de DNA de todas as amostras utilizadas. Fragmentos de DNA entre 6 e 20 kb aproximadamente.	As amostras apresentaram coloração marrom e não foram purificadas	Não ocorreu amplificação das amostras.
3	PVPP + Lisozima + bead-beater (anexo II). Bead-beater: vel oCi. 4, 20 s, pérolas de vidro 1,0 mM.	ocorreu a extração de DNA, com rendimento muito inferior aos métodos 1 e 2.	Recuperação de DNA da banda de gel de agarose LMP 0,8%.	As amostras não foram amplificadas.
4	CTAB + proteinase K+ bead-beater ou shaker.	Pouca quantidade de DNA extraído, porém a extração foi maior quando utilizado o shaker. Grande quantidade de DNA degradado.	As amostras não foram purificadas.	As amostras não foram amplificadas.
5	Lavagem prévias do solo com tampão fosfato + CTAB + proteinase K (shacker) protocolo segundo Zhou	O DNA estava degradado.	_____	_____
6	Protocolo segundo Zhou + Nycodens	ocorreu extração de DNA, mas de baixo peso molecular de ~15 a 20kb.	O DNA apresentava ainda uma coloração marrom e não foi purificado.	_____
7	Protocolo segundo Zhou modificado	ocorreu extração de DNA com ~25kb.	O DNA foi purificado utilizando o kit GFX PCR: <i>DNA and gel band purification</i> (Invitrogen). O DNA fragmentou ficando com baixo peso molecular.	As amostras não foram amplificadas.
8	Idem ao 7	ocorreu extração de DNA em grande quantidade. Fragmentos de DNA ~ 25kb.	Foi realizada o protocolo de eluição em gel de agarose. Pouca quantidade de DNA e algumas amostras degradaram.	As amostras não foram amplificadas.

(Continua)

	Método de Extração	Resultados da Extração	Método de Purificação	Teste de Amplificação de 16S rDNA ou Digestão com Enzimas de Restrição
9	Idem ao 7	ocorreu extração de DNA em grande quantidade. Fragmentos de DNA 25kb.	Duas purificações sucessivas, sendo uma com o protocolo de eletroeluição e em seguida modificação no processo de precipitação do DNA.	As amostras não foram amplificadas.
10	Idem ao 7 + adição de guanidina 0,01M no tampão de extração.	ocorreu extração de DNA em grande quantidade. DNA com fragmentos de 30kb.	Duas purificações sucessivas, sendo uma com o protocolo de eletroeluição e em seguida modificação no processo de precipitação do DNA. Foi utilizado o kit GFX TM DNA (Invitrogen) para eluição do DNA, houve fragmentação do DNA.	A amostra de DNA foi submetida à digestão com a enzima Hind III, não havendo digestão.
11	Protocolo segundo Zhou com modificações no processo de precipitação do DNA	ocorreu extração de DNA em grande quantidade. DNA com fragmentos de 30kb.	Foi realizado o protocolo de eletroeluição em gel de agarose.	O DNA foi digerido com a enzima BamHI. Não houve digestão das amostras.
12	Protocolo segundo Simonet <i>et al.</i> , 2001. Gradiente de nycodenz	Não houve extração de DNA.		
13	Extração de DNA utilizando kit Ultra Clean Mega Soil DNA da Mo Bio	ocorreu a extração de DNA.	_____	Foram realizadas digestões: somente com a enzima BamHI com a enzima EcoRI e uma dupla digestão utilizando EcoRI e BamHI. Não houve digestão do DNA.
14	Idem ao 13 com algumas alterações nos passos de lavagem e passagem pela coluna (2x).	ocorreu a extração de DNA que ficou com coloração mais clara. O DNA obtido tem o tamanho ~de 50kb.	_____	O DNA foi amplificado com primers 16S rDNA e houve digestão do DNA com a enzima HindIII.

(conclusão)

O protocolo ideal para a extração de um DNA com alto peso molecular foi obtido ao utilizar o kit Ultra Clean Mega Soil DNA da Mo Bio. A princípio a extração de DNA foi feita utilizando na íntegra as recomendações contidas no kit, porém este DNA não apresentou pureza suficiente, pois não ocorreu a digestão com enzimas de restrição e nem a amplificação por PCR, demonstrando a co-extração de contaminantes. Foram necessárias modificações em

várias etapas durante a utilização do Kit para a obtenção de DNA de solo puro e de alto peso molecular, incluindo: duas lavagens da amostra de solo com a solução S4 para a remoção de contaminantes; uma tripla purificação, sendo a primeira e a segunda feita em uma única coluna e a terceira numa coluna nova. Para complementar a purificação, o DNA foi precipitado adicionando 10 mM Guanidina, etanol absoluto e NaCl 5M seguido de incubação overnight a -20 °C.

O DNA purificado foi observado em gel de agarose 6%. Como resultado foi obtido DNA com alto peso molecular ~ 50kb e sem contaminantes observado através dos resultados da amplificação por PCR, utilizando *primers* universais ao Domínio Bactéria e, digerido com enzimas de restrição. Para as amplificações e digestão com enzima de restrição *Hind* III, o DNA foi diluído 1:10.

5.3 Amplificação dos fragmentos de DNA do solo com *primers* para o gene que codifica para cetosintase das vias de PKS tipo I e tipo II

Para a bioprospecção de genes biossintéticos de policetídeos em DNA ambiental, foi realizada a amplificação por PCR utilizando conjuntos de *primers* degenerados descritos na literatura, específicos para os genes presentes nas vias de PKS I (Tabela 3) e PKS II (Tabela 4). Os *primers* utilizados para as amplificações são complementares a regiões altamente conservadas de genes que codificam enzimas essenciais da biossíntese de policetídeos, as sintases de policetônicos (PKSs). Os *primers* para a detecção de PKS tipo II são complementares a regiões homólogas do gene *KS α* de *Streptomyces spp.* (Metsa-Ketela *et al.*, 1999). Para a detecção de PKS tipo I, os *primers* utilizados são complementares a regiões com homologia aos genes que flanqueiam sítios ativos das enzimas PKS tipo I em actinomicetos (Courtois *et al.*, 2003).

A. Seqüência dos *primers* para amplificação de genes relacionados à biossíntese de policetídeos do tipo I:

Para amplificação de fragmentos relacionados à biossíntese de PKs tipo I foi utilizada a técnica de multiplex, sendo que, na mesma reação foram utilizados quatro primers (Tabela 4).

Tabela 4. Seqüências dos primers degenerados utilizados para a amplificação do gene KS de PKS tipo I.

Seqüência	Autor
5'- CCSCAGSAGCGCSTSTTSCTSGA-3'	COURTOIS <i>et al.</i> , 2003.
3'- GTSCCSGTSCCGTGSGTSTCS-5'	COURTOIS <i>et al.</i> , 2003.
5'- CCSCAGSAGCGCSTSTCTSGA-3'	COURTOIS <i>et al.</i> , 2003.
3'- GTSCCSGTSCCGTGSGCCTCSA-5'	COURTOIS <i>et al.</i> , 2003.

(Símbolo dos *primers* degenerados: S= C ou G).

A padronização das reações de PCR também foi realizada a partir da utilização de diferentes condições de amplificação e concentrações de reagentes. O DNA somente amplificou quando diluído 10X em uma solução de guanidina a 100 mM, tanto para a amplificação com *primers* PKS I quanto PKS II. Para a amplificação foi realizado um gradiente de temperatura de anelamento do *primer* e a condição ideal para a amplificação foi: tampão de reação 1 X (20 mM Tris-HCL pH 8,4; 50 mM KCL); 2 mM de MgCl₂; 5% de DMSO; 200 µM de dNTP's (Invitrogen); 0,6 µM de cada *primer*; 0,08 U de *Taq* polimerase (Invitrogen). Os parâmetros usados no termociclador foram: 1 ciclo inicial de 96 °C por 5 minutos; 1 ciclo de 1 minuto a 64 °C; 1 ciclo de 72 °C por 1 minuto; 29 ciclos com desnaturação de 1 minuto a 95 °C, anelamento de 1 minuto com temperaturas entre 55,8 °C a 61,1 °C, tempo de extensão de 1 minuto a 72°C e 1 ciclo de extensão final de 10 minutos.

As temperaturas ideais para a amplificação do DNA do solo foram: 57,4 °C e 60,5 °C. O fragmento amplificado na temperatura de 60,5 °C foi clonado no vetor pGem para a construção da biblioteca.

B. Seqüência dos primers para amplificação de genes relacionados à biossíntese de policetídeos do tipo II:

A figura 13, ilustra o cluster gênico que contempla os 3 genes, conhecidos como PKS mínima, presentes nas vias de produção de policetônicos da classe PKS tipo II.

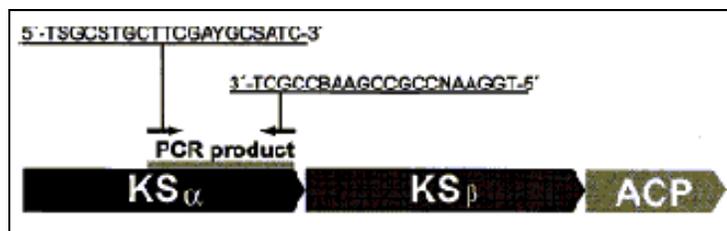


Figura 13. Seqüências e sítios de anelamento dos primers degenerados no cluster de PKS mínima para PKs tipo II de *Streptomyces*. KS α : β -cetoacil sintase, KS β : β -cetoacil sintase e ACP: proteína carreadora de acil (Metsa-Ketela *et al.*, 1999).

A padronização das reações de PCR foi realizada a partir da utilização de diferentes condições de amplificação e concentrações de reagentes. Foi realizado um gradiente de temperatura de anelamento do *primer* e a condição ideal para a amplificação foi: tampão de reação 1 X (20 mM Tris-HCL pH 8,4; 50 mM KCL); 2 mM de MgCl; 5% de DMSO; 200 μ M de dNTP's (Invitrogen); 0,8 μ M de cada *primer*; 0,08 U de Taq polimerase (Invitrogen). Os parâmetros usados no termociclador foram: 1 ciclo inicial de 96 °C por 5 minutos; 30 ciclos com desnaturação de 1 minuto a 94 °C, anelamento de 1 minuto com temperaturas entre 59 °C a 62,3 °C, tempo de extensão de 1 minuto a 72 °C e 1 ciclo de extensão final de 10 minutos. As temperaturas ideais para a amplificação do DNA foram de 59°C, 60,7°C e 62°C. Estes três fragmentos amplificados DNA podem conter seqüências diferentes e, portanto, foram clonados em vetor pGEM para construção da biblioteca metagenômica.

Tabela 5. Seqüências dos primers degenerados utilizados para a amplificação do gene KS α de PKS tipo II.

Seqüência	Autor
5'- TSGCSTGCTTCGAYGCSATC-3'	Metsa-Ketela <i>et al.</i> , 1999.
3'- TCGCCBAAGCCGCCNAAGGT-5'	Metsa-Ketela <i>et al.</i> , 1999.

Símbolo dos *primers* degenerados: S= C ou G; Y= C ou T; B= C, G ou T e N= A, T, C ou G.

C. Controles:

Tabela 6. Microorganismos utilizados como controle para as amplificações de genes biossintéticos de policetônicos PKS I e PKS II.

Microorganismos	Características do controle
<i>Streptomyces avermitilis</i>	Produtor de PKS tipo II
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Produtor de PKS tipo I e PKS tipo II

5.4 Construção da biblioteca metagenômica PKS I e PKS II

A partir dos produtos amplificados correspondentes aos genes catabólicos da amostra de DNA do solo, foram construídas duas bibliotecas metagenômicas para análise de similaridade dos genes das vias dos policetídeos I e II com as sequências referências depositadas no Genbank. Os fragmentos de DNA de solo amplificados com *primers* KS I e II nas temperaturas mencionadas foram clonadas utilizando-se o Kit pGEM-T *easy* (Promega), conforme instruções do fabricante. Após o preparo da reação, o sistema de ligação foi incubado por 7 h a 25 °C. Para a clonagem utilizou-se 5µl da ligação, com a proporção de inserto:vetor de 3:1 e, para transformar células de *E.coli* XL1Blue competentes. A eficiência de transformação foi de 10⁶ transformantes µg⁻¹ DNA. A transformação foi realizada por choque térmico. Após a adição da ligação nas células competentes, o tubo foi aquecido em banho maria à 42 °C por 1 minuto e 30 segundos em seguida colocado 1 minuto no gelo. Para a recuperação das células foi adicionado ao tubo 500 µl de meio Luria-Bertani (LB; Bertani, 1951) (NaCl 10 g/L; Triptona 10 g/L; Extrato de levedura 10 g/L) e levado a incubação a 37°C por 1 hora. Em seguida a transformação foi plaqueada em meio LB Agar, acrescido de ampicilina (USB; 100 µg/ml) e incubado a 37 °C por 16 horas, sendo transferidas para geladeira até o repique das colônias transformantes. As colônias selecionadas foram passadas para placas de 96 poços e crescidas em 150µl de meio LB com ampicilina (USB; 100 µg/ml) à 37 °C por 16 horas e em seguida adicionados 50 µl de glicerol 60%, para preservação das células, que são acondicionadas à temperatura de -70 °C.

5.5 Sequenciamento e análise filogenética dos genes PKS I e PKS II

A confirmação dos insertos foi realizada após a extração do DNA plasmidial dos clones tanto para a biblioteca PKS I e PKS II, utilizando o protocolo de MiniPrep (Maniatts, 1986) e amplificados por PCR com *primers* complementares aos sítios de clonagem do plasmídeo pGEM-T *Easy Vector*. O conjunto de *primers* empregados para essa amplificação foi M13r (5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3') e M13f (5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3').

Os plasmídeos contendo inserto de aproximadamente 620 a 700 pb, tanto para PKS I, quanto para o gene PKS II foram sequenciados em sequenciador automático MegaBace (Amersham Biosciences), empregando o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems* (Amersham Biosciences).

As sequências obtidas com cada conjunto de *primers* empregados neste estudo foram analisadas com auxílio do programa Phred/Phrap para verificação da qualidade das bases. Para análise de similaridade, as sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram comparadas com as sequências depositadas no GenBank, utilizando respectivamente os programas Blastn e Blastx (Altschul *et al.*, 1997) do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Mega 4). A obtenção das sequências consenso foi realizada utilizando o programa *Chromas Procurrent Version 1:34*.

Após obtenção das sequências “consenso”, as linhagens foram exportadas em formato FASTA, formatação utilizada para inferência filogenética a partir do programa MEGA. As construções das árvores filogenéticas para os clones das bibliotecas de PKS I e PKS II, foram realizadas empregando o alinhamento múltiplo dos nucleotídeos dos genes de poliketídios sintase, respectivamente, com sequências recuperadas do Genbank. O alinhamento foi feito utilizando o programa CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1997).

As árvores filogenéticas foram construídas pelo método de *Neighbour-Joining* com teste de *bootstrap* em 1000 réplicas para calcular a confiabilidade da árvore. No caso do método de *Neighbour-Joining* foi utilizado o modelo de distância *p* para comparação de topologia.

5.6 Isolamento de Bactérias do Solo

Para o isolamento de bactérias “não-cultivadas” utilizamos dois protocolos descritos por Janssen com modificações.

O primeiro protocolo (A) testado foi a utilização do meio de cultivo AV ágar (0,08 g/L de caldo nutriente; 15 g de gelatina e 0,6 mM de CaCl₂; pH 6,0) (Jansen, 2000) suplementado com ampicilina e cicloheximida (100 µg/ml). A adição de substâncias químicas inibidoras do crescimento de determinadas populações de micro-organismos no

meio de cultura pode tornar as avaliações mais específicas. Utilizados 10 g de amostra de solo que foi submetido às temperaturas de 37 °C e 70 °C por 1 hora. Em seguida o solo foi ressuspensão em tampão fosfato de potássio (1 M, pH 8,0) e, agitado a temperatura ambiente nos tempos de 2h, 5h e 12h. Após estes períodos o solo foi centrifugado a 10000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente. Alíquotas do sobrenadante foram semeados em meio de cultura AV. As placas de cultura foram incubadas no escuro a temperatura ambiente por 6 semanas.

Foi utilizado outro protocolo (B) descrito por Jansen (2002) com as seguintes modificações: utilizamos 2,50 g de solo; ao solo foi adicionado 100 ml de água destilada estéril e submetido à agitação em shaker (rotação de 200 rpm por 15 minutos), à temperatura ambiente; sonicadas por 20 minutos. Ao final do protocolo alíquotas do sobrenadante foram diluídos em tampão PBS e plaqueados em meio DNB (0,08 g/l de Nutrient Broth; 15 g de Gelatina; 0,6 mMol/l de CaCl₂, pH 6,0). As placas foram vedadas e incubadas no escuro a temperatura de 25 °C.

5.6.1 Extração de Metabólitos Intracelular e Extracelular das Bactérias Isoladas do solo

a) Cultivo de Bactérias: Uma alíquota da suspensão de cultura das bactérias isoladas do solo (armazenadas em glicerol a – 20 °C) foi adicionada em 50ml de meio R5 modificado (R5M) (Tabela 6), cultivados a 28 °C por 48h em agitação a 200 rpm, para ativação das células. Após o período um volume de 5ml foi retirado deste meio e transferido para 50ml do mesmo meio R5M e cultivados a 28 °C por 4 dias em agitação a 200 rpm. Ao final do cultivo as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos a 10 °C, com o sobrenadante (meio de cultura) seguiu-se o protocolo de extração de metabólitos extracelular e com o *pellet* celular seguiu-se com a extração intracelular de metabólitos.

b) Extração Intracelular e Extracelular de Metabólitos:

❖ Metabólito Intracelular:

O *pellet* celular foi pesado e para a extração intracelular foi adicionado 2 vezes o peso do micélio de Metanol, as culturas foram deixadas durante a noite em agitação protegidas da luz (evitar degradação). Após este período o micélio foi filtrado para recuperar o solvente

e concentrado em rotavapor. O frasco foi pesado para estimar a concentração do extrato e foi recuperado eluindo com 2ml de metanol, proteger o frasco da luz. Os frascos foram armazenados a -20 °C.

❖ Metabólito Extracelular:

Ao líquido fermentado (meio de cultura) foi adicionado $\frac{3}{4}$ do volume de Acetato de Etila (Taddei, 2006; Bonfim 2008), os frascos foram protegidos da luz e deixados durante a noite em agitação a temperatura ambiente. O solvente foi recuperado em funil de separação, nesta etapa formam-se duas fases, o funil foi agitado para a separação e foi adicionado 30% do volume de Acetato de Etila, desprezou-se o meio de cultura. O solvente foi, então, recuperado. Ao solvente foi adicionado sulfato de sódio anidro até que o extrato fique translúcido, este foi filtrado e concentrar em rotavapor. Os frascos foram pesados para estimar a concentração dos extratos e recuperados com 2 ml de Metanol. Os extratos extracelulares foram armazenados a - 20 °C.

Em seguida prossegui-se com a leitura do extrato intracelular e extracelular em espectrofotômetro para verificar os comprimentos de ondas dos compostos bioativos. Furlan (2004) cita o comprimento de onda para o antibiótico antraciclina.

Tabela 7. Formulação do caldo R5 modificado (segundo Hopwood, 1985).

Componentes	g/L
Glicose	10
Extrato de levedura	5
Casaminoácidos	0,10
Tris	3,09
Sulfato de potássio	0,25
MgCl ₂ . 6H ₂ O	10,12

*O meio foi esterilizado em autoClave por 15 minutos a 121 °C.

Após a autoClavagem foram adicionados 2 mL de uma solução de elementos traços (Hopwood, 1985), 10 mL de uma solução a 0,5% de KH₂PO₄ e 4 mL de uma solução a 5 M de CaCl₂ . 2H₂O.

5.6.2 Ensaio de Antibiograma Utilizando os Extratos Metabólicos das Bactérias do Solo

Foi realizado o antibiograma para verificar a susceptibilidade/resistência de uma bactéria a composto bioativo, intracelular e extracelular extraídos das bactérias do solo. Para isto, utilizou-se disco de difusão de papel filtro depositado sobre a superfície do meio Nutrient Broth (NB, Gibco) onde se inoculou, por espalhamento, 100 µl de uma cultura bacteriana previamente crescida em meio NB líquido a uma DO de 0,5-0,6 nm. A placa foi incubada a 37 °C por cerca de 24 horas. A formação de um halo transparente sobre a superfície do meio, ao redor do disco, indica uma região com ausência de crescimento bacteriano, revelando a ação inibitória do agente antimicrobiano sobre a bactéria teste. No nosso caso o meio NB e NA foram os melhores para este tipo de teste.

5.6.3 Ensaio de Antagonismo com as bactérias isoladas do solo

Foi realizado o ensaio de antagonismo das bactérias do solo contra os fungos, *A.flavus*, *Penicillium commune*, *Fusarium verticillioides*, para verificar a capacidade de inibição das bactérias isoladas. As culturas de fungos foram cedidas pelo laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Com a alça de platina foi feita uma estria das linhagens isoladas do solo no centro da placa de *petri* contendo meio de cultura R5M. As placas foram incubadas a 30 °C por 4 dias. Após o período de crescimento, foi feita estria dos fungos testes nas laterais da placa de *petri*. A placa foi novamente incubada, mas a temperatura ambiente e no escuro de 3 a 4 dias. Como resultado foi verificada a inibição do crescimento dos fungos e feita a medição da inibição. Foi realizado o mesmo procedimento com as bactérias testes.

5.6.4 Análise dos extratos brutos em CCD

A cromatografia de camada delgada (CCD) geralmente é o próximo passo, para uma análise inicial para separar o extrato bruto e testar sua atividade. Consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial. Técnica que permite a separação de componentes em breve espaço de tempo, grande reprodutibilidade e baixo custo. Desta forma, 10µl dos extratos intracelulares e extracelulares foram analisados em diferentes sistemas de solventes (vide Resultados).

5.6.5 Análise dos extratos por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência)

As amostras dos extratos das bactérias isoladas do solo foram dissolvidas em MeOH na concentração de 1mg/mL filtradas com filtros para seringa de teflon (3 mM, 0,45 µm) (Corning, NY).

A análise por CLAE foi realizada em um sistema Shimadzu (Kyoto, JP) constituída de duas bombas analíticas modelo LC 10AD, um detector de arranjo de diodos SPD-M10Avp, um controlador SCL-10Avp, e um auto-injetor SIL 9A. O programa do sistema Shimadzu Class VP foi empregado para o tratamento dos dados. Utilizou-se uma coluna analítica Luna C18 (Phenomenex[®], 25 cm x 4,6 mM, 5 µm), sendo a fase móvel metanol e água em um fluxo de 1 mL/min e eluída com o gradiente, no qual, de 0 a 2 min, a porcentagem de metanol foi mantida em 20 %, em 25 min aumentada até 100 % e mantida até 30 min a 100%.

5.6.6 Análise dos extratos por CLAE/EM (Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas)

A análise por espectrometria de massas foi realizada em um equipamento Quattro II triploquadrupolo (Micromass, Manchester, U.K.) em modo “electrospray” positivo, voltagem docapilar 4,5 kV e do ski mMer 40 V, os fluxos do gás nitrogênio nebulização e secagem foram de 250 e 30 L/h. O fluxo da amostra inserida no espectrômetro de massa foi de 180 µL/min. O sistema de CLAE (Shimadzu) consistia

em duas bombas analíticas LC-10ADvp, um detector UV/Vis SPD 10ADvp em 280 nm, um controlador SCL 10Avp, injetor automático SIL 10ADvp e forno para colunas CTO 10Avp. As amostras foram analisadas utilizando-se como fase móvel MeOH (+ 0,5 % de ácido fórmico) e H₂O (+ 0,5 % de ácido fórmico) em um gradiente, no qual de 0 a 25 min a porcentagem de metanol foi de 50 a 100 %, mantida nesse patamar até 30 min. O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min porém o fluxo de injeção no massas foi de 100 µL/min utilizando-se um “splitter”.

5.6.7 Análise molecular das bactérias do solo através do gene rDNA 16S

Para verificar a filogenia das bactérias isoladas do solo, o DNA cromossômico foi extraído segundo protocolo para extração de DNA de Actinomicetos (Kieser, *et al.*, 2000) e foi amplificado por PCR utilizando *primers* para o Domínio Bactéria, 16S rDNA: 27f (5'-AGAGTTTGATCC/ATGGCTAG-3', LANE, 1991) e 1401r (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3', HEUER *et al.*, 1997). A reação de amplificação foi otimizada e constitui-se de 0,2 µM de cada *primer*; 200 µM de dNTP's; 1X de tampão para PCR (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) totalizando um volume final de 25 µL. Como controle positivo, foram utilizados 100 ng de DNA genômico *Streptomyces avermitilis*. O programa de amplificação inicia com 1 ciclo *hot start* de 5 minutos a 95 °C; 1 ciclo de 5 minutos a 94 °C; 34 ciclos de 1 minuto a 94 °C; 5 minutos a 63,5 °C e 1 minuto a 72 °C, com um ciclo de extensão final de 10 minutos a 72 °C. Todas as amplificações a partir da linhagem controle mostraram produtos com tamanho esperado de ~1500 pb.

6 Resultados e Discussão:

6.1 Análise Independente de Cultivo: Bioprospecção

Devido à grande biodiversidade de micro-organismos encontrada no solo e as dificuldades técnicas em acessar uma porção significativa destes, optamos por utilizar a técnica do metagenoma com o objetivo de caracterizar diretamente genes metabólicos presentes nas vias dos policetídeos.

Este trabalho é inovador por utilizar amostras de solo de Mata Atlântica, uma fonte ainda inexplorada de diversidade bioquímica, utilizando abordagem independente de cultivo (metagenoma) e dependente de cultivo.

A amostra de solo foi coletada na região da IlhaBela. O local da coleta apresenta uma mata preservada. Esta amostra foi analisada, quanto à atividade microbiana e quantidade de células bacterianas e fúngicas (contagem por diluição do solo não sendo verificada a viabilidade), pelo Departamento de solos e nutrição de Plantas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo em Piracicaba (SP) (Tabela 8 e Figura 14).

Tabela 8. Número provável de propágulos por grama de solo.

Solo	Nº. de bactérias	Nº. de Fungos
Amostra 1	$50,54 \times 10^6$	$5,05 \times 10^3$

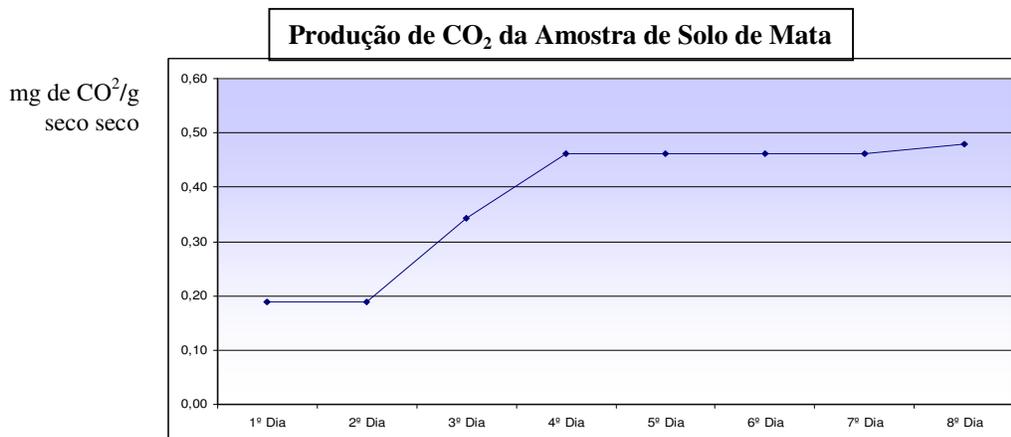


Figura 14. Produção diária de CO₂ na amostra de solo armazenada a – 20 °C.

Os procedimentos na preservação e o período de armazenamento da amostra de solo são de grande importância na avaliação da comunidade microbiana. As modificações das condições físicas, químicas e biológicas desta amostra devem ser minimizadas, visto que a atividade dos micro-organismos é um processo dinâmico ao longo do tempo dependendo das condições ambientais (Andrade & Hamakawa 1994). A temperatura de armazenamento foi significativa influenciando na atividade de micro-organismos no solo.

Metagenoma pode ser definido como análise do DNA total (genomas) presente em amostras do meio ambiente. Esta estratégia tem sido usada com bastante sucesso para acessar qualquer informação genética disponível em uma amostra até mesmo os micro-organismos recalcitrantes estudados por outros métodos. O sucesso desta técnica depende basicamente da eficiência de extração do DNA ambiental. A maior dificuldade foi em obter um DNA de qualidade e com alto peso molecular já que estávamos procurando regiões gênicas que ficam organizados em grupos (clusters) com tamanho que variam de 25 a 100 kb.

Os solos de florestas são ricos em matéria orgânica, uma desvantagem para purificação do DNA já que muitos dos compostos, como os ácidos húmicos, são co-extraídos junto com o DNA. Estes compostos orgânicos, geralmente presentes em amostras de DNAs e RNAs de amostras ambientais, interagem com o DNA genômico total, inibindo a ação da *Taq* DNA polimerase no PCR, interferindo na atividade de enzimas de restrição, reduzindo a eficiência de ligação e transformação e afetando a especificidade da hibridação do DNA com sondas (Zhou *et al.*, 1996). Entretanto, muitos autores tem elaborado várias técnicas de extração de DNA do solo, para diversos estudos, porém não há um protocolo padrão a ser seguido já que as amostras diferem quanto a quantidade de compostos orgânicos. Utilizamos os dados da literatura para estabelecer um protocolo apropriado para nosso objetivo. Todos os protocolos de extração de DNA ambiental testados utilizaram a lise direta das células na matriz do solo, posterior extração e purificação. Foram testados 14 protocolos na íntegra e com modificações (material e métodos). Deparamo-nos com diversas dificuldades como: rápida degradação do material e impurezas que foram co-extraídas. Observamos que, em geral, estes protocolos não eram ideais para nossa amostra de solo, pois obtivemos somente DNA de baixo peso molecular e de baixa qualidade. Para inferir a pureza dos fragmentos de DNA do solo obtidos, após cada processo de extração e purificação testado, foram realizadas digestões com enzimas de restrição e amplificação por PCR com *primers* (iniciadores) homólogos às regiões conservadas do gene rDNA 16S do Domínio Eubactéria (Bellicanta,

2004).

Dentre os protocolos avaliados neste trabalho foram utilizados reagentes que são capazes de solubilizar os ácidos húmicos, como por exemplo, polivinilpirrolidona (PVPP) e brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB). Porém, não foram eficientes para purificar a amostra de solo. O protocolo amplamente utilizado para extração de DNA de solo descrito por Zhou (1996) foi empregado na íntegra e com modificações, não sendo apropriado para a amostra de solo de Mata Atlântica.

A obtenção de DNA do solo livre de matéria orgânica e com alto peso molecular ocorreu ao utilizar um kit de extração de DNA de solo (kit Ultra Clean Mega Soil DNA da Mo Bio) (Figura 15). Nos primeiros experimentos não obtivemos DNA puro e precisamos fazer algumas modificações no protocolo do kit. Este kit combina vários passos para a lise completa dos micro-organismos, como: aquecimento, detergentes e ruptura mecânica por pérolas (*beads*) especiais. Outros kits já tinham sido utilizados como DNA Wizard clean up e GFXTM DNA, na tentativa de purificação do DNA.

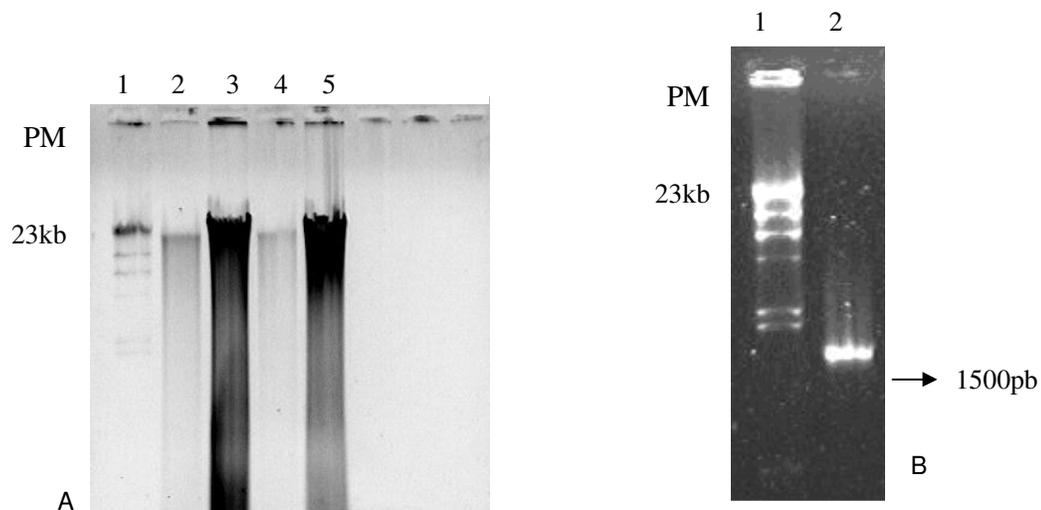


Figura 15. Extração e amplificação por PCR do DNA ambiental. **A)** Extração de DNA do solo com kit Ultra Clean Mega Soil DNA da Mo Bio: **1)** PM: 2µl de λ Hind III; **2) e 4)** 3µl de DNA do solo digerido com a enzima Hind III; **2 e 5)** 2 µl de DNA do solo bruto; **B)** Amplificação do DNA solo com *primers* rDNA 16S em gel de agarose 0,6%: 1) PM: 2µl de λ Hind III; 2) 5 µl de DNA solo amplificado ~1500pb.

A etapa inicial para estudos metagênicos como o isolamento do DNA ambiental é a etapa crucial e difícil, onde é necessário fazermos algumas considerações. Primeiro, a metodologia empregada para lise de células deve ser aplicada com cautela para evitar a ruptura do DNA. A comunidade microbiana do solo é composta por arqueas, bactérias e

protistas possuindo parede celular com características próprias e, assim, variam em sua susceptibilidade à lise. Em segundo, o DNA deve ser livre de substâncias contaminantes que interferem com seu processamento.

Apenas o método desenvolvido neste trabalho, foi adequado para obtenção de DNA livre de contaminação de uma amostra de floresta tropical. Com o método foi possível obter DNA >50 kb, com pureza suficiente para seguir com as análises de bioprospecção.

Devido às limitações das diversas técnicas abordadas para analisar o DNA em bibliotecas metagenômicas, como baixa ou nenhuma expressão do cluster biossintético de interesse, trabalhos da literatura evidenciam que um número grande de insertos ou sequências repetidas na bactéria hospedeira como *E. coli* podem causar mutações no genoma do hospedeiro, devido à instabilidade do genoma, inviabilizando a clonagem pela não expressão do gene de interesse (Yang *et al.*, 2006). Em se tratar de metagenoma este fato pode se tornar um grande problema. A análise abordada neste estudo é baseada na técnica da sequência-específica, onde o DNA ambiental foi analisado por PCR utilizando *primers* para as regiões conservadas das enzimas policetídeos sintases I e II, para descoberta de novos genes.

Verificado a pureza e o tamanho do DNA do solo partimos para a segunda etapa do nosso projeto a bioprospecção de genes marcadores policetídeos.

Obtivemos um DNA metagenômico com tamanho suficiente para iniciar a bioprospecção de genes localizado sem clusters biossintéticos, sendo representativo da diversidade microbiana. Para esta estratégia foram realizadas as amplificações parciais dos genes, utilizando *primers* (iniciadores) degenerados específicos às regiões conservadas do gene presente na via biossintética de PKS I e PKS II em Actinomicetos. Os genomas de alguns actinomicetos já foram sequenciados, bem como, genes parciais dos clusters biossintéticos de bactérias, auxiliando nos estudos comparativos das sequências e sobre entendimento de como atuam essas sintases.

Os *primers* utilizados para a amplificação de genes PKS II foram desenhados por Metsa-Ketela e colaboradores (1999) que utilizaram o códon *usage* para *Streptomyces*. Inicialmente o DNA do solo não amplificou e tivemos que adequar o protocolo de amplificação. O DNA total do solo somente amplificou quando foi diluído em uma solução de guanidina (material e métodos). Os ácidos húmicos tem afinidade pela guanidina minimizando sua interação com o DNA. Neste sentido, o DNA foi, então, amplificado em diferentes temperaturas, tanto para o gene PKS I quanto para o gene PKS II (Figura 16). Nestas diferentes amplificações pode haver genes de diferentes micro-organismos e, por isso,

esses diferentes amplificados foram clonados em vetor pGEM. Desta forma construímos duas bibliotecas metagenômicas denominadas PKS I e PKS II. Na biblioteca PKS I o produto da amplificação do gene na temperatura 60,5 °C (amostra 10) foi clonado em pGEM, (não foi possível clonar o outro fragmento devido a pequena concentração de produto). Para a biblioteca PKS II três fragmentos amplificados para o gene foram clonados.

Com o fragmento clonado conseguimos isolar 50 clones de PKS I, sendo que após a confirmação do inserto de 600 a 700 pb, através da extração plasmidial, selecionamos 31 clones para serem sequenciados. Um fato interessante ocorreu somente com a biblioteca de PKS I, onde observamos uma inviabilidade da célula hospedeira *E. coli* linhagem XL1Blue utilizada para transformar. Após 5 dias as células guardadas a 4°C não cresciam mais em meio de cultivo apropriado. Os plasmídios dos clones analisados foram armazenados a -20 °C. No nosso caso as análises com clones contendo os insertos de PKS I teriam que ser estudados o mais breve possível antes de perder a linhagem. Como já mencionado há relatos somente de inviabilidade da célula hospedeira, no caso particular do DNA metagenômico, postulamos que os insertos de PKS I possam gerar algum composto tóxico à célula hospedeira.

Na biblioteca de PKS II, o DNA do solo foi amplificado em três diferentes temperaturas: 59 °C (amostra 1), 60,7 °C (amostra 5) e 62,3 °C (amostra 7). Estes fragmentos foram clonados no vetor pGEM e foram gerados 70 clones dos fragmentos obtidos na temperatura de 59°C; 70 clones dos fragmentos obtidos a 60,7 °C e 96 clones dos fragmentos obtidos a 62,3°C.

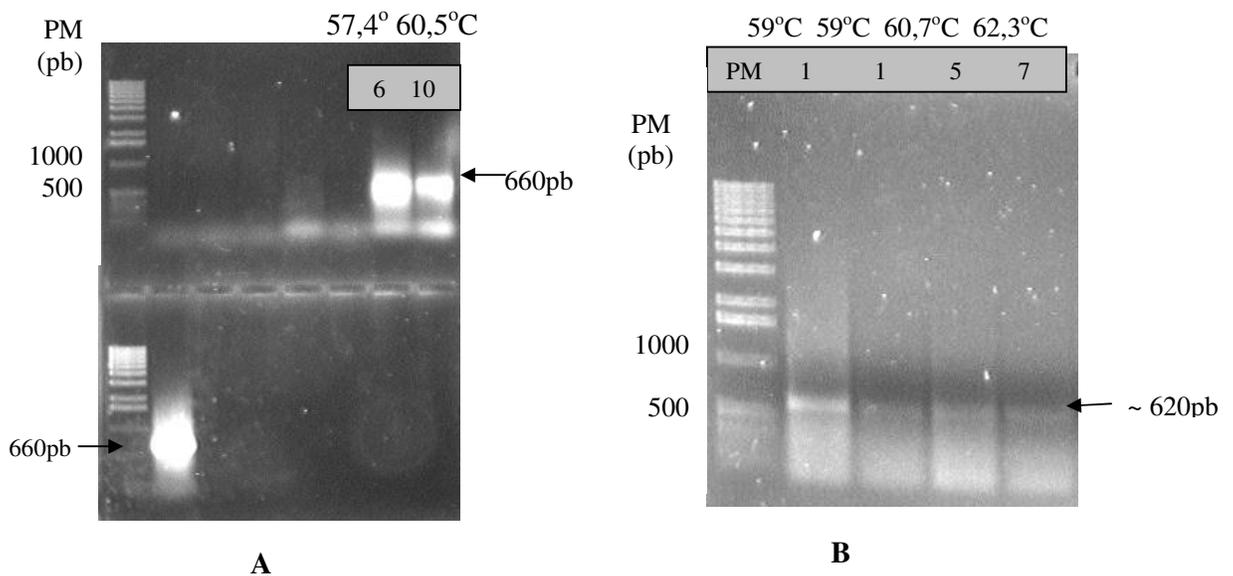


Figura 16. Amplificação do DNA metagenômico pela técnica de PCR com primers para PKS I e PKS II. **A)** DNA do solo amplificado com *primers* para PKS I, em diferentes temperaturas de 57,4°C e 60,5°C e controle *S. avermitilis*; **B)** DNA do solo amplificado com *primers* para PKS II, nas temperaturas de 59°C, 60,7°C e 62,3°C. Gel de agarose 1%.

Com as bibliotecas geradas alguns clones foram selecionados e sequenciados em Mega Base (material e métodos) em duplicata com os *primers* senso para os genes PKS I e PKS II. As sequências com baixa qualidade de sequenciamento foram desconsideradas. Obtivemos uma grande quantidade de sequências ruins em virtude dos *primers* utilizados serem degenerados ocasionando erros, neste caso repetimos o sequenciamento utilizando *primers* do vetor pGem M13. No total foram selecionados 31 clones da biblioteca PKS I, sendo que 18 clones tiveram boa qualidade de sequenciamento (duplicata) os quais foram utilizados nas análises de diversidade de genes PKS I.

Foram sequenciados 25 clones da biblioteca PKS II, sendo que 12 clones tiveram bons resultados no sequenciamento sendo analisados quanto sua diversidade gênica. Todas as sequências em duplicata foram alinhadas utilizando o programa Mega e a sequência consenso gerada foi analisada quanto a similaridade de sequências do Genbank.

As análises de sequências obtidas da biblioteca PKS I mostraram aproximadamente 68% de identidade com sequências depositadas no Genbank para o gene cetosintase de PKS I. Devido à complexidade e tamanho das sequências dos genes PKS I e PKS II (em torno de 14000 pb) as análises de diversidade foram complicadas, sendo necessários realizar múltiplos alinhamentos entre as sequências do Genbank e dos clones obtidos do solo.

Na Tabela 9, estão representados resultados obtidos com as sequências depositadas no Genbank, foi realizado alinhamento utilizando o programa Blastx.

Alguns trabalhos sobre diversidade de genes de PKS I em bibliotecas metagenômicas nos forneceram parâmetros para a construção da árvore. A maioria dos trabalhos consegue visualizar grupos de genes entre as divisões de bactérias, são poucos os que conseguem separá-los em grupos de compostos produzidos pelas bactérias referência, fazendo, assim, uma correlação com os achados na amostra analisada (Pang, *et al.*, 2008). A árvore foi construída baseando-se no alinhamento de sequências de proteínas com as sequências referências do Genbak

A maioria dos resultados obtidos com o alinhamento das sequências dos clones revelou uma maior similaridade com PKS I modular presentes nas divisões Actinobacteria, Proteobactérias e Cianobactérias (Figura 17). Este resultado é um indicativo de que o emprego dos *primers* degenerados desenhados para amplificar genes do gênero Actinomicetes amplifica genes homólogos pertencentes à micro-organismos filogeneticamente distintos. Uma vantagem para análise de diversidade gênica da cetosintase de PKS I.

Os clones analisados apresentaram heterogeneidade sendo necessário estudar várias sequências depositadas no Genbank. Entretanto, análise filogenética mostrou que dentro da divisão Actinobacteria as espécies de *Streptomyces* foram as mais predominantes.

A presença de organismos da mesma ordem em “clados” diversos é devido à diferença de composto produzido, podendo ter diferentes níveis de modificações pós-síntese.

Tabela 9. Análise da Biodiversidade das sequências de proteínas correspondentes aos genes PKS I

CLONES ^(a)	SIMILARIDADE	GENE	Tamanho (pb)	LINHAGEM ^(b)
KSI-1	80%	<i>angA1</i>	736	<i>Streptomyces eurythermus</i> (ABY21538.1)
KSI-5	80%	PKS I	736	Bactéria “nãocultivável” (ACC99582)
KSI-6	85%	<i>fscE</i> Policetídeo sintase (síntese de Candicidina)	736	<i>Streptomyces sp.</i> FR-008 (AAQ82567)
KSI-7	80%	policetídeos/ peptídeo sintase não ribossomal	736	<i>Myx oC oCcus xanthus</i> DK 1622 (ABG20988)
KSI-8	67%	<i>jerD</i>	736	<i>Polyangium cellulorum</i> (ABK32290)
KSI-13	78%	Policetídeo sintase	736	<i>Scytonema sp.</i> PCC 7110 (AAX44132)
KSI-14	81%	<i>onnB</i> * Policetídeo sintase (síntese antitumoral)	736	Bactéria “nãocultivável” Simbionte de Esponja (AAV97870.1)
KSI-15	65%	Domínio da cetosintase (PKS I)	736	<i>Scytonema sp.</i> PCC 7110 (AAW55365.1)
KSI-17	60%	β -cetosintase	668	<i>Nost oC punctiforme</i> PCC 73102 (YP_001866786.1)
KSI-18	67%	PKSI	656	Bactéria “nãocultivável” (ABG20983.1)
KSI-20	59%	PKS I	736	<i>Chondromyces cr oCatus</i> (CAQ18833.1)
KSI-22	88%	<i>ChlA1</i> PKS I	736	<i>Streptomyces antibioticus</i> (AAZ77693.1)
KSI-23	80%	β -cetosintase	736	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (YP325239.1)
KSI-24	74%	PKS I	736	<i>Nost oC sp.</i> PCC 7120 (NP486686.1)
KSI-25	77%	eritromicina sintase (PKS I) híbridocom NRPS	736	<i>Opitutus terrae</i> PB90-1 (YP_001818849.1)
KSI-30	82%	PKS	736	Bactéria “nãocultivável” (AAW84211)

^(a) Clones isolados da Biblioteca

^(b) Entre parênteses número de acesso no GenBank.

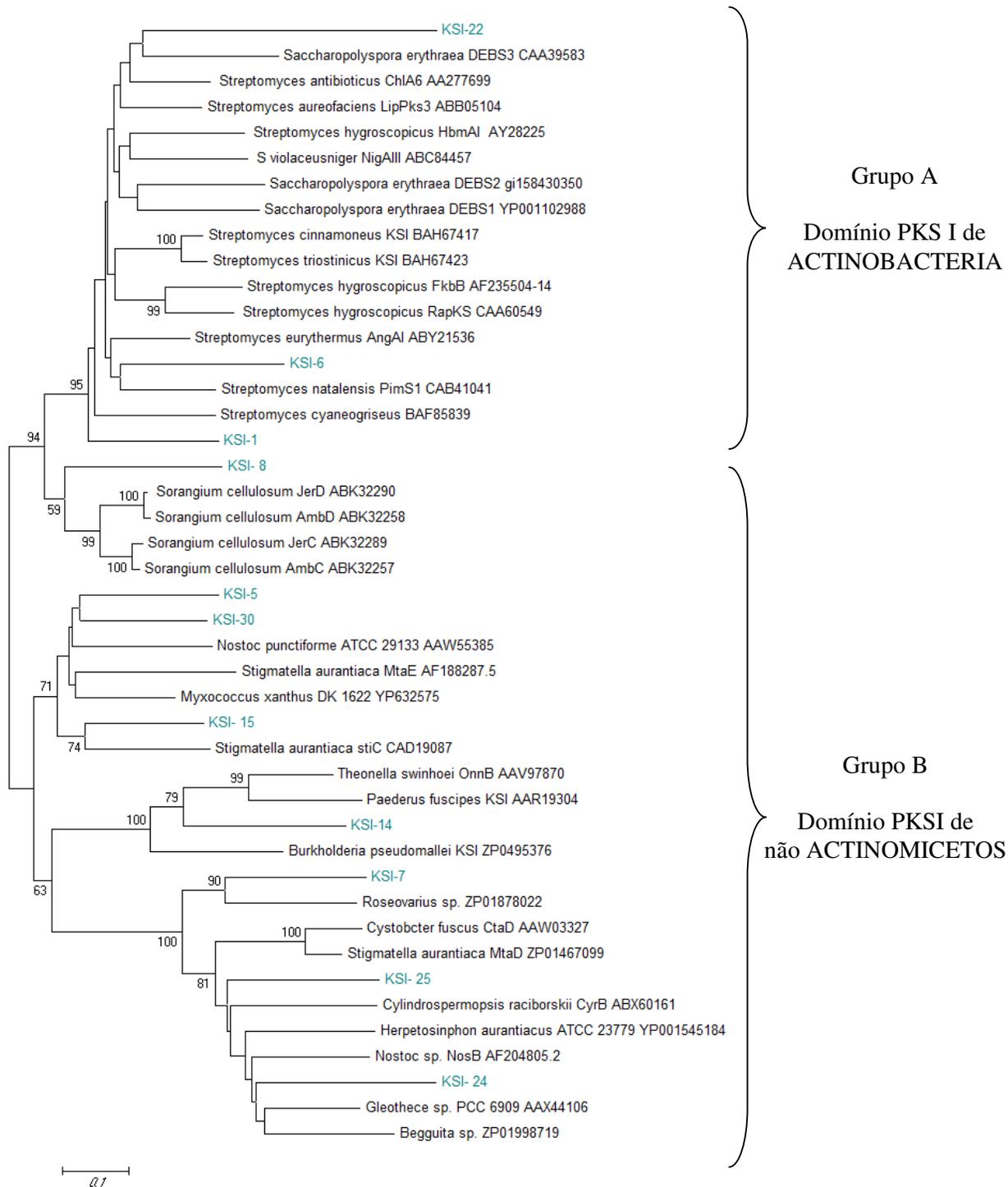


Figura 17. Análise filogenética das sequências dos genes de PKS tipo I a partir da amostra do solo. As linhagens referências foram obtidas do Genbank.

Na análise das sequências dos clones apresentaram uma região conservada composta dos seguintes aminoácidos CSSS sítio ativo do gene cetosintase da via PKS I. Com exceção dos clones KSI-24 e KSI-25 que apresentaram a sequência CSTS.

A árvore filogenética demonstra um primeiro grupo (A) formado exclusivamente por Actinomicetes evidenciando uma alta homologia entre os domínios de PKS entre espécies de *Streptomyces* (bootstrap de 94%). Este cluster está bem delimitado quanto à similaridade de sequências KSI, revelando uma variabilidade genética intra-específica (Figura 18 do ramo 1 da árvore). Neste agrupamento somente três clones apresentam similaridade com os Actinomicetes sendo KSI-22, KSI-8 e KSI-1. O clone KSI-22 possui similaridade com o módulo DEBS1 de *Saccharopolyspora erythraea* produtor da eritromicina, no entanto, na árvore observamos que a sequência do clone parece ter alguma divergência com as sequências do módulo DEBS3.

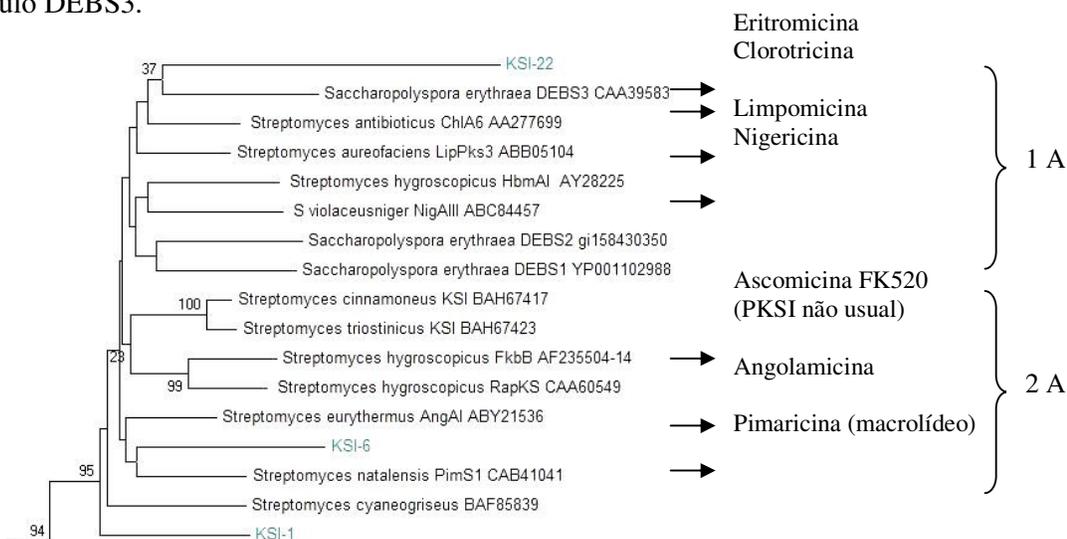
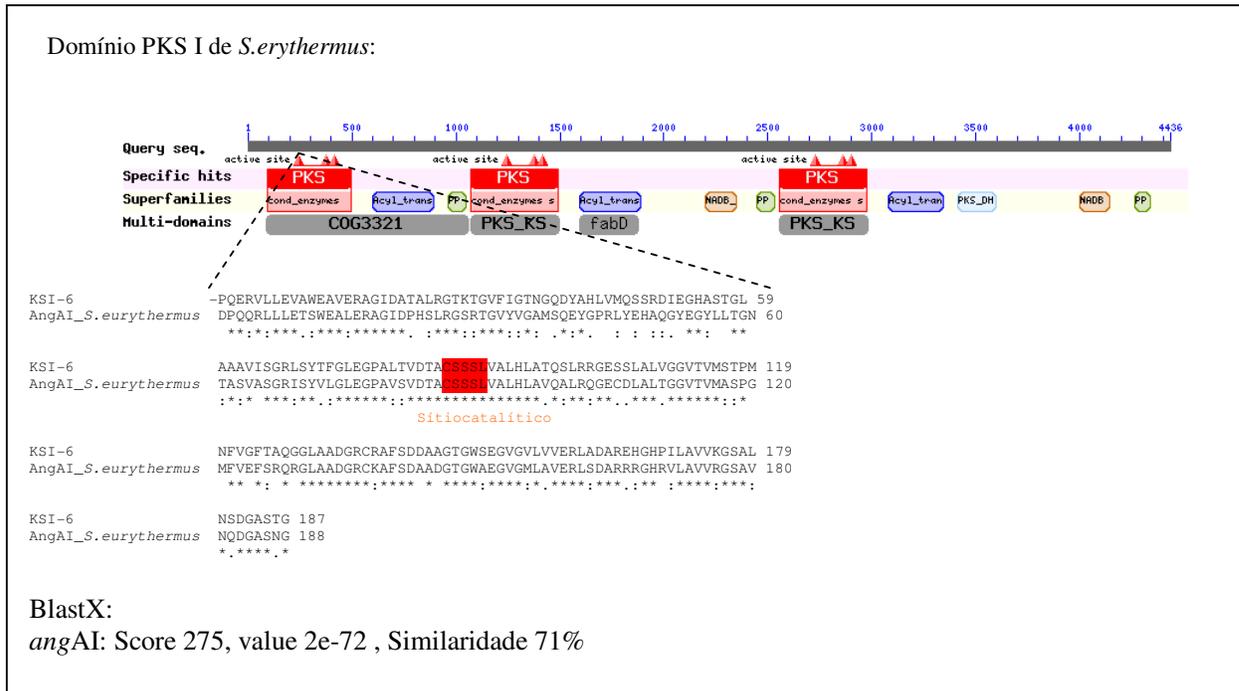


Figura 18. Primeiro grupo (A) da árvore filogenética (Actinobactéria).

No subgrupo 2 A obtivemos um resultado interessante onde micro-organismos produtores de macrolídeos agruparam-se com o clone KSI-6. Podemos observar que houve uma proximidade da KS do clone KSI-6 com o gene *angI* de *S. erythermus* ATCC 23956, produtor de angolamicina (Quadro 1). Os macrolídeos são formados via ciclização pela ação da policetídeo sintase tipo I. Esta enzima realiza várias condensações descarboxilativas nos ácidos carboxílicos iniciando sua síntese (Zotchev *et al.*, 2006; Borgos *et al.*, 2006). Estruturas como os macrolídeos produzidos por *Streptomyces*, são amplamente estudados devido a sua importante atividade antibactericida, antifúngica, inseticida, nematocida e

imunossupressora. A variabilidade da estrutura dos macrolídeos está relacionada com o tamanho do anel macrolactona, um exemplo, o antibiótico quinolidomicina. Esta estrutura permite a ligação de várias subunidades, como, peptídeos, açúcares e outros (Kleinkauf e Döher, 1997).

Quadro 1. Alinhamento parcial do gene cetosintase do clone KSI-6.



A Linhagem de *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyeticus* possui uma característica interessante como a presença de uma unidade extensora não usual, na via do PKS, produzindo o composto ascomicina FK520 um macrolídeo com atividade imunossupressora, antifúngica e neutrópica (Kai, *et al.*, 2000).

O gene cetosintase do clone KSI-1 embora possuir uma similaridade 68% com as espécies de *S. hygroscopicus* e *S. erythermus* formou um clado aparte, indicativo de um provável gene novo.

O segundo grupo (B) é formado por diversas divisões de bactérias. Encontramos alinhados ao clone KSI-8 seqüências da espécie *S. celluloseum* (Figura 19 e quadro 2).

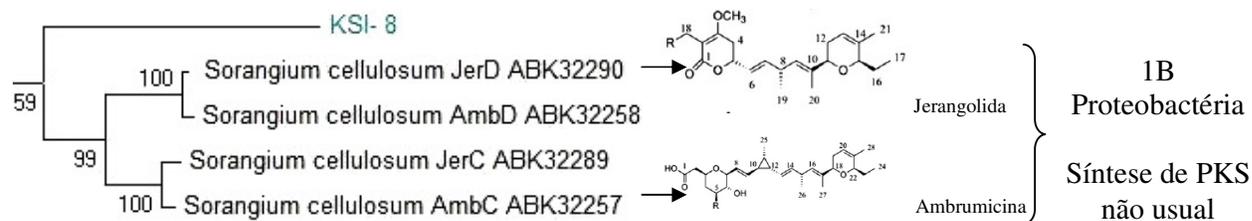


Figura 19. Subgrupo do segundo agrupamento (B) da árvore filogenética.

No agrupamento 1B a espécie de *Sorangium cellulosum* produz policetídeos via síntese PKS caracterizada como não usual. Produzem compostos como jerangolida e ambrumicina que possuem atividade antifúngica. Podemos verificar na molécula ambrumicina um anel (em pirâmide), com uma estrutura normalmente não encontrada em compostos policetídeos. A hidroxila deste composto pode conter um grupo amina metilado (Brayn *et al.*, 2000). A via de síntese desses tipos de compostos não está bem compreendida.

Quadro 2. Alinhamento entre oclone KSI-8 e os genes cetosintase de *S.cellulosum*.

JerD	DPQQRLLLECAWEALERAGVAPHTLEASATGVFVGLVYSYDYGRRLEHLEVFDGYVATGS	60
AmbD	DPQQRLLLECAWEALERAGLAPHSLEASATGVFVGLVYSYDYGRRLEHLEVFDGYVATGS	60
JerC	DPQQRLLLECAWEALERAGLAPHLEASATGVFVGLSVTDYGGRRLLHDPALDGYIATGT	60
AmbC	DPQQRLLLECAWEALERAGLAPHSLEASATGVFVGLSVTDYGGRRLLHEPEALDGYIATGT	60
KSI_8	DPQQRVLLLEVTVWEALEHAGLRSEDIEGSQTGVFVGLMFNDYAALLTAHLEQYDGYVTSGS	60
	*****:*** :*****:***: .. :*. * ***** .**.. * . * *****:***:	
JerD	FPSVSGRIAYTLGLRGPVAVTDTA CSSSLV SLHLACMSLRAGECDMALAGGATVMATPM	120
AmbD	FPSVSGRIAYTLGLRGPVAVTDTA CSSSLV SLHLACMSLRAGECDLALAGGATVMATPM	120
JerC	LPSVSGRIAYTLGLRGPAMTVDTA CSSSLV SLHLACMSLRAGECDMALAGGATVMATPM	120
AmbC	LPSVSGRIAYTLGLRGPVAVTDTA CSSSLV SLHLACMSLRAGECDLALAGGATVMATPM	120
KSI_8	SPSVAAGRVSYLLGLKGPVAVDTG CSSSLV SLHLACESLRSGGCDRALAGGVTLSTPM	120
	.:**:* * **:*:***:*****:***** ***** **:* * **:* * **:* **:	
	Sitiocatalítico	
JerD	AFIEFSRQRGMAPDARCKAFGAAANGIGPAEGCGILVLKRLSDARRDGDRLAVIRGSAV	180
AmbD	AFIEFSRQRGMAPDARCKAFGAAANGIGPAEGCGLLVLKRLSDARRDGDRLAVIRGSAV	180
JerC	AFIEFSRQRGTALDGRCKAFGAGADGAGWSEGCGILALKRLSDAQRDGDRLAVIRGSAV	180
AmbC	AFIEFSRQRGTALDGRCKAFGAGADGAGWSEGCGILTALKRLSDARRDGDRLAVIRGSAV	180
KSI_8	AAIESSRLRGQSSDGRCKSFDAADGVGWEGCAVLVLKRLSDATRDGDRILAVVIRGSAV	180
	* * * * * : * .***:*. * .*: * * .***.:* .***** *****:***:*.***	
JerD	NQDGR-SQG- 188	
AmbD	NQDGR-SQGC 189	
JerC	NQDGR-SQG- 188	
AmbC	NQDGR-SQG- 188	
KSI_8	NQDGR-SNG- 188	
	*****:***:	

Na via de síntese dos compostos jerangolida e ambrumicina os genes *jerC*, *jerD*, corresponde aos módulos 3 e 5 e os genes *ambC* e *ambD* aos módulo 4 e 5 na via do PKS,

O sistema NRPS possui domínios específicos para a formação da molécula como: domínio para alongamento do peptídeo, ou seja, domínios adenilação (A), domínio de condensação (C) e o domínio de transferência do peptidil (PCP) (Kodama, 2009). Este sistema gera compostos com diversas atividades. Devido os clones KSI-5 e KSI-30 estarem em um agrupamento separado sugere que estes sejam novos genes. No agrupamento 2B observamos o alinhamento entre o clone KSI-15 e a espécie de *S. aurantiaca* (Deltaproteobactéria) o gene KS *stiC* está presente na síntese da stigmatellina. O clone KSI-15 possui uma similaridade de 68%. Verificamos uma heterogeneidade entre o alinhamento dos genes KS neste grupo onde a sequência de uma proteobactéria mostrou-se similar às KS de cianobactéria.

Vários domínios PKS demonstram uma homologia relativamente alta com outros domínios dentro de uma determinada família funcional, podendo ser identificados por comparação de pares com um único modelo de sequências de cada domínio. No entanto, os domínios de NRPS possuem uma elevada divergência de sequências entre os membros da família de um determinado agrupamento. Em contraste, na síntese de PKSs são poucas as unidades extensoras envolvidas na biosíntese de policetídeos, os domínios de adenilação dos NRPSs são capazes de reconhecer mais de 50 aminoácidos. Isso faz com que a análise de seus domínios seja complexa e desafiadora.

Na árvore filogenética o agrupamento 4 B e 5 B apresentam uma diversidade entre as divisões Proteobactéria (Delta e Gamaproteobactéria), Cianobactéria e Bactérias simbiotes (Figura 21).

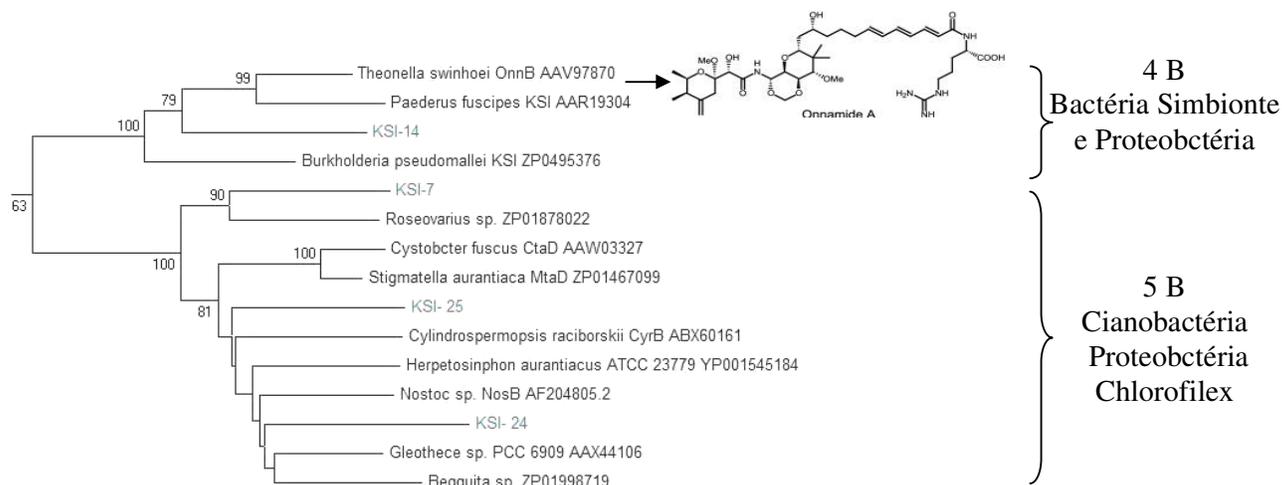


Figura 21. Subgrupo (B) da árvore filogenética.

Oclone KSI-14, provável gene novo, possui uma similaridade de 63% com o gene cetosinatse *onnB* da cianobactéria *Theonella swinhoei* produtor de um antitumoral onamida A. Este simbionte possui uma particularidade *nocluster* biossintético onde o domínio AT (unidade extensora) encontra-se em *trans*, o que caracteriza o composto onamida A como um PKS não usual. O gene que codifica para o domínio AT encontra-se fora do *cluster* do PKS (Piel, *et al.*, 2004). Normalmente na síntese de PKS este domínio atua em *cis* no domínio. Este clone apresentou uma similaridade de 58% com a bactéria simbionte *P. fuscipes* e 59% com *Burkholderia pseudomallei*. No subgrupo 5 B encontramos agrupados os clones KSI-25 e KSI-24 prováveis genes novos. Oclone KSI-7 está próximo do gene KS da alfaproteobactéria *Roseavirus* sp. produtora de compostos híbridos do sistema PKS-NRPS (Quadro 4). No alinhamento do clone KSI-7, encontramos uma modificação no padrão da sequência do sítio ativo de CSSSL para QTACSTSL.

No total foram analisados 78 sequências do Genbank para o gene KSI e as análises mostraram uma variabilidade gênica significativa. Observando que a amostra isolada do solo possui grupos taxonômicos com biodiversidade para a sequência do gene cetosintase. Os nossos clones ficaram bem distribuídos nos diversos grupos evidenciando a diversidade de sequência. Os *primers* utilizados foram eficientes para o estudo dos genes KSI para amostra de solo de Mata Atlântica.

Na biblioteca de PKS II os genes cetosintases dos clones apresentaram uma maior similaridade com a divisão Actinobactéria (Tabela 10).

Tabela 10. Similaridade dos clones obtidos com o banco de dados Genbak.

Clone	Similaridade	Gene	Produto	Espécie
KC 5	99%	<i>whiE</i>	Pigmento de esporo	<i>S. coelicolor</i> (X55942)
KB 5.3	87%	<i>curA</i>	Pigmento de esporo	<i>S. curacoii</i> (M33704)
KC 5.6	90%	Cetosintase	Não identificado	<i>S. venezuelae</i> (AB024980)
K 1.8	73%	<i>cosB</i>	Cosmomicina	<i>S. olindensis</i> (DQ280500)
K 1.5	72%	<i>cosB</i>	Cosmomicina	<i>S. olindensis</i> (DQ280500)
KS 7.5	100%	CosB	Cosmomicina	<i>S. olindensis</i> (DQ280500)
KB 5.4	80%	<i>rubA</i>	Rubrumicina	<i>S. collinus</i> (AF293355)

A árvore filogenética foi formada através do alinhamento de nucleotídeos dos clones obtidos e às do Genbak que possuíssem similaridade maior que 60%.

Através da topologia da árvore filogenética gerada foi possível observar a formação de 2 grupos: A) responsáveis pela produção de pigmentos; B) diferentes famílias de antibióticos (Figura 22). Neste estudo os clones revelaram uma similaridade com a importante classe de antibióticos as antraciclinas.

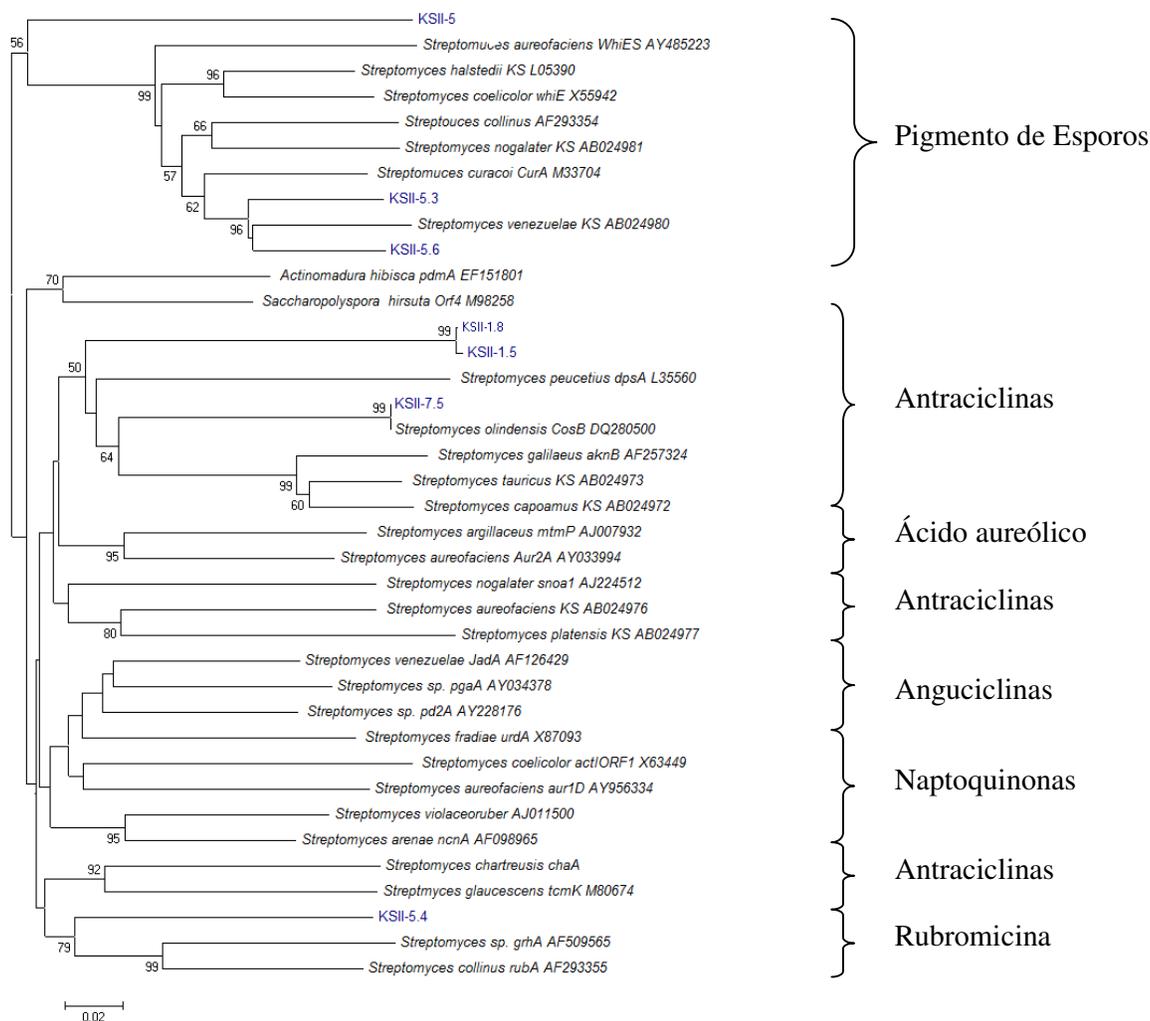


Figura 22. Análise filogenética das sequências dos genes de PKS tipo II a partir de amostras do solo. As linhagens referências foram obtidas do Genbank

O primeiro agrupamento contendo os clones identificados como KSII-5 (5; 5.6; 5.7) são resultados de ampliações do DNA ambiental na mesma temperatura de anelamento (59 °C; 60,7 °C; 62,3 °C) dos *primers* PKS II. Com resultado verificamos que estes clones contêm genes que codificam para regiões responsáveis pela produção de pigmentos. Neste agrupamento nota-se que somente o clone KSII- 5 ficou isolado, em uma ramificação provavelmente indicando um gene novo. Os clones KSII-5.6 e KSII-5.7 tiveram homologia com o gene KS (cetosintase) da via de síntese de pigmentos de esporos da espécie *S. venezuelae*. Os pigmentos são sintetizados via PKS e seu cluster gênico produz uma diversidade de moléculas (Shen, *et al.*, 1998). A expressão desses genes ocorre durante a esporulação em Actinomicetos dando a coloração aos esporos.

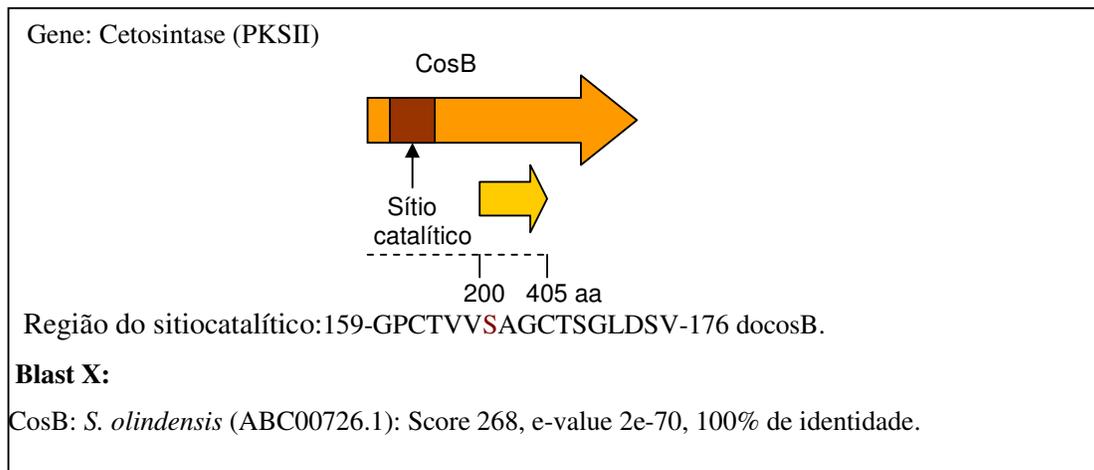
Evolutivamente a presença desses genes se mantém nos micro-organismos presentes nos solos devido às características protetoras da sua expressão, resguardando os micro-organismos da ação da luz ultravioleta, excesso de umidade, dessecação entre outras variações ambientais.

Os genes que codificam para pigmentos de esporos são chamados de pleiotrópicos. Alguns trabalhos indicam uma relação na expressão de genes que codificam para pigmentos e a expressão de antibióticos, mas o mecanismo de sinalização celular ainda não está bem compreendido (Ohnishi, Y., *et al.*, 2004; Tomono, A., *et al.*, 2005).

O gene *whiE* codifica para proteína semelhante à do sistema PKS tipo II, envolvida na síntese de uma variedade de antibiótico aromático. O cluster para a síntese de esporos é composto pela ORFIII a-v que codificam para PKS responsável pela síntese da cadeia primária do policetídeo, enquanto a ORFII, ORFVII e ORFVIII codificam para adenilato, aromatase e uma provável hidroxilase respectivamente (Kelemen, *et al.*, 1998).

Um resultado interessante foi o obtido no alinhamento do segundo grupo formando dois subgrupos compostos por espécies produtoras de importantes famílias de antibióticos. Verificando que os clones 1.8 e 1.5 possuem alta similaridade entre si, porém, são distintos. Neste grupo observamos um polimorfismo. O clone 7.5 possui uma homologia com a espécie *S. olindensis* produtor da cosmomicina, (análogo ao composto antitumoral doxorubicina) indicativo de amplificação de um provável gene novo pertencente à via de síntese deste tipo de composto (Quadro 6). Notavelmente o nosso grupo de trabalho tem desenvolvido pesquisas para caracterizar os genes envolvidos na biossíntese da cosmomicina, onde foi verificada a função do gene *cosB* (Garrido *et al.*, 2006). Uma biblioteca genômica da linhagem *S. olindensis* DAUFPE 5622 foi obtida e o clone contendo o cluster gênico para a PKS II foi sequenciado, verificando que o gene *cosB* é responsável por codificar e expressar a região KS α .

Quadro 6: Anotação do clone 7.5 com indicação da homologia ao gene *cosB*.



O gene *cosB* possui tamanho de 1269 pb apresentando alta homologia com o gene *aknB* de *S. galileus*, chegando a 73% de identidade. Esta espécie é produtora do antibiótico aclacinomicina. A alta similaridade do gene *cosB* com outras espécies é um indicativo da variabilidade da sequência PKS dados que corroboram com os obtidos na árvore do presente estudo. Neste agrupamento foi possível relacionar os genes amplificados com as sequências referência.

Dentre as sequências pertencentes à *Streptomyces* ocorreu a formação de agrupamentos distintos entre as sequências do Genbak. As espécies relacionadas são produtoras de ácido aurélico, anguciclinas e naftoquinonas. Podemos verificar uma variabilidade intra-específica do gene PKS II neste agrupamento.

Observamos também a formação de três grupos produtores de diferentes compostos pertencentes a família das antraciclinas indicando um polimorfismo do gene PKS. Um agrupamento a parte se formou com o clone KB 5.4 com espécies de *Streptomyces* produtoras do antibiótico rubromicina (Quadro 7).

Quadro 7. Alinhamento do clone KB 5.4 com a sequência referência.

Gene: cetosintase subunidade alfa

Clone 5.4	262	HETAAFKSALGDRAYGV	PVSSIKS	MIGHSLGAIGSIEVAACALAVKHNVPPTANLHTAD
		HETAAFK +LG RA+	PVSSIKS	MIGHSLGAIGS+E+ACALA++H VVPPTANL T D
<i>S. collinus</i>		HETAAFKRSLGQRAHEV	PVSSIKS	MIGHSLGAIGSLEIAACALALRHQVVPPTANLSTPD 381

Sítio catalítico

Blast X:
S. collinus: Score 224, e-value 7e-73, 79% de identidade.
Frame = +3

Os resultados obtidos com as análises das árvores filogenéticas, tanto de PKS I quanto para PKSII, confirmam a presença de genes relacionados à via de síntese de um composto ativo de importância médica em micro-organismos presentes no solo de Mata Atlântica. Esta abordagem metodológica foi eficiente para buscar genes pertencentes à via de PKS I e PKSII, sendo uma alternativa viável para estudo de bioprospecção.

Foi verificado na biblioteca para os genes presentes na via de PKS I uma grande diversidade nas sequências em diversas divisões de bactérias, fato interessante já que os *primers* utilizados foram desenhados para a divisão actinobacteria. Observou-se também, a presença de diversos compostos produzidos por vias, tais como, PKS não usual devido à alteração de determinados domínios e PKS-NRRPS que são moléculas policetílicas híbridas com aminoácidos não ribossômicos.

Na biblioteca de genes para a via PKS II foi possível buscar a diversidade de diversas classes de antibióticos com ampla atividade biológica produzidos por diversas espécies de *Streptomyces*.

Os resultados são interessantes que evidenciam a grande diversidade de micro-organismos presentes no solo de floresta tropical, que possuem um enorme potencial biotecnológico. Os genes caracterizados como sendo um provável gene novo serviram como sondas moleculares para buscar os *clusters* biossintéticos em biblioteca metagenômica. Conseguiu-se obter uma biblioteca metagenômica com 4000 clones contendo insertos >50kb em vetor pBac OriV (~8kb). Através da metodologia como a hibridação, utilizaremos os genes de PKS I e PKSII identificados nas árvores filogenéticas para isolar o clone da biblioteca metagenômica com a finalidade em estudar a via biossintética. Portanto, com os resultados obtidos foi possível verificar a diversidade de genes catabólicos em diversos organismos e com isso gerou perspectivas de novos estudos.

6.2 Isolamento de bactérias do solo de Mata Atlântica com atividade antibacteriana e/ou Antifúngica

6.2.1 Isolamento de bactérias do solo

A avaliação de bactérias do solo produtoras de compostos naturais com atividade antibacteriana e ou antifúngica são de grande importância. Uma vez isoladas minimizam os diversos passos de análises posteriores, sendo mais fácil trabalhar com uma bactéria isolada. Após detectado a diversidade de genes e prováveis genes novos de PKS I e PKS II na amostra de solo estudada nos incentivou a buscar micro-organismos produtores destes compostos. Isolar novos micro-organismos de amostras ambientais não é uma etapa fácil uma vez que se procuram micro-organismos cujas necessidades nutricionais são desconhecidas. Assim, a escolha do meio é uma etapa crítica.

A adição de substâncias químicas inibidoras do crescimento de determinadas populações de microrganismos nos meios de cultura pode tornar as avaliações mais específicas. Tem-se observado que a adição de agentes antibacterianos favorece o crescimento fúngico, enquanto que os antifúngicos resultam em melhor desenvolvimento das populações bacterianas. Por outro lado, a combinação adequada de inibidores bacterianos e fúngicos nos meios de cultura podem favorecer o desenvolvimento das populações de actinomicetos.

Utilizamos a mesma abordagem de Janssen (2000) para cultivar micro-organismos desconhecidos, mas os passos iniciais foram modificados. Elaboramos um protocolo para a manipulação inicial da amostra de solo para a seleção de micro-organismos que esporulam, como os Actinomicetes. Somente uma bactéria com morfologia parecida aos *Streptomyces* foi isolada com o desenvolvimento do protocolo(1), possuindo as seguintes características morfológicas: coloração branca, esporulada, formação de micélio ao visualizar no microscópio. A bactéria isolada recebeu a denominação inicial de IS-A. Utilizamos outro protocolo(2) descrito por Jansen (2002) e como resultado obtivemos 6 isolados com características de Actinomicetes, denominadas de IS-F, IS-G, IS-H, IS-I, IS-J, IS-O. Todas as 7 bactérias são *Gram* positivas e, possuem coloração branca. As bactérias IS-A e IS-O tem a capacidade de esporular possuindo uma morfologia parecida aos *Streptomyces*. Uma vez isoladas estas bactérias realizamos alguns experimentos qualitativos com a finalidade em

conhecer algumas características dos isolados.

Foi verificada a suscetibilidade das bactérias a agentes antimicrobianos (Tabela 11). Verificamos na tabela 6 que bactéria O mostrou uma múltipla resistência aos antimicrobianos analisados.

Tabela 11. Teste de suscetibilidade dos isolados do solo aos agentes antimicrobianos.

Antibiótico*	Gen.	Apra.	Amp.	Clorf.	TSR	Kan	Eritr.	Strept.
Bactéria								
A	S	S	R	R	S	S	R	R
F	S	S	R	S	S	R	R	R
G	S	S	R	R	R	R	R	R
H	S	S	R	S	S	S	R	R
I	S	S	R	S	S	S	R	S
J	S	S	R	S	S	S	R	S
O	R	R	R	R	R	R	R	R

*(Gen: gentamicina; Apra: apramicina; Amp: ampicilina; Clorf: clorafenicol; TSR: Tioestrepton; Kan: canamicina; Eritr: eritromicina; Strep: streptomicina. S=sensível; R= resistente) (concentração de 100 µg/µl).

Análises bioquímicas foram realizadas para conhecer algumas necessidades nutricionais e observaram-se os fenótipos apresentados na tabela 12.

Tabela 12. Teste Bioquímico dos isolados do solo.

Bactérias	Glicose	H₂S	Triptofano desaminase	Uréia	Lisina	Indol	Catalase	Oxidase
A	+	-	-	-	-	-	+	+
F	+	-	-	-	-	-	-	-
G	+	-	-	-	+	+	-	-
H	+	-	-	-	+	-	+	+
I	+	-	-	-	+	-	+	+
J	+	-	-	-	+	+	+	+
O	+	-	-	-	-	-	+	+

Com o intuito em verificar se os isolados possuem alguma capacidade em produzir um composto ativo foram realizados testes de antagonismo frente aos micro-organismos (Tabela 13 e Figura 23). Os micro-organismos testados foram: *Aspergillus flavus*, *Penicillium c mmune*, *Fusarium verticillioides*, *Klebsiella sp.* e *Bacillus cereus*.

Tabela 13. Inibição do crescimento de micro-organismos testes. Foi medida o diâmetro da inibição do crescimento.

Bactérias Isoladas	<i>A.flavus</i>	<i>P.co mMune</i>	<i>F.verticilloides</i>	<i>Klebsiellasp.</i>	<i>B.cereus</i>
IS-A	+	+	+	++	++
IS-F	+	++	+	++	++
IS-G	+	+++	+	++	Não cresceu
IS-H	-	-	-	+	+
IS-J	-	-	-	+	+
IS-O	+	+	+	++	+

+ : inibiu o crescimento (5 a 10 mM);

++: boa inibição (15 a 20 mM)

+++ : excelente inibição (30 mM).

-: não inibiu o crescimento

Os isolados do solo foram capazes de inibir o crescimento de alguns micro-organismos, onde verificamos que a bactéria IS-A, IS-G e IS-O foram as que apresentaram maior capacidade de inibição. Postula-se que esta inibição do crescimento é devido à atividade de um composto que está sendo secretado pela bactéria no meio de cultura.



Figura 23. Antagonismo das bactérias isoladas do solo.

Uma vez que uma fonte biológica produtora de um antimicrobiano é encontrada, esta normalmente produz um complexo de substâncias as quais devem ser fracionados em componentes e compostos bioativos. O fracionamento geralmente consiste inicialmente em separar extratos de uma fonte biológica identificada entre os sistemas de solventes. Optamos pela metodologia convencional de extração de metabólitos, utilizando o sistema de solvente: metanol para a extração intracelular e ácido acético para a extração dos metabólitos extracelulares (meio de cultura). Ao final das extrações os extratos brutos apresentavam coloração que variava do amareloclaro ao escuro e odor característico de terra. Foram extraídos os extratos extracelulares e intracelulares das sete bactérias. Todos os extratos foram ressuspensos em metanol. Em uma avaliação preliminar, foi realizada uma varredura

até 600 nm a fim de verificar a presença de algum composto. Em todas as bactérias observamos um pico esperado a 280-300 nm correspondente a potenciais policetídeos.

Foi verificado se os extratos possuem alguma atividade pela técnica de difusão em ágar. Os resultados foram visualizados pela formação de halos de inibição do crescimento do micro-organismo teste. Apenas os extratos extracelulares da bactéria G contra *B.subtilis* e a bactéria O apresentaram atividade contra *B.subtilis* e *Klebsiella*. Verificamos a atividade antibacteriana e/ou antifúngica dos isolados através do antagonismo frente aos organismos testes e também dos extratos brutos intracelulares.

Tabela 14. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos intracelular dos isolados do solo.

Bactérias Isoladas	<i>Salmonella</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>B.cereus</i>	<i>C.albicans</i>
A	++	+	+++	-
F	+++	++	-	+
G	+	-	-	-
I	-	-	-	-
H	-	-	-	-
J	-	-	-	-
O	++	+	++	-

(+ : inibiu o crescimento (halo de 5 a 10 mM); ++: boa inibição (halo de 15 a 20 mM)
+++ : excelente inibição (halo de 30 mM). -: não inibiu o crescimento)

Os extratos brutos foram submetidos à cromatografia de camada delgada (CCD). Consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial de polaridade da molécula. Técnica que permite a separação de componentes em breve espaço de tempo com grande reprodutibilidade e baixocusto. Verificamos que os compostos possuem características polares, pois precisamos adequar a metodologia para poder visualizar as frações no cromatograma. O sistema de solvente mais adequado foi metanol 30%: ácido acético 3% (Tabela 15).

Tabela 15. Medidas das frações (Rfs) dos extratos visualizados em lâmpada U.V em dois comprimentos de onda 264 e 365 nm.

Isolados do solo	Rf
IS-A	Rf ₁ = 0,36 Rf ₂ = 0,89
IS-F	Rf ₁ = 0,45 Rf ₂ = 0,89
IS-G	Rf ₁ = 0,45 Rf ₂ = 0,76
IS-H	Rf ₁ = 0,45 Rf ₂ = 0,76
IS-I	Rf ₁ = 0,45 Rf ₂ = 0,76
IS-J	Rf ₁ = 0,45 Rf ₂ = 0,76
IS-O	Rf ₁ = 0,45 Rf ₂ = 0,76

Os extratos brutos de todos os isolados foram analisados por cromatografia CLAE para verificar a presença de picos que nos indicassem a presença do composto produzido pelos isolados. Em uma análise preliminar podemos verificar picos em diferentes tempos de retenção dos isolados IS-A e IS-O, tanto dos extratos brutos intracelular como os extracelulares. Os outros isolados não apresentaram diferenças nos picos e fizemos as análises somente com os isolados IS-A e IS-O (Figura 24).

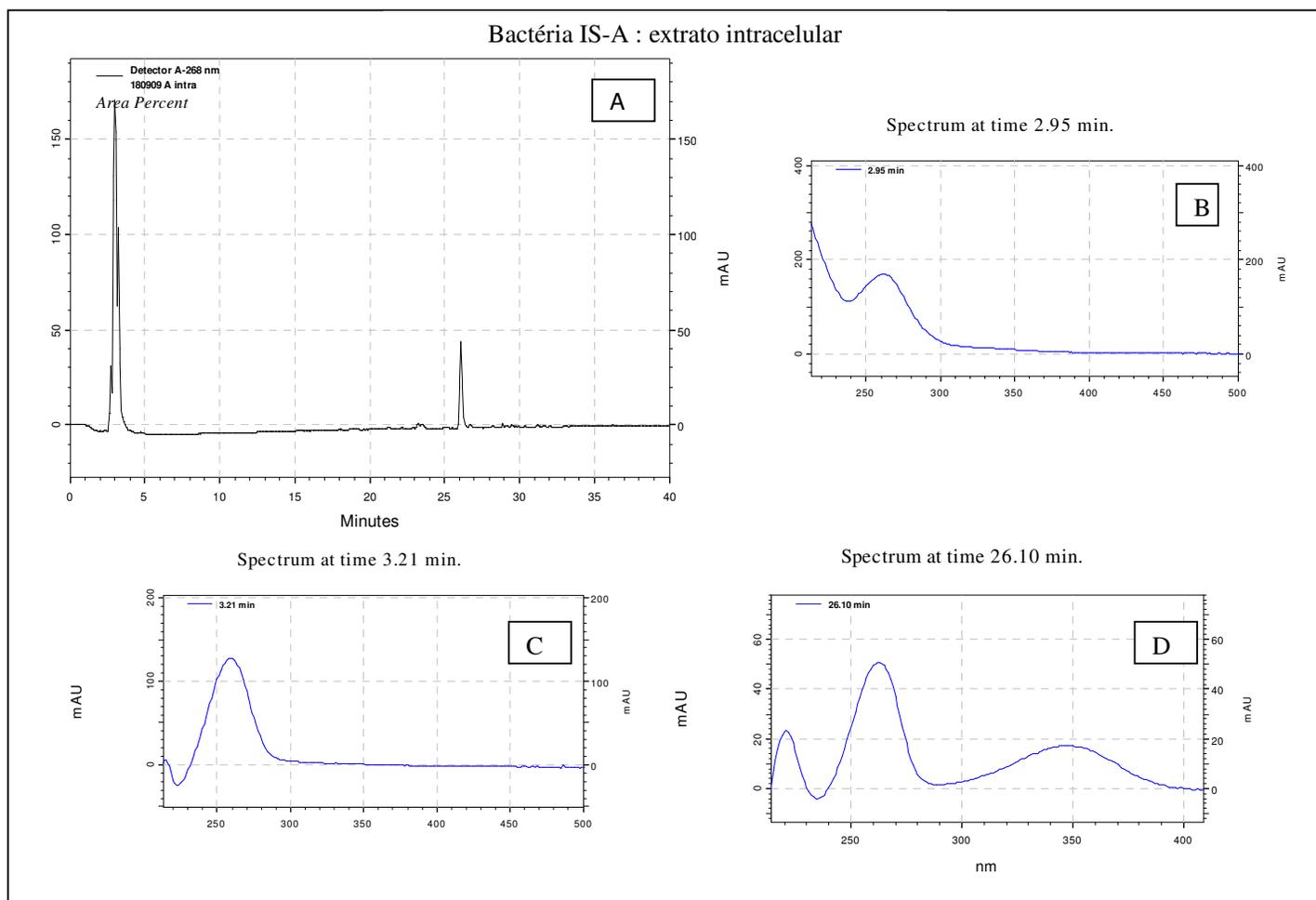


Figura 24. Análise do extrato intracelular do isolado IS-A por CLAE.

O extrato intracelular da bactéria IS-A foi analisado por CLAE com detector de arranjo de diodos e apresentou picos referentes a substâncias polares em aproximadamente 3 minutos que não se separaram adequadamente com o sistema cromatográfico utilizado (Figura 24). Os espectros no ultravioleta indicam que os picos majoritários possuem absorvância máxima em 200 e 264 nm no pico de 2,95 min (Figura 24 B) e 264 nm no pico de 3,21 min (Figura 24 C). Observou-se também um pico em 26,10 min que apresentou um espectro em 226, 264 e 354 nm (Figura 24 D).

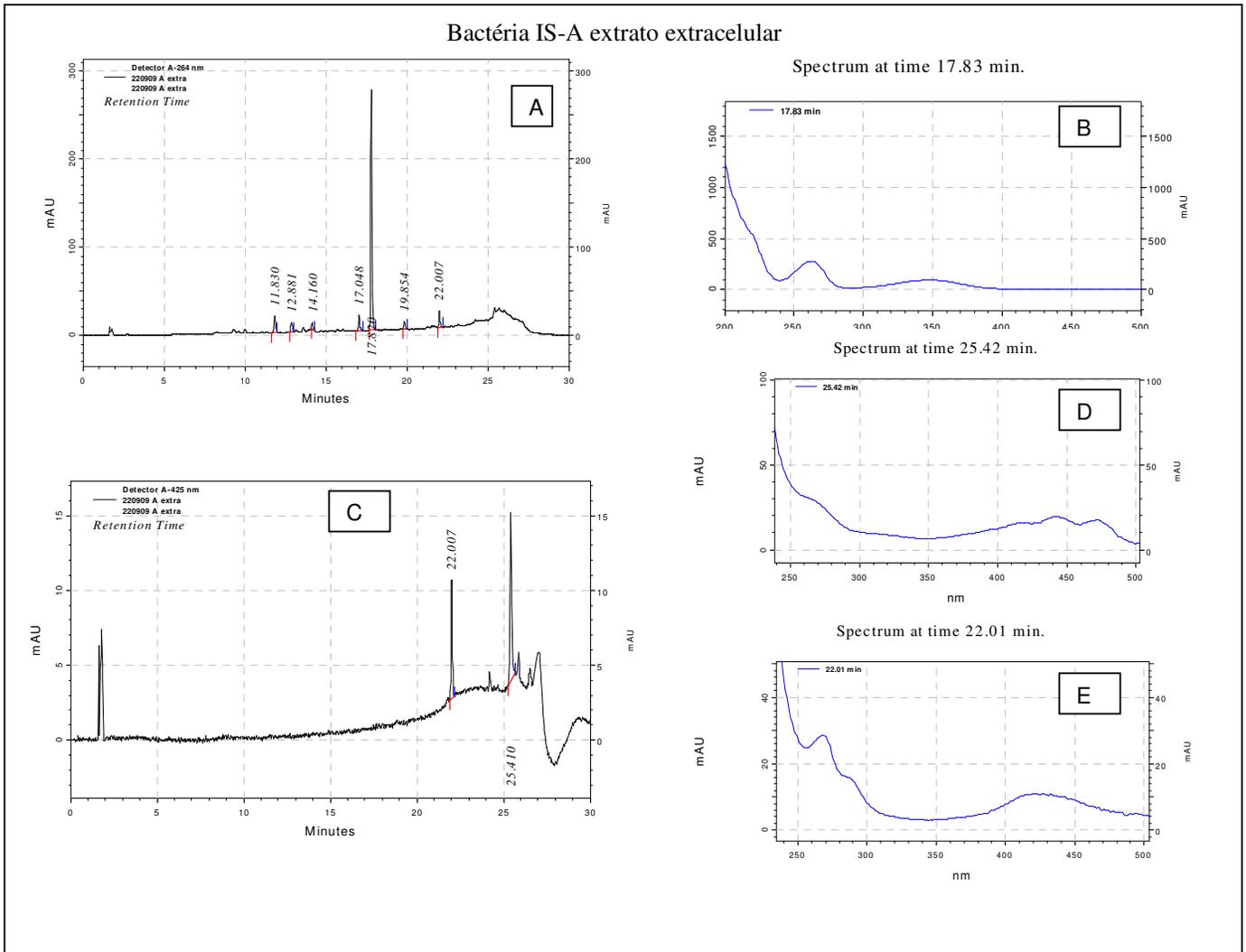


Figura 25. Análise do extrato extracelular do isolado IS-A por CLAE.

A amostra A extracelular analisada por CLAE indicou a presença de um pico majoritário em 17,82 min (Figura 25A) com o espectro de absorvância (Figura 25B) com os picos máximos em 254 e 350 nm. Também indicou a presença de carotenóides que foram detectados em 426 nm (Figura 25 C). Observaram-se dois picos em 22,01 e 25,41 min e os seus espectros no ultravioleta indicaram que são característicos de carotenóides.

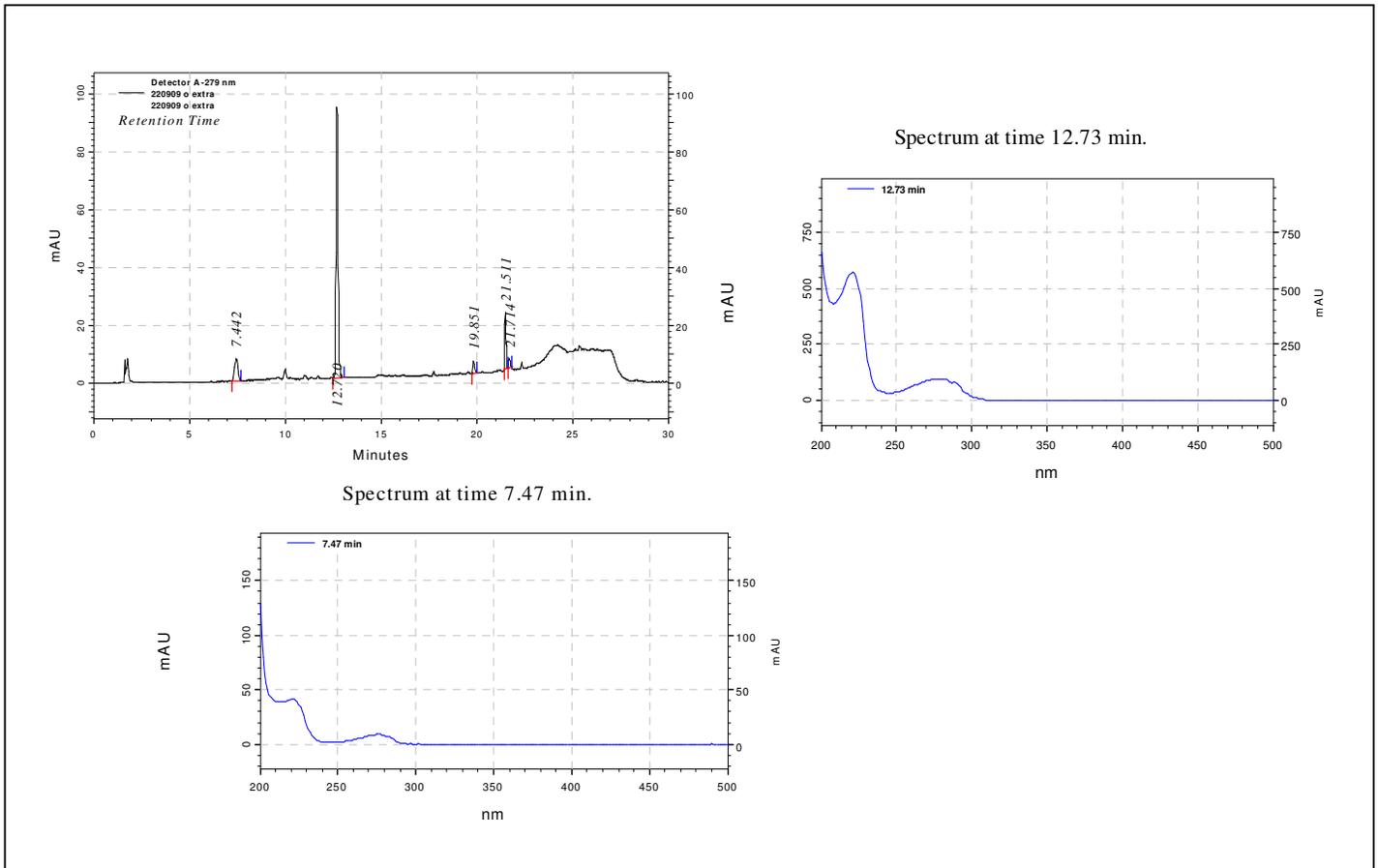


Figura 26. Análise do extrato do isolado IS-O extracelular.

O extrato extracelular do isolado IS-O analisado por CLAE indicou a presença de um pico em 17,81 min. com o mesmo perfil espectrofotométrico do composto presente na amostra A extra com absorvâncias em 264 e 350 nm.

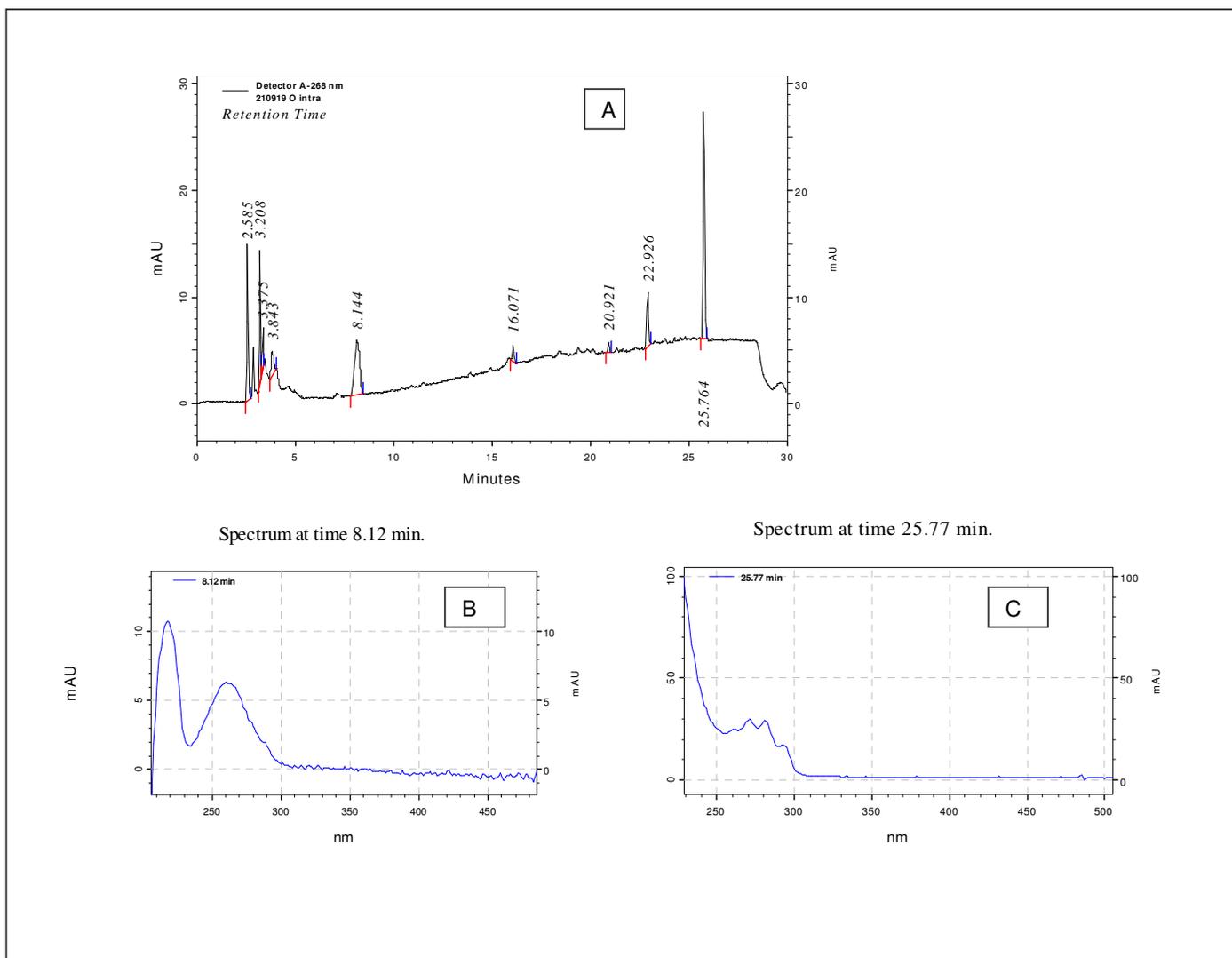


Figura 27. Análise do extrato intracelular do isolado IS-O. Cromatograma da análise da amostra O intracelular por CLAE acoplado a um detector de arranjo de diodos. (B) Espectro no ultravioleta do composto eluído em 8,12 min. (C) Espectro no ultravioleta do composto relativo ao pico em 25,76 min.

A amostra do extrato bruto intracelular da bactéria IS-O analisado por CLAE indicou a presença de um pico em 17,81 min. com o mesmo perfil espectrofotométrico do composto presente na amostra IS-A extra com absorvâncias em 264 e 350 nm.

A amostra IS-O intracelular analisado por CLAE indicou a presença de uma fração com alta polaridade com pouca definição na separação e observou-se a presença de um pico em 8, 14 min de eluição (Figura 27 A) com os picos de absorvância em 210 e 254 nm (Figura 27 B). Foi observado também um pico majoritário em 25,76 min (Figura 27 A) e o seu espectro de absorvância no ultravioleta (Figura 27 C) indicou os máximos de absorvância em 265, 275 e 290 nm. O espectro de massas referente a esse pico (Figura C) indicou o pico base em m/z 301, mas novamente nesse caso o íon molecular não foi identificado, necessitando de mais estudos para a sua caracterização estrutural.

Devido à semelhança entre os picos dos isolados IS-A e IS-O, somente a bactéria IS-A foi analisada por espectrometria de massa (Figura 28 e 29).

A amostra do isolado IS-A extracelular, no tempo de retenção de 17, 82, foi analisada também por CLAE acoplado à espectrometria de massas e o espectro referente ao composto eluído em 17,82 min está apresentado na figura 28. Observou-se a presença de um pico base em 218 m/z e fragmentações em 312 e 262 m/z , porém o íon molecular não foi identificado.

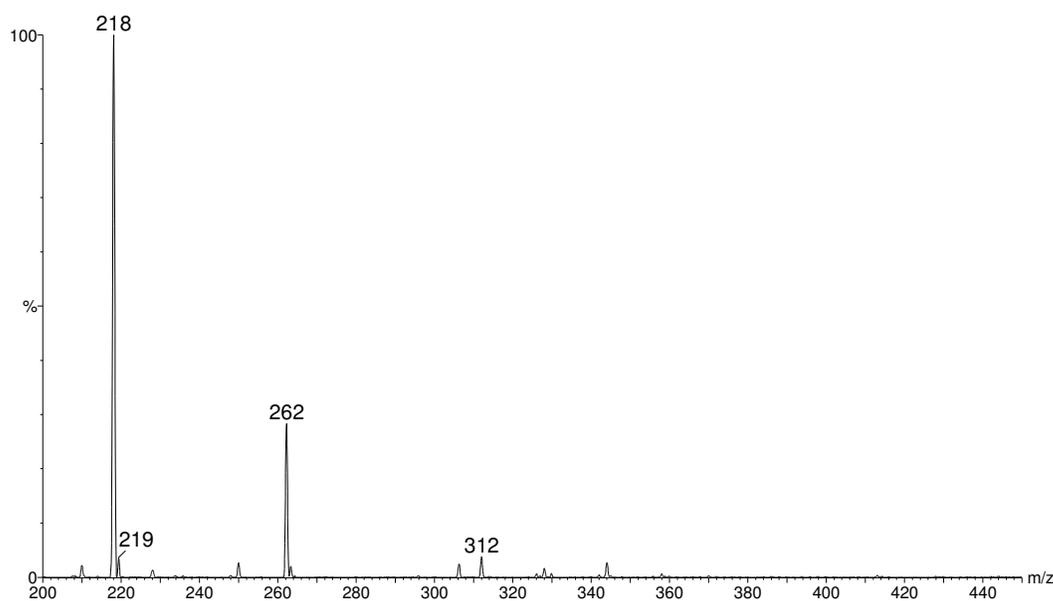


Figura 28. Espectro de massas no modo “electrospray” positivo referente ao pico em 17,82 min do CLAE do isolado IS-A extracelular.

O espectro de massas referente ao pico em 26,10 min da amostra intracelular do isolado IS-A (Figura 29) indicou a presença de um pico molecular em 276 m/z e um aduto com sódio em 298 m/z e uma fragmentação em 259 m/z com a perda de uma massa de 17 m/z .

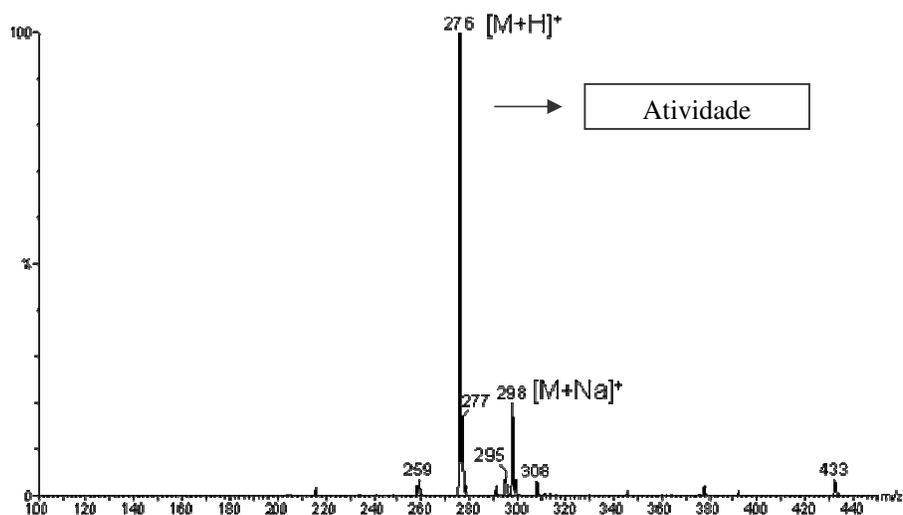


Figura 29. Espectro de massas no modo “electrospray” positivo do composto eluído em 26,10 min no CLAE da isolado IS-A intracelular.

Os picos foram eluídos e testados para verificar a atividade frente aos organismos testes. Somente o pico de retenção de 26,10 (fase apolar) apresentou uma inibição contra a bactéria *E. coli* (halo de inibição de 12 mM).

A elucidação estrutural destes compostos ainda está em curso e pretende-se analisar por RMN ¹H e ¹³C e outras metodologias analíticas para total identificação.

6.2.2 Identificação dos isolados do solo

Devido à imensa diversidade genética e fenotípica das comunidades microbianas do solo, ainda existe limitações na utilização de métodos que representem satisfatoriamente essas comunidades, pois esses métodos fornecem somente um retrato parcial da diversidade microbiana, sendo necessário estudar as populações microbianas em diferentes níveis.

Desta forma, para inferir sobre a que grupo pertencem os isolados do solo, utilizamos

primers rDNA 16S para o Domínio Bactéria (Figura 24).

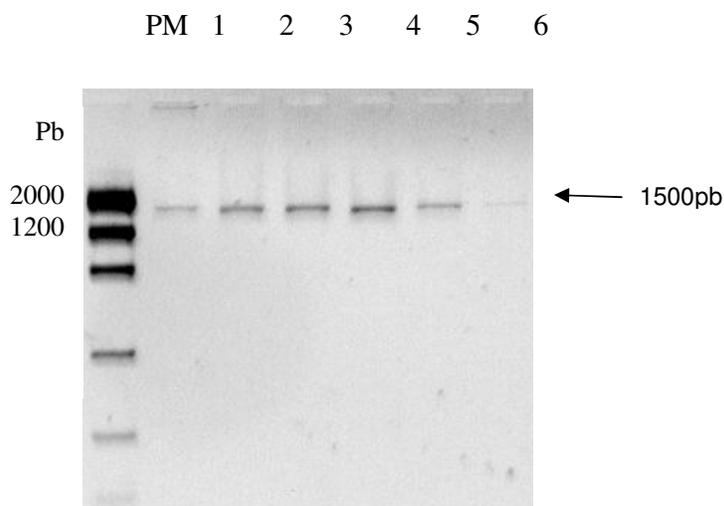


Figura 24. Amplificação do gene 16S rDNA dos isolados do solo. Canaletas 1 a 6, quantificação do 16S rDNA amplificado das bactérias isoladas do solo (IS-A, IS-F, IS-G, IS-H, IS-I, IS-J, IS-O). Gel de agarose 2%.

Os fragmentos de 16S rDNA obtidos foram sequenciados, mas os dados ainda são preliminares, pois não foi possível formar a sequência consenso para os 1500pb. Obtivemos uma boa qualidade no sequenciamento somente para uma fração do gene (Tabela 16). Este resultado, no entanto, nos fornece subsídios para inferir sobre a que grupo os isolados pertencem. De qualquer forma os genes serão completamente sequenciados para confirmar os resultados.

Tabela 16. Similaridade das sequências de 16S rDNA dos isolados do solo com as sequências referência do genbank (Blastn).

Isolados	Tamanho (pb)	Similaridade	Espécies
IS-A	688	98%	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC10137 (Y15501)
IS-F	750	97%	<i>Brevibacillus limnophilus</i> (EU977766)
IS-G	800	98%	Uncultured <i>Shigella</i> sp. (FJ193356)
IS-H	700	93%	<i>Bacillus cereus</i> (EU857430)
IS-I	750	97%	<i>Bacillus thuringiensis</i> (FJ613540)
IS-J	350	97%	<i>Bacillus</i> sp. (AB178208)

Com resultados preliminares podemos verificar que com a metodologia empregada foi possível isolar membros de três divisões: Actinobacteria, pertencente a este grupo o isolado IS-A; Firmicutes, com os isolados IS-F, IS-H, IS-I e Proteobacteria, com o isolado IS-G. Não conseguimos obter um bom sequenciamento do gene 16S do isolado IS-O e a região amplificada foi somente 150pb (dados não mostrados), mas devido à morfologia e similaridade desta pequena região nos dá indícios que esteja na divisão de Actinobacteria.

7 Perspectivas

Com a metodologia desenvolvida neste trabalho servirá como base para futuros estudos pelo nosso grupo de pesquisa. Com a obtenção dos candidatos a novos genes de PKS I e PKS II servirão como sondas para screening em outras bibliotecas metagenômicas para o estudo de novas vias biossintéticas. Esta abordagem abre caminho para geração de novos compostos através da biossíntese combinatória. Os resultados evidenciam a diversidade bioquímica dos micro-organismos presentes em solo de floresta sendo necessários novos estudos na tentativa em isolar estes micro-organismos.

8 Conclusões

Poucos trabalhos mostram a biodiversidade microbiana da Mata Atlântica, bem como, o seu potencial biotecnológico e mostram menos ainda o potencial antimicrobiano produzidos por isolados bacterianos desta região. Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

- a) Foi possível definir uma metodologia viável para a extração de DNA do solo de Mata Atlântica e obter um DNA de alto peso molecular de qualidade para posteriores análises;
- b) Estudar a diversidade de genes cetosintases presentes na via de síntese dos policetídeos tipo I e II. Com a biblioteca de PKS I foi possível detectar os seguintes clones candidados a novos genes: KSI-1; KSI-5; KSI-8; KSI-14; KSI-24 e KSI-30. Na biblioteca de PKSII, obtivemos: - clones candidados a novos genes que codificam para síntese de esporos: KSII-5; KSII-5.3 e KSII-5.6; - clones candidados a novos genes responsáveis pela síntese de compostos naturais: KSII-1.8; KSII-1.5; KSII7.5 e KSII 5.4;
- c) Com a metodologia dependente de cultivo utilizada conseguimos isolar sete bactérias com atividade antibacteriana e/ou antifúngica de grande interesse.

Referências Bibliográficas

ANDRIELLI F. Diversidade de Bactérias e Amplificações por PCR de Genes de Sintase de Policetônicos (PKS) tipo II em solo de Mata Atlântica [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas; 2006.

Attili DS. Isolamento, identificação e ecologia de fungos celulolíticos do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins [Tese]. Rioclaro: Universidade Estadual de São Paulo; 1994.

Axelrod PE, Chow ML, Radomski C, Mcdermott JM, Davies J. Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soil subject to disturbance. *Can J Microbiol.* 2002; 48: 655-674.

Dwight Db, Min C, Uma O, Vineet R. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Nat. Prod. Rep.* 2007; 24: 1225–1244.

Berry AE, Chi oCchini C, Selby T, Sosio M, Wellington EM. Isolation of high molecular weight DNA from soil for cloning into BAC vectors. *FEMS Microbiol Letters.* 2003; 223: 15-20.

Berdy, J . Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo).* 2005; 58(4): 1–26.

Bentley Sd, Chater Kf, Cerdeno-Tarraga Am, Challis Gl, Thomson Nr, James Kd, Harris De, Quail Ma, Kieser H, Harper D, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*. *Nature* A3(2). 2002; 417:141–147.

Benson Da, Karsch-Mizrachi, Ilene, Lipman, David J., Ostell, James And Wheeler, David, L. GenBank. *Nucleic Acids Research.* 2008; 36(D25-D30).

Borgos SEF, Tsan P, Sletta H, Ellingsen TE, Lancelin, JM, Zotchev SB. Probing the Structure-Function Relationship of Polyene Macrolides: Engineered Biosynthesis of Soluble Nystatin Analogues. *J Med Chem.* 2006; 49(8): 2431-2439.

Brachmann AO, Joyce SA, Jenke-Kodama H, Schw G, Clarke RDJ, Bode HB. A type II polyketide synthase is responsible for anthraquinone biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. *Chem Biol Chem.* 2007; 8(14): 1721 – 1728.

Brady SF, Clardy J. Palmitoylputrescine, an antibiotic isolated from the heterologous expression of DNA extracted from bromeliad tank water. *Journ Nat Prod.* 2004; 67:1283–1286.

De acordo com:
As normas de Vancouver

Brady Sf, Clardy J. Cloning and heterologous expression of is oCyanide biosynthetic genes from environmental DNA. *Ang Che Int Edit Eng*. 2005; 44(43):7063–7065.

Bull AT, Ward AC, Goodfellow M. Search and Discovery strategies for biotechnology the paradigms shift. *Microboil Mol Biol Rev*. 200;64(3):573-606.

Câamara IG. Breve história da conservação da Mata Atlântica. In: Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas. Galindo-Leal C, Câmara I G. Fundação SOS Mata Atlântica - Belo Horizonte: Conservação Internacional, São Paulo, 2005.

Campbell MN, Dainsbury M, Searle PA. The biosynthesis and synthesis of shikimic acid, chorismic acid and related compounds. *Synthesis*. 1993; 5: 179-193.

Casamayor EO, Schafer H, Baneras L, Pedros-Alioc, Muyzer G. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol*. 2000;66(2):499-508..

Chater, K. Multilevel regulation of *Strptomyces* differentiation. *Trends in genetics*. 1989; 5: 372-377.

Chow ML, Radomski CC, Mcdermott J, Davies M J, Axelrood PE. Molecular characterization of bacterial diversity in Lodgepole pine (*Pinus contorta*) rhizosphere soils from British Columbia forest soils differing disturbance and geographic source. *FEMS Microbiol Ecol*. 2002 ; 42 : 347-357.

Courtois S, Frostegard A, Goransson P, Depret G, Jeannin P, Simonet P. Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environ Microbiol*. 2001; 7(3): 431-439.

Courtois S, CapellanocM, Ball M, Francou FX, Normand P, Helynck G, Martine, A et al. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl and Environ Microbiol*. 2003; 49-55.

Daniel R. The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology*. 2005;3:470-478.

Demain AL. Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. In: Chadwick DJ, Whelan J, editors. *Secondary Metabolites : Their Function and Evolution*. Edited. Chichester: John Wiley; 1992.p. 3-23.

Derakshani M, Lukow T, Liesack W. Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA genes from bulk soil and rise roots of flooded rise micr oCosms. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67: 623-631.

Diallo MD, Martens M, Vloemans N, Cousin S, Vandekerckhove TTM, Van Der Gucht K. Phylogenetic analysis of partial bacterial 16S rDNA sequences of tropical grass pasture soil under *Acacia tortilis* subsp. *Raddiana* in Senegal. *Syst Appl. Microbiol.* 2004; 27: 238-252.

Duineveld BM, Kowalchuk GA, Van Elsas JD. Analysis Of Bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67: 172-178.

Egan S, Wiener P, Kallifidas D, Wellington E M H. Transfer of streptomycin biosynthesis gene clusters within streptomycetes isolated from soil. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64:5061-5063.

Elsas Jdv, Smalla K. Extraction of microbial community DNA from soils. Kluwer Academic Publishers. 1995; 1-11.

Eschenfeldt WH, Stols L, Rosenbaum H, Khambatta Z S, Quate-Randall E, Wu S, Kilgore DC, Trent JD, Donnelly MI. DNA from Uncultured Organisms as a Source of 2,5-Diketo-D-Gluconic Acid Reductases. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67: 4206-4214.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985; 39:783-791.

Fischbach MA, Walsh CT. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic, machinery, and mechanisms. *Chem Rev.* 2006; 106:3468–3496.

Foerstner KU, Doerks T, Creevy CJ, Doerks A, Bork P. A Computational Screen for Type I Polyketide Synthases in Metagenomics Shotgun Data. *PlosOne.* 2008; 3(10):1-7.

Furlan RLA, Garrido LM, Mendes GPA, Rohr J, Branã A, Mendez C, Salas JA, Beck JL, Padilla, G. DNA-Binding Properties of Cosmomycin D, an Anthracycline with Two Trisaccharide Chains. *Jourl of Antib.* 2004; 57: 647-654.

Furlan RLA, Garrido LM, Brumatti G, Amarante-Mendes, GP, Martins, RA, Facciotti MCR, Padilla, G. A Rapid and sensitive method for the screening of DNA intercalating antibiotics. *Biotechnol Let.* 2002; 24: 1807-1813.

Gans J, Wolinsky M, Dunbar J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science.* 2005; 309: 1387–1390.

Gao B, Paramanathan R, Gupta RS. Signature proteins that are distinctive characteristics of Actinobacteria and their subgroups. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2006; 90(1):69-91.

Garrido LM. Construção de uma biblioteca genômica de *Streptomyces olindensis* e triagem de clones envolvidos na biossíntese do antitumoral retamicina [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2000.

Jason Gans, Murray Wolinsky, John Dunbar. Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. *Science*. 2005; 309 (5739): 1387 – 1390.

Grayston S J, Griffith GS, Mawdesley JL, Campbell CD, Bardgett R D. Accounting of variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystem. *Soil Biol and Biochem*. 2001; 33 (4/5): 533-551.

Gillespie DE, Brady SF, Bettermann AD, Cianciotto NP, Liles MR, Rondon MR, Clardy J, Goodman RM, Handelsman AN. Isolation of antibiotics Turbomycin A and B from metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl and Environ Microbiol*. 2002; 68(9): 4301-4306.

Gross H, Stockwell Vo, Henkels Md, Nowak-Thompson B, Loper Je, Gerwick. Wh J. The genomics approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. *Chem Biol*. 2007; 14(1):53–63.

Handelsman, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol and Mol Bio Rev*. 2004; 669-685.

Hackl E, Zechmeister-Boltern S, Bodrossy L, Sessitsch A. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70(9): 5057-5065.

Hackl E, Zechmeister-Boltern S, Bodrossy L, Sessitsch A. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70(9): 5057-5065.

Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. Pharmacokinetic Data. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill; 2001. p. 1924.

Hayakawa T, Anakat T, Sakaguchi K, Otaken N, Yonehara H. A linear plasmid-like DNA in *Streptomyces sp.* producing lankacidin group antibiotics. *Jour Gene Appl Microbiol*. 1979; 25: 255-260.

Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington E. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol*. 1997; 63(8):3233-41.

Hodgson, D. A. Primary metabolism and its control in Streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology*. 2000; 42: 47-238.

Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Jour Bacteriol*. 1998; 180(18): 4765-74.

Hopwood DA, Sherman DH. Annu Rev Genet. 1990; 24:67. In: Staunton J, Weissman KJ. Polyketide biosynthesis: a millennium review. Nat Prod Rep. 2001; 18: 380–416. Review.

Hopwood DA. Genetic contribution to understanding polyketide synthases. Chemical Reviews. 1997; 97: 2465-2497.

Hugenholtz P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. Genome Biology. 2002; Disponível em: <http://genomebiology>. Reviews.

Hutchinson CR. Combinatorial biosynthesis for new drug discovery. Curr Opin in Microbiol. 1998; 1: 319-329.

Hutchinson CR, Fujii I. Polyketides synthetase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics. Ann Rev Microbiol. 1995; 49: 201-38.

Ikeda H, Nonomiya T, Usami M, Ohta T, Omura S. Organization Of The Biosynthetic Gene Cluster For The Polyketide Anthelmintic Macrolide Avermectin In *Streptomyces Avermectilis*. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96(17):9509-9514.

Julien B, Tian ZQ, Reeves CD. Analysis of the ambructin and jeronlid gene clusters of *Sorangium cellulosum* reveals unusual mechanisms of polyketide biosynthesis. Chem Biol. 2006; 13(12):1277-1286.

JEONG S H, Bae IK, Kwon SB, Lee JH, Jung HI, Song JS, Jeong BC, Kim SJ, Lee SH. Investigation of extended-spectrum β -lactamases produced by clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Korea. Letters in Appl Microbiol. 2004;49:41-47.

Jolik C. Zinsser microbiologia. Médica Panamericana. 2003. p. 1696.

Kato M J. Phytochemistry. 2001; (57):621-623.

Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes Foundation, 2000.

Jenke-Kodama H, Sandmann A, Müller R, Dittmann E. Evolutionary implications of bacterial polyketide synthases. Mol Biol Evol. 2005; 22:2027–2039.

Kennedy AC. Bacterial diversity in agroecosystems. Agriculture, Ecosystems and Environment, Amsterdam. 1999;74(1):65-76.

Kennedy AC, Smith KL. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soil. Plant and Soil. 1995;170:75-86.

Kinashi H, Shimaji-Murayama, M. Physical characterization of SCP1, a giant linear plasmid from *Streptomyces coelicolor*. J Bacteriol. 1991;173:1523-1529.

- Kim H, Woloshuk Cp. In: Fox EM, Howlett BJ. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Curren Opin in Microbiol.* 2008;11:481–487.
- Byung K K, Yoon-Dong P, Hyun-Myung O, Chun J. Identification and characterization of metagenomic fragments from tidal flat sediment. *The Journal of Microbiology.* 2009;(47):1225-8873..
- Kinashi H, Shimaji M, Sakai A. Giant Linear Plasmid In *Streptomyces* Whichcode Or Antibiotic Bosynthesis genes. *Nature.* 1987;328: 454-456.
- Kleinkauf HE, Döhrem Von H. *Biotechnology.* 1997;(7):1-728.
- Kleinkauf HE, Döhrem Von H. A nonribossomal system of peptide biosynthesis, *European Journal os Bi oChemistry.* 1996;236:335-351..
- Klokhlov AS. *Actinomycetos* biorregulators. Biological, bi oChemical and biomedical aspects of Actomycetes. In: Szabo, G. et al. Akadémiai kiadó Budapest;1997 p. 791-789.
- Khosla C, Zawada R J. Generation of polyketide libraries via combinatorial biosynthesis. *Trends Biotechnol.* 1996;14: 335–341.
- Kumar P, Koppisch DEC, Khosla C. Enhancing the modularity of the modular polyketide synthetases: Transacylation in modular polyketide synthetases catalyzed by malonyl-CoA: ACP transacylase. *Jour Americ Chemic S oCi.* 2003;125:14307-14312.
- Kurtböke DI, Swings J, Storms V. Microbial genetic resources and biodiscovery. In: Ferreira, L. C. Aspectos bioquímicos e moleculares de bactérias isoladas da Terra Preta Antropogência na região da Amazônia Brasileira, 2007.
- Lä mMle K, Zipper H, Breuer BM, Hauer BB, Buta AC, Brunner AH, Rupp S. Identification Of Novel Enzymes With Different Hydrolytic Activities By Metagenome Expression Cloning. *Jour of Biotech.* 2006; 575-592
- Lakshmi P, Kotra JH, Shahriar M. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies tocounter Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2000;3249-3256.
- Lautru S, Deeth RJ, Bailey LM, Challis GL. *Nat Chem Biol.* 2005;1:244–245.
- Lavelle P. Ecological challenges for soil science. *Soil Science.* 2000; 165(1):73-86.
- La Montagne MG, Schimel JP, Holsen PA. Comparison of subsurface and surface soil bacterial co mMunities in California Grassland as assessed by terminal restriction fragment length polymorphisms of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Microb Ecol.* 2003;46:216-227.
- Liras P, Martin JF. Gene cluster for β -lactam antibiotics and controlo f their expression: why have cluster evolved, and from where did they originate? *Intern Microbiol.* 2006;9: 9-19.
- Lim HK, Chung EJ, Kim JC, Choi GJ, Jang KS, Chung YR, Cho KY, Lee SW.

Characterization of a forest soil metagenome clone that confers indirubin and indigo production on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:7768–7777.

Lorenz P, Liebeton K, Niehaus F, Eck J. Screening for novel enzymes for biocatalytic process: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Current opinion in Biotechnol.* 2002; 13:572-577.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Microbiologia de Bacteria*. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

Martin JF, Gutiérrez S, Aparicio JF. Secondary metabolic. In: Ledenberg J. *Academ Press.* 2000; 213-236.

Mcalpine JB, Bachmann BO, Pirae M, Tremblay S, Alarco AM, McDaniel R, Ebert K S, Hopwood DA, Khosla C. Rational design of aromatic polyketide natural products by recombinant assembly of enzymatic subunits. *Nature.* 1995;375: 549–554.

Melo IS, De Azevedo JL. *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna: embrapa-CNPMA, 1997.

Metsä-ketelä M, Halo L, E Munukka, Hakala J, Mäntsälä P, Ylihonko K. Molecular evolution of aromatic polyketides and comparative sequence analysis of polyketide ketosynthase and 16S ribosomal DNA genes from various *Streptomyces species*. *Appl and Env Microbiol.* 2002; 4472-4479.

Moffitt MC, Neilan BA. Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. *Journal Mol Evol.* 2003;56(4):446-457.

Moreira FMS, Gillis M, Pot B, Kersters K, Franco AA. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Syst Appl Microbiol.* 1993;(16): 135-146.

Moore B. S & Piel, J. Engineering biodiversity with type II polyketide synthase genes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 391–398, 2000.

Morimoto, S e Fuji, T. A new approach to retrieve full lengths of functional genes from soil by PCR-DGGE and metagenome walking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 83:389–396, 2009.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca G A B, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature.* 2000; 403:853-858.

Myser G. Structure, function and dynamics of microbial communities: the molecular biological approach. *Advances in Molecular Ecology*,. 1998; 86-117.

Muysers G, Ramsing N B. Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Water Science Technology.* 1995;32:1-9.

Núñez LE, Mendez C, Brana AF, Blanco G, Salas JA. The Biosynthetic gene cluster for the β -lactam carbapenem thienamycin in *Streptomyces catelleya*. *Chemistry & Biology*. 2003;10:301-311.

Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M, Takahashi Y, Horikawa H, Nakazawa H, Osonoe T, *et al.* *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98:12215–12220.

O'Hagan D. *The Polyketide Metabolites*; Ellis Horwood: Chichester, U.K. 1991.

Osburne MS, Grossman TH, August PR, Macneil IA. Tapping into microbial diversity for natural products drug discovery. *ASM News*. 2002;66(7): 411-417.

Ovreas L. Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. *Ecol Lett*. 2000;3:236-251..

Ovreas L, Torsvik V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb Ecol*. 1998;36:303-315.

Peláez F. The historical delivery of antibiotic from microbial natural products can history repeat? *Biochem Pharmacol*. 2006;71:981-990.

Piepersberg, W. *Streptomyces* and corynebacteria, 1993. In: Kleinlauf HE, Döhrem VON H. *Biotechnolog*. 1997;7:1-728.

Pickup WR. Development of molecular methods for the detection of specific bacteria in the environment. *Journ of Gener Microbiol*. 1991;137: 1009-1019..

Purohit Mk, Singh SP. Assessment of various methods for extraction of metagenomic DNA from saline habitats of coastal Gujarat (India) to explore molecular diversity. *Lett Appl Microbiol*. 2009;49(3):338-44.

Racke K D. Pesticide in the soil microbial ecosystem. In: Racke, K.D.; Coats, J.R. *Enhanced biodegradation of pesticides in the environmental*. 1990;1-12.

Ranganathan A, Timoney M, Bycroft M, Cortes J, Thomas IP, Wilkinson B *et al.* Knowledgebased design of bimodular and trimodular polyketide synthases based on domain and module swaps: a route to simple statin analogues. *Chem Biol*. 1999;(6):731–741.

Reeves DR. The enzymology of combinatorial biosynthesis. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2003;23(2):95-147.

Rodriguez-Valera F. Environmental genomics, the big picture? *FEMS Microbiol Lett*. 2004;231: 153-158.

Rondon M.R, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, Loiacono KA, et al. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(6):2541-2547.

Roselló-Mora R, Amann R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* 2000; 25: 39-67.

Sandmann A, Dikschat J, Jenke-Kodama H, Kunze B, Dittmann ERM. *Lier Angew Chem.* 2007;119:2768 – 2772;

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

Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

Schloss PD, Handelsman J. Toward a Census of Bacteria in Soil, *PLoS Comput Biol.* 2006;2(7): 92.

Schloss PD, Handelsman J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current opinion in Biotechnology.* 2003;14: 303-310.

Schleifer HK. Microbial diversity: facts, problems and prospects. *System Appl Microbiol.* 2004; 27: 3-9.

Seow KT, Meurer G, Gerlitz M, Wendt-Pienkowski E, Hutchinson CR, Davies J. A study of iterative type II polyketide synthases using genes cloned from soil DNA: a means to access and use genes from uncultured microorganisms. *Jour Bacteriol.* 1997;179: 7360-7368

Sheo B. Singh SB, Barrett JF. Empirical Antibacterial Drug Discovery—Foundation In natural products. *Bi oChme Pharmacol.* 2006;71:1006-1015.

Shen Y, Yoon P, Tin-Wien Y, Floss GH, Hpwood D, Moore SB. Ectopic expression of the minimal *whiE* polyketide synthase generates a library of aromatic polyketides of diverse sizes and shapes. *PNAS.* 1999;96(7):3622-3627.

Schmeisser C, Steele H, Wolfgang RS. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;75(5):955-962.

Stach Je, Maldonado La, Masson Dg, Ward Ac, Goodfellow M, Bull At. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(10):6189-200.

Stenberg B. Monitoring soil quality of arabe land: Microbiological indicators. *Soil and Plant Sciense.* 1999;49:1-24.

Streit WR, Schmitz RA. Metagenomics- the key to the uncultured microbes. *Curr Opin in Microbiol.* 2004; (7): 492-498.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 2007;24:1596-1599.

Torvisk V L. Isolation of bacterial DNA from soil . *Soil bBiol Bi oChem.* 1980;12n18-21.

Torsvik V, Øvreas L. Microbial diversity abd function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opinion Microbiol.*2000;5: 240-245.

Uchiyama T, Abe T, Ikemura T, Watanabe K. Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nat Biotechnol.* 2005;23:88–93.

Vinning LC. Roles of secondary metabolites from microbes. *Secondary metabolites: their funstion and evolution.* While, Chihester-Ciba foundation Symposium.1990;171:184-198.

Wang G-Y-S, Gui-Yang-Sheng Wang, Graziani E, Waters B, Pan W, Li X, McDermott J, et al. Novel natural products from soil DNA libraries in a *Strptomycete* host. *Jour Am Chem S oC.* 2000; 2(16): 2401-2404.

Ward DM. A natural species concept for prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology.*1998;1(3): 271-277..

Wawrik B, Kerkhof L, Gerben JZ, Kukor1 JJ.. Identification of Unique Type II Polyketide Synthase Genes in Soil. *Applied and Environmental Microbiology.* 2005;(71): 2232-2238.

Weissman KJ, Leadlay PF. Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(12): 925-36.

Woose C R. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 1987;51(2):221-71.

Wu K, Chung L, Revelli P, Katz L, Reeves CD. The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var.*asco myceticus* (ATCC17891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide units. *Gene.* 2000;25(1):81-90.

Yadav G, Gokhale RS, Mohanty D. Computational Approach for Prediction of Domain Organization and Substrate Specificity of Modular Polyketide Synthases. *Journ Mol Biol.* 2003; 328: 335–363.

Yamada K, Terahara T, Kurata S, Yokomaku T, Tsuneda S, Harayama S. Retrieval of entire genes from environmental DNA by inverse PCR with pre-amplification of target gene using primers containing l oCked nucleic acids. *Environ Microbiol.* 2008;10:978–987.

Yilmaz M, Soran H, Beyatli Y. Antimicrobial activities of some *Bacillus spp.* strains isolated from the soil. *Microbiological Research.* 2006;161:127-131.

Zazopoulos E, Farnet CM. Microbial Genomics as a Guide to Drug Discovery and Structural Elucidation: ECO-02301, a Novel Antifungal Agent, as an Example. *Jour Nat Prod.* 2005;68(4): 493-496.

Zazopoulos E, Huang K, Staffa A, Liu W, Bachmann Bo, Nonaka K, Ahlert J, Thorson Js, Shen B, Farnet Cm. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21:187-190.

Zhou J, BRUNS MA, TIEDJE J. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(2):316-322.

Zhou J, Davey ME, Figueras JB, Rivkina E, Gilichinsky D, Tiedje JM. Phylogenetic diversity of a bacterial community determined from Siberian tundra soil DNA. *Microbiology.* 1997;143:3913-3919.