MAURÍCIO ROCHA DIMITROV

**CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA METAGENÔMICA
E PROSPECÇÃO DE GENES PARA A SÍNTESE DE
POLIHIDROXALCANOATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora:

Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

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

Dimitrov, Maurício Rocha.

Construção de biblioteca metagenômica e prospecção de genes para a síntese de polihidroxialcanoatos / Maurício Rocha Dimitrov. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Microbiologia Aplicada. Linha de pesquisa: Microbiologia, Genética Molecular.

Versão do título para o inglês: Metagenomic library construction for PHA synthase screening.

Descritores: 1. Bibliotecas metagenômicas 2. Polihidroxialcanoatos 3. PHA sintase 4. Polímeros bacterianos 5. Fosmídeo 6. Biotecnologia I. Lemos, Eliana Gertrudes de Macedo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB0149/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Maurício Rocha Dimitrov.

Título da Dissertação: Construção de biblioteca metagenômica e prospecção de genes para a síntese de polihidroxialcanoatos .

Orientador(a): Eliana Gertrudes de Macedo Lemos.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **331/09**, referente ao projeto intitulado: “*Construção de biblioteca metagenômica e prospecção de genes para a síntese de polihidroxalcanoatos*” sob a responsabilidade de **Mauricio Rocha Dimitrov**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPsh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 18 de agosto de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais,

Maurício Dimitrov e Marieni Rocha da Silveira Dimitrov,

que são os grandes responsáveis por tudo que sou e por tudo

que conquistei até hoje. Obrigado pelo amor, carinho, dedicação,

paciência, esforço, compreensão, amizade, apoio, incentivo e

por possibilitar a realização de um grande sonho. Amo vocês.

Ao meu irmão,

Gabriel Rocha Dimitrov, pelo amor, carinho,

amizade, incentivo, apoio, compreensão e companheirismo.

A minha avó, Maria Thereza de Freitas Rocha,

pelo amor, carinho, dedicação, apoio e incentivo.

Você foi, é, e sempre será muito importante em minha vida.

A minha esposa e companheira,

Fernanda Laroza Paganelli pelo amor e carinho incondicional,

pelo apoio, incentivo, compreensão, paciência, amizade, ajuda e

companheirismo em todos os momentos. Você é muito especial.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pela oportunidade, amizade, apoio, incentivo, compreensão, confiança e, principalmente, pela orientação segura e ensinamentos que levarei sempre comigo em minha vida profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves, pela amizade, apoio, incentivo, imensa ajuda e ensinamentos, que foram de fundamental importância para a realização deste trabalho e meu aprendizado.

Ao Dr. João Carlos Campanharo pela amizade, ajuda, por me ensinar os primeiros passos no laboratório e por todo auxílio nas práticas laboratoriais.

Ao Msc. Douglas Antônio Alvaredo Paixão, meu grande companheiro nesta interminável jornada em busca do conhecimento. Chegamos juntos, aprendemos juntos, trabalhamos juntos, e crescemos juntos, sempre! Sem você, meu grande amigo, tudo teria sido diferente.

A Dra. Simone Picchi, você chegou e não levou muito tempo para conquistar a todos nós. Obrigado pela amizade, paciência, imensa ajuda e ensinamentos.

Aos meus amigos Luciano Takeshi Kishi e Maurício Egídio Cantão pela amizade e grande ajuda com as análises de bioinformática.

A todas as pessoas que fizeram e fazem parte do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas. Sem a amizade e ajuda de vocês a realização deste trabalho não seria possível.

À família Laroza Pagenelli, que me “adotou” e sempre me recebeu com todo amor e carinho.

Aos meus familiares, pelo amor, carinho, incentivo, apoio e amizade, em especial: Tia Maitê e minhas primas Mariana e Joana, Tio Ricardo, Tia Ana, minha prima Tatiana (*in memoriam*) que sempre estará em meu coração e minha cachorra Mel.

A Dra Eiko Eurya Kuramae e a todos os integrantes do “Departament of Terrestrial Microbial Ecology” pertencente ao “The Netherlands Institute of Ecology”, pela ajuda e acolhimento.

Aos meus grandes amigos Alexandre Fernandes de Carvalho, Haroldo Xavier Linhares Volpe e Victor Gasperotto Krepschi, com quem morei e dividi experiências maravilhosas.

Ao meu amigo, Eduardo Fernandes Vasconcellos, amigo e companheiro de longa data.

A todos os meus amigos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram com a realização deste sonho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida.

RESUMO

DIMITROV, M. R. **Construção de biblioteca metagenômica e prospecção de genes para a síntese de polihidroxicarboxilatos**. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Historicamente, estudos sobre a diversidade microbiana e descoberta de metabólitos secundários têm se apoiado na suposição de que o cultivo revela a maioria dos microrganismos da amostra. No entanto, progressos em ecologia microbiana molecular mostram a existência de muitos novos tipos de microrganismos, os quais suplantam aqueles poucos revelados pelo cultivo em laboratório. Esta percepção proporcionou a base científica para o desenvolvimento de nova abordagem de acesso ao potencial metabólico dos microrganismos, sem a necessidade de cultivá-los. Tal abordagem, denominada metagenoma, constitui-se de um conjunto de técnicas de biologia molecular, que permitem o acesso da diversidade total da microbiota de um determinado ambiente, mesmo na ausência de cultivo. Visto que, produtos derivados do metabolismo secundário microbiano, têm sido utilizados para fins médicos, industriais e agrícolas, e que a maioria desses metabólitos secundários, em uso hoje, é obtida a partir de microrganismos habitantes do solo, torna-se justificável o estudo deste ambiente na procura de novos genes de interesse biotecnológico. Como objetivo o projeto visou identificar e avaliar a diversidade de organismos (bactérias) produtores de polihidroxicarboxilatos (PHAs), em diferentes amostras de solo. Os PHAs são macromoléculas produzidas por diferentes grupos de bactérias, sendo que estas possuem propriedades materiais similares a de alguns plásticos petroquímicos, no entanto, diferentemente dos plásticos petroquímicos, são biodegradáveis e recicláveis, fazendo com que a variedade das aplicações destes biopolímeros seja muito grande. Para identificação destes organismos utilizou-se abordagem metagenômica em amostras de solo coletadas em uma região sob arboreto de eucalipto (UNESP/Jaboticabal), sedimentos contaminados por óleo (Bacia de Guanabara/RJ), campo experimental sob cultivo (Feagri/UNICAMP), e de um consórcio microbiano isolado de solo contaminado com óleo diesel (Ribeirão Preto/SP). Procurou-se assim, investigar o potencial da tecnologia metagenômica, na recuperação de genes e/ou produtos gênicos de interesse biotecnológico. A extração de DNA das amostras coletadas foi realizada com o Fast DNA spin Kit for soil (MP Biomedicals), de acordo com as recomendações do fabricante. Usou-se o DNA total extraído para a construção de bibliotecas metagenômica em vetor fosmídeo, utilizando-se kits comerciais (EPICENTRE), de acordo com as recomendações do fabricante. Os clones obtidos foram utilizados para a construção de macroarranjos de DNA, onde se buscou, através de sondas não radioativas, identificar a presença do gene *phaC* em tais clones. Foram utilizadas sondas para as quatro classes conhecidas do gene *phaC*. Tais sondas, foram obtidas amplificando-se, por reação em cadeia da polimerase (PCR), o DNA total extraído de solo sob arboreto de eucalipto, com conjuntos de oligonucleotídeos para as quatro classes do gene *phaC*. Tais produtos de amplificação foram clonados em vetor pGEM®-T Easy (Promega), e os clones obtidos foram seqüenciados. A prospecção realizada nas diferentes bibliotecas metagenômicas resultou na identificação de clones contendo o gene *phaC*, quando utilizadas sondas para PHA sintase do tipo I, II e III. Não foi encontrado, nas

bibliotecas metagenômicas, clones que contenham o gene para PHA sintase do tipo IV. Os produtos de amplificação dos diferentes conjuntos de oligonucleotídeos, utilizados na síntese das sondas, foram utilizados para construção de modelos filogenéticos para o gene *phaC*. De uma forma geral, pôde-se concluir que ainda há uma grande diversidade do gene *phaC* a ser descoberta no ambiente estudado.

Palavras-chave: Bibliotecas metagenômicas. Polihidroxialcanoatos. PHA sintase. Polímeros bacterianos. Fosmídeo. Biotecnologia.

ABSTRACT

DIMITROV, M. R. **Metagenomic library construction for PHA synthase screening**. 2009. 100 p. Master thesis (Biotechnology) - Programa Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Historically, studies about microbial diversity and discovery of secondary metabolites have relied on the assumption that culture reveals majority of microorganisms in the sample. However, progress in molecular microbial ecology has showed the existence of new kinds of microorganisms, which outnumber those few revealed by culture in the laboratory. This perception provided the scientific basis for development of new approach to access the metabolic potential of microorganisms without the need to cultivate them. This approach, called metagenomic, it is a set of molecular biology techniques, which allow access to the total diversity of microorganism in a particular environment, even in the absence of cultivation. Since, products derived from microbial secondary metabolism, have been used for medical, industrial and agricultural activities and that most of these secondary metabolites in use today, are obtained from soil microorganisms, it becomes justifiable to study this environment in order to search new genes that have biotechnological interest. The aim of this work was to identify and access the diversity of organisms (bacteria) in soil, that produce polyhydroxyalkanoates (PHAs). The PHAs are macromolecules produced by different groups of bacteria, and these materials have similar properties to some petrochemical plastics, however, differently of petrochemical plastics, are biodegradable and recyclable, making applications of these polymers very large. For identification of these organisms the metagenomic approach was used in soil samples, collected from an area under eucalyptus arboretum (UNESP/Jaboticabal), sediments contaminated by oil (Guanabara Bay/RJ), experimental field under cultivation (Feagri/UNICAMP), and a microbial consortium isolated from soil contaminated with diesel oil (Ribeirão Preto/SP). Therefore it tried to investigate the potential of metagenomic technology in order to recovery genes and gene products that might have biotechnological interest. The extraction of DNA from collected samples was performed with the Fast DNA spin kit for soil (MP Biomedicals), according to the manufacturer's recommendations. The total DNA extracted was used to construct metagenomic libraries using fosmid vector, provided in commercial kit (EPICENTER), according to the manufacturer's recommendations. The clones obtained were used for construction of DNA macroarrays. These macroarrays were used to screening all the metagenomic libraries, using non-radioactive probes, to identify the presence of the phaC gene in those libraries. It was used probes for the four known classes of phaC gene. These probes were obtained by amplifying the total DNA extracted from soil under eucalyptus arboretum by polymerase chain reaction (PCR), with sets of primers for the four classes of gene phaC. These amplification products were cloned into vector pGEM ®-T Easy (Promega), and the clones obtained were sequenced. The screening of metagenomic libraries had resulted in an identification of clones containing the phaC gene, when used probes for PHA synthase type I, II and III. It was not found in the metagenomic libraries, clones containing the gene for PHA synthase type IV. The amplification products of different sets of primers, used in the synthesis of the probes, were used to construct

phylogenetic models for gene phaC. In a general way, it was concluded that there is still a great diversity of phaC gene to be discovered in the studied environment.

Key words: Metagenomic library. Polyhydroxyalkanoates. PHA synthase. Bacterial polyesters. Fosmid. Biotechnology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Diversidade microbiana do solo	18
2.2 Análise molecular e abordagem metagenômica da diversidade microbiana do solo	19
2.3 Metagenoma e biotecnologia	21
2.4 Os polihidroxicarboxilatos	23
2.5 Importância e aplicação dos polihidroxicarboxilatos	24
2.6 Enzimas envolvidas na biossíntese de polihidroxicarboxilatos	26
3 OBJETIVOS	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Amostras ambientais	29
4.2 Extração do DNA metagenômico	29
4.3 Quantificação do DNA do solo	30
4.4 Determinação do tamanho do DNA por eletroforese em campo pulsado...	31
4.5 Meios de cultura utilizados	31
4.6 Construção de biblioteca metagenômica a partir de DNA extraído das amostras de solo	31
4.6.1 Reparo dos fragmentos para clonagem em vetor fosmídeo	32
4.6.2 Seleção do tamanho dos insertos	32
4.6.3 Eluição dos fragmentos reparados do DNA	33
4.6.4 Clonagem dos insertos em vetor fosmídeo	33
4.6.5 Reação de ligação dos insertos no vetor fosmídeo	34
4.6.6 Reação de empacotamento	35
4.6.7 Preparo do inóculo de células EPI300-T1 ^R	35
4.6.8 Infecção das células EPI300-T1 ^R	35
4.6.9 Seleção, cultivo e estoque dos clones	36
4.6.10 Cultivo dos clones bacterianos e extração do DNA fosmidial	36

4.6.11 Quantificação do DNA fosmidial	37
4.7 Construção dos macroarranjos	37
4.7.1 Seleção dos clones para a confecção dos macroarranjos	37
4.7.2 Construção dos macroarranjos de colônias bacterianas a partir das bibliotecas metagenômicas de campo experimental, sedimento e arboreto de eucalipto	38
4.7.2.1 Confecção das membranas	39
4.7.2.2 Desenvolvimento das bactérias na membrana	41
4.7.2.3 Processamento da membrana após desenvolvimento das bactérias	42
4.7.3 Confecção dos macroarranjos de DNA a partir da biblioteca metagenômica do consórcio microbiano	42
4.7.3.1 Cultivo, extração e quantificação do DNA fosmidial	42
4.7.3.2 Confecção das membranas.....	43
4.8 Amplificação, por reação em cadeia da polimerase (PCR), da região do DNA correspondente a PHA sintase	44
4.9 Construção de sondas para a prospecção das diferentes classes de PHA sintases	46
4.9.1 Amplificação, por PCR, do gene <i>phaC</i>	46
4.9.2 Purificação dos produtos de PCR obtidos	46
4.9.3 Eluição dos fragmentos do gel e quantificação do DNA obtido	47
4.10 Construção de bibliotecas a partir das sondas obtidas.....	48
4.10.1 Clonagem em vetor pGEM®-T Easy	48
4.10.1.1 Reações de ligação	48
4.10.2 Transformação das células competentes	48
4.10.3 Seleção, cultivo e estoque dos clones	49
4.10.4 Cultivo dos clones bacterianos e extração do DNA Plasmidial	49
4.10.5 Quantificação do DNA Plasmidial	50
4.11 Sequenciamento dos clones das bibliotecas construídas a partir das sondas obtidas.....	50
4.12 Análise das seqüências	51
4.13 Hibridização dos macroarranjos	52
4.14 Análise das imagens	52
4.15 Confirmação, por PCR, dos clones positivos	53

4.16 Sequenciamento dos clones positivos	53
4.17 Construção de sub-biblioteca	53
4.17.1 Fragmentação do DNA	53
4.17.2 Precipitação do DNA fragmentado	54
4.17.3 Reparo das extremidades dos fragmentos	54
4.17.4 Fosforilação dos fragmentos reparados	54
4.17.5 Seleção do tamanho dos insertos	55
4.17.6 Eluição dos fragmentos de DNA do gel de agarose	55
4.17.7 Clonagem dos insertos em vetor plasmideo	56
4.17.7.1 Reação de ligação	56
4.17.8 Transformação das células competentes	57
4.17.9 Seleção, cultivo e estoque dos clones	57
4.17.10 Cultivo dos clones bacterianos e extração do DNA Plasmidial	57
4.17.11 Quantificação do DNA Plasmidial	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 Amostras ambientais	58
5.2 Extração e Quantificação do DNA do solo	59
5.3 Construção de biblioteca metagênômica a partir de DNA extraído das amostras de solo	60
5.4 Construção dos macroarranjos	61
5.5 Amplificação, por PCR, da região do DNA correspondente a PHA sintase ...	63
5.6 Construção de sondas para prospecção das diferentes classes de PHA sintase	67
5.7 Construção de bibliotecas a partir das sondas obtidas	68
5.8 Sequenciamento e análise das seqüências	70
5.9 Hibridização dos macroarranjos	83
5.10 Análises das imagens	85
5.11 Confirmação e sequenciamento dos clones positivos	88
5.12 Sub-biblioteca	89

6 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 50 anos, produtos derivados do metabolismo secundário microbiano têm sido utilizados para fins médicos, industriais e agrícolas. A maioria desses metabólitos secundários, em uso hoje, é obtido a partir de microrganismos habitantes do solo. Dentre uma variedade de metabólitos secundários produzidos, os polihidroxicanoatos (PHAs) sintetizados por diversas bactérias Gram positivas e Gram negativas, despertam interesse para estudos que indiquem métodos que possam melhorar e facilitar a produção destes produtos do metabolismo bacteriano. Os PHAs são macromoléculas que possuem propriedades materiais similares a de alguns plásticos comuns, como o polipropileno. A origem microbiana dessas macromoléculas faz delas produtos naturais e, certamente, muitos organismos possuem a habilidade de degradá-las, o que as tornam biodegradáveis e recicláveis, fazendo com que haja um grande interesse em uma variedade de aplicações destes polímeros.

Historicamente, estudos sobre a diversidade microbiana e a descoberta de metabólitos secundários têm se apoiado na suposição de que pelo cultivo a maioria dos microrganismos da amostra é identificada. Pesquisas realizadas nas últimas décadas têm mostrado que a verdadeira extensão da diversidade microbiana é ainda desconhecida, devendo exceder, em muito, as estimativas prévias, devido ao fato de que muitos microrganismos não são recuperados através de cultivo, pelas técnicas existentes. Anteriormente ao surgimento de técnicas de avaliação da diversidade microbiana, através do uso de marcadores moleculares, a diversidade taxonômica e genômica de microrganismos eram avaliadas, principalmente, através da caracterização fenotípica e/ou genotípica de organismos isolados e cultivados em laboratório. Entretanto, tem sido demonstrado que os organismos cultivados representam apenas uma fração pequena da diversidade de espécies em comunidades microbianas. A visualização direta dos microrganismos em uma amostra natural de solo, através de coloração e microscopia, revelou que não muito mais do que 1-10% das células da amostra podem ser estudadas pela técnica de cultivo. Certamente, ambos os métodos, baseado em cultivo ou cultivo-independente, sem dúvida, apóiam o estabelecido de que os solos representam um dos mais diversos habitats para microrganismos.

Progressos na ecologia microbiana molecular têm proporcionado à base científica para o desenvolvimento de novas abordagens de acesso ao potencial metabólico dos microrganismos do solo sem a necessidade de cultivá-los. A metagenômica, denominação dada ao conjunto de genomas da microbiota total encontrada em uma determinada amostra, seja ela ambiental ou não, vem se constituindo numa das abordagens mais interessantes para o acesso da diversidade total da microbiota do solo, permitindo, inclusive, o exame da genômica funcional de seus membros, mesmo na ausência de cultivo.

Desta forma a utilização de tal abordagem se mostra promissora na busca de genes e/ou produtos gênicos com interesses biotecnológicos, que possam ser utilizados ou incorporados em processos industriais, visando melhorias e diminuição de custos destes processos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diversidade microbiana do solo

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

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

Até recentemente, com o desenvolvimento de técnicas de cultivo puro, os microrganismos puderam ser estudados individualmente e caracterizados, principalmente, por critérios nutricionais. Nesse contexto, vários meios de cultura, seletivos ou não, foram utilizados para enumerar e isolar microrganismos do solo e da rizosfera, com influência dos mesmos nos graus da diversidade genética obtida (BUYER, 1995; TABACCHIONI et al., 2000). Entretanto, a abordagem do cultivo limitou, seriamente, a avaliação taxonômica e filogenética como estimativa da

diversidade microbiana, devido à falha de cultivo da maioria dos microrganismos pelos métodos convencionais (PACE, 1997). Estudos sobre diversidade microbiana utilizando técnicas de contagem direta de células e microscopia revelam que é possível recuperar não mais que 1-10% dos microrganismos presentes em uma amostra ambiental, através de técnicas de cultivo e isolamento (AMANN et al., 1995; HUGENHOLTZ et al., 1998). Entretanto, ferramentas moleculares e tecnologias baseadas em seqüências gênicas vêm reduzindo essas limitações e revelando nova perspectiva sobre a diversidade microbiana.

A caracterização dos microrganismos não-cultiváveis, utilizando-se de métodos moleculares e análises filogenéticas a partir de seqüências de DNA é, portanto, uma nova abordagem para identificar e conhecer suas distribuições e funções no meio ambiente. Esses novos métodos de detecção de microrganismos, sem necessidade de cultivá-los, certamente, contribuirão para inferências inéditas sobre o significado dos mesmos nos solos.

Ambas as abordagens, baseadas em cultivo (HATTORI et al., 1997) ou cultivo-independente, apóiam, uma vez mais, o estabelecido de que os solos representam um dos mais diversos habitats para microrganismos. Estudos moleculares confirmam esta rica diversidade, tal como obtido por análises de seqüências da porção 16S do RNA/DNA ribossomal entre divisões bacterianas divergentes (HUGENHOLTZ et al., 1998).

2.2 Análise molecular e abordagem metagenômica da diversidade microbiana do solo

A partir da década de 80, um grande número de metodologias moleculares baseadas no estudo de DNA começou a ser desenvolvidas para análise da diversidade microbiana dos solos (AMANN et al., 1995; BORNEMAN et al., 1996; ZHOU et al., 1996; CULLEN e HIRSCH, 1998; DUARTE et al., 1998; SANDAA et al., 1998; TORSVIK et al., 1998). Com quantidades pequenas de solo, os procedimentos de extração e purificação de DNA através de kits comerciais permitem análise de múltiplas amostras com alta eficiência, tornando-as, também, muito rápidas (ZHOU

et al., 1996; KUSKE et al., 1998; OGRAM, 2000). Através de reassociação cinética do DNA extraído de comunidades bacterianas, Torsvik et al. (1990a, 1990b) encontraram valores acima de 10 mil espécies em apenas um grama de solo sob floresta, muitas das quais nunca haviam sido cultivadas em laboratório. RITZ e GRIFFITHS (1994), através de hibridização do DNA total extraído de diferentes solos, e sob diversas condições, verificaram diferentes padrões de diversidade genética entre os mesmos. O acesso molecular individual das espécies de bactérias existentes no solo tem-se baseado na amplificação e clonagem do gene correspondente a porção 16S do RNA/DNA ribossomal (AMANN et al., 1995; BORNEMAN et al., 1996; LEE et al., 1996; KUSKE et al., 1997; GELSOMINO et al., 1999).

A análise da comunidade total de DNA de uma amostra constitui-se em uma medida de sua heterogeneidade, inferindo-se para a diversidade microbiana presente na mesma. Os genomas da microbiota total encontrada em uma comunidade são denominados coletivamente de metagenoma (HANDELSMAN et al., 1998; HANDELSMAN, 2004), sendo que tal estratégia acessa muito mais informação genética que os procedimentos baseados em cultivo. Esta abordagem tem sua origem nos genomas de eucariotos (RONDON et al., 1999). Através de amplificação, clonagem e análise de segmentos de DNA microbiano do solo, pode-se avaliar, com mais detalhes, a fisiologia e a função dos microrganismos na natureza. No solo, estudos envolvendo as seqüências 16S do RNA/DNA ribossomal com análises metagenômicas, se constituíram nos primeiros passos para a ligação da fisiologia e função de sua microbiota total (RONDON et al., 1999).

A metagenômica oferece, assim, um caminho para acessar mais completamente a diversidade microbiana total de um solo, permitindo examinar a genômica funcional dos membros de sua microbiota, mesmo na ausência de cultivo de muitos dos organismos presentes.

2.3 Metagenômica e biotecnologia

Se analisarmos a história, o desenvolvimento da microbiologia e o uso dos microrganismos como fonte de produtos naturais de grande importância para a humanidade, veremos que os microrganismos do solo tiveram, e ainda tem grande importância neste cenário (BULL et al., 2000). Nos últimos 50 anos, produtos derivados do metabolismo secundário microbiano têm sido utilizados para fins médicos, industriais e agrícolas, tais como antibióticos, antifúngicos, antitumorais, probióticos, biopolímeros, enzimas das mais variadas classes, herbicidas, pesticidas, entre outros, sendo importantes tanto para pesquisas acadêmicas, como para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas (OLIVEIRA et al.; 2006).

Tradicionalmente compostos com atividades biológicas tem sido acessados por métodos tradicionais de isolamento e cultivo dos organismos, a partir de amostras ambientais. Tal abordagem ainda é utilizada atualmente para a busca de novas enzimas aplicáveis a processos industriais. No entanto, a alta taxa de “redescoberta” de produtos naturais, principalmente metabólitos secundários, a partir de microrganismo cultiváveis tem mostrado que novas alternativas precisam ser adotadas (ZAEHNER e FIEDLER, 1995). Diante deste panorama, metodologias moleculares foram criadas e adaptadas, superando assim a limitação imposta pela necessidade de cultivo dos microrganismos. A extração de ácidos nucleicos totais de uma amostra e análise de seqüências-alvo nas amostras mistas de DNA de diversos microrganismos (metagenoma) vêm sendo adotada como metodologia padrão para analisar a diversidade microbiana de um determinado local, revelando inclusive, a existência de muitos grupos de microrganismos nunca antes cultivados (WARD et al. 1990; PACE, 1996; HUGENHOLTZ et al., 1998).

Apesar de tal metodologia ser muito eficiente para o estudo da diversidade microbiana, não é possível, da forma anteriormente descrita, acessar o potencial metabólico dos microrganismos presentes na amostra estudada. A estratégia encontrada para o acesso a esse enorme potencial metabólico foi à construção de bibliotecas metagenômicas, onde fragmentos de DNA, extraídos de uma amostra ambiental, são clonados em vetores do tipo cosmídeos, fosmídeos ou BACs, vetores estes, que suportam a clonagem de fragmentos grandes de DNA (20-300 Kb). Uma

vez que este DNA ambiental está imobilizado nas bibliotecas metagenômicas, estas são analisadas em busca de novos produtos com atividades biológicas desejadas (HANDELSMAN et al., 1998; RONDON et al., 2000). Desta forma, as bibliotecas metagenômicas oferecem assim uma alternativa de acesso mais abrangente a diversidade microbiana de um dado ambiente, permitindo a análise de genes funcionais de membros da microbiota do ambiente estudado, possibilitando inclusive a identificação de compostos com atividades biológicas de interesse, em um numero maior do que as técnicas tradicionais de cultivo permitem (LORENZ et al., 2002).

Podemos encontrar na literatura diversos exemplos de estudos que, através de prospecção de bibliotecas metagenômicas, foram capazes de identificar novos genes, dos mais variados tipos (HENNE et al., 1999; HENNE et al., 2000; GUPTA et al., 2002; GINOLHAC et al., 2004). Os avanços recentes obtidos na procura por novos produtos com atividades biológicas interessantes, fazem da clonagem metagenômica e da prospecção dos clones resultantes, uma tecnologia oportuna e factível (OLIVEIRA, et al., 2006).

Atualmente, a biotecnologia é tida como uma das mais promissoras tecnologias, com potencial para revolucionar a busca por novos recursos biológicos industrialmente exploráveis, por novas soluções para problemas como doenças, nutrição, sustentabilidade e poluição ambiental, ainda mais sabendo que tal revolução é de extrema importância no atual cenário mundial (LORENZ e ECK, 2005). Há tempos os microrganismos vêm ajudando a humanidade a lidar, melhorar e, às vezes, até solucionar problemas como estes, portanto, investir em tecnologias que ajudem a aprimorar o conhecimento a respeito desses organismos é de fundamental importância. Seguramente a metagenômica tem muito a contribuir com o avanço da biotecnologia e, conseqüentemente, com a melhoria da qualidade do ambiente em que vivemos.

2.4 Os polihidroxialcanoatos

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres sintetizados por diversos grupos bacterianos e armazenados na forma de inclusões citoplasmáticas como reserva de carbono, energia e poder redutor (ANDERSON e DAWES, 1990). Estes polímeros têm atraído recentemente muita atenção por causa de seu uso potencial como termoplásticos biodegradáveis e elastômeros, além de poderem ser produzidos a partir de substratos renováveis (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

Historicamente, o polihidroxibutirato (PHB), um tipo de PHA, tem sido estudado e caracterizado mais extensivamente dentre os diversos tipos de PHAs, desde sua descoberta pelo microbiologista francês Maurice Lemoigne (LEMOIGNE, 1926). No entanto, atualmente já foram identificados cerca de 150 monômeros diferentes como constituintes dos PHAs (REHM, 2007), sendo que a incorporação destes monômeros aos grânulos depende do organismo produtor e do substrato a ele fornecido. A estrutura básica destes polímeros está apresentada na figura 1, onde de acordo com o número n , e o radical R , é formado um tipo de polímero. Assim como a incorporação monomérica, o tipo de polímero sintetizado também é determinado pelo substrato fornecido e organismo sintetizador.

Figura 1: Estrutura geral dos PHAs.

Os PHAs são sintetizados nas células bacterianas apenas em situações de desequilíbrio nutricional, onde há um excesso de uma fonte de carbono, concomitantemente a limitação de ao menos um nutriente essencial ao desenvolvimento e multiplicação celular, tal como fósforo, nitrogênio, oxigênio, entre outros (ANDERSON e DAWES, 1990; STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995). A limitação de algum nutriente essencial ao desenvolvimento e a multiplicação das

células bacterianas, na presença de excesso de carbono, indica para a bactéria que ela deve estocar esse carbono excedente, que futuramente será utilizado para a produção de energia e manutenção do organismo.

De acordo com Steinbüchel e Valentin, 1995 os PHAs podem ser classificados em dois grupos distintos: PHAs de cadeia curta (HAscl – “HydroxyAcids of Short-Chain-Length”) e PHAs de cadeia média (HAMcl – “HydroxyAcids of Medium-Chain-Length”). Os PHAs de cadeia curta são polímeros que apresentam monômeros contendo de 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal, e os PHAs de cadeia média são polímeros que apresentam monômeros contendo de 6 a 16 átomos de carbono na cadeia principal. Os PHAs de cadeia média são produzidos por diversas espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, enquanto que os PHAs de cadeia curta são produzidos por incrível gama de espécies bacterianas, pertencentes a diferentes gêneros (MADISON e HUISMAN, 1999).

Os PHAs correspondem a um conjunto grande de polímeros biodegradáveis com inúmeras aplicações. A composição monomérica e a massa molecular de um polímero definem as propriedades físicas e materiais deste, e conseqüentemente, a gama de aplicações ao qual tal polímero pode ser submetido. Os PHAs de cadeia curta, como por exemplo, o PHB, são polímeros mais duros, diferentemente dos PHAs de cadeia média, que são mais maleáveis, e que podem se apresentar inclusive como materiais viscosos e aderentes, dependendo da quantidade de monômeros insaturados em sua composição (GOMEZ, 2000).

2.5 Importância e aplicação dos polihidroxicarboxilatos

Não é necessário mais do que uma reflexão rápida para percebermos que os polímeros sintéticos (plásticos) estão presentes em uma quantidade absurdamente grande nos dias atuais. Basta um olhar ao redor e é possível perceber a quantidade de artefatos produzidos como o uso dos plásticos petroquímicos. Sabe-se que uns dos maiores desafios ambientais da atualidade é o esgotamento dos recursos não renováveis e o equacionamento da questão do lixo urbano, fatores que estão diretamente ligados ao setor de produção de plásticos. Em 2000, o Brasil produziu aproximadamente 23 mil toneladas de lixo/dia, sendo em média 20% desse volume correspondente aos plásticos (COUTINHO et al. 2004). Estima-se ainda o consumo mundial de plástico chegue a 140 milhões de toneladas/ano, sendo necessários 150

milhões de toneladas de combustível fóssil para a produção deste montante de plástico (SURIYAMONGKOL et al., 2007). Desta forma, torna-se essencial o desenvolvimento de alternativas que possam compatibilizar a praticidade do uso dos materiais plásticos e o desenvolvimento sustentável, permitindo o consumo e a conveniência, sem comprometer os recursos do planeta. Visto que a ordem de grandeza da degradação dos plásticos é 40-50 anos, podendo chegar até 200 anos no caso dos polímeros sintéticos (BOHMERT et al., 2002), somado ao montante de resíduos plásticos no lixo gerado, e a quantidade de combustível fóssil necessário para a sua produção, torna-se claro a urgência de adoção de alternativas ao uso destes materiais.

Uma das possíveis alternativas é a substituição dos polímeros de origem petroquímica pelos PHAs. Os PHAs possuem importantes propriedades que permite sua aplicação em diversas áreas. São termoplásticos, insolúveis em água, enantioméricos puros, não tóxicos, biocompatíveis, biodegradáveis (STEINBÜCHEL e EVERSLOH, 2003) e são produzidos com o uso de matéria prima renovável. Os PHAs podem ser utilizados nas mais variadas aplicações, tais como: embalagens, garrafas, filmes, fibras, produtos de higiene, pinos e suturas cirúrgicas, sistemas de liberação controlada de drogas, de hormônios, de inseticidas, entre outras.

No entanto, apesar da vantagem no critério ambiental, a produção em larga escala dos plásticos biológicos é mais cara quando comparada a produção dos plásticos de origem petroquímica, apesar disso, o Brasil apresenta-se como um forte candidato a ser um dos maiores produtores mundiais de PHAs. Sabe-se que o custo da fonte de carbono utilizada na produção dos PHAs contribui significativamente no seu custo final, portanto, o Brasil como um dos maiores produtores mundiais de fontes de carbono renováveis, apresenta-se com um grande potencial para a produção destes biopolímeros com um custo aceitável (PRADELLA, 2006).

Diante do atual panorama descrito, torna-se justificável o investimento em estudos que procurem aperfeiçoar processos de produção, a fim de barateá-los, assim como, estudo que busquem identificar novos organismos capazes de sintetizar novos polímeros, ou capazes de oferecer novos genes e/ou novas vias metabólicas que venham a contribuir com a busca por uma produção acessível.

2.6 Enzimas envolvidas na biossíntese de polihidroxialcanoatos

O caminho biossintético para a formação dos PHAs em bactérias, de uma forma geral, consiste de três reações enzimáticas, catalisadas por três enzimas distintas (MADISON e HUISMAN, 1999), sendo elas: β -cetotiolase, acetoacetil-CoA redutase e PHA sintase.

A primeira reação para a biossíntese dos PHAs consiste na condensação reversível de duas moléculas de acetil-CoA em uma de acetoacetil-CoA e CoASH livre, catalisada pela enzima β -cetotiolase (codificada pelo gene *phaA*). A regulação da reação de condensação ocorre pela concentração celular de coenzima A. Acredita-se que em condições normais de crescimento bacteriano, têm-se altos níveis de coenzima A livres na célula, devido à grande demanda por grupos acetil exercida pelo ciclo de Krebs. Supõe-se que as altas taxas de CoA tem efeito inibitório sobre a enzima β -cetotiolase, impedindo a síntese de PHA. Em excesso de fonte de carbono e energia, mas com a limitação de alguns nutrientes essenciais que impedem a multiplicação da bactéria, a demanda por acetil diminui, e com isso os níveis de CoA livre se tornam reduzidos, diminuindo assim, a inibição sobre β -cetotiolase e desencadeando a síntese de PHA (GOMEZ e NETO, 2000).

Na segunda reação a redução da molécula de acetoacetil-CoA para (R)-3-hidroxiacil-CoA é promovida, reação catalisada pela enzima acetoacetil-CoA redutase, enzima esta dependente de NAPH. A enzima acetoacetil-CoA redutase é codificada pelo gene *phaB*.

Na terceira e última reação, as unidades de (R)-3-hidroxiacil-CoA são polimerizados, pela enzima PHA sintase, formando os polihidroxialcanoatos. A enzima PHA sintase apresenta-se como a enzima chave para a síntese de PHAs, pois esta catalisa a reação decisiva desta via biossintética. Tal enzima é codificada pelo gene *phaC* e estudos sobre seu funcionamento (REHM, 2006; REHM, 2007), assim como tentativas de identificação de novas PHA sintases, estão em evidencia atualmente (SHEU et al., 2000; SOLAIMAN et al., 2000; SOLAIMAN, 2002; SHAMALA et al., 2003). Foram clonados e caracterizados os genes codificadores de PHA sintases provenientes de 31 organismos diferentes, totalizando 38 genes (REHM e STEINBÜCHEL, 1999). Existem diferentes tipos de PHA sintases, e estas

são divididas em quatro classes diferentes, de acordo com a especificidade pelo substrato e estrutura primária apresentada (REHM, 2003).

As PHA sintases do tipo I são enzimas que apresentam uma única subunidade, codificada pelo gene *phaC* (QI e REHM, 2001). São específicas para os monômeros de ácidos hidroxialcanóicos de cadeia curta (de 3 a 5 carbonos) como substrato.

As PHA sintases do tipo II estão presentes em *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas oleovorans* (MADISON e HUISMAN, 1999), e catalisam principalmente a polimerização de monômeros de ácidos hidroxialcanóicos de cadeia média (de 6 a 16 carbonos). As PHA sintases do tipo II também são codificadas por genes denominados *phaC*, no entanto, pode-se encontrar dois genes *phaC* nas bactérias do gênero *Pseudomonas*.

As PHA sintases do tipo III são formadas por duas subunidades diferentes, codificadas pelos genes *phaC* e *phaE*. A subunidade codificada pelo gene *phaC* apresenta similaridade na sua sequência de aminoácidos com as PHA sintases do tipo I e II, porém, a subunidade codificada pelo gene *phaE* não apresenta tal similaridade (REHM, 2003). As PHA sintases do tipo III apresentam uma maior velocidade de polimerização de monômeros de ácido hidroxialcanóico de átomos de 3 a 5 carbonos.

As PHA sintases do tipo IV se assemelham as do tipo III, pois também são formadas por duas subunidades, codificadas pelos genes *phaC* e *phaR* (REHM, 2003). Neste caso o gene *phaE*, presente nas PHA sintases do tipo III, é substituído pelo gene *phaR*, sendo que estas duas subunidades não apresentam grande similaridade entre si, na ordem de 18% (SATO et al., 2002). A subunidade codificada pelo gene *phaC* das PHA sintases de classe IV apresenta grande similaridade com a subunidade *phaC* das PHA sintases de classe III.

3 OBJETIVOS

Procurando investigar o potencial da tecnologia metagenômica na recuperação de genes e/ou produtos gênicos de interesse biotecnológico, o projeto visou identificar genes envolvidos na produção de PHAs, em bibliotecas metagenômicas construída a partir de amostras de solos. Desta forma visou-se identificar e avaliar a diversidade de organismos produtores de PHAs, nas diferentes bibliotecas construídas, através da prospecção de genes ligados a síntese da enzima PHA sintase.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras ambientais

No presente trabalho utilizaram-se, como fonte de DNA para a construção das bibliotecas metagenômicas, amostras ambientais provenientes de diferentes locais, sendo elas: amostras de sedimento contaminado por óleo, proveniente da Baía de Guanabara/RJ; amostras de solo de um campo experimental da Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); e amostras de um consórcio microbiano especializado na degradação de óleo diesel, isolado de solo contaminado com óleo diesel na região da cidade de Ribeirão Preto/SP.

As amostras de solo provenientes da Baía de Guanabara e do campo experimental da UNICAMP foram utilizadas para a montagem de microcosmos. Os microcosmos montados a partir das amostras de solo do campo experimental foram impactados com petróleo (concentração máxima 10%) e metais pesados.

4.2 Extração do DNA metagenômico

As extrações do DNA total presente nas amostras de sedimento, solo e consórcio microbiano foram realizadas utilizando-se FastDNA[®] SPIN Kit for soil (MP Biomedicals), seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. As condições para o uso foram: O método consiste em lisar os microrganismos presentes nas amostras, colocando-se 500 mg de solo em tubos com sílica e adicionando-se 978 µL de tampão de fosfato de sódio (pH 8,0) e 122 mL de tampão MT. A suspensão foi agitada vigorosamente pelo FastPrepR FP120 (BIO 101 - SAVANT) a velocidade de 5,5 m/s e, posteriormente, o tubo foi centrifugado a 14.000 rpm, por 1 minuto, a temperatura ambiente.

O sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo estéril e a ele foram adicionados 250 µL de uma solução de precipitação de proteínas, tampão PPS, misturando-se cuidadosamente a amostra por inversão por 10 vezes. Em

seguida, a solução foi centrifugada a 14.000 rpm, por 5 minutos, a 25 °C para precipitação do sedimento formado. O sobrenadante foi coletado, transferido para um tubo estéril de 15 mL e a ele adicionado 1 mL do Binding Matrix Superior. A amostra foi misturada por inversão durante 2 minutos e, posteriormente, o tubo foi deixado em repouso por 3 minutos, a temperatura ambiente. Deste, foram removidos 500 µL do sobrenadante e o restante foi misturado em um agitador de tubos. Todo o volume desta solução foi transferido para um tubo com filtro e este foi centrifugado a 14.000 rpm, por 1 minuto, a temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e, novamente, repetiu-se à centrifugação por 1 minuto. Adicionaram-se 500 µL de solução de lavagem de sais, também fornecida pelo fabricante, SEWS-M ao filtro e este foi centrifugado a 14.000 rpm, por 3 minutos, a temperatura ambiente, para precipitação dos fragmentos de DNA. O DNA foi eluído adicionando-se no filtro 50 µL da solução DES, água estéril ausente de DNase, e centrifugado a 14.000 rpm, por 2 minutos, a temperatura ambiente. Ao final, as amostras foram mantidas a -20 °C.

Os reagentes utilizados neste procedimento, a saber: tampão MT e tampão Fosfato de sódio, reagente PPS e solução de lavagem SEWS-M (Etanol + Sal) constam do FastDNA[®] SPIN Kit e portanto não são conhecidas suas composições e concentrações.

4.3 Quantificação do DNA de solo

A concentração do DNA extraído das amostras foi estimada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v), em tampão TBE1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3), adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/mL). Uma alíquota de DNA, adicionada de tampão de carregamento [0,025% (p/v) de azul de bromofenol e 50% (v/v) de glicerol], foi aplicada, assim como diferentes volumes de DNA de um plasmídeo pGEM (Applied Biosystems) com concentração conhecida (50 ng/µL). Aplicou-se também um padrão de tamanho molecular conhecido. O gel foi visualizado sob luz UV e registrado através de um sistema de documentação de géis (GEL DOC, Bio-Rad), através do software Quantity One (Bio-RadTM,

HERCULES, CA, USA). Este mesmo software foi utilizado para a determinação da concentração do DNA.

4.4 Determinação do tamanho do DNA por eletroforese em campo pulsado

Posteriormente a extração do DNA total das amostras de solo, estas foram analisadas por eletroforese de campo pulsado, em gel de agarose 1% (p/v). A eletroforese foi conduzida em uma cuba modelo CHEF MAPPER 3 (Bio-Rad), em tampão TEB 0,5X, a 6 V por 20 horas. Padrões de tamanho molecular conhecido foram aplicados juntamente com as amostras de DNA.

4.5 Meios de cultura utilizados (SAMBROOK et al., 1989)

1. Meio Luria-Bertani (LB): Triptona (10 g/L); Extrato de Levedura (5 g/L), NaCl (10 g/L), pH 7,0. Ágar (9 g/L) foi utilizado para meios sólido;
2. Meio CircleGrow (Bio[®] Systems - Q-Biogene): 40 g/L de meio CG.

4.6 Construção de biblioteca metagenômica a partir de DNA extraído das amostras de solo

Utilizou-se para as construções das bibliotecas metagenômica aqui realizadas o CopyControl[™] Fosmid Library Production Kit (EPICENTRE[®] Biotechnologies), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante no manual do produto, descritas a seguir.

4.6.1 Reparo dos fragmentos para clonagem em vetor fosmídeo

A reação de reparo das extremidades do DNA metagenômico foi realizada, possibilitando assim a ligação ao vetor fosmídeo, que vem aberto no sítio de restrição da enzima *Sma*I, ao DNA metagenômico .

Uma combinação das enzimas T4 DNA polimerase (bacteriófago T4) e Klenow DNA polimerase (*Escherichia coli*) foi utilizada para o preenchimento de terminais nos fragmentos de DNA, através da incorporação de nucleotídeos complementares livres em terminais 3' da dupla fita de DNA. Adicionalmente, a atividade exonucleásica 3'→5' da T4 DNA polimerase degrada extremidades protuberantes nos terminais 3'.

Para cada amostra contendo até 20 µg de DNA metagenômico, em um volume de 50 µL, foram acrescentados 8 µL de 10X tampão de reparo (EPICENTRE), 8 µL de dNTPs, 8 µL de ATP 10 mM e 4 µL de enzima de reparo (EPICENTRE). A reação foi mantida a temperatura ambiente por 45 minutos e em seguida a 75 °C, por 20 minutos, para inativação das enzimas. Os tubos foram estocados a 4 °C até serem utilizados.

4.6.2 Seleção do tamanho dos insertos

A seleção do tamanho do DNA foi feita através de eletroforese preparativa em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1% (p/v), isento de brometo de etídio. A cuba de eletroforese foi previamente descontaminada com exposição à luz UV por 20 minutos.

Uma alíquota de DNA metagenômico foi aplicada ao gel, e ao lado desta aplicou-se o marcador de tamanho molecular 36 Kb "T7 control DNA" (EPICENTRE). O restante do DNA foi aplicado em um poço largo do gel. A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA) isento de brometo de etídio, a voltagem constante 30 V por 15 horas.

Após a eletroforese, foi realizado um corte vertical no gel de agarose resultando em duas porções de gel, uma contendo os insertos a serem recuperados, e outra com o marcador e a amostra comparativa para corar. A porção do gel que continha o marcador foi corada com brometo de etídio e observada sob luz UV em

um transiluminador. O padrão de bandejamento serviu como guia para obtenção dos insertos na porção não corada do gel, colocando-se as duas partes do gel lado a lado. A região do gel contendo insertos de tamanho desejado, em torno de 30 Kb foi marcada e cortada com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo depositada em tubos de 1,5 mL, com aproximadamente 400 mg de gel/tubo. Os pedaços de agarose que continham o DNA de tamanho selecionado foram armazenados a 4 °C até o momento do uso. O restante do gel foi corado, visualizado em luz UV e documentado em fotodocumentador, através do software Quantity One (Bio-Rad™, HERCULES, CA, USA).

4.6.3 Eluição dos fragmentos reparados do DNA

Os tubos contendo os fragmentos de gel de agarose foram incubados em banho-maria a 65 °C durante 15 minutos. Cada amostra teve seu volume igualado a 500 µL, completando o volume com TE (10:1) pH 8,0, quando necessário. Um volume 10 µL do tampão da enzima gelase (EPICENTRE) e 3 µL da enzima (EPICENTRE) foram adicionados aos tubos. As amostras foram incubadas em banho-maria a 45 °C por 1 hora. Em seguida, a reação foi submetida a 70 °C por 15 minutos, para inativação da enzima. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos para precipitação do material insolúvel. Cuidadosamente, foram transferidos 95% (v/v) do sobrenadante para um tubo novo. Adicionou-se 1/10 de volume de acetado de sódio 3 M (pH 7,0) seguido de 2 volumes de etanol absoluto. A precipitação se deu a temperatura ambiente por 10 minutos. O tubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% (v/v) e centrifugado 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O DNA precipitado foi ressuscitado num volume total de 40 µL e quantificado em gel de agarose, de forma idêntica a descrita no item 4.3.

4.6.4 Clonagem dos insertos em vetor fosmídeo

O vetor utilizado na clonagem foi o pCC2FOS™ (EPICENTRE). Tal vetor possui 8.181 pares de bases (Figura 2), e é fornecido pronto para uso, linearizado no sítio de restrição único da enzima *Sma*I, e desfosforilado.

Figura 2. Esquema ilustrativo apresentando características do vetor pCC2FOSTM (EPICENTRE).

4.6.5 Reação de ligação dos insertos no vetor fosmídeo

A ligação foi efetuada mantendo-se uma relação de concentração entre insertos de DNA metagenômico e vetor, na proporção [1:10], respectivamente. Para o cálculo da razão molar foi utilizada a fórmula apresentada na figura 3.

$$mi = \frac{Ti \cdot mv}{10 \cdot Tv} \quad \text{onde: } mi = \text{massa do inserto}$$

$$Ti = \text{tamanho do inserto}$$

$$mv = \text{massa do vetor}$$

$$Tv = \text{tamanho do vetor}$$

Figura 3. Fórmula para determinação da razão molar utilizada no ligação do insertos de DNA metagenômico e o vetor fosmídeo.

A reação foi executada em um volume de 20 µL contendo 2 µL de inserto DNA metagenômico (±0,2 µg, ± 30 Kb), 1 µL de vetor pCC2FOS, 2 µL de tampão fast-link ligation buffer 10X (EPICENTRE), 1 µL de ATP 10 mM, 1 µL da enzima fast link DNA ligase (EPICENTRE) e 13 µL de H₂O Milli-Q estéril. A reação foi mantida a temperatura ambiente (25 °C) por 3 horas e depois a 70 °C por 10 minutos para inativação da enzima. Posteriormente a reação foi armazenada a -20 °C.

4.6.6 Reação de empacotamento

Retirou-se do freezer (-80 °C) o extrato de empacotamento, mantendo este no gelo por 5 minutos. Ao material ligado foi adicionado 25 µL de extrato de empacotamento. As amostras foram agitadas cuidadosamente e incubadas a 30 °C por 90 minutos. Após esse período, foram adicionados mais 25 µL do extrato de empacotamento e novamente incubou a reação a 30 °C por mais 90 minutos. Em seguida, foi adicionado 500 µL de tampão de diluição de fagos [10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂] e 25 µL de clorofórmio. Os tubos foram agitados por inversão e estocados a 4 °C.

4.6.7 Preparo do inoculo de células EPI300-T1^R

Um dia antes da realização da reação de empacotamento, uma colônia isolada de células EPI300-T1^R, crescida em placas com meio LB, suplementado com 10 mM MgSO₄, foi inoculada em 50 mL de meio LB, também suplementado com 10mM MgSO₄, ficando sob agitação de 250 rpm a 37 °C durante a noite. No dia da reação de empacotamento, 50 mL de meio LB, suplementado com 10 mM MgSO₄, foi inoculado com 5 mL das células cultivadas anteriormente. O cultivo foi mantido a sob as mesmas condições de temperatura e agitação, anteriormente descritas, até atingir um valor entre 0,8 e 1,0, quando medida a densidade ótica a 600 nm. A densidade óptica foi determinada no “Biophotometer” (Eppendorf). As amostras foram mantidas a 4 °C até o momento do uso.

4.6.8 Infecção das células EPI300-T1^R

Cada 10 µL da solução com os foscídeos empacotados foi misturado, em condições estéreis, a uma alíquota de 100 µL de células EPI300-T1^R, previamente preparadas como descrito em 4.6.7. Os tubos foram gentilmente agitados e incubados em banho-maria a 37 °C, por 20 minutos. Após esse período, os 110 µL de cada um dos tubos foi aplicado em placa contendo meio de cultura LB, adicionado de cloranfenicol (12,5 µg/mL). As placas foram incubadas durante a noite em uma estufa B.O.D a 37 °C.

4.6.9 Seleção, cultivo e estoque dos clones

Após a incubação das placas que receberam os clones transformantes em estufa B.O.D. a 37 °C por 22 horas, as colônias presente nas placas foram coletadas. Os clones transformados foram repicados com palitos de madeira esterilizados para placas estéreis de poliestireno (96 “well assay plate”, 250 µL) contendo 125 µL de meio CG acrescido de 12,5 µg/mL de cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. por 22 horas. Após esse período, foram adicionados 125 µL de solução de glicerol 40% (v/v). As placas foram estocadas à – 80 °C.

4.6.10 Cultivo dos clones bacterianos e extração do DNA fosmidial

Os clones estocados foram inoculados (10 µL) em 1 mL de meio LB, adicionado de 12,5 µg/mL de cloranfenicol, em placas de cultivo de bactérias (Mega Titer, 96 “wells”, 2,5 mL). As placas foram incubadas com agitação de 250 rpm, a 37 °C, por 18 horas. Após a incubação, as placas foram centrifugadas por 10 minutos, a 4000 rpm, a 20 °C. O sedimento foi lavado por ressuspensão em 240 µL de solução GTE [Glicose 50 mM; Tris-HCl 23 mM (pH 8,0); EDTA 10 mM (pH 8,0)], com agitação em “vortex” por 2 minutos e centrifugação a 4000 rpm a 20 °C, por 10 minutos. Esse procedimento foi repetido mais uma vez.

Após a lavagem acima descrita as células foram ressuspensas em 85 µL de solução de GTE contendo de 5 µg de ribonuclease A (Sigma). Um volume de 60 µL de cada amostra foi transferido para microplacas de polipropileno de fundo “U”. Acrescentou-se 60 µL de solução de lise [NaOH 0,2 N / SDS 1% (p/v)] a suspensão, e esta foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente. Após esse período 60 µL de acetato de potássio 3 M ácido foi adicionado, repetindo-se o período de incubação anterior. As placas foram centrifugadas para concentrar o material no fundo da placa e retirar bolhas, e posteriormente incubadas por 30 minutos a 90 °C. Após tal incubação as placas foram resfriadas em gelo por 5 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm, a 20 °C. Todo o volume, cerca de 170 µL, de cada poço

foi transferido para placas Millipore providas de filtro e acopladas em placas de polipropileno novas. Este conjunto foi centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm, a 20 °C.

Ao material filtrado foram adicionados 110 µL de isopropanol absoluto gelado. Após selar as placas com adesivos resistentes a álcool, as mesmas foram invertidas 10 vezes, para misturar a amostra, e posteriormente centrifugadas a 4000 rpm por 45 minutos, a 20 °C. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 70% (v/v) gelado. As placas foram centrifugadas por 10 minutos nas mesmas condições de rotação e temperatura já descritas. Após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado e o resíduo seco em temperatura ambiente por 60 minutos. O DNA foi ressuspendido em 30 µL de água Milli-Q esterilizada, e armazenada a -20 °C.

4.6.11 Quantificação do DNA fosmidial

A quantificação do DNA fosmidial obtido foi realizada de forma idêntica como descrito anteriormente, item 4.3.

4.7 Construção dos macroarranjos

4.7.1 Seleção dos clones para a confecção dos macroarranjos

Os macroarranjos de colônias bacterianas foram construídos a partir dos clones obtidos nas diferentes bibliotecas metagenômicas aqui construídas, assim como, a partir dos clones obtidos na construção de uma biblioteca metagenômica previamente realizada. Tal biblioteca foi construída anteriormente a este projeto onde se utilizou amostras de solo sob arboreto de eucalipto de uma área próximo ao Departamento de Tecnologia da UNESP/Campus de Jaboticabal.

4.7.2 Construção dos macroarranjos de colônias bacterianas a partir das bibliotecas metagenômicas de campo experimental, sedimento e arboreto de eucalipto

Os clones bacterianos obtidos na construção das bibliotecas metagenômicas a partir de sedimento, solo de campo experimental e solo sob arboreto de eucalipto foram repicados inicialmente para placas Genetix de 96 poços, as quais continham 200 μ L de meio de cultura LB suplementado de 8% (v/v) de glicerol e antibiótico adequado. Para a biblioteca de solo de arboreto de eucalipto o antibiótico utilizado foi a ampicilina na concentração de 70 μ g/mL, enquanto que nas outras duas bibliotecas o antibiótico utilizado foi o cloranfenicol na concentração de 12,5 μ g/mL. O repique foi realizado em fluxo laminar com o auxílio de replicadores previamente flambados anteriormente a cada troca de placa das bibliotecas. As placas Genetix, após receberem o inóculo dos clones das bibliotecas metagenômicas, foram então colocadas em estufa a 37 °C para desenvolvimento dos clones bacterianos por um período de 16 horas para as bibliotecas de solo de campo experimental e de sedimento, e 22 horas para a biblioteca de solo de arboreto de eucalipto.

Após o desenvolvimento dos clones bacterianos as placas referentes ao repique da biblioteca metagenômica de solo sob arboreto de eucalipto foram conduzidas ao fluxo laminar onde se transferiu 80 μ L de meio de cultura crescido para novas placas Genetix de 384 poços. Esta transferência foi realizada manualmente com a utilização de micropipetadores multi-canais. Após a transferência as placas foram armazenadas em “freezer” -80 °C até a utilização destas para a confecção das membranas

A transferência dos clones das bibliotecas de solo de campo experimental e de sedimento das placas Genetix de 96 poços para as placas Genetix de 384 poços foi feita pelo robô Q-bot (Genetix). Feita tais transferência as placas Genetix de 384 poços foram colocadas em estufa a 37 °C por uma noite. No dia seguinte as placas foram armazenadas em freezer -80 °C até a utilização destas para a confecção das membranas.

4.7.2.1 Confeção das membranas

Todas as membranas contendo os arranjos de colônias bacterianas descritos neste item foram confeccionadas no Centro Brasileiro de Estocagem de Clones (BCC Center), UNESP, Jaboticabal. As colônias bacterianas utilizadas para a confecção destas membranas foram oriundas de placas Genetix com 384 clones (colônias) diferentes. Os clones foram dispostos em 24 colunas e 16 linhas. Cada clone, portanto, ocupa um lugar definitivo na placa.

A transferência das colônias bacterianas para as membranas de náilon foi feita pelo robô Q-bot (Genetix). A partir de um filtro de náilon de alta densidade (PerForma II – Genetix) com dimensões 22,5 X 22,5 cm² foram construídas seis membranas idênticas, com dimensões 8 X 12 cm². Cada membrana é dividida em 384 quadrantes e corresponde a um campo do filtro (Figura 4). A posição do quadrante, por sua vez, indica a posição do clone em sua placa original. Desta forma, cada colônia bacteriana na membrana pode ser identificada quanto a sua posição de origem. Em cada quadrante (destaque em amarelo na Figura 4) foram depositados 16 (arranjo de 4X4) ou 25 (arranjo de 5X5) clones bacterianos, de acordo com o número total de clones das bibliotecas metagenômicas (Figura 5).

Figura 4. Esquema ilustrativo da membrana utilizada para a construção dos macroarranjos de DNA. Cada quadrante, como o que esta em destaque, contem 16 ou 25 colônias bacterianas em arranjos 4X4 ou 5X5, respectivamente. Todas as colônias contidas neste quadrante são oriundas da posição A1 de suas placas de origem.

Figura 5. Arranjo das colônias bacterianas em cada quadrante da membrana. Estes quadrantes possuem os arranjos utilizados na confecção das membranas aqui relatadas, 5X5 (A) e 4X4 (B). Os números indicam a placa que o clone ali depositado pertence.

Para a transferência do material biológico as membranas, foram utilizadas as placas Genetix de 384 poços previamente organizadas. Previamente a transferência dos clones, filtros de náilon umedecidos em meio 4% (p/v) de CG suplementado com 0,5% (p/v) do antibiótico adequado foram colocados sobre papel Whatman também umedecidos neste meio. Bolhas de ar ou excesso de meio líquido no papel de filtro ou na membrana podem prejudicar o desenvolvimento bacteriano e, portanto, foram evitados.

No processo de transferência, o robô imergiu sua cabeça de 384 pinos (0,4 mm cada) por 3 segundos na placa contendo as colônias bacterianas e, em seguida, imprimiu na membrana, fazendo uma leve pressão por 10 milisegundos, depositando cerca de 20 nL de solução contendo bactérias viáveis. Este processo foi repetido de acordo com o arranjo pré-determinado para os 6 campos do filtro de 22,5 X 22,5 cm². Ao final de uma placa esta foi trocada, e a cabeça do robô foi lavada automaticamente em uma solução de água sanitária, seguida de lavagem em água Milli-Q, e por fim em etanol absoluto. Uma vez concluída a lavagem, os pinos foram secos com um jato de ar por 6 segundos para iniciar a transferência das colônias bacterianas da placa seguinte. O processo de limpeza e secagem foi repetido a cada troca de placa.

4.7.2.2 Desenvolvimento das bactérias na membrana

Após a transferência das colônias bacterianas para o filtro de náilon, contendo 6 membranas, este foi colocado em uma placa (QTray-Genetix) contendo meio CG semi-sólido [4% (p/v) de ágar e 1% (p/v) do antibiótico adequado]. As membranas foram invertidas e incubadas à 37 °C em estufa, para o desenvolvimento das colônias bacterianas. O tempo de desenvolvimento para as membranas referentes à biblioteca de solo de campo experimental e de sedimento foi de 12 horas, enquanto que para as membranas referentes à biblioteca metagenômica de solo de arboreto de eucalipto foi aproximadamente 18 horas.

4.7.2.3 Processamento da membrana após desenvolvimento das bactérias

Após o desenvolvimento bacteriano a 37 °C, os filtros foram colocados sobre papel Whatman umedecidos em solução desnaturante (1,5 M NaCl e 0,5 M NaOH), onde permaneceram por 4 minutos em temperatura ambiente. A seguir os filtros foram colocados sobre outro papel Whatman, umedecidos em solução desnaturante, onde permaneceram por 4 minutos em uma placa de vidro dentro do banho-maria, contendo água fervente. Após este procedimento, os filtros foram transferidos para outro papel Whatman, umedecido desta vez em solução neutralizante (1,5 M NaCl, 1 M Trizma pH 7,0), onde foram deixados por 4 minutos. Posteriormente, os filtros foram colocados sobre papel Whatman seco e ali deixados por 4 minutos.

Transcorrido o tempo, os filtros foram transferidos para uma solução de proteinase K [5 M NaCl, 1 M Tris e HCL pH 8.0, 0,5 M EDTA pH 8.0, 10X Sarcosil, 1,5% (p/v) de Proteinase K]. A proteinase K foi adicionada à solução momentos antes de seu uso. Assim, os filtros foram invertidos nesta solução, de modo que a face onde estavam às colônias fique totalmente submersa. Os filtros foram então incubados por 1 hora à 37 °C em agitador orbital a 50 rpm. Após a incubação, o excesso de solução foi retirado com o auxílio de um papel filtro, em cada uma de suas faces. A seguir, o material genético das bactérias foi fixado nos filtros utilizando-se o aparelho “Ultraviolet Crosslinker” (CL-508), através de exposição a 120.000 microjoules por cm² por 30 segundos.

4.7.3 Confecção dos macroarranjos de DNA a partir da biblioteca metagenômica do consórcio microbiano

4.7.3.1 Cultivo, extração e quantificação do DNA fosmidial

Os clones da biblioteca metagenômica foram cultivados de maneira idêntica a descrita anteriormente (item 4.6.10). Após o cultivo, as placas contendo os clones da biblioteca metagenômica foram centrifugadas por 10 minutos, a 4000 rpm, a 20 °C.

O sedimento foi lavado por ressuspensão em 240 µL de solução GTE, agitação em “vortex” por 2 minutos e centrifugação a 4000 rpm a 20 °C, por 10 minutos. Posteriormente, o sedimento foi novamente ressuspendido em solução GTE e reunido em uma única amostra conjunta, isto é, o sedimento ressuspendido de cada um dos 96 poços foi transferido para um único tubo falcon, resultando assim em uma amostra composta. Este procedimento foi realizado para todas as placas obtidas na biblioteca metagenômica do consórcio microbiano.

O tubo falcon contendo os 96 clones de cada placa da biblioteca foi centrifugado por 10 minutos, a 4000 rpm, a 20 °C. O DNA fosmidial foi extraído do sedimento obtido com a utilização do GFX Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado de acordo com descrição prévia (item 4.3).

4.7.3.2 Confeção das membranas

Os macroarranjos de DNA para a biblioteca metagenômica do consórcio microbiano foram construídos com a utilização de um sistema de Slot Blot (Life Technologies). O DNA dos clones da biblioteca metagenômica foi fixado em uma membrana de náilon carregada positivamente (Zeta Probe Blotting Membranes, Bio-Rad) de acordo com o procedimento descrito a seguir.

Uma solução de volume final de 0,5 mL contendo DNA, NaOH na concentração final de 0,4 M e 10 mM de EDTA, concentração final, foi aquecida a 100°C por 10 minutos e mantida em gelo até o momento do uso. Uma membrana de náilon com dimensões 13X10 cm² previamente umedecia por imersão em água Milli-Q foi colocada no equipamento de Slot Blot. O equipamento foi montado e aplicou-se uma pressão negativa (vácuo) ao sistema, certificando-se sempre de que todos os componentes encontrassem-se muito bem apertados sob ação do vácuo, evitando assim a contaminação entre os poços. Ainda sob ação do vácuo, os poços foram lavados com água Milli-Q, e posteriormente as amostras previamente aquecidas foram aplicadas. Após a sucção completa pelo sistema das amostras aplicadas, adicionou-se, a cada poço que recebeu amostra, 0,5 mL de uma solução

de NaOH 0,4 M. Manteve-se o vácuo ligado ate certificar-se que toda a solução de NaOH houvesse passado pela membrana. Após esta etapa o vácuo foi desligado, a membrana retirada do equipamento e lavada em solução 2X SSC [1,8% (p/v) de NaCl e 1,5% (p/v) de ácido cítrico]. A seguir, o DNA aplicado foi fixado à membrana utilizando-se o aparelho Ultraviolet Crosslinkes (CL-508), através de exposição a 120.000 microjoules por cm² por 30 segundos.

4.8 Amplificação, por reação em cadeia da polimerase (PCR), da região do DNA correspondente a PHA sintase

Para a amplificação da PHA sintase, os seguintes oligonucleotídeos foram utilizados: phaCF1 e phaCR4 (SHEU et al., 2000), I-179L(a) e I-179R(a) (SOLAIMAN et al., 2000; SOLAIMAN, 2002), Haphapcr1 e Haphapcr2 (HAI et al., 2001), P1 e P2 (HAI et al., 2004), B1F e B1R (SHAMALA et al., 2003).

As reações de PCR foram feitas utilizando-se como DNA molde um DNA extraído de solo sob arboreto de eucalipto, extração esta realizada de acordo com o descrito no item 4.2.

Nas reações de PCR onde se utilizou os “primers” phaCF1 e phaCR4 as seguintes condições foram adotadas: diferentes concentrações de DNA das amostras, foram adicionados a uma mistura para reação de PCR contendo tampão de PCR 1X, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 2,5 µM de cada oligonucleotídeo degenerado, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase, 3% (v/v) do volume final da reação de DMSO (Merck), 1 M de betaína (Sigma) e água Milli-Q filtrada para completar um volume final de 50 µL. O programa ao qual foi submetido às amostras foi de um ciclo de 94 °C por 4 minutos, 51 °C por 2 minutos, 72 °C por 2 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 57 °C por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto, e extensão a 72 °C por 5 minutos e incubação final a 4 °C.

Na utilização dos “primers” I-179L(a) e I-179R(a) as condições estipuladas foram: diferentes concentrações de DNA das amostras, foram adicionados a uma mistura para reação de PCR contendo tampão de PCR 1X, 3 mM MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 1,2 µM de cada oligonucleotídeo degenerado, 1,25 U de *Taq* DNA

polimerase, 3% (v/v) do volume final da reação de DMSO (Merck) e água Milli-Q filtrada para completar um volume final de 25 μ L. O programa ao qual foi submetido às amostras consiste de um ciclo de 95 °C por 5 minutos; 5 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 68 °C por 5 minutos (decrecendo 2 °C por ciclo), 72 °C por 1 minutos; 5 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 58 °C por 2 minutos (decrecendo 2 °C por ciclo), 72 °C por 1 minutos; 25 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 50 °C por 2 minutos, 72 °C por 1 minuto, depois incubação a 72 °C por 5 minutos e incubação final a 4 °C.

O conjunto de “primers” Haphapcr1 e Haphapcr2 foi utilizado nas seguintes condições: diferentes concentrações de DNA das amostras, previamente extraídas, foram adicionados a uma mistura para reação de PCR contendo tampão de PCR 1X, 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M de dNTPs, 1,6 μ M de cada oligonucleotídeo degenerado, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase e água Milli-Q filtrada para completar um volume final de 25 μ L. O programa ao qual foi submetido às amostras consiste de um ciclo de 95 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minutos e 20 segundos, depois incubação a 72 °C por 5 minutos e incubação final a 4 °C.

As condições adotadas para o conjunto de “primers” P1 e P2 foram às seguintes: diferentes concentrações de DNA das amostras, previamente extraídas, foram adicionados a uma mistura para reação de PCR contendo tampão de PCR 1X, 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M de dNTPs, 2 μ M de cada oligonucleotídeo degenerado, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase, e água Milli-Q filtrada para completar um volume final de 25 μ L. O programa ao qual foi submetido às amostras consiste de um ciclo de 95 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 40 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minutos, depois incubação a 72 °C por 5 minutos e incubação final a 4 °C.

Para as reações de PCR utilizando-se o conjunto B1F e B1R, utilizaram-se as seguintes condições: diferentes concentrações de DNA das amostras, previamente extraídas, foram adicionados a uma mistura para reação de PCR contendo tampão de PCR 1X, 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M de dNTPs, 2,5 μ M de cada oligonucleotídeo, 1 U de *Taq* DNA polimerase, e água Milli-Q filtrada para completar um volume final de 25 μ L. O programa ao qual foi submetido às amostras consiste de um ciclo de 94 °C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 60 °C por 30 segundos,

72 °C por 1 minutos, depois incubação a 72 °C por 5 minutos e incubação final a 4 °C.

O perfil eletroforético das reações de PCR foi realizado em gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TBE 1X, adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/mL). Uma alíquota de DNA adicionada de tampão de carregamento [0,025% (p/v) de azul de bromofenol e 50% (v/v) de glicerol] foi aplicada ao gel. Padrões de tamanho molecular foram utilizados para a determinação dos tamanhos dos fragmentos de PCR obtidos. O gel foi visualizado sob luz UV e registrado através de um sistema de documentação de géis (GEL DOC, Bio-Rad).

4.9 Construção de sondas para a prospecção das diferentes classes de PHA sintases

4.9.1 Amplificação, por PCR, do gene *phaC*

As reações de PCR para a síntese das sondas, assim como o perfil eletroforético realizado para a confirmação de amplificação, foram realizadas de acordo com o descrito anteriormente (item 4.8).

4.9.2 Purificação dos produtos de PCR obtidos

O produto de cada reação de PCR foi submetido a uma eletroforese preparativa em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1,5% (p/v) em tampão TAE 1X. A cuba de eletroforese foi previamente tratada para remoção do Brometo de etídio, sendo colocada sob luz UV, por 30 minutos.

Uma alíquota da amostra foi aplicada no gel, assim como um marcador de tamanho molecular, para orientação na seleção do fragmento de DNA a ser retirado do gel. Após a aplicação da alíquota que servirá de guia para a seleção do

fragmento, pulou-se uma canaleta, e na próxima foi aplicado todo o produto da reação de PCR. A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 1X, isento de brometo de etídio, a voltagem constante 80 V por 2 horas.

Após a eletroforese descrita, foi realizado um corte vertical no gel de agarose resultando duas porções de gel, uma contendo os insertos a serem recuperados e outra com o marcador e a amostra guia para corar. A porção do gel que continha o marcador e a amostra guia foi corada com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e observada sob um transiluminador UV. O padrão de bandeamento serviu como guia para obtenção do fragmento de DNA na porção não corada do gel, colocando-se as duas partes do gel lado a lado. A região do gel contendo insertos de tamanho desejado foi marcada, e cortada com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo depositada em tubos eppendorfs de 1,5 mL, aproximadamente 400 mg de gel/tubo. Os pedaços de agarose que continham o DNA de tamanho selecionado, foram armazenados a 4 °C até o momento do uso. O restante do gel foi corado, visualizado em luz UV e fotografado em fotodocumentador (GEL DOC, Bio-Rad).

Este procedimento foi realizado cinco vezes, uma vez para cada produto de amplificação dos cinco conjuntos de oligonucleotídeos distintos.

4.9.3 Eluição dos fragmentos do gel e quantificação do DNA obtido

A recuperação dos fragmentos de DNA do gel de agarose foi realizada com a utilização do GENE CLEAN® Kit (Q-BIOgene), de acordo com a descrição do fabricante.

O DNA obtido foi analisado em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TBE 1X, adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/mL), de maneira idêntica ao descrito anteriormente (item 4.3). O DNA obtido também foi analisado em espectrofotômetro NanoDrop ND-100 para a determinação da concentração e pureza da amostra.

4.10 Construção de bibliotecas a partir das sondas obtidas

4.10.1 Clonagem em vetor pGEM®-T Easy

Os DNAs obtidos após a eluição dos produtos de PCR resultantes da síntese das sondas para PHA sintases foram clonados em vetor pGEM®-T Easy (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

4.10.1.1 Reações de ligação

A ligação dos produtos de PCR ao vetor foi efetuada utilizando-se uma relação de concentração insertos:vetor na proporção [3:1]. A reação foi executada em um volume final de 10 µL, contendo 100 ng insertos e 50 ng de vetor pGEM®-T Easy (Promega). A reação de ligação foi incubada a 16 °C durante a noite, aproximadamente 16 horas.

4.10.2 Transformação das células competentes

Foram utilizadas células competentes de *Escherichia coli* DH5α (HANAHAN, 1983) para transformação, células estas gentilmente cedidas pelo Prof. Manoel Victor Franco Lemos do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

Todo o procedimento realizado seguiu as instruções fornecidas no manual do fabricante do vetor pGEM®-T Easy (Promega).

As células competentes foram previamente removidas do freezer -80 °C e descongeladas em banho de gelo por aproximadamente 5 minutos antes de serem utilizadas. As células (45 µL) foram depositadas cuidadosamente em um tubo falcon

de 15 mL junto com 5 μ L do produto obtido pela ligação, o mesmo foi feito com o material de controle. Todos os tubos foram mantidos em gelo por 20 minutos e em seguida, foram colocados em banho-maria a 42 °C, por exatos 90 segundos, e imediatamente, recolocados no banho de gelo por 2 minutos.

Aos tubos foram adicionados 950 μ L de meio LB e estes foram incubados durante 1,5 horas, a 37 °C, com agitação de 150 rpm. Após incubação das células transformadas, 100 μ L de cada cultura foram espalhadas nas placas de Petri com o meio LB seletivo, com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada. Tal meio LB foi adicionado de ampicilina, esterilizada por filtração, para uma concentração final de 50 μ g/mL. Após a solidificação do meio, 100 μ L de IPTG [4,8% (p/v) em água], esterilizado por filtração, e 100 μ L de X-GAL [5% (p/v) em N,N'-dimetil formamida], foram espalhados sobre a superfície com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada, tornando o assim um meio seletivo para crescimento apenas das células transformadas.

As placas de meio LB seletivo acrescidas de 100 μ L de cultura de células supostamente transformadas foram incubadas em B.O.D. a 37 °C por 22 horas.

4.10.3 Seleção, cultivo e estoque dos clones

Após o período de incubação, foram selecionadas as colônias de coloração branca, recombinantes. O cultivo e estoque dos clones foram realizados de acordo como descrito previamente (item 4.6.9). Nesta etapa o antibiótico usado como fator de seleção foi a ampicilina, na concentração de 50 μ g/mL.

4.10.4 Cultivo dos clones bacterianos e extração do DNA Plasmidial

O cultivo e a extração de DNA destes foram realizados de acordo com o descrito no item 4.6.10.

4.10.5 Quantificação do DNA Plasmidial

A quantificação do DNA plasmidial obtido foi realizada de forma idêntica como descrito anteriormente (item 4.3).

4.11 Seqüenciamento dos clones das bibliotecas construídas a partir das sondas obtidas

As reações de PCR, para o seqüenciamento dos fragmentos de DNA clonados em vetor pGEM®-T Easy (Promega), foram realizadas em microplacas nas seguintes condições: 2 µL de BigDye Terminator (Applied Biosystems); 10 pmoles do oligonucleotídeo (T7 ou SP6); 3 µL tampão 5X (400 mM Tris-HCl pH 9; 10 mM MgCl₂); 0,2 µg de DNA e água Milli-Q esterilizada para completar um volume de 10 µL. Foram feitas reações individuais para cada oligonucleotídeo utilizado.

As placas foram seladas com um adaptador de silicone e levadas ao termociclador, sendo submetidas ao seguinte programa: 40 ciclos (96 °C por 30 segundo, 52 °C por 30 segundos e 60 °C por 4 minutos).

Após a reação de seqüenciamento os fragmentos de DNA amplificados foram precipitados, e os dNTPs marcados por fluorescência que não foram incorporados, foram retirados por sucessivas lavagens.

Para a precipitação do DNA amplificado, marcado pela PCR de seqüenciamento, adicionou-se 80 µL de isopropanol 75% (v/v) às amostras, as placas foram agitadas, cuidadosamente, em “vortex” por alguns segundos, posteriormente incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos, e centrifugadas a 20°C por 45 minutos, a 4000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e 150 µL de etanol 70% (v/v) foram adicionados às amostras. As placas foram centrifugadas por 10 minutos, na mesma temperatura e força centrifuga descrita anteriormente, e os sobrenadantes foram descartados. As placas foram secas durante 30 minutos no fluxo laminar na ausência de luz.

Para a aplicação no seqüenciador, as amostras foram ressuspendidas em 9 µL de Hi-Di Formamide (ABI Prism), submetidas à desnaturação por 5 minutos, a 96 °C. O seqüenciamento foi realizado em um aparelho de capilar modelo 3700 DNA Analyzer ABI Prism (Applied Biosystems).

4.12 Análise das seqüências

Após o seqüenciamento, os eletroferogramas foram analisados usando-se o programa Phred/Phrap (EWING et al., 1998; EWING e GREEN, 1998), onde relatórios da qualidade das seqüências foram gerados, assim como a reunião destas em diferentes grupos (“contigs”) foi promovida, reunião esta de acordo com a seqüência de nucleotídeo apresentada. O programa Consed (GORDON et al., 1998) foi utilizado para visualizar a reunião das seqüências nos diferentes grupos.

O conjunto dos diferentes grupos de seqüências gerados (“contigs”) para cada biblioteca das diferentes sondas, foi submetido ao programa BlastX (ALTSCHUL et al., 1997) para comparação com as seqüências disponíveis no banco de dados “GenBank” do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

As seqüências dos diferentes grupos (“contigs”) e seus três primeiros resultados mais significativos, com relação a valores de “score” e “e-value”, no relatório fornecido pelo programa BlastX, foram reunidas e alinhadas utilizando-se o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994). O resultado do alinhamento foi editado manualmente, removendo-se as regiões pobremente alinhadas, e posteriormente utilizado para análise filogenética pelo método “Maximum Likelihood” utilizando-se o programa PhyML 3.0 (GUINDON e GASCUEL, 2003).

Os arquivos gerados pelo programa PhyML foram visualizados e editados com a utilização do programa TreeView (PAGE, 1996).

4.13 Hibridização dos macroarranjos

Para a prospecção do gene *phaC* nos macroarranjos, realizou-se a hibridização destes com as sondas anteriormente sintetizadas, a partir do DNA metagenômico sob arboreto de eucalipto. Tal procedimento foi realizado utilizando-se o Kit Amersham AlkPhos Direct Labeling and Detection System with CDP-*Star* (GE Healthcare), de acordo com as instruções do manual do produto, fornecidas pelo fabricante.

Previamente a pré-hibridação das membranas, estas foram imersas em solução de SDS 0,1% em ebulição, durante 20 minutos. O tempo adotado para a pré-hibridação das membranas nos experimentos foi de 2 horas. Posteriormente a pré-hibridização adicionou-se a sonda, previamente marcada, na proporção de 10 ng/mL de tampão de hibridização. A hibridização foi conduzida a 55 °C por 16 horas.

Após a hibridização, procedeu-se a lavagem das membranas para retirada das hibridizações inespecíficas, que possivelmente pudessem ter ocorrido. Após as lavagens, o excesso dos tampões utilizados foi retirado, e procedeu-se a aplicação do reagente de detecção CDP-*Star*. Neste ponto as membranas estavam prontas para serem envoltas em filme plástico PVC, e expostas em filme revelação Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) por diferentes períodos. A revelação foi realizada com Fixador e Revelador GBX (Kodak).

4.14 Análise das imagens

As imagens reveladas foram captadas com auxílio de um scanner (EPSON CX7300) e foram convertidas em extensão “TIFF” monocromática 16 bits. De posse das imagens após a digitalização dos filmes revelados, estas foram submetidas ao software BZScan (<http://tagc.univ-mrs.fr/ComputationalBiology/bzscan/>), onde a posição dos clones positivos pode ser identificada.

4.15 Confirmação, por PCR, dos clones positivos

Para a confirmação da presença, do gene prospectado, nos clones positivos encontrados, utilizou-se o conjunto de “primers” phaCF1/phaCR4 em reações de PCR. As reações foram realizadas e conduzidas de acordo com o descrito em 4.8.

4.16 Seqüenciamento dos clones positivos

O seqüenciamento dos produtos de PCR dos clones seguiu as seguintes condições: 0,5 µL de DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare); 5 pmols do oligonucleotídeo iniciador; 80 ng de DNA em um volume final de 10 µL. As condições no termociclador foram idênticas as descritas em 4.8, para reações de PCR com o conjunto de primers aqui utilizado.

Para a precipitação, lavagem, preparação para seqüenciamento e seqüenciamento dos produtos de PCR, seguiu-se maneira idêntica o descrito previamente no item 4.11.

4.17 Construção de sub-biblioteca

4.17.1 Fragmentação do DNA

Foram adicionados em um nebulizador (Invitrogen - K7025-05), 50 µg de DNA fosmidial do clone positivo escolhido, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 15 mM MgCl₂ e 25% (v/v) de glicerol esterilizado 50% (v/v), em um volume final de 2 mL. O nebulizador foi conectado a um tubo de gás nitrogênio e mantido sob pressão de 3 Kg/cm² durante 25 segundos. O processo foi realizado em câmara fria, 4 °C, sendo que o nebulizador com amostra foi mantido sob gelo durante todo o procedimento. O nebulizador foi adaptado a um tubo de centrífuga (GSA - SORVALL), e centrifugado por 2 minutos a 1000 rpm, 4°C. A amostra recuperada foi dividida em tubos eppendorf de 1,5 mL.

4.17.2 Precipitação do DNA fragmentado

Para a precipitação do DNA fragmentado acrescentou-se 0,1 volume de acetato de sódio 3 M (pH 5,2), e 1 volume de isopropanol absoluto gelado. A amostra foi incubada durante a noite a -20 °C. Após a incubação, o tubo contendo o DNA precipitado foi centrifugado a 12000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C. Em seguida, foi acrescentou-se 1 mL de etanol 70% (v/v) gelado para limpeza do precipitado, sendo efetuada uma nova centrifugação a 12000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C. O sedimento obtido foi seco à temperatura ambiente, e posteriormente dissolvido em água Milli-Q esterilizada. O DNA obtido foi analisado em gel de agarose 1,0% (p/v), de maneira idêntica a descrita em 4.3.

4.17.3 Reparo das extremidades dos fragmentos

Para cada amostra contendo até 5 µg de DNA fragmentado, em um volume final de 35 µL, foram acrescentados 5 µL de blunting buffer 10x (Invitrogen), 1 µL de BSA (soroalbumina bovina – 1 mg/mL), 5 µL de dNTPs (10 mM), 2 µL de T4 DNA polimerase (4 U/µL) (Invitrogen). A reação foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e em seguida a 75 °C, por 20 minutos, para inativação das enzimas.

4.17.4 Fosforilação dos fragmentos reparados

O tratamento com a enzima T4 polinucleotídeo quinase, promovendo a fosforilação dos insertos, foi necessário para que os insertos de DNA reparados pudessem ser clonados no vetor plasmídeo escolhido. Para proceder-se à reação de fosforilação, os fragmentos reparados foram primeiramente purificados e precipitados conforme descrito a seguir.

Adicionou-se um volume de uma mistura de fenol, saturado com Tris-HCl (pH 8,0) e clorofórmio, na proporção 1:1, estocado à 4 °C. A mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto, e posteriormente centrifugada a 14000 rpm, por 2 minutos, a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para novo tubo eppendorf. Adicionou-se um volume de clorofórmio, estocado à 4°C. A mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto, e posteriormente centrifugada a 14000 rpm, por 2 minutos, a 4 °C. Novamente a fase aquosa foi transferida para novo tubo eppendorf. A precipitação do DNA realizada aqui foi feita de maneira idêntica a descrita em 4.17.2.

Ao DNA ressuspendido foram adicionados 2,5 mM de ATP, 2 mM de DTT, 5 µL de tampão 10X, e 10 U de T4 polinucleotídeo quinase (Invitrogen). As amostras foram então incubadas a 37 °C, por 30 minutos. A reação foi inativada a 65 °C, por 5 minutos.

4.17.5 Seleção do tamanho dos insertos

A seleção do tamanho dos insertos a serem clonados foi feita em eletroforese preparativa em gel de agarose 1% (p/v) de baixo ponto de fusão, isento de brometo de etídio. A eletroforese foi conduzida durante 2 horas, a 90 V, em tampão TBE 1X, isento de brometo de etídio. Utilizou-se, para auxílio na seleção do tamanho ideal dos insertos, o marcador de tamanho molecular 1 Kb DNA ladder (Life Technologies). O resto do procedimento foi realizado da mesma forma como descrito em 4.6.2.

4.17.6 Eluição dos fragmentos de DNA do gel de agarose

Os tubos contendo os fragmentos de gel de agarose foram incubados em banho a 65 °C, durante 15 minutos. Cada amostra teve seu volume igualado a 500 µL, completando o volume com TE (10:1) pH 8,0, quando necessário. Foram realizadas extrações sucessivas com um volume de fenol puro, saturado com Tris-

4.17.7 Clonagem dos insertos em vetor plasmideo

pUC18/19
2686 bp

lacZ (469 bp)

ori (pMB1) (1110 bp)

bla (Amp^r) (1626 bp)

Restriction Sites (Circular Map):

- Top:** Eco0109I, AatII, PstI, BstAPI, NdeI, EhoI, SspI, PdmI, BclI, ScaI.
- Right:** BsaXI, SspI, AflIII, PstI, BseYI, ClaI.
- Bottom:** GsuI, Cfr10I, Eco31I, Eam110SI, BamHI, XbaI, HincII, SalI, XmiI, BstI, SdaI, PaeI, HindIII.

Linear Sequence (5' to 3'):

5' G TTG TAA AAC GAC GGC CAG **GA ATT CGA GCT CGG TAC CGC GGG ATC CTC TAG AGT CGA GCT GCA GGC ATG CAA GCT** TGG CGT AAT CAT GGT CAT AGC TGT TTC CTG 3'

3' C AAC ATT TTG CTG CCG GTC ACT TAA GCT CGA GCC ATG GGC CCC TAG GAG ATC TCA GCT GCA CGT CCG TAC GTT CGA ACC GCA TTA GTA CCA **GTA TCG ACA NAG GAC** 5'

LacZ ← Leu Val Val Ala Leu Ser Asn Ser Ser Pro Val Arg Pro Asp Glu Leu Thr Ser Arg Cys Ala His Leu Ser Pro Thr Ile Met Thr Met

M13pUC sequencing primer (17-mer): 396

Figura 6. Esquema ilustrativo apresentando características do vetor pUC19DNA/*Sma* I (Fermentas).

4.17.7.1 Reação de Ligação

56

pUC19DNA/*Sma* I (Fermentas), 2 µL de tampão 10X e 20 U de T4 DNA ligase (New England Biolabs). A reação foi mantida a 16 °C durante a noite, aproximadamente 16 horas.

4.17.8 Transformação das células competentes

Procedimento realizado de forma idêntica a descrita previamente no item 4.10.2.

4.17.9 Seleção, cultivo e estoque dos clones

Procedimento realizado de forma idêntica ao descrito em 4.10.3.

4.17.10 Cultivo dos clones bacterianos e extração do DNA Plasmidial

O cultivo e a extração de DNA destes foram realizados de acordo com o descrito no item 4.6.10.

4.17.11 Quantificação do DNA Plasmidial

A quantificação do DNA plasmidial obtido foi realizada de forma idêntica como descrito anteriormente (item 4.3).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amostras ambientais

Faz-se necessário mencionar que as amostras de solo provenientes do sedimento de manguezal, obtido na Ilha do Fundão, Bacia de Guanabara/RJ, e de solo de um campo experimental, pertencente e situado na UNICAMP, foram coletadas por Tiago Henrique Nogueira Simões, na época, aluno do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Butantan, e orientado do Prof. Dr. Gilson Paulo Manfio. Estas coletas fizeram parte do desenvolvimento da tese de doutorado deste aluno, assim como de uma parceria científica entre: Tiago H. N. Simões; Prof. Dr. Gilson P. Manfio; Dra. Valéria Maia de Oliveira, coordenadora da Divisão de Recursos Microbianos, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPBA/UNICAMP); Profa. Dra. Eliana G. M. Lemos coordenadora do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, da Universidade Estadual Paulista (UNESP/Jaboticabal), e seus alunos de Mestrado, Maurício Rocha Dimitrov e Douglas Antonio Alvaredo Paixão.

O consórcio microbiano, fonte de DNA metagenômico para realização de experimentos descritos neste trabalho, foi isolado pela Dra. Maria Benincasa Vidotti, pesquisadora do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus Jaboticabal. Após o estabelecimento deste consórcio a Dra Maria Benincasa Vidotti propôs a Profa. Dra. Eliana G. M. Lemos o estabelecimento de uma parceria para a determinação da diversidade microbiana daquele consórcio. Tal parceria resultou no trabalho de mestrado do aluno Douglas Antônio Alvaredo Paixão, que orientado pela Profa. Dra. Eliana Lemos realizou o levantamento, através do seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA, da diversidade bacteriana ali presente. Os resultados obtidos neste levantamento indicam a presença de um grande numero de bactérias do gênero *Pseudomonas* neste consórcio. Bactérias desse gênero possuem PHA sintases de classe II e são notadamente reconhecidas por sintetizarem PHAs de cadeia média, cujas aplicações biotecnológicas são muitas, devido às propriedades físicas e químicas apresentadas por estes biopolímeros.

Devido ao fato do consórcio microbiano ter sido inicialmente isolado de uma amostra de solo coletada em uma região com histórico de contaminação por óleo diesel, e depois ter sofrido um enriquecimento, também com óleo diesel, especializando assim a comunidade microbiana, ali presente, na degradação de hidrocarbonetos; e sabendo-se que os PHAs são produzidos por alguns grupos de bactérias, quando se encontram em um meio onde há um desequilíbrio nutricional, havendo necessariamente um excesso de fonte de carbono e uma limitação de outros nutrientes essenciais ao crescimento (RAMSAY et al., 1990; STEINBÜNCHEL e SCHLEGEL, 1991), decidiu-se então, construir uma biblioteca metagenômica a partir do DNA extraído do consorcio, devido à grande possibilidade de identificar, nessa biblioteca, PHA sintases.

5.2 Extração e Quantificação do DNA do solo

Para a construção das bibliotecas metagenômica, optou-se por fazer a extração de DNA das amostras de sedimento, solo e consórcio microbiano utilizando o FastDNA[®] SPIN Kit for soil (MP Biomedicals), visto que a eficiência, qualidade e praticidade do mesmo já havia sido determinada em experimentos prévios. Outro kit comercial foi testado, na tentativa de obter a melhor extração possível, no entanto, no decorrer do trabalho os resultados obtidos indicaram o Kit, aqui utilizado, como a melhor alternativa para a obtenção de DNA em quantidade, qualidade e tamanho para as finalidades aqui descritas. O Kit testado foi o PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories).

A quantificação do DNA metagenômico extraído das amostras revelou que estes se apresentavam em quantidade, qualidade e tamanho satisfatórios para a construção das bibliotecas metagenômica. Desta forma, o método de extração de DNA metagenômico das amostras de solo foi considerado adequado para a continuidade dos experimentos. Um exemplo dos DNAs obtidos, com a utilização do kit citado, pode ser visto na figura abaixo (Figura 7).

Figura 7. A. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL). (P1) 1 Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies); (P2) Lambda EcoRI + Hind III (Promega); (1) DNA metagenômico extraído de sedimento; (2) DNA metagenômico extraído de solo de campo experimental; (3) e (4) pGEM (Applied Biosystems) 50 ng e 150 ng, respectivamente. B. Perfil eletroforético em campo pulsado, gel de agarose 0,8% (p/v). (1) e (2) DNA metagenômico extraído de consórcio microbiano; (3) e (4) DNA metagenômico extraído de solo sob arboreto de eucalipto; (P1) 36 Kb Fosmid Control DNA (EPICENTRE); (P2) GeneRuler™ DNA Ladder, High Range (Fermentas); (P3) Lambda EcoRI + Hind III (Promega).

Pode-se notar uma considerável diferença entre os tamanhos dos fragmentos de DNA obtidos para os diferentes tipos de solo acima mostrados. Tal diferença pode ser atribuída aos diferentes tipos de solo, ou seja, as diferentes composições físicas, químicas e biológicas, que definitivamente influenciam no rendimento e qualidade do material obtido.

5.3 Construção de biblioteca metagenômica a partir de DNA extraído das amostras de solo

Como já mencionado, as bibliotecas metagenômica construídas nesta etapa do projeto foram feitas em vetor fosmídeo. A escolha deste tipo de vetor de clonagem se justifica por ser capaz de receber grandes insertos de DNA, que se constitui de um fator importante nas construções de bibliotecas metagenômicas. A capacidade de clonar grandes fragmentos de DNA metagenômico permite que “operons” funcionais possam ser prospectados, com a possibilidade de recuperação de vias

biossintéticas inteiras (COWAN et al., 2005).

A seleção de tamanho dos DNAs metagenômico, realizada através de eletroforese preparativa, permitiu a recuperação de fragmentos entre 20-35 Kb. Após a clonagem destes DNAs em vetor fosmídeo, e a inserção destes em *Escherichia coli*, coletou-se 5376 clones (56 placas) para a biblioteca feita a partir de DNA metagenômico de solo sob de campo experimental, 864 (9 placas) para a biblioteca feita a partir de sedimento, e 4330 clones (45 placas) para a biblioteca feita com a utilização de DNA metagenômico isolado de consórcio microbiano.

Atribui-se o menor rendimento da biblioteca metagenômica de sedimento a dificuldade de obter um DNA de qualidade e tamanho para os experimentos de clonagem. O DNA metagenômico de sedimento apresentou menor quantidade e mais fragmentação que os DNAs provenientes das outras amostras de solo, dificultando assim sua clonagem. Além disso, o rendimento da eluição deste DNA foi inferior, quando comparado a eluição do DNA metagenômico restante.

5.4 Construção dos macroarranjos

Para a construção dos macroarranjos utilizou-se os clones obtidos nas bibliotecas metagenômicas construídas e descritas neste projeto, assim como, optou-se também por usar uma biblioteca metagenômica previamente construída. O intuito em utilizar todas estas bibliotecas, foi de aumentar as possibilidades de encontrar os genes de interesse para esse projeto.

Durante o processo de repique das bibliotecas metagenômicas, para a construção dos macroarranjos de colônias bacterianas, pode-se perceber uma nítida diferença de desenvolvimento entre as colônias bacterianas das bibliotecas recém construídas (solo de campo experimental e sedimento), e as colônias bacterianas da biblioteca anteriormente construída (solo sob arboreto de eucalipto). Esta diferença pode ser atribuída a dois fatores: o tempo que a biblioteca de solo sob arboreto de eucalipto ficou armazenada a -80 °C, sem utilização, e a quebra do robô Q-bot (Genetix), pertencente ao BCC Center, robô este responsável também pela transferência das colônias bacterianas das placas Genetix de 96 poços para as

placas Genetix de 384 poços.

Visto que as bibliotecas de solo sob cultivo e sedimento tinham acabado de serem construídas, interpretou-se com normal o fato de suas células se apresentarem mais viáveis e, portanto, com uma capacidade de desenvolvimento superior as células da biblioteca de solo sob arboreto de eucalipto. Porém, com a quebra do robô Q-bot (Genetix), o repique da biblioteca de solo de arboreto de eucalipto ocorreu apenas uma única vez, diferentemente do repique das outras duas bibliotecas. Neste caso, o meio de cultura contendo os clones já desenvolvidos, foi transferido manualmente para as placas Genetix de 384 poços, em um volume exato para uso futuro, e estas estocadas a -80 °C (maiores esclarecimentos vide metodologia).

Tal deficiência no desenvolvimento das células da biblioteca de solo de arboreto de eucalipto, assim como a quebra do robô Q-bot (Genetix), acarretaram em diferentes tempos de desenvolvimento destas células nas membranas de náilon, promovendo assim, um desenvolvimento desuniforme destas células. Tal desenvolvimento desuniforme pode afetar a quantidade de DNA fixado na membrana, podendo ou não proporcionar problemas nas hibridizações.

Diante da impossibilidade de utilizar a mesma metodologia aplicada na construção dos macroarranjos de colônias bacterianas, uma nova abordagem teve que ser desenvolvida, para que o macroarranjo da biblioteca metagenômica do consórcio microbiano fosse construído.

A abordagem desenvolvida consistiu em utilizar um sistema de Slot Blot (The Convertible Filtration Manifold System, Life Technologies) para fixar o DNA extraído das 45 placas da biblioteca metagenômica, em uma membrana de náilon carregada positivamente. A estratégia consistiu em realizar primeiramente a extração de DNA dos clones da biblioteca metagenômica, a partir de uma amostra composta, isto é, realizou-se 45 extrações de DNA, uma para cada placa da biblioteca. Ao final, obteve-se uma amostra composta de DNA, amostra esta representativa da placa cujo DNA foi extraído. O sistema de Slot Blot permitiu que esses DNAs extraídos, após serem quantificados para a certificação de que os mesmos encontravam-se em quantidade e qualidade ideal para serem utilizados, fossem fixados na membrana de náilon. Desta maneira pode-se em uma única membrana ter as 45 placas da

biblioteca representadas, pretendendo assim, após a realização das hibridizações, direcionar a prospecção apenas para as placas que se apresentarem positivas.

5.5 Amplificação, por PCR, da região do DNA correspondente a PHA sintase

Foram sintetizados oligonucleotídeos para os quatro tipos conhecidos de PHA sintases, sendo estes: phaCF1 e phaCR4 (SHEU et al., 2000), conjunto utilizado na prospecção de enzimas PHA sintases de classe I e II; I-179L(a) e I-179R(a) (SOLAIMAN et al., 2000; SOLAIMAN, 2002), conjunto utilizado na prospecção de enzimas de classe II; Haphapcr1 e Haphapcr2 (HAI et al., 2001), conjunto utilizado na prospecção de enzimas de classe III; P1 e P2 (HAI et al., 2004), conjunto também utilizado na prospecção de enzimas de classe III; B1F e B1R (SHAMALA et al., 2003), conjunto utilizado na prospecção de enzimas de classe IV.

Para a confirmação do funcionamento dos conjuntos de oligonucleotídeos sintetizados, para as diferentes classes da enzima PHA sintase, amostras de DNA de solo, inclusive DNA proveniente de áreas diferentes das abrangidas neste trabalho, e não utilizado para a construção de bibliotecas metagenômicas (DNA extraído de solo de Mata Atlântica), assim como, DNA extraído de linhagens puras, quando disponíveis, foram utilizados como molde em reações de PCR.

Os conjuntos de oligonucleotídeos phaCF1/phaCR4, Haphapcr1/Haphapcr2, P1/P2 e B1F/B1R mostraram-se eficientes na amplificação parcial do gene *phaC*, quando utilizados em amostras de DNA de solo sob arboreto de eucalipto. Os fragmentos de DNA amplificados por estes conjuntos de “primers” foram comparados visualmente com padrões de tamanho molecular, e os conjuntos phaCF1/phaCR4, Haphapcr1/Haphapcr2 e B1F/B1R apresentaram tamanhos compatíveis com os descritos na literatura de onde estes “primers” foram retirados (Figuras 8, 9 e 10, respectivamente). O conjunto P1/P2 mostrou-se eficiente na amplificação parcial do gene *phaC*, quando utilizado com DNA de solo sob arboreto de eucalipto, no entanto, o tamanho do fragmento de amplificação produzido diferiu do apresentado na literatura de onde este conjunto de primer foi retirado. Hai et al., (2004) apresentam um produto de amplificação de aproximadamente 500 pb,

quando submetido a eletroforese, e após clonagem e seqüenciamento deste produto, um tamanho molecular de 536 pb é relatado. O conjunto P1/P2 foi utilizado por Hai et al., (2004) para amplificar parcialmente o gene *phaC* de *Desulfococcus multivorans*, e a seqüência parcial deste gene foi depositada no banco de dados “GenBank” do NCBI. Apesar de os autores relatarem um produto de PCR de 536 pb, esse tamanho molecular de amplificação não foi o mesmo observado quando os “primers” P1/P2 foram usados para uma simulação de pareamento virtual com a seqüências depositada no banco de dados GenBank, através do uso do software BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999). Neste caso o pareamento dos “primers” mostra uma amplificação de 437 pb, tamanho esse compatível com o obtido, após as reações de PCR, utilizando esse conjunto de “primers” em amostras de DNA de solo sob arboreto de eucalipto (Figura 11).

Figura 8. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL), da amplificação, por PCR, do gene *phaC* com conjuntos de oligonucleotídeos phaCF1 e phaCR4. (P) 100 bp DNA Ladder (Life Technologies); A. (CN) Controle negativo; (1) *E. coli** DH5α contendo operon *phaCAB* de *Cupriavidus necator*; (2) solo sob arboreto de eucalipto*. B. (1) solo de Mata Atlântica* e (2) *Pseudomonas aeruginosa**.

* Organismos ou local de onde o DNA, utilizado na reação de PCR, foi isolado.

Figura 9. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL), da amplificação, por PCR, do gene *phaC* com conjuntos de oligonucleotídeos Haphapcr 1 e Haphapcr2. (P) 100 bp DNA Ladder (Life Technologies); (CN) Controle negativo; (1) DNA de solo sob arboreto de eucalipto.

Figura 10. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL), da amplificação, por PCR, do gene *phaC* com conjuntos de oligonucleotídeos B1F e B1R. (P) 100 bp DNA Ladder (Life Technologies); (CN) Controle negativo; (1) solo de Mata Atlântica* e (2) solo sob arboreto de eucalipto*.

Figura 11. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL), da amplificação, por PCR, do gene *phaC* com conjuntos de oligonucleotídeos P1 e P2. (P) 100 bp DNA Ladder (Life Technologies); (CN) Controle negativo; (1) DNA de solo de Mata Atlântica* e (2) DNA de solo sob arboreto de eucalipto*.

* Organismos ou local de onde o DNA, utilizado na reação de PCR, foi isolado.

O conjunto de oligonucleotídeos I-179L(a)/I-179R(a) foi o único que não se mostrou eficiente na amplificação parcial do gene *phaC* quando utilizado com amostra de DNA de solo sob arboreto de eucalipto. Diversas condições de reações foram testadas, e mesmo assim não se obteve resultados positivos. Diante disso os “primers” I-179L(a)/I-179R(a) foram testados na amplificação parcial do gene *phaC*, usando como molde o DNA de uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*, que foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Fernando Antonio Ávila do Departamento de Microbiologia da UNESP/Jaboticabal. Neste caso, o conjunto de “primers” mostrou-se eficiente, visto que essa bactéria é notadamente reconhecida como portadora de PHA sintases de classe II, a amplificação deste controle positivo ocorreu então como o esperado (Figura 12). As mesmas condições aplicadas à amplificação da PHA sintase de *P. aeruginosa* foram aplicadas para amostras de DNA de solo sob arboreto de eucalipto, mas não mostram resultados positivos. Permanece assim, incerto o motivo pelo qual esse conjunto de “primers” não foi eficiente na amplificação do DNA de solo.

Figura 12. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL). Amplificação, por PCR, do gene *phaC* com conjuntos de oligonucleotídeos I179L(a) e I179R(a). Canaletas: (P) padrão de tamanho molecular (100 bp DNA Ladder – Life Technologies); (CN) Controle negativo; (1) DNA genômico de *P. aeruginosa* e (2) DNA de solo sob arboreto de eucalipto.

5.6 Construção de sondas para prospecção das diferentes classes de PHA sintase

A construção das sondas para a prospecção do gene *phaC* foi realizada através de reações de PCR, utilizando os distintos oligonucleotídeos previamente descritos. Como DNA molde para as reações com os conjuntos phaCF1/phaCR4, Haphapcr1/ Haphapcr2, P1/P2 e B1F/B1R, utilizou-se DNA de solo sob arboreto de eucalipto, previamente extraído como descrito anteriormente. Para construção de sonda utilizando o conjunto I-179L(a)/I-179R(a), o DNA molde foi obtido de uma linhagem de *P. aeruginosa*.

Optou-se por utilizar como molde, para a construção das sondas, o DNA extraído de solo sob arboreto de eucalipto, pois dos cinco conjuntos de “primers” escolhidos para essa etapa, quatro se mostraram eficientes na amplificação deste DNA, e destes quatros, três deles são conjuntos de “primers” degenerados. A utilização deste “primers” degenerados, em DNA de solo, cria a possibilidade de que, em uma reação de PCR, diferentes seqüências de DNA do mesmo gene sejam amplificadas. Quando realizamos uma extração de DNA de solo, da maneira como foi aqui realizada, estamos realizando uma extração total do DNA dos organismos presentes naquela amostra. Partindo do princípio de que a metodologia utilizada foi suficiente para lisar todas as células ali presentes e expor seus conteúdos genéticos, podemos afirmar que temos, nesta amostra, DNA de todos os organismos presentes na amostra inicial de solo que foi coletada, e posteriormente processada. Portanto, acharemos nesta amostra extraída DNA de diferentes organismos, organismos estes que podem carregar o mesmo gene, mas não a mesma seqüência gênica para este, criando assim a possibilidade de, em uma reação de PCR, distintas seqüências do mesmo gene serem amplificadas.

Após a confirmação da amplificação parcial do gene *phaC*, realizada por eletroforese, fez-se necessário realizar a purificação destes fragmentos, para posterior clonagem em vetor pGEM®-T Easy, assim como, para o uso como sonda nas hibridizações com os macroarranjos de DNA. O método escolhido, eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão, mostrou-se muito eficiente neste procedimento, uma vez que é possível assim isolar do gel apenas a banda

correspondente ao produto de amplificação do gene *phaC*. De posse dos cubos de agarose contendo os fragmentos de DNA, estes foram isolados com o auxílio de um kit comercial, etapa esta crucial para a recuperação de um DNA de boa qualidade e quantidade para futuros experimentos. O uso de kits comerciais revela-se como uma ótima alternativa para a realização deste processo, uma vez que são rápidos e seguros, evitando assim o uso de solventes orgânicos, repetidas manipulações das amostras e o dispêndio de horas para a realização do processo. Nesta etapa diferentes kits comerciais foram testados e o GENE CLEAN® Kit (Q-BioGene) apresentou melhores resultados quanto à concentração e quantidade do DNA isolado.

A quantificação das amostras, tanto em gel de agarose (Figura 13), quando em espectrofotômetro mostrou uma recuperação de DNA de boa qualidade e quantidade para a continuação dos experimentos.

Figura 13. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL) da quantificação dos fragmentos amplificados, por PCR, do gene *phaC*. (P1) 1 Kb DNA Ladder (Fermentas); (P2) 100 bp DNA Ladder (Amershan GE); (1) *phaCF1/phaCR4*; (2) *I179L(a)/I179R(a)*; (3) P1/P2; (4) B1F/B1R; (5) e (6) pGEM (Applied Biosystems) 100 ng e 200 ng, respectivamente.

5.7 Construção de bibliotecas a partir das sondas obtidas

Optou-se por realizar a construção de bibliotecas com as sondas obtidas, pois se viu aqui uma possibilidade de confirmar a identidade das sondas utilizadas,

através do seqüenciamento dos clones obtidos e análises das seqüências, assim como, visualizar a eficiência dos conjuntos de “primers” em amplificar diferentes seqüências de DNA do gene prospectado, quando a amplificação é realizada a partir de DNA obtido de solo. Desta maneira foram realizadas quatro bibliotecas diferentes, uma para cada conjunto de “primers” que se mostrou eficiente na amplificação parcial do gene *phaC*, a partir de amostras de DNA de solo sob arboreto de eucalipto. Portanto, foram construídas bibliotecas com os produtos de amplificação dos “primers” phaCF1/phaCR4, Haphapcr1/Haphapcr2, P1/P2 e B1F/B1R. Como o conjunto dos “primers” I-179L(a)/I-179R(a) foi ineficiente na amplificação do DNA extraído de solo, o produto de amplificação destes “primers”, quando utilizados com DNA molde de *P. aeruginosa*, também foi clonado, porém, aqui a intenção foi somente confirmar a identidade da sonda produzida.

Optou-se pela escolha do vetor pGEM®-T Easy (Promega), pois este sistema mostra-se conveniente para a clonagem de produtos de PCR, e já vem sendo utilizado com freqüência em nosso laboratório, produzindo bons resultados. Tal vetor é preparado cortando-se o vetor pGEM®-5Zf(+) (Promega) com a enzima EcoRV, e adicionando-se uma base nitrogenada Timina a cada terminal 3' gerado após o corte. Estes terminais 3'-T, presentes no sítio de clonagem do inserto, melhoram a eficiência de ligação de um produto de PCR a este plasmídeo, uma vez que evitam a re-circularização do vetor, e fornecem um terminal compatível para os produtos de PCR gerados com a utilização de algumas enzimas DNA polimerase, tais como a *Taq*, *Tfl*, *Tth* (MEZEI e STORTS, 1994; ROBLES e DOERS, 1994). Estas polimerases freqüentemente, adicionam uma desoxiadenosina aos terminais 3' dos fragmentos amplificados (CLARK, 1988; NEWTON e GRAHAM, 1994), proporcionando assim, uma condição favorável a ligação destes fragmentos ao vetor de clonagem.

A clonagem dos fragmentos de DNA obtidos mostrou-se eficiente para todos os conjuntos de “primers”, produzindo assim, muitos clones transformantes. Foram coletados 96 clones, para cada biblioteca construída a partir dos conjuntos de “primers” que apresentaram resultados positivos na amplificação do DNA de solo, e apenas seis clones foram coletados para a clonagem do produto de amplificação dos “primers” I-179L(a)/I-179R(a).

5.8 Seqüenciamento e análise das seqüências

O seqüenciamento de todos os clones obtidos nas diferentes bibliotecas foi realizado, e as seqüências geradas foram analisadas pelo pacote de programas Phred/Phrap/Consed. As análises, feitas com a utilização dos softwares citados, propiciaram a verificação da qualidade obtida no seqüenciamento para cada clone seqüenciado. Desta forma, foi possível identificar as seqüências que não apresentavam qualidade satisfatória para o procedimento das análises, indicando assim, quais clones deveriam ter seus insertos seqüenciados novamente.

Após sucessivos seqüenciamentos das amostras, as seqüências geradas foram submetidas ao programa Phrap, que proporcionou a reunião das seqüências obtidas de diferentes clones, mas que se mostravam iguais quanto à seqüência de nucleotídeos, em um único grupo (“contig”). Foram observados a criação de 58 grupos (“contig”) para os “primers” phaCF1/phaCR4, 78 para os “primers” Haphapcr1/Haphapcr2, 58 para os “primers” P1/P2 e 30 para os “primers” B1F/B1R, confirmando assim, a hipótese de que os “primers”, utilizados no presente estudo, foram capazes de amplificar diferentes seqüências de um mesmo gene, quando usados em amostras de DNA extraídos de solo. A seqüência consenso dos diferentes grupos, assim como, duas seqüências obtidas do seqüenciamento de dois clones, clones estes resultantes da clonagem do fragmento de DNA amplificado na reação de PCR com os “primers” I-179L(a)/I-179R(a), usando-se como molde DNA de *P. aeruginosa*, foram submetidos ao programa BlastX.

O programa Blast foi utilizado na tentativa de identificar as seqüências consenso obtidas nos diferentes grupos, comparando estas perante as existentes no banco de dados “GenBank”. Como resultado o programa apresenta um relatório, onde indica a possível identidade das seqüências submetidas, de acordo com valores de alguns parâmetros (“score”, “e-value” e tamanho do alinhamento entre as seqüências comparadas). Tais parâmetros são utilizados como referência para a determinação se o resultado apresentado é plausível ou não.

De acordo com os relatórios gerados pelo programa Blast, pode-se observar que todos os conjuntos de “primers” propiciaram correta amplificação parcial do

gene *phaC*, tanto em amostras de DNA de solo, como na amplificação realizada a partir de DNA molde de *P. aeruginosa*.

De posse das seqüências analisadas e agrupadas, análises filogenéticas foram realizadas individualmente para cada conjunto de “primers”. Tais análises indicam claramente que a diversidade do gene *phaC*, para as quatro classes conhecidas, em amostras de DNA de solo sob arboreto de eucaplitó é grande. Tal inferência se sustenta na observação de que, no total das seqüências obtidas através da amplificação parcial do gene *phaC*, usando como molde DNA de solo, poucas puderam ser atribuídas a organismos conhecidos e/ou disponíveis no banco de dados “GenBank” (vide Figuras 14, 15, 16, 17 e 18).

A análise filogenética para o conjunto de “primers” phaCF1/phaCR4 foi separada em duas, visto que este conjunto de “primers” foi aplicado para a prospecção de organismos que possuam PHA sintase de classes I e II. A figura 10 apresenta árvore filogenética gerada pelo programa PhyML, a partir dos grupos de seqüências consenso, dos “primers” phaCF1/phaCR4, atribuídos como PHA sintases de classe I de acordo com o resultado apresentado pelo programa Blast. Nesta representação gráfica da relação filogenética entre, as seqüências amplificadas, e os resultados mais significativos encontrados pelo Blast, podemos perceber uma grande diversidade do gene *phaC*, com relação aos organismos apresentados como mais próximos pelo programa Blast. Os grupos (“contigs”) de seqüências amplificadas agrupam-se entre si, apresentando similaridade maior entre eles. As exceções são os grupos (“contigs”) 8, 54, 22, 30 e 31, que se apresentam geneticamente próximos aos organismos encontrados como seus semelhantes no programa Blast.

As PHA sintases apresentam um domínio α/β -hidrolase, assim como outras enzimas ligadas a catálise de ligações éster, apresentando um “motif” semelhante à de enzimas lípases (G-X-S-X-G). Nas PHA sintase, o aminoácido serina é substituído pelo aminoácido cisteína, e devido a essa semelhança entre o “motif” das duas enzimas, esse sítio das PHA sintase é comumente referido como “Lipase-like box”. Devido ao fato de o resíduo cisteína, presente no “motif” das PHA sintase, ser importante para a ação catalítica destas enzimas, a região referida como “Lipase-like box” apresenta-se relativamente conservada, em sua estrutura secundária, dentre as

diversas PHA sintase conhecidas. Diante desta constatação, optou-se por observar também o “Lipase-like box”, encontrado nas seqüências dos produtos de PCR que foram utilizados para a construção das bibliotecas a partir das sondas, como um indício da diversidade de genes, codificantes para as PHA sintase, nas amostras de solo sob arboreto de eucalipto.

De acordo com o sítio “Lipase-like box”, pode-se observar que o agrupamento das seqüências na árvore filogenética apresentada segue, de uma forma geral, o padrão apresentado no agrupamento dos organismos. Podemos notar a presença de diferentes aminoácidos, nos diferentes grupamentos formados, podendo inclusive, ver o aparecimento de aminoácidos não comuns ao “Lipase-like box”, como os presentes nos “contigs” 31, 37, 50, 28, 2, 4, 57, entre outros. No entanto, o resíduo de cisteína, como esperado, esta presente em todos os organismos.

De acordo com as seqüências de aminoácidos, e o agrupamento destas nas árvores, podemos afirmar que no solo analisado ainda há uma grande quantidade de organismos cujo gene *phaC* codifica para enzimas próximas as PHA sintases de classe I, porém, ainda desconhecidas.

Figura 14. Árvore filogenética gerada pelo programa PhyML, a partir dos grupos de seqüências consenso dos “primers” phaCF1/phaCR4. O “Lipase-like box” é indicado pelas seqüências de aminoácidos destacadas.

Na figura 15, a relação filogenética entre as seqüências também amplificadas com o uso dos “primers” phaCF1/phaCR4, porém, atribuídas a PHA sintases de classe II é apresentada. Nesta árvore foram incluídas as seqüências dos dois clones que continham fragmentos de DNA amplificados, usando como molde *P. aeruginosa*, e o conjunto de “primers” I-179L(a)/ I-179R(a). Tal inclusão se justifica, pois esse conjunto de “primers” é específico para genes *phaC* de classe II. Podemos observar que o “contig” 15 é mais próximo de Burkholderia, enquanto que, os “contigs” 19 e 46 são mais próximos de bactérias não cultiváveis (Figura 15). O restante dos grupos (“contigs”) forma um único agrupamento que se apresenta mais distante filogeneticamente dos “contigs” 15, 19 e 46. Os dois clones, contendo o produto de amplificação dos “primers” I-179L(a)/I-179R(a), agrupam-se com seus respectivos resultados apresentados pelo programa Blast, e de acordo com a análise, seus insertos são iguais ao gene *phaC* dos organismos apresentados. De acordo com a seqüência do “Lípase-like box” podemos perceber a presença de diferentes aminoácidos, nos diferentes grupos apresentados, mostrando assim que estes diferem com relação a este sítio. No entanto, assim como esperado, todas as seqüências representadas na árvore apresentam o resíduo cisteína. Assim como na análise das seqüências obtidas com o mesmo conjunto de “primers”, mas cujo resultado do programa Blast indicava seqüências de PHA sintases de classe I, podemos afirmar que, no solo estudado há uma grande diversidade do gene *phaC*, sendo que a grande maioria destes genes ainda não apresentam representantes no banco de dados “GenBank”, indicando assim uma grande diversidade, ainda para ser descoberta.

Figura 15. Árvore filogenética gerada pelo programa PhyML a partir dos grupos de seqüências consenso dos “primers” phaCF1/phaCR4 e I179L(a)/I179R(a). O “Lipase-like box” é indicado pelas seqüências de aminoácidos destacadas.

A figura 16 apresenta a árvore filogenética para as seqüências obtidas com o conjunto de “primers” Haphapcr1/Haphapcr2, “primers” estes utilizados para a amplificação de seqüências do gene *phaC* de classe III. Novamente aqui se percebe um agrupamento maior entre os grupos (“contigs”) do que entre os grupos e seus respectivos resultados apresentados pelo programa Blast, com exceção dos grupos (“contigs”) 3 e 16, que apresentam-se agrupados com organismos encontrados no resultado fornecido pelo programa Blast. Nota-se também, o agrupamento do gênero *Xanthomonas* como um grupo distante do restante apresentado. De acordo com a análise do “Lipase-like box”, e o agrupamento das seqüências na árvore, podemos perceber a grande diversidade apresentada pelas seqüências amplificadas do solo, tendo como parâmetro as seqüências dos organismos apresentado pelo programa Blast. De uma forma geral, novamente pode-se afirmar que ainda há muitos organismos no solo estudado que contem PHA sintase de classe III e sem representantes no banco de dados “GenBank”.

Figura 16. Árvore filogenética gerada pelo programa PhyML a partir dos grupos de seqüências consenso dos “primers” Haphapcr1/Haphapcr2. O “Lipase-like box” é indicado pelas seqüências de aminoácidos destacadas (Continua)

Figura 16. Árvore filogenética gerada pelo programa PhyML a partir dos grupos de seqüências consenso dos “primers” Haphapcr1/Haphapcr2. O “Lipase-like box” é indicado pelas seqüências de aminoácidos destacadas (Conclusão).

Na figura 17, a relação filogenética entre as seqüências amplificadas com o uso dos “primers” P1/P2 é mostrada. Faz-se importante comentar que este conjunto de “primers” foi o único a produzir amplificações inespecíficas do gene *phaC*, sendo que dos 58 grupos apresentados, somente 14 possuíam similaridade com o gene *phaC*, quando foram submetidos ao programa Blast. Como tal conjunto de primer foi construído para a amplificação parcial do gene *phaC* de *Desulfococcus multivorans*, foram incluídas na construção da árvore duas seqüências de PHA sintases de bactérias do grupo Desulfo. O agrupamento das seqüências amplificadas mostra uma maior proximidade destas com PHA sintases de cianobactérias, que são organismos possuidores de PHA sintase de classe III. O grupo formado pelas seqüências dos gêneros *Desulfobacterium* e *Desulfococcus* agrupa-se fora dos grupos formados pelas seqüências amplificadas, e fora também dos resultados apresentados pelo programa Blast, mostrando assim que as seqüências amplificadas do solo não possuem proximidade com as seqüências deste grupo de bactérias. Com relação ao “Lipase-like box”, notamos que todas as seqüências apresentadas para os grupos (“contigs”), e seus respectivos resultados no programa Blast, mostram-se idênticas as apresentadas na árvore do conjunto de “primers” Haphapcr1/Haphapcr2, mostrando assim uma relativa conservação deste sitio entre seqüências de classe III.

Figura 17. Árvore filogenética gerada pelo programa PhyML a partir dos grupos de seqüências consenso dos “primers” P1/P2. O “Lipase-like box” é indicado pelas seqüências de aminoácidos destacadas.

Na figura 18 a relação filogenética entre as seqüências amplificadas com o uso dos “primers” B1F/B1R é mostrada. Dentre todos os conjuntos de “primers” utilizados, pode-se perceber aqui uma menor diversidade entre as seqüências amplificadas. Acredita-se que tal diferença possa estar relacionada ao uso de “primers” não degenerados para a amplificação de genes *phaC* de classe IV (B1F/B1R), diferentemente dos demais. No entanto, pode-se ainda perceber algumas pequenas diferenças nas seqüências amplificadas pelo conjunto de “primers” B1F/B1R, sendo que, podemos afirmar que genes *phaC* pertencentes a um mesmo gênero ou espécie de organismos foi amplificado, mas com diferenças em suas seqüências de aminoácidos. Podemos ainda, perceber uma nítida separação das seqüências de *Bacillus cereus* e de *Bacillus megaterium*, tendo as seqüências amplificadas se agrupado mais proximamente da espécie *B. megaterium*, fato este plausível, visto que os “primers” foram desenhados baseando-se na seqüência de *B. megaterium*. Esta diferença entre a seqüência do gene *phaC* de *B. cereus* e *B. megaterium* já havia sido observada por SOLAIMAN e ASHBY (2005), sendo que tal autores propuseram a separação das PHA sintase classe IV em duas classes distintas. A seqüência de aminoácidos do “Lipase-like box” mostra-se bem conservada nestes organismos, apresentando uma única mudança no grupo (“contig” 13).

Figura 18. Árvore filogenética gerada pelo programa PhyML a partir dos grupos de seqüências consenso dos “primers” B1F/B1R. O “Lipase-like box” é indicado pelas seqüências de aminoácidos destacadas.

De uma forma geral, podemos dizer que atualmente observa-se a falta de seqüências no banco de dados “GenBank”, com relação ao gene estudado, isto é, os resultados apresentados mostram que há grande diversidade, do gene estudado no solo, ainda a ser descoberta.

5.9 Hibridização dos macroarranjos

Como descrito anteriormente, a hibridização dos macroarranjos foi realizada com a utilização do kit Amersham AlkPhos Direct Labeling and Detection System with CDP-*Star* (GE Healthcare). A escolha deste kit proporcionou uma alternativa à marcação radioativa, comumente utilizada em experimentos de hibridização, sendo que, a marcação das sondas utilizadas se fez por quimiluminescência através da enzima fosfatase alcalina, que se liga ao DNA desnaturado através de um “cross-link”, na presença de formaldeído. O uso deste tipo de marcação permite maior agilidade na conclusão dos experimentos, maior segurança devido ao não manuseio com material radioativo e ainda, a possibilidade de repetição dos ensaios em um intervalo maior de tempo, visto que o kit mantém-se estável por um período mais longo do que o material radioativo.

Realizou-se a hibridização dos macroarranjos com as cinco sondas previamente sintetizadas. Tal técnica mostrou ser rápida e eficiente na prospecção das PHA sintases, no entanto, algumas particularidades foram observadas. Os macroarranjos, construídos a partir da biblioteca de DNA de solo sob arboreto de eucalipto, não puderam ser utilizado para a prospecção das PHA sintases com todas as sondas, pois após a realização do primeiro ensaio, experimento feito com a sonda construída utilizando-se o conjunto de “primers” phaCF1 e phaCR4, pode-se observar uma grande irregularidade na concentração de DNA nos macroarranjos desta biblioteca. Diante deste fato, diferentes testes foram feitos para determinar se realmente havia uma grande diferença na concentração de DNA, ou se os parâmetros utilizados anteriormente não haviam sido satisfatórios para promover a hibridização da sonda com o DNA fixado na membrana de náilon. Após a realização dos testes mencionados, chegou-se a conclusão que os macroarranjos construídos

a partir da biblioteca metagenômica de DNA de solo sob arboreto de eucalipto, tinham que ser retirados das futuras análises, pois a diferença, e até mesmo a ausência em alguns locais, de DNA fixado a membrana, comprometem a análise posterior a hibridização, visto que se torna impossível de rastrear a posição dos clones positivo. Esta diferença na concentração de DNA foi atribuída ao problema da quebra do robô Q-bot (Genetix) que deveria ter realizado o repique dos clones desta biblioteca mais de uma vez. Tal duplo repique deveria ter ocorrido antes dos clones serem transferidos para a membrana de náilon, onde deveriam crescer uniformemente, anteriormente ao início da realização dos tratamentos que promovem a fixação do DNA na membrana, fato que não ocorreu.

A outra particularidade observada, diz respeito aos tipos de arranjos escolhidos para a disposição dos clones bacterianos nas membranas de náilon. Foram utilizados arranjos 4X4 e 5X5, sendo que os arranjos 4X4 proporcionam uma melhor visualização dos resultados após a hibridização. Estes arranjos foram escolhidos, pois propiciaram o uso de menos membranas, visto que é possível dispor um maior número de clones, quando o espaço entre eles é menor. No entanto, para futuras construções de macroarranjos de DNA, como os construídos neste projeto para as bibliotecas de solo sob arboreto de eucalipto, sedimento de manguezal e solo de campo experimental, sugere-se que seja utilizado o menor arranjo possível, isto é, o arranjo com o menor número de clones possíveis por quadrante, possibilitando assim um maior espaçamento entre os clones e facilitando as análises pós-hibridizações.

O macroarranjo construído a partir do DNA fosmidial isolado dos clones da biblioteca metagenômica de consórcio microbiano mostrou-se ser muito eficiente para a prospecção do gene *phaC*. Os resultados obtidos com a hibridização destes macroarranjos são muito consistentes, e de fácil análise, visto que não se faz necessário o uso de nenhum digitalizador de imagens, assim como de software para determinação dos clones positivos. Vale salientar também, que a construção do macroarranjo de DNA seguindo a metodologia aqui descrita, mostrou-se muito mais acessível, em termos financeiros, do que a metodologia utilizada para a construção dos demais macroarranjos. As desvantagens com relação aos macroarranjos construídos para a biblioteca metagenômica de consórcio microbiano e os demais são: no macroarranjo construído a partir do consórcio microbiano, um número maior

de experimentos é necessário para prospectar um grande número de clones, visto que após a hibridização com a membrana que contém o DNA de cada placa da biblioteca é necessário construir um novo macroarranjo para as placas positivas, e posteriormente realizar a hibridização destes; os DNAs nesta construção não foram dispostos em duplicatas devido ao modelo experimental que se optou por fazer, diferentemente do restante dos macroarranjos que apresentavam duplicata para todos os clones ali dispostos, proporcionando assim, uma maior segurança na identificação dos clones positivo.

5.10 Análises das imagens

Após a realização da hibridização de todos os macroarranjos com as cinco sondas diferentes, fez-se necessário identificar os clones positivos para cada biblioteca metagenômica, e cada sonda utilizada. Para os macroarranjos construídos a partir das bibliotecas de sedimento de manguezal, e solo agricultável, o programa BZScan foi utilizado para auxiliar a identificação dos clones positivos. O programa BZScan permite a construção uma malha que pode ser encaixada na imagem resultante da hibridização, e desta forma auxiliar na identificação dos clones (Figura 19). Para o macroarranjo construído a partir da biblioteca metagenômica de consórcio microbiano, a análise foi realizada simplesmente observando o filme sensibilizado após a hibridização. Visto que um corte feito no canto superior esquerdo da membrana indicava que naquela posição o DNA da placa 01 foi colocado, a identificação das placas positivas foi realizada simplesmente contando o número de hibridizações ocorridas e verificando a que placas aquelas hibridizações pertenciam (Figura 20).

Figura 19. Imagem gerada pelo programa BZScan durante análises das imagens obtidas após as hibridizações.

Figura 20. Imagem gerada após hibridização do macroarranjo construído para a biblioteca metagenômica a partir de consórcio microbiano.

A figura 21 ilustra o resultado obtido após a realização das hibridizações e a identificação de clones positivos.

Figura 21. Clones positivos identificados durante as análises das imagens obtidas após hibridização dos macroarranjos com as diferentes sondas.

Ao final das análises foi possível identificar oito clones positivos quando se utilizou sonda sintetizada com o conjunto de “primers” phaCF1/phaCR4, seis clones positivos na utilização da sonda sintetizada com “primers” I-179L(a)/I-179R(a) e apenas um clone positivo para a sonda sintetizada com o conjunto de primer Haphapcr1/Haphapcar2.

A utilização das sondas sintetizadas a partir dos “primers” P1/P2 e B1F/B1R não produziram resultados positivos, ou seja, não foi possível identificar clones, nas diferentes bibliotecas prospectadas, utilizando as sondas preparadas com estes conjuntos de “primers”. Tal resultado negativo pode ser interpretado de duas maneiras: as condições utilizadas na hibridização dos macroarranjos de DNA com as respectivas sondas não foram adequadas para a detecção de clones positivos e os DNAs clonados nas diferentes bibliotecas metagenômica não forneceram a homologia requerida para o pareamento das sondas. A primeira suposição apresenta-se plausível uma vez que são vários os fatores que podem interferir na hibridização das sondas ou até mesmo na remoção destas depois de hibridizadas, como por exemplo, as temperaturas usadas durante a hibridização e lavagens das membranas após as hibridizações. Acredita-se que a segunda hipótese seja mais improvável, pois podemos dizer que no solo há organismos que contenham o gene *phaC* para as classe III e IV, classes estas específicas para os “primers” P1/P2 e B1F/B1R respectivamente, visto que os “primers” produziram amplificações positivas quando utilizados com DNA molde de solo sob arboreto de eucalipto e alguns organismos modelo para PHA sintases de classe III e IV são freqüentemente

encontrados em solo como cianobactérias e bactérias do gênero *Bacillus*. No entanto, a segunda suposição não deixa de ser plausível, visto que a diversidade bacteriana em solos é imensa o suficiente para afirmarmos que há possibilidade de nas bibliotecas metagenômicas construídas, não haver DNA que apresente homologia com as sondas utilizadas. Tal suposição justifica-se ao compararmos a diversidade do gene *phaC* encontrada na clonagem das sondas e a quantidade de clones positivos encontrados para este gene, posteriormente as hibridizações com os macroarranjos. Se assumirmos que o genoma de uma bactéria tenha aproximadamente em média 3,4 Mb, valor este determinado após ser feita média do tamanho de todos os genomas bacterianos seqüenciados e depositados no “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), e que nas bibliotecas construídas tenhamos em média fragmentos de DNA clonados de aproximadamente 35 Kb, com um total de aproximadamente 11000 clones, podemos dizer que as bibliotecas metagenômicas, aqui construídas, possuem aproximadamente 114 genomas bacterianos clonados. Visto a quantidade de bactérias que habitam o solo, e sabido que a microbiota deste ambiente não é composta apenas de bactérias, fica claro que a suposição de que os DNAs clonados nas diferentes bibliotecas metagenômica, podem não ter fornecido a homologia requerida para o pareamento das sondas construídas a partir dos conjuntos P1/P2 e B1F/B1R.

5.11 Confirmação e seqüenciamento dos clones positivos

Posteriormente as análises das imagens resultantes dos experimentos de hibridização, e a identificação dos possíveis clones positivos para o gene *phaC*, se fez necessário a realização de confirmações de tais clones positivos. Diante dos resultados obtidos até o momento, dos quinze clones positivos, quatorze deles apresentam-se como possíveis clones contendo genes para PHA sintase de classe I ou II, resolveu-se então, realizar reações de PCR para a confirmação da identidade dos genes encontrados. As reações de PCR foram feitas utilizando o conjunto de “primers” *phaCF1/phaCR4*. Tal conjunto foi escolhido, pois a funcionalidade deste está ligada a identificação de genes *phaC* que sintetizam PHA sintase de classe I ou II. As reações de PCR foram feitas de acordo com o descrito no item 4.8, assim

como seus resultados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose, de maneira idêntica a descrita no mesmo item citado.

Após a realização de tais experimentos, dos quatorze clones positivos para PHA sintase de classe I ou II, previamente identificados nos macroarranjos, apenas cinco produziram amplificação. Tal resultado indica que dos quatorze, apenas cinco possuíam o gene *phaC* no fragmento de DNA clonado, sendo os outros nove falso-positivos. O aparecimento de tantos falso-positivos pode ter acontecido devido à ocorrência de algum tipo de amplificação inespecífica durante a confecção das sondas, onde o DNA metagenômico de solo foi amplificado, por PCR, com o uso de “primers” degenerados para o gene *phaC*. Outras porções de DNA, não necessariamente a correspondente ao gene *phaC*, podem ter sido amplificadas de forma inespecífica, e durante os procedimento de hibridização, hibridizaram com fragmentos de DNA não correspondentes ao referido gene, e sim correspondentes a porção previamente amplificada nas reações de PCR.

O seqüenciamento dos cinco clones positivos foi realizado de acordo com o previamente descrito (item 4.16). Os eletroferogramas gerados posteriormente ao seqüenciamento foram analisados de forma semelhante ao descrito no item 4.12, sendo que nesta análise, foram feitas apenas comparações entre os resultados obtidos pós seqüenciamento e o banco de dados “GenBank”, concluindo-se que os cinco clones positivos tratavam-se de clones contendo o gene *phaC*, ou pelo menos parte dele. As análises comparativas com os dados disponíveis no “GenBank” permitiram constatar que o gene *phaC*, ou parte dele, contido nos clones positivos, possuem uma grande probabilidade de codificar enzimas PHA sintase de classe I ou II.

5.12 Sub-biblioteca

Dentre os cinco clones positivos, um foi escolhido para a construção de uma sub-biblioteca. Tal procedimento se justifica, pois desta forma é possível conhecer o fragmento de DNA clonado no clone escolhido, sendo assim possível o isolamento do gene *phaC*, ou parte dele, caso este não apresente-se completo.

A escolha do clone para a construção da sub-biblioteca foi feita de acordo com o resultado obtido nas análises descritas em 5.11.

Com a construção da sub-biblioteca foram obtidos 960 clones, que serão a fonte para a reconstrução do fragmento de DNA clonado através de seqüenciamento e análises de bioinformática.

6 CONCLUSÕES

As análises dos resultados permitiram as seguintes conclusões:

1. Os oligonucleotídeos, aqui utilizados, específicos para o gene *phaC*, com exceção do conjunto I-179L(a)/I-179R(a), foram adequados para a amplificação deste gene em amostras de DNA de solo;
2. A construção de bibliotecas a partir das sondas sintetizadas, e o seqüenciamento destas, mostrou a grande diversidade do gene *phaC* no solo, indicando assim, que ainda há uma considerável diversidade de organismos, produtores de PHAs, a ser descoberta neste ambiente;
3. As bibliotecas metagenômica construída em vetor fosmídeo consistem de um método eficiente para a identificação rápida de possíveis genes e/ou produtos gênicos de interesse biotecnológico;
4. A prospecção das bibliotecas metagenômica através da construção de macroarranjos mostrou ser um método eficiente e possibilitou a identificação de clones cujos insertos possuem o gene *phaC*, ou parte dele.

REFERÊNCIAS[†]

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

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**, v. 54, p. 450-472, 1990.

ASTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

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

BOHMERT, K.; BALBO, I.; STEINBÜCHEL, A.; TISCHENDORF, G.; WILLMITZER, L. Constitutive Expression of the β -Ketothiolase Gene in Transgenic Plants: a Major Obstacle for Obtaining Polyhydroxybutyrate-Producing Plants. **Plant Physiology**, v. 128, p.1282-1290, 2002.

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

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 573-606, 2000.

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

[†] De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro. 2002.

CLARK, J. M. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 9677, 1988.

COUTINHO, B. C.; MIRANDA, G. B.; SAMPAIO, G. R.; DE SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. A importância e as vantagens do polihidroxibutirato (plástico biodegradável). **Holos**, v. 20, p. 77–81, 2004.

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

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

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

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

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

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

GOMEZ, J. G. C. **Produção por *Pseudomonas* sp de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia media a partir de carboidratos:** avaliação de eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes. 155 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2000.

GOMEZ, J. G. C.; NETTO, C. L. B. Produções de poliésteres bacterianos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Ed.). **Biotecnologia Industrial**. Volume 3 - Processos fermentativos e enzimáticos. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2002. p. 219-248.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.

GUINDON, S., GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, p. 696-704, 2003.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p.15-32, 2002.

HAI, T.; HEIN, S.; STEINBÜCHEL, A. Multiple evidence for widespread and general occurrence of type-III PHA synthases in cyanobacteria and molecular characterization of the PHA synthases from two thermophilic cyanobacteria: *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 and *Synechococcus* sp. strain MA19. **Microbiology**, v. 147, p. 3047-3060, 2001.

HAI, T.; LANGE, D.; RABUS, R.; STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Accumulation in Sulfate-Reducing Bacteria and Identification of a Class III PHA Synthase (PhaEC) in *Desulfococcus multivorans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4440-4448, 2004.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, p. 557-580, 1983.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v 68, p. 669-685, 2004.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry and Biology**, v. 5, p. 245-249, 1998.

HATTORI, T.; MITSUI, H.; HAGA, H.; WAKAO, N.; SHIKANO, S.; GORLACH, K.; KASAHARA, Y.; BELTAGY, A. E.; HATTORI, R. Advances in soil microbial ecology and the biodiversity. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 72, p. 21-28, 1997.

HENNE, A.; DANIEL, R.; SCHMITZ, R. A.; GOTTSCHALK, G. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3901-3907, 1999.

HENNE, A.; SCHIMITZ, R. A.; BOMEKE, M.; GOTTSCHALK, G.; CANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3113-3116, 2000.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 4765-4774, 1998.

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

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

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

LORENZ, P.; ECK, J. Metagenomics and industrial applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 510-516, 2005.

LORENZ, P.; LIEBETON, K.; NIEHAUS, F.; ECK, J. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 572-577, 2002.

MADISON, L. L.; HUISMAN, F. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 21-53, 1999.

MEZEI, L. M.; STORTS, D. R. Purification of PCR products. In: GRIFFIN, H. G. AND GRIFFIN, A. M. (Ed.). **PCR Technology: Current Innovations**. Boca Raton: CRC Press, 1994.

NEWTON, C. R.; GRAHAM, A. PCR. **BIOS Scientific Publishers**. Oxford:BIOS Scientific Publishers, 1994.

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

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; GARBOGGINI, F. F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **Multiciência**, v. 7, p. 1-19, 2006.

PACE, N. R. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. **American Society for Microbiology News**, v. 62, p. 463-470, 1996.

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

PAGE, R. D. M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, v. 12, p. 357-358, 1996.

PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e Intermediários Químicos. 2006. Disponível em: <http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06_biopolimeros.pdf>.

Acesso em: 23 ago. 2009.

QI, Q.; REHM, B. M. A. Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase. **Microbiology**, v. 147, p. 3353-3358, 2001.

RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBÉ, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J. A. Production of poly-(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2093-2098, 1990.

REHM, B. H. A. Polyester synthase: natural catalysts for plastic. **Biochemical Journal**, v. 376, p. 15-33, 2003.

REHM, B. H. A. Genetic and biochemistry of polyhydroxyalkanoates granule self-assembly: The key role of polyester synthase. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 207-213, 2006.

REHM, B. H. A. Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granule: a platform technology for the production of tailor-made bioparticules. **Current Issues on Molecular Biology**, v. 9, p. 41-67, 2007.

REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 3-19, 1999.

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

ROBLES, J.; DOERS, M. pGEM^R-T Vector Systems troubleshooting guide. **Promega Notes**, Madison, v. 45, p. 19, 1994.

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

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1989.

SANDAA, R. A.; ENGER, O.; TORSVIK. Rapid methods for fluorometric quantification of DNA in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 265-268, 1998.

SATOH, Y.; MINAMOTO, N.; TAJIMA, K.; MUNAKATA, M. Polyhydroxyalkanoate synthase from *Bacillus* sp INT005 is composed of PhaC and PHAR. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94, p. 343-350, 2002.

SHAMALA, T. R.; CHANDRASHEKAR, A.; VIJAYENDRA, S. V. N.; KSHAMA, L. Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 369-374, 2003.

SHEU, D. S.; WANG, Y.T.; Lee, C.Y. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. **Microbiology**, v. 146, p. 2019-2055, 2000.

SOLAIMAN, D. K. Y. Polymerase-chain-reaction-based detection of individual polyhydroxyalkanoate synthase phaC1 and phaC2 genes. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 245-250, 2002.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D. Rapid Genetic Characterization of Poly(hydroxyalkanoate) Synthase and Its Applications. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 532-537, 2005.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A. Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 690-694, 2000.

STENBÜCHEL, A.; EVERSLOH, T. L. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 81-96, 2003.

STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 419-427, 1998.

STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H. G. Physiology and molecular genetics of poly(b-hydroxy-alkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 535–542, 1991.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 219-228, 1995.

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review. **Biotechnology Advances**, v. 25, 148-175, 2007.

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

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

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TORSVIK, V.; DAAE, F. L.; SANDAA, R. A.; OSLASH L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, v. 64, p. 53-62, 1998.

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

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

WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, v. 345, p. 63-65, 1990.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: The unseen majority. **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

ZAEHNER, H.; FIELDLER, H. P. The need for new antibiotics: possible ways forward. In: RUSSEL, J. J. (Ed.). **Fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trends**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. P. 67-84.

ZHOU, J.; BRUNS, M. A.; TIEDJE, J. M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 316-322, 1996.