YEIMY PAOLA GALINDO ROZO

Bioprospecção de genes relacionados à biossíntese de polímeros biodegradáveis a partir de uma biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica.

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

São Paulo
2011

YEIMY PAOLA GALINDO ROZO

Bioprospecção de genes relacionados à biossíntese de polímeros biodegradáveis a partir de uma biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica.

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.

Orientador: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva

Versão original

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Galindo Rozo, Yeimy Paola.
Bioprospecção de genes relacionados à biossíntese de polímeros biodegradáveis a partir de uma biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. / Yeimy Paola Galindo Rozo. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Luiziana Ferreira da Silva.

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

Versão do título para o inglês: Bioprospecting in a metagenomic library from Atlantic forest soil for genes involved on the biosynthesis of biodegradable polymers.

Descritores: 1. Polihidroxialcanoatos 2. PHA sintase 3. Biblioteca Metagenômica 4. Bioprospecção de genes I. Silva, Luiziana Ferreira da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0174/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Yeimy Paola Galindo Rozo.

Título da Dissertação: Bioprospecção de genes relacionados à biossíntese de polímeros biodegradáveis a partir de uma biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica.

Orientador(a): Luiziana Ferreira da Silva.

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

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Presidente: Nome completo: .....
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 **355/10** referente ao projeto intitulado: ***"Bioprospecção de genes da biossíntese de polímeros biodegradáveis a partir de uma biblioteca metagenômica de Solo de Mata Atlântica"*** sob a responsabilidade de **Yeimy Paola Galindo Rozo,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS 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, 25 de fevereiro de 2010.

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

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

A Deus,
Aos meus pais Joaquin e Myriam,
Aos meus irmãos Fernando e Laura,
A minha vovó Mariela,
e ao meu grande amor Leonardo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha orientadora, a Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva, por ter me acolhido com muito carinho e principalmente por ter acreditado no meu potencial, inteligência e dedicação para desenvolver o presente projeto. Sua amizade e confiança foram muito importantes para acreditar nesta pesquisa e assim poder realizá-lo da melhor forma possível.

Agradeço ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez, pelas orientações e ideias que enriqueceram e direcionaram minha pesquisa.

Agradeço ao Prof. Gabriel Padilla pelo acompanhamento, pela ajuda prestada, pela amizade e incentivo ao longo deste trabalho.

Às minhas estagiárias Diana, Amanda e Kelli, agradeço o esforço e a dedicação que tiveram com o projeto, sem dúvida vocês são parte muito importante deste trabalho. Desejo muito sucesso em tudo o que façam.

Às minhas melhores amigas Renata, Érica e a Ana, agradeço todo o apoio, carinho, amizade, confiança, momentos de descontração, por cada uma das tardes de café e discussão que fizeram muito mais divertidos cada um dos dias. Vocês são parte muito importante deste trabalho e principalmente da minha vida, a onde eu for vou levá-las sempre pertinho de mim. Sem a ajuda vocês, este sonho não teria se concretizado. Não tenho como pagar e agradecer todas as coisas que vocês fizeram e fazem por mim! Amigas muito obrigada mesmo. Adoro vocês e desejo o melhor do mundo sempre.

Aos meus grandes amigos Luis, Liege, Diana Marcela, Prunella, Carolina e Diana Chica, agradeço todo o apoio, carinho, amizade, compreensão, companhia e principalmente por me animar quando mais precisava. Adoro vocês e desejo o melhor do mundo porque vocês merecem!

A todos meus amigos e companheiros atuais dos laboratórios 148, 172 e 164 e aqueles que já passaram, obrigada pela ajuda, atenção, compreensão nos momentos difíceis, amizade e descontração. Aprendi muito de vocês!

Às técnicas, Rosa e Iris, muito obrigada pela amizade, ajuda, disponibilidade e boa vontade que tiveram comigo durante estes anos de pesquisa.

A minha nova família Edgar, Elizabeth, Diana e Sebastian, muito obrigada pelas orações, apoio e ajuda, vocês são parte muito importante deste processo.

Agradeço especialmente a todas as tias/tio Tobar Cortés e aos meus tios maternos William e Yaneth pela força que me deram nos momentos mais difíceis e pelas orações. Muito obrigada mesmo!!!

Aos meus pais Joaquin Galindo e Myriam Rozo, agradeço por terem incentivado sempre a realizar os meus sonhos sem importar a onde tiver que ir. Obrigada pais pelo carinho, dedicação, por terem acreditado em mim, nas minhas capacidades, no meu conhecimento... Obrigada, pela força que deram para vir morar no Brasil e enfrentar um mundo novo. Nestes dois anos senti muito a sua falta, mas seu amor é tão grande que dava para sentir a cada segundo da minha vida. Vocês são os melhores pais do mundo e agradeço a Deus por tê-los em minha vida. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos, meus melhores amigos e companheiros, Fernando e Laura, agradeço todo o apoio, amor, carinho, ajuda, incentivo e por me animar a continuar lutando pelos meus sonhos quando achava que as forças estavam se esgotando. Amo vocês e desejo o melhor do mundo sempre!

À minha vovó Mariela, agradeço o carinho, amor, compreensão, incentivo, força e pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Você é um exemplo a seguir. Muito obrigada por me ensinar que todas as coisas que se fazem na vida devem se fazer com a mesma paixão sem importar para quem for. Amo muito você.

Ao meu grande amor Edgar Leonardo Romero Tobar, agradeço pelo amor, carinho, ajuda, apoio, incentivo, cumplicidade, pelos momentos de descontração, pela paciência e compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho, só você poderia ter agüentado as inumeráveis noites de géis e reações de PCR! Obrigada por ficar sempre pertinho de mim. Te amo muito e sei que em qualquer lugar que fomos vamos ser muito felizes!

Finalmente, gostaria agradecer a CAPES pelo apoio financeiro durante os primeiros cinco meses e à FAPESP pelo apoio financeiro no tempo restante do desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço também à FAPESP pelo suporte financeiro ao projeto Regular no qual estive inserida que permitiram a efetivação e divulgação dos resultados obtidos.

"De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!"

Fernando Sabino

RESUMO

Galindo YP. Bioprospecção de genes da biossíntese de polímeros biodegradáveis a partir de uma biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Nas últimas décadas, têm surgido novas alternativas ecologicamente corretas como a produção de biopolímeros a partir de fontes renováveis que procuram substituir os plásticos de origem petroquímica. Os polihidroxialcanoatos (PHA) são polímeros biodegradáveis produzidos por uma ampla variedade de bactérias quando há um excesso de fonte de carbono e alguns dos nutrientes essenciais estão em condições limitantes. Três aspectos são determinantes para a produção de PHA: a fonte de carbono, as vias metabólicas bacterianas e a enzima PHA sintase. A enzima PHA sintase catalisa a polimerização de moléculas de *R*-hidroxiacil-CoA formando o biopolímero, sendo, assim, a enzima chave na biossíntese de PHA. São conhecidos quatro tipos de PHA sintases, de acordo com a especificidade pelo substrato e pela composição de peptídeos. Os tipos I e II possuem só uma subunidade peptídica, enquanto os tipos III e IV possuem 2 subunidades. Muitos estudos têm sido desenvolvidos procurando novas informações sobre PHA em diferentes ambientes. O presente estudo teve como objetivo realizar a triagem de PHA sintases em uma biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica empregando duas técnicas de busca. A primeira técnica empregada foi o método de detecção fenotípica, baseado na coloração com o reagente *Sudan Black B* do PHA acumulado pelos clones da biblioteca, a qual não apresentou resultados positivos. A segunda técnica empregada para a triagem de genes envolvidos na síntese de PHA foi a técnica de PCR. Para desenvolver esta segunda metodologia, os clones da biblioteca foram cultivados em meio LB com arabinose e cloranfenicol. Posteriormente, foi feita a extração de DNA plasmidial por conjuntos e realizada uma PCR com 6 pares de oligonucleotídeos descritos na literatura e empregados por outros autores. Em 10.67% dos clones da biblioteca foram obtidos amplicons com o tamanho esperado para os diferentes tipos de PHA sintase, sendo obtidos mais de 300 clones positivos. Sete amostras foram enviadas para seqüenciamento, das quais cinco seqüências apresentaram alta similaridade para os genes *phaC* do tipo II, mas mostraram diferenças entre elas, mesmo sendo amplificadas com o mesmo par de iniciadores. Também foi obtido um resultado positivo para o seqüenciamento de dois amplicons que mostraram alta similaridade com o gene *phaC* do gênero *Bacillus*, pertencente à PHA sintase do tipo IV. Foram selecionados os 67 clones positivos para a classe III da PHA sintase e testados novamente como todos os iniciadores para PHA sintase, confirmando assim uma única amplificação. Os 67 clones também foram testados para diferentes oligonucleotídeos relatados na literatura para a classe III, incluindo iniciadores desenhados no presente trabalho; sendo escolhidos quatro clones que apresentaram amplicon para todos os pares de iniciadores testados. Amplicons obtidos a partir do DNA plasmidial foram posteriormente seqüenciados. Duas das seqüências obtidas mostraram alta similaridade com o gene codificador da enzima glutamina sintetase tipo I, outro deles para a proteína hipotética conservada pertencente à família de enzimas oxidoredutases e a outra para o componente D do gene hidrogenase-4, demonstrando que os iniciadores não foram adequados e/ou na biblioteca metagenômica não estavam presentes genes de PHA sintase do Tipo III. A partir da análise dos resultados, iniciadores mais específicos para a classe III da PHA sintase poderão ser desenhados tentado confirmar se os outros 63 clones abrigam genes codificadores de PHA sintase pertencentes à classe III. Assim, a técnica de PCR foi muito eficiente na detecção de genes codificadores da enzima PHA sintase a partir de seqüencias conhecidas, permitindo encontrar uma grande diversidade de genes da PHA sintase na biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica, sugerindo que ainda há uma considerável diversidade de genes a ser explorada.

Palavras-chave: Polihidroxialcanoatos. PHA sintase. Biblioteca metagenômica. Bioprospecção de genes.

ABSTRACT

Galindo YP. Bioprospecting in a metagenomic library from Atlantic forest soil for genes involved on the biosynthesis of biodegradable polymers [Master dissertation (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Over the last decades, new alternatives have emerged such as the environmental friendly biopolymers production from renewable sources as a replacement for petrochemical polymers. Polyhydroxyalkanoates are biodegradable polymers produced by a wide variety of bacteria when the carbon source is in excess and other essential nutrients are in limiting conditions. There are three fundamental aspects to the PHA production: the carbon source, the bacterial metabolic pathways and the PHA synthase enzyme. The PHA synthase enzyme catalyses the R-hidroxyacyl-CoA molecules polymerization forming the biopolymer, thus, being the key enzyme in the PHA biosynthesis. There are four types of PHA synthase described, according the substrate specificity and to peptide composition. Types I and II have only one peptide subunit, while types III and IV have 2 subunits. Many studies were developed searching information about different environments. This work screened PHA synthases in a metagenomic library from Atlantic soil using two different techniques. The first technique was the phenotypic detection, based on a *Sudan Black B* staining of accumulated PHA in the clones from the library, this approach did not show positive results. The second technique was the screening of PHA encoding genes by PCR. To develop the second methodology, clones of the library were cultivated in a LB medium with chloramphenicol and arabinose. The plasmidal DNA was extracted by sets and was PCR reactions were performed with 6 pairs of oligonucleotides described in the literature and used by other authors. In 10.67% of the library amplicons were obtained with the expected size for the different types of PHA synthase, counting more than 300 positive clones. From the 7 samples that were sequenced, 3 samples showed high similarity with the *phaC* class II, however with different sequences among them, even when amplified with the same primers. A positive result was also obtained for the sequencing of 2 amplicons, which showed high similarity with the *phaC* gene of the *Bacillus* genus, belonging to the class IV PHA synthase. The 67 positive clones for the class III PHA synthase were selected and tested with all the primers for the PHA synthase, confirming an unique amplification. These 67 clones were also tested for different oligonuclotides reported in the literature for the class III, including primers designed during the present work. 4 clones presenting amplicons for all of the tested primers were selected. Amplicons obtained from plasmidial DNA were sequenced. Two of the obtained sequences showed high similarity with a gene encoding enzyme glutamine synthetase type I, another sequence was similar to the hypothetical protein belonging to the oxidoreductase family and the latter was similar to the component D Hydrogenase-4. This result showed that the primers were not appropriate and/or the genes of the PHA synthase class III were not present in the metagenomic library. We suggest that more specific primers can be developed for the class III PHA synthase, in order to confirm whether the other 63 clones contain PHA synthase genes belonging to class III. Therefore, the PCR technique showed to be efficient for the detection of genes codifying PHA synthase from previously known sequences, finding a great diversity of PHA synthase genes in a metagenomic library from Atlantic forest soil. These results suggest that still an important diversity of genes remain to be explored.

Key words: Polyhydroxyalkanoates. PHA synthase. Metagenomic Library. Gene bioproscpection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Célula bacteriana contendo grânulos intracelulares de PHA. (fotomicrografia eletrônica). 23

Figura 2 - Fórmula química geral dos PHA. n pode variar de 1 a 3. Quando o grupo R for igual a H, CH_3, CH_2 CH_3, para n=1, os PHA são classificados como PHAscl ("short chain length"), ou seja, compostos por monômeros de cadeia curta. Quando R = $(CH_2)_2$ CH_3 a $(CH_2)_8$ CH_3 , os monômeros são considerados de cadeia média, constituindo os PHAmcl ("medium chain length"). 23

Figura 3 - Modelo metabólico genérico para a síntese de PHA ressaltando os substratos, vias metabólicas e PHA sintase como os três aspectos mais importantes para a síntese de PHA.. 25

Figura 4 - Classes de PHA sintases mostrando a organização genética de cada uma das classes descritas. *PhaC*: PHA sintase, *phaA*: β-cetotiolase, *phaB*: (R)-3-cetoacil-CoA redutase, *phaC1* e *phaC2*: PHA síntese, *phaZ*: PHA despolimerase, *phaD*: Proteína com função desconhecida, *phaF*: Histona H1- proteína com função regulatória, *phaI*: Proteína ligada a grânulos maiores, *phaE*: Subunidade do heterodímero da classe três da PHA sintase, *phaP*: phasina, *phaQ*: Proteína homóloga à helix-turn-helix resistente a diversos antibióticos, *phaR*: Subunidade do heterodímero da classe quatro, ORF: fase de leitura aberta com função desconhecida. 28

Figura 5 - Esquema da extração de DNA plasmidial de cada uma das placas de placas de polipropileno de 96 poços contendo os clones da biblioteca metagenômica do solo de Mata Atlântica. 43

Figura 6 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.6% (p/v), mostrando nas 24 caneletas os diferentes tamanhos de DNA, obtidos da digestão do DNA dos clones da biblioteca metagenômica com enzima de restrição *HindIII* À esquerda do gel pode-se visualizar o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII* e à direita o marcador de peso molecular de 1kb plus (Fermentas). 51

Figura 7 - Test fenotípico para o acúmulo de grânulos intracelulares de PHA, sendo A o cultivo em meio LBGC da placa 28 da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica empregando o corante lipofílico *Sudan Black B,* objetivando a detecção de clones positivo (azuis) para a produção de PHA. Na parte B, é apresentada a mesma placa sem adição do corante lipofílico, onde se pode evidenciar o acúmulo de PHA do controle positivo pela opacidade da colônia, sendo comparado com a ausência de colônias positivas para o acúmulo

de PHA, devido à carência desta mesma característica, como acontece com o controle negativo. 53
Figura 8 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando a sensibilidade da técnica de PCR para detectar a concentração mínima em ng/µL do gene da PHA sintase do tipo IV de *Bacillus megaterium* M.A 3.3 utilizando os iniciadores B1F/B1R na reação de PCR. A concentração mínima detectada pela técnica é de 0.001 ng/µL. Nos extremos do gel se pode visualizar o marcador de peso molecular de DNA de 1 kb plus (Fermentas)..... 54
Figura 9 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando a sensibilidade da técnica de PCR para detectar a concentração mínima do gene em ng/µL da PHA sintase do tipo II no plasmídio pBHR71 utilizando os iniciadores I-179L(a)/I-179R(a) na reação de PCR. A concentração mínima detectada pela técnica é de 0.001 ng/µL. À esquerda do gel pode-se visualizar o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII* e à direita o marcador de peso molecular de 1kb plus (Fermentas). 55
Figura 10 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando a sensibilidade da técnica de PCR para detectar a concentração mínima em ng/µL do gene da PHA sintase do tipo II do plasmídio pBHR71 quando adicionado a uma mistura de DNA de biblioteca metagenômica na concentração de ~1000 ng/µL. Foram empregados os iniciadores I-179L(a)/I-179R(a) na reação de PCR. A concentração mínima detectada pela técnica é de 0.01 ng/µL. À esquerda do gel pode-se visualizar o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII* e à direita o marcador de peso molecular de 1kb plus (Fermentas)..... 56
Figura 11 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando a sensibilidade da técnica de PCR para detectar a concentração mínima em ng/µL do gene da PHA sintase do tipo II do plasmídio pBHR71 quando adicionado a uma mistura de DNA de biblioteca metagenômica na concentração de 6000 ng/µL. Foram empregados os iniciadores I-179L(a)/I-179R(a) na reação de PCR. A concentração mínima detectada pela técnica é de 0.01 ng/µL. À esquerda do gel pode-se visualizar o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII* e à direita o marcador de peso molecular de 1kb plus (Fermentas)..... 56
Figura 12 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando a sensibilidade da técnica de PCR para detectar a concentração mínima em ng/µL do gene da PHA sintase do tipo IV de *Bacillus megaterium* M.A 3.3, em uma mistura de DNA de 96 clones de uma biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica com concentração de 1000 ng/µL

utilizando os iniciadores B1F/B1R na reação de PCR. A concentração mínima detectada pela técnica é de 10 ng/µL. Nos extremos do gel se pode visualizar o marcador de peso molecular de DNA de 1 kb plus (Fermentas). 57

Figura 13 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando a sensibilidade da técnica de PCR para detectar a concentração mínima em ng/µL do gene da PHA sintase do tipo IV de *Bacillus megaterium* M.A 3.3, em uma mistura de DNA de 96 clones de uma biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica com concentração de 5000 ng/µL, utilizando os iniciadores B1F/B1R na reação de PCR. A concentração mínima detectada pela técnica é de 10 ng/µL. Nos extremos do gel se pode visualizar o marcador de peso molecular de DNA de 1 kb plus (Fermentas). 57

Figura 14 - Regiões flanqueadas pelos iniciadores utilizados na detecção de PHA sintase da classe II. 59

Figura 15 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando ausência de amplicons obtidos em reações de PCR quando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase são testados sem DNA molde. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*; Coluna 1: iniciadores phaCF1/phaCR4; Coluna 2: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); Coluna 2': iniciadores I-179L(a)/DEV15R; Coluna 3: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; Coluna 3': iniciadores P1/P2 e Coluna 4: iniciadores B1F/B1R. 59

Figura 16 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando ausência de amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase quando testado com o DNA do plasmídeo pBAC/oriV sem inserto. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com *HindIII*; *Coluna 1:* pBAC/oriV com iniciadores phaCF1/phaCR4; *Coluna 2:* pBAC oriV com iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *Coluna 2':* pBAC/oriV com os iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *Coluna 3:* pBAC/oriV com os iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *Coluna 3':* pBAC oriV com os iniciadores P1/P2; *Coluna 4:* pBAC/oriV com os iniciadores B1F/B1R..... 60

Figura 17 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando ausência de amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase quando testados com o DNA genômico da *E. coli* DH10B. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*; *Coluna 1*: *E. coli* DH10B com iniciadores phaCF1/phaCR4; *Coluna 2*: *E. coli* DH10B com iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *Coluna 2'*: *E. coli* DH10B com os iniciadores I-

179L(a)/DEV15R; *Coluna 3*: *E. coli* DH10B com os iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *Coluna 3'*: *E. coli* DH10B com os iniciadores P1/P2; *Coluna 4*: *E. coli* DH10B com os iniciadores B1F/B1R. 60

Figura 18 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando o amplicon obtido na reação de PCR utilizando como DNA molde o plasmídio pJM9131, testando os iniciadores phaCF1/phaCR4 para detecção de genes de PHA sintase tipo I (*Coluna 1*). À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*; *Coluna 2*: pJM9131 com iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *Coluna 2'*: pJM9131 com os iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *Coluna 3*: pJM9131 com os iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *Coluna 3'*: pJM9131 com os iniciadores P1/P2; *Coluna 4*: pJM9131 com os iniciadores B1F/B1R. 61

Figura 19 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando os amplicons obtido nas reações de PCR utilizando os iniciadores phaCF1/phaCR4 (*Coluna 1*) e I-179L(a)/I-179R(a) (*Coluna 2)* para detecção de genes de PHA sintase tipo I e II respectivamente quando testado com o DNA plasmidial do pBHR71. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*; *Coluna 2'*: pBHR71 com os iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *Coluna 3*: pBHR71 com os iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *Coluna 3'*: pBHR71 com os iniciadores P1/P2; *Coluna 4*: pBHR71 com os iniciadores B1F/B1R. 62

Figura 20 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando o amplicon obtido na reação de PCR utilizando os iniciadores B1F/B1R para detecção de genes de PHA sintase tipo IV (*Coluna 4*) quando testado com o DNA genômico de *Bacillus* M.A. 3.3. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*; *Coluna 1: Bacillus* M.A. 3.3 com iniciadores phaCF1/phaCR4; *Coluna 2*: *Bacillus* M.A. 3.3 com iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *Coluna 2'*: *Bacillus* M.A. 3.3 com os iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *Coluna 3*: *Bacillus* M.A. 3.3 com os iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2 e *Coluna 3'*: *Bacillus* M.A. 3.3 com os iniciadores P1/P2..... 62

Figura 21 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da PLACA 38 da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII.* T: Extração total da placa 38; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de

DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os microrganismos controle para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras, sendo empregados na linha 1: iniciadores phaCF1/phaCR4; 2: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); 2': iniciadores I-179L(a)/DEV15R; 3: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; 3': iniciadores P1/P2 e 4: iniciadores B1F/B1R. 63

Figura 22 - Regiões flanqueadas pelos iniciadores phaC3F e phaC3R para detectar o gene *phaC*, e localização dos iniciadores phaE3F e phaE3R para amplificação do gene *phaE*, nos clones da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. Localização dos iniciadores desenhados por Hai et al., 2001, estão colocados nas caixas de texto cor verde com o símbolo *..... 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Bactérias e plasmídeos utilizados no desenvolvimento do presente trabalho..... 36

Tabela 2 - Oligonucleotídeos empregados na detecção dos genes *phaC*. 44

Tabela 3 - Tamanho médio de inserto de 24 clones da biblioteca metagenômica de Mata Atlântica selecionados ao acaso. Os fragmentos foram obtidos pela digestão do DNA plasmidial com a enzima *Hind III*..... 51

Tabela 4 - Resumo dos resultados obtidos no screening primário da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica empregando a técnica de PCR. Os xis indicam a presença de amplicons para esta classe de PHA sintase em cada placa avaliada..... 65

Tabela 5 - Localização dos clones (linha e coluna) contendo o gene *phaC* nas diferentes placas da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. 72

Tabela 6 - Combinações de iniciadores para PHA sintase do tipo III para seleção de clones de interesse. 75

Tabela 7 - Identificação dos clones positivos para PHA sintase de classe III..... 75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 20
2 OBJETIVO. 21
3 REVISÃO DA LITERATURA 22
3.1 Plásticos Biodegradáveis 22
3.2 Polihidroxialcanoatos (PHA) 22
3.3 Síntese de PHA 24
3.4 PHA sintase 25
3.5 Bioprospecção e Metagenômica. 28
3.6 Técnicas de triagem 31
3.7 Aprimoramento da freqüência de detecção de genes. 33
4 MATERIAL E MÉTODOS 36
4.1 Microrganismos e plasmídeos 36
4.2 Recuperação da biblioteca metagenômica e análise de viabilidade. 36
4.3 Condições de cultivo 37
4.4 Meio de Cultura 37
4.5 Esterilização 38
4.6 Preservação das linhagens bacterianas. 39
4.7 Análise do tamanho dos fragmentos de DNA. 39
4.8 Triagem de genes da biossíntese de polímeros biodegradáveis na biblioteca metagenômica. 40
4.8.1 Triagem de genes *phaC* pelos métodos de detecção fenotípica na biblioteca metagenômica. 40
4.8.2 Triagem de genes *phaC* empregando seqüencias conhecidas na biblioteca metagenômica (Triagem primária) 41
4.8.2.1 Teste de Sensibilidade da Técnica de PCR para detecção de genes em biblioteca metagenômica. 41
4.8.2.2 Extração de DNA plasmidial 41
4.8.2.3 Oligonucleotídeos e condições de amplificação de DNA. 44
4.9 Quantificação do DNA 45
4.10 Visualização do DNA 45
4.11 Identificação dos clones positivos para o gene *phaC* (Triagem secundária) 46
4.12 Seleção dos clones de interesse 47

4.13 Teste dos clones positivos para todas as classes de PHA sintase. 48
4.14 Purificação dos produtos de PCR obtidos. 48
4.15 Reação de seqüenciamento..... 48
4.16 Análise das seqüências. 49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 50
5.1 Recuperação e viabilidade da Biblioteca Metagenômica. 50
5.2 Análise da diversidade de fragmentos..... 50
5.3 Triagem de genes *phaC* pela atividade fenotípica na biblioteca metagenômica. 52
5.4 Teste de Sensibilidade da técnica de PCR para triagem de genes *phaC* em biblioteca metagenômica. 54
5.5 Controle dos oligonucleotídeos..... 58
5.6 Triagem do gene *phaC* na biblioteca metagenômica. 63
5.7 Seqüenciamento e análise das seqüências. 66
5.8 Identificação dos clones positivos..... 70
5.9 Teste dos clones positivos para todas as classes de PHA sintase. 73
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS. 83
REFERÊNCIAS..... 85
ANEXO A 95
ANEXO B 96
ANEXO C 97
ANEXO D 102

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A produção de polihidroxialcanoatos (PHA) como material de reserva de carbono e energia é uma característica presente em muitas bactérias. A descoberta que poli-3-hidroxibutirato (P3HB), o mais conhecido dos PHA, apresenta propriedades termoplásticas despertou o interesse industrial já na década de 1960. O interesse industrial se tornou aumentado com a descoberta que diversos outros monômeros podem ser incorporados aos PHA produzidos por bactérias e que as propriedades térmicas e mecânicas do polímero são moduladas de acordo com essa composição.

Um dos fatores importantes para a síntese de PHA contendo diferentes combinações de monômeros é a especificidade que a PHA sintase (enzima responsável pela polimerização dos monômeros) tem por esses monômeros. Desta forma, ter acesso a novas PHA sintase presentes na biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica estudada, permitirá buscar por novas enzimas para a síntese de PHA com novas composições monoméricas, gerando assim novos polímeros com propriedades diferentes daquelas descritas na literatura, o que aumentaria as aplicações dos PHA.

Neste contexto, o presente trabalho buscou, nesta biblioteca metagenômica, a triagem de genes de interesse industrial e biotecnológico como os envolvidos na produção de polihidroxialcanoatos, visando avaliar a diversidade dos genes *phaC* descritos na literatura, empregando diferentes técnicas de triagem.

2 OBJETIVO.

Este trabalho teve como objetivo a triagem de genes de interesse industrial e biotecnológico como os envolvidos na produção de polihidroxialcanoatos, em uma biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica, visando avaliar a diversidade de genes *phaC* descritos na literatura, empregando diferentes técnicas de triagem.

Os seguintes objetivos específicos foram definidos para atingir o objetivo geral acima:

- Realizar a triagem por métodos de detecção fenotípica (técnica de coloração) de clones produtores de PHA.
- Realizar a triagem por técnica de PCR de genes *phaC* na biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica;
- Identificar os clones positivos para genes *phaC* na biblioteca metagenômica;
- Selecionar os clones de interesse e comparar as seqüências dos genes com os reportados na literatura ou aos mais representativos e diferentes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Plásticos Biodegradáveis

Os plásticos têm grande influência na sociedade moderna e estão presentes na vida das pessoas com diversas aplicações, sendo uma delas a substituição de matérias-primas convencionais como metais, vidros, papéis e madeira. Há também sua aplicação na manufatura de embalagens e outros produtos por causa de sua praticidade e descartabilidade rápida. Entre os diversos polímeros de uso na sociedade atual, os plásticos sintéticos têm sido os mais utilizados (Lee, 1996; Ramsay, 1991).

No entanto, devido a sua lenta degradabilidade e ao descarte volumoso dos plásticos sintéticos é cada vez maior a preocupação com os impactos ambientais e as conseqüências à saúde e à vida na Terra. Uma vasta gama de alternativas biodegradáveis têm sido propostas para substituir os plásticos convencionais (Gomez, Bueno, 1997; Silva et al., 2007).

Dentre os substitutos em desenvolvimento encontram-se os polímeros de amido modificado (combinado com polipropileno, polietileno, poliestireno, etc.), poli-ε-caprolactona (PCL), copoliésteres de acetato de celulose, álcool polivinílico (PVOH), polilactato (PLA) e polihidroxialcanoatos – PHA (Almeida, 2005; Pradella, 2006).

3.2 Polihidroxialcanoatos (PHA)

Os PHA são poliésteres acumulados por diversas bactérias, na forma de grânulos intracelulares que atuam como reserva de energia e equivalentes redutores na ausência de fonte de carbono externa. A síntese de PHA normalmente ocorre quando há excesso de fonte de carbono disponível e limitação de pelo menos um nutriente essencial à multiplicação das células bacterianas (N, P, Mg, Fe, etc.) (Gomez, 2000; Lee, 1996b). Por outro lado, quando há limitação de carbono ou energia, mas não de outros nutrientes, os PHA podem ser reutilizados para suprir essa necessidade (Anderson, Dawes, 1990; Lee et al., 1996). Na Figura 1, pode-se observar uma célula bacteriana contendo grânulos intracelulares de PHA.

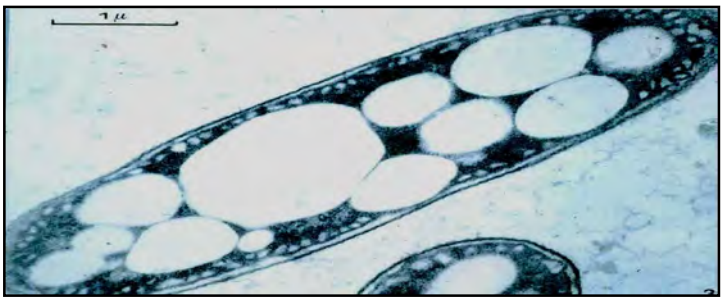


Figura 1 - Célula bacteriana contendo grânulos intracelulares de PHA. (fotomicrografia eletrônica).

Fonte: http://www.nrc-cnrc.gc.ca/highlights/2007/0703maplesap_e.html.

As propriedades dos PHA permitem que sejam utilizados como plásticos biodegradáveis, substituindo os convencionais, de origem petroquímica, em algumas aplicações, tais como, o uso em embalagens, filmes de recobrimento, aparatos médicos, aditivos para tintas e adesivos. As propriedades do polímero, bem como suas aplicações, dependem de sua composição monomérica (Holmes, 1985; Steinbüchel, 1991; Steinbüchel, Füchtenbusch, 1998; Gomez, 2000). Uma fórmula genérica deste material está apresentada na Figura 2.

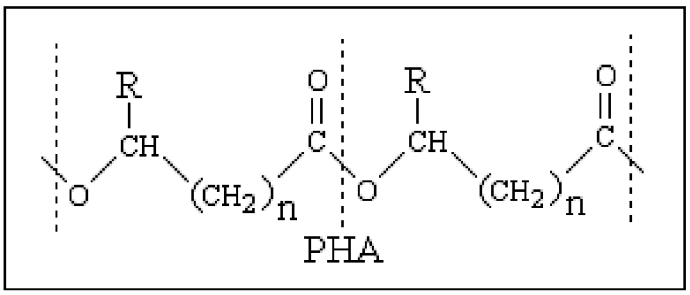


Figura 2 - Fórmula química geral dos PHA. n pode variar de 1 a 3. Quando o grupo R for igual a H, CH_3, CH_2 CH_3, para n=1, os PHA são classificados como PHAscl ("short chain length"), ou seja, compostos por monômeros de cadeia curta. Quando R = $(CH_2)_2$ CH_3 a $(CH_2)_8$ CH_3 , os monômeros são considerados de cadeia média, constituindo os PHAmcl ("medium chain length").

Fonte: Silva et al., 2007.

Atualmente, mais de 150 monômeros distintos já foram identificados como constituintes de PHA bacterianos das mais variadas combinações, que incluem monômeros saturados e insaturados, ramificações, grupos funcionais na cadeia lateral (aromáticos, etc.) ou ainda com o grupo hidroxila em diferentes posições (Steinbüchel, Valentin, 1995; Rehm, Steinbüchel, 1999; Rehm, 2003).

Enquanto o primeiro grupo apresenta propriedades termoplásticas (alongamento para ruptura menor que 5%), o segundo se apresenta como elastômero (alongamento para ruptura

maior que 1000%). A composição monomérica e a massa molecular do PHA são responsáveis por suas propriedades físicas e mecânicas. Do ponto de vista industrial é interessante o controle da composição monomérica porque isto influencia nas propriedades do material (PHA) e em suas diferentes aplicações. Por exemplo, as propriedades de PHA permitem a obtenção de materiais que englobam desde materiais rígidos, como o P3HB, a materiais flexíveis, como PHA_{MCL}, podendo também se apresentar como materiais viscosos e aderentes, que é o caso dos PHA_{MCL} contendo uma grande fração de monômeros insaturados (Gomez, 2000; Steinbüchel, Hein, 2001).

Os PHA_{SCL} são encontrados em bactérias pertencentes aos mais diversos grupos taxonômicos, enquanto que os PHA_{MCL} só foram detectados em *Pseudomonas* do grupo I de homologia do RNA ribossomal (*Pseudomonas sensu stricto*) (Huisman et al., 1989). Diferentes autores têm reportado e demonstrado a possibilidade de síntese de PHA contendo HA_{SCL} e HA_{MCL} em uma mesma cadeia polimérica (Gomez, 2000; Liebergesell et al., 1993; Valentin et al., 1994; Abe et al., 1994; Antonio et al., 2000).

No Brasil, a partir de 1992, a produção de alguns tipos de PHA vem sendo estudada, destacando-se o homopolímero P3HB – homopolímero poli-3-hidroxibutirato e o copolímero de poli-3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato (P3HB-*co*-3HV), para gerar PHA mais maleáveis (Steinbüchel, Valentin, 1995). O interesse comercial por este polímero vem aumentando no país graças à possibilidade de produzi-los a partir de fontes de carbono renováveis pela agricultura, como a sacarose, glicose, xilose e derivados do bagaço de cana-de-açúcar entre outros (Holmes, 1985; Lopes, 2009). Leva-se em consideração neste caso, o fato de que o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de açúcar, que o valor agregado de PHA é maior que o álcool, além de poder se tornar num produto de exportação (Bueno Netto et al., 1993).

3.3 Síntese de PHA

Embora um grande número de monômeros diferentes já tenha sido detectado como constituintes dos PHA, convém destacar que a síntese e incorporação destes monômeros dependem do fornecimento de um substrato adequado, que possa ser convertido no hidroxiacil-CoA desejado através das vias metabólicas existentes na célula bacteriana. Além disso, é necessário que a célula bacteriana contenha uma PHA sintase capaz de incorporar ao poliéster o hidroxiacil-CoA gerado (Rehm, Steinbüchel, 1999; Madison, Huisman, 1999).

Tanto a especificidade das vias metabólicas geradoras do hidroxiacil-CoA, como da PHA sintase, podem impedir a combinação de certos monômeros em uma mesma cadeia polimérica ou, ainda, restringir a quantidade de um determinado monômero que pode ser incorporada ao PHA (Gomez, 2000; Rehm, 2003; Solaiman, Ashby, 2005). Na Figura 3, pode-se observar um modelo metabólico genérico para a síntese de PHA, no qual são ressaltados os três aspectos determinantes na produção de PHA.

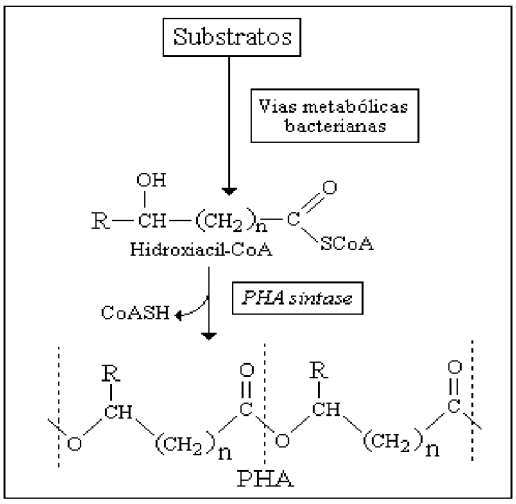


Figura 3 - Modelo metabólico genérico para a síntese de PHA ressaltando os substratos, vias metabólicas e PHA sintase como os três aspectos mais importantes para a síntese de PHA.

Fonte: Gomez e Bueno Netto, 2001.

Entre as estratégias mais comumente aplicadas para a produção de PHA com composição variada, a mais comum tem sido o fornecimento de fontes de carbono como carboidratos, resíduos industriais, ácidos graxos de cadeias longa ou curta e em geral diretamente relacionados quimicamente ao polímero que se deseja produzir (Steinbüchel, Valentin, 1995; Silva *et al.*, 2004). Este procedimento limita a natureza química do monômero incorporado, tanto pela oferta limitada de substratos (hidroxiacil-CoAs) à PHA sintase microbiana, como pela especificidade da mesma pelo substrato, além de incidir em maior custo na otimização do processo de produção industrial.

3.4 PHA sintase

A PHA sintase é a enzima chave para a biossíntese de PHA, sendo responsável pela catálise da polimerização das moléculas de *R*-hidroxiacil-CoA formando o biopolímero (Rehm, 2003). O alinhamento das seqüências das diferentes classes de PHA sintase, revelou

que estas são homólogas às lípases, sendo membros da superfamília de proteínas α/β hidrolases (Jia et al., 2000).

De acordo com a estrutura primária das seqüências dos genes codificadores e da especificidade das PHA sintase pelo substrato, estas foram, divididas em 4 classes, como mostra a Figura 4, que apresenta também as suas respectivas unidades características, espécies microbianas típicas e substrato preferencial.

Associados aos genes codificadores da PHA sintase são encontrados outros genes participantes na biossíntese de PHA, promovendo diferentes conteúdos monoméricos. Os produtos destes outros genes estão envolvidos em etapas como a biossíntese dos monômeros fornecidos à PHA sintase (como é o caso dos genes *phaA* e *phaB*), ou são componentes estruturais do grânulo de polímero (*phaP)* ou mobilizam os grânulos intracelulares (*phaZ*) (Rehm, 2003; Liebergesell et al., 1993; Madison, Huisman, 1999; Rehm, Steinbüchel, 2001). A Figura 4 também apresenta a organização de genes próximos ao codificador da PHA sintase (*phaC)* em organismos portadores de diferentes classes desta enzima.

As PHA sintases das classes I e II consistem em homodímeros compostos por uma e duas subunidades (PhaC) respectivamente. O operon da PHA sintase classe I tem só um gene *phaC* e o operon da classe II tem duas subunidades protéicas (PhaC1 e PhaC2). Estas diferem também nas especificidades dos substratos: PHA sintase da classe I usa preferencialmente cadeias curtas (R)-3-hidroxiacil-CoAs, enquanto a PHA sintase da classe II usa cadeias longas de (R)-3-hidroxiacil-CoA como substrato. A PHA sintase da classe I é encontradas em bactérias púrpuras não fototróficas do enxofre e na maioria das bactérias heterotróficas excetuando as pseudomonaceas. Estas são representadas pela *Wautersia eutropha* (*Ralstonia eutropha)* (Steinbüchel, Hein, 2001). As PHA sintases da classe II são especificas das pseudomonaceas, representadas pela *Pseudomonas oleovorans* (Madison e Huisman, 1999). A PHA sintase da classe III consiste em dois tipos de subunidades: PhaC e PhaE. A subunidade PhaC apresenta semelhanças com as PHA sintases das classes I e II, enquanto a subunidade PhaE não apresenta semelhança com nenhuma proteína conhecida. A PHA sintase da classe III é encontrada em bactérias púrpuras do enxofre e em algumas cianobactérias, sendo representadas pela *Allochromatium vinosum*. A PHA sintase da classe III prefere cadeias curtas (*R*)-3-hidroxiacil-CoAs. A PHA sintase da classe IV também tem duas subunidades PhaC e PhaR, sendo encontrada em espécies de *Bacillus* e são representadas pelo *Bacillus megaterium*. Esta PHA sintase também utiliza cadeias curtas de

(*R*)-3-hidroxiacil-CoAs. A organização dos genes biossintéticos de PHA em cada uma das classes nos organismos representativos são apresentados na Figura 4. A PHA sintase da classe I (*phaC*) costuma formar um operon *phaCAB* com genes codificadores de ß-ketothiolase (*phaA*) e acetoacetil-CoA redutase dependente NADPH (*phaB*) posicionados à jusante de *phaC* (downstream). Embora tenham diferente organização, as PHA sintases da classe I costumam estar localizadas agrupadas a outros genes da biossíntese de PHA.

A análise comparativa das seqüencias das PHA sintases indica que estas enzimas apresentam uma similaridade entre 8 e 96 % (Rehm, 2003; Steinbüchel, Hein, 2001). Baseado nos alinhamentos das seqüencias de aminoácidos, 8 são altamente conservados em todas as classes de PHA sintases, sugerindo que estes resíduos de aminoácidos têm um papel importante na função enzimática. Estes aminoácidos são Ser-260 (S260), Cys-319 (C319), Gly-322 (G322), Asp-351 (D351), Trp-425 (W425), Asp-480 (D351), Gly-507 (G507) e His-508 (H508) com referencia à localização destes resíduos em *Ralstonia eutropha*. C319 e G322 são uma parte da "G-X-G-X-G" chamada "lipase box" modificada. A cisteína nas PHA sintases substitui o sítio ativo serina das lipases (Rehm, Steinbüchel, 2001).

As PHA sintases contêm dois domínios: uma porção PhaC_N na região N terminal e um domínio α/ß hidrolase na região C terminal. A porção N-terminal das PHA sintases é altamente variável, contudo a porção C terminal é bastante conservada, sendo a região essencial na atividade enzimática (Rehm, Steinbüchel, 2001).

As PHA sintases estão localizadas na monocamada de fosfolipídios circundante aos grânulos amorfos de PHA no citoplasma, junto com a PHA despolimerase, proteínas estruturais anfifílicas (phasinas), proteínas reguladoras e algumas outras proteínas com funções ainda desconhecidas (Rhem, 2003). A PHA sintase está covalentemente ligada à superfície amorfa do grânulo.

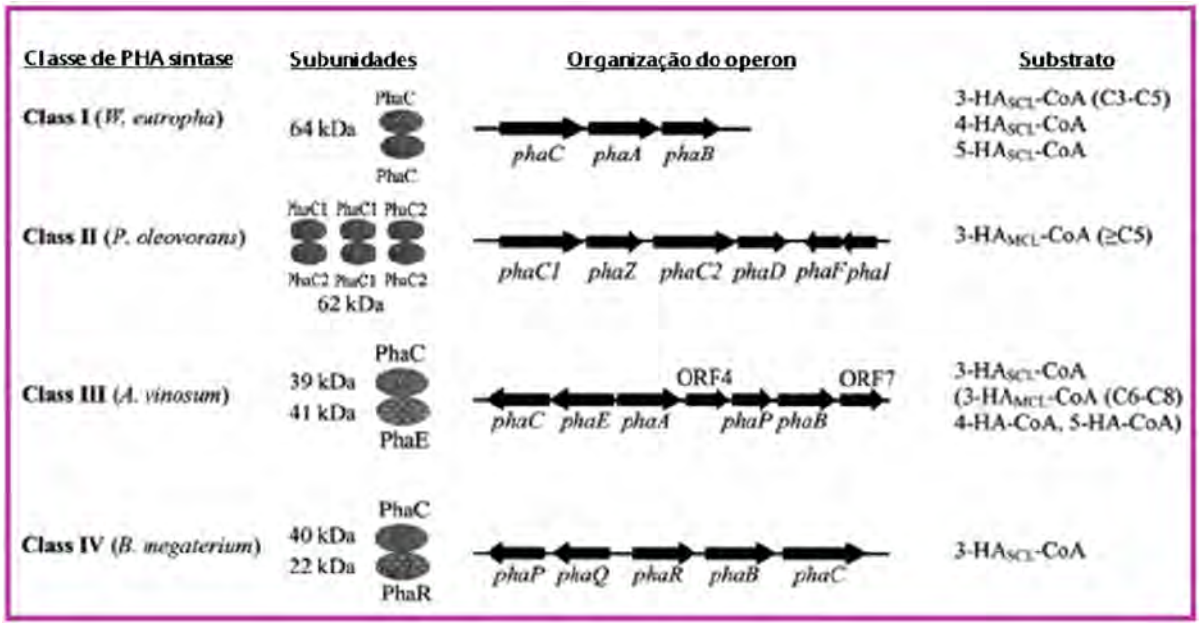


Figura 4 - Classes de PHA sintases mostrando a organização genética de cada uma das classes descritas. *PhaC*: PHA sintase, *phaA*: β-cetotiolase, *phaB*: (R)-3-cetoacil-CoA redutase, *phaC1* e *phaC2*: PHA síntese, *phaZ*: PHA despolimerase, *phaD*: Proteína com função desconhecida, *phaF*: Histona H1- proteína com função regulatória, *phaI*: Proteína ligada a grânulos maiores, *phaE*: Subunidade do heterodímero da classe três da PHA sintase, *phaP*: phasina, *phaQ*: Proteína homóloga à helix-turn-helix resistente a diversos antibióticos, *phaR*: Subunidade do heterodímero da classe quatro, ORF: fase de leitura aberta com função desconhecida.

Fonte: Modificada de Yilmaz, 2006.

3.5 Bioprospecção e Metagenômica.

Os diversos trabalhos desenvolvidos no país até o momento focalizaram a busca, em fontes como o solo, por microrganismos produtores de PHA_{SCL} e PHA_{MCL} por meio de isolamento e cultivo de microrganismos ou melhoramento de linhagens pré-existentes em coleções microbianas (Gomez, 2000; Silva et al., 2007). A busca foi direcionada a microrganismos capazes de crescer e acumular PHA utilizando produtos da agricultura, resíduos industriais ou produtos químicos com potencial para gerar novos materiais (Buffoni et al., 2005; Buffoni, 2006; Silva et al., 2007). Neste aspecto, o potencial da biodiversidade brasileira tem oferecido grandes perspectivas de obtenção de microrganismos, ainda não descritos, que apresentam a capacidade metabólica tanto da utilização de substratos não usuais, como da sua transformação em PHA.

Entretanto, os métodos tradicionais de isolamento e cultivo para análise da diversidade microbiana do meio ambiente são limitados, pois poucos microrganismos são cultiváveis. Estima-se que cerca de 90% da microbiota existente não tenha sido cultivada em laboratório. Além disto, os métodos de cultivo microbiano inibem o exame de interações ecológicas entre

microrganismos, dificultando ou impedindo a compreensão de processos dinâmicos que ocorrem no meio ambiente (Atlas, Bartha, 1997; Pereira, 2003).

Desse modo, a partir da década de 80, um grande número de ferramentas moleculares e tecnologias baseadas em seqüências gênicas vêm sendo desenvolvidos para análise da diversidade microbiana dos solos e reduzindo as limitações causadas pelos métodos tradicionais de isolamento e cultivo (Borneman, Triplett, 1997; Torsvik et al., 1998).

Pesquisadores têm usado com sucesso a clonagem de grandes fragmentos de DNA para isolamento de antibióticos de bibliotecas metagenômicas, assim como para estudar a fisiologia de microrganismos não cultivados em comunidades do solo (Atlas, Bartha, 1997; Gillespie et al., 2002; Lefevre et al., 2008).

Metagenoma é uma técnica que analisa o conjunto de genomas encontrado na microbiota total de determinado habitat. Esta técnica oferece um caminho para acessar de forma mais completa a diversidade microbiana total de um determinado ambiente, visto que nem todos os microrganismos presentes no ambiente podem ser cultivados com as técnicas de meios de cultura disponíveis (Pereira, 2003).

A ideia por trás dos ecogenomas microbianos foi concebida em 1991, quando o fago λ foi usado como vetor para inserir o DNA natural de uma população (Schmidt et al., 1991). A introdução aos vetores de clonagem BAC (do inglês *bacterial artificial chromosome*) e fosmídeo (do inglês F1 *origin-based cosmid vector*) em 1992 tem melhorado dramaticamente os esforços de clonagem genômica. Estes vetores são plasmídeos modificados que contêm uma origem de replicação derivada do fator F de *E. coli*. A replicação do vetor BAC é estritamente controlada, mantendo o replicom em uma ou duas cópias por célula. Relatos iniciais do desenvolvimento e caracterização da técnica BAC (Shizuya et al., 1992) demonstraram que estes vetores podem-se manter estavelmente e replicar segmentos de 300kb por eles abrigados. Shizuya et al., (1992) sugeriram também que os vetores de BAC mostram baixos níveis quiméricos, como resultado da inserção de dois genes no plasmídeo (*parA* e *parB*). A ideia da genômica ambiental amadureceu em 1996 quando forças unidas, nas quais incluem-se Jeff Stein e Ed DeLong, testaram esta abordagem com amostras do ambiente. As tecnologias mais recentes foram desenvolvidos para o projeto do genoma humano, por exemplo, BAC de uma cópia e vetores fosmídeos (Rappé, Giovannoni, 2003)

foram combinados com métodos da oceanografia para produzir a primeira biblioteca metagenômica.

Recentemente, foi construída por Massini (2009) uma biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. Segundo dados da SOS Mata Atlântica, esta região possui uma área de 92% de mata preservada. Várias técnicas para extração do DNA do solo foram utilizadas e otimizadas. Deste modo, obteve-se um de DNA total de qualidade, que foi digerido com a enzima *HindIII* obtendo tamanhos aproximados de 50kb que posteriormente foram isolados e clonados em vetor pBAC/oriV (Wild et al., 2002). Como produto foi então obtida uma biblioteca metagenômica com cerca de 5.000 clones. Este material foi disponibilizado pelos seus autores para novas investigações, pois representa uma fonte de recursos genéticos brasileiros, nem sempre alcançados por técnicas convencionais que podem abrigar novos genes ou conjuntos de genes com potencial para a síntese de novos produtos, como o caso dos PHA.

O vetor pBAC/oriV usado para a construção da biblioteca genômica possui duas origens de replicação: *oriS* e o*riV*. Quando o pBAC é replicado a partir do *oriS* ele é mantido a uma cópia por célula garantindo a sua estabilidade. A *oriV*, por sua vez, é uma origem de replicação indutível e a replicação a partir dela pode aumentar o número de cópias do pBAC para cerca de 200 por célula. A indução da replicação por *oriV* é dependente da proteína de replicação TrfA. Na estirpe de *E. coli* DH10B, usada como hospedeira, o gene *trfA* está sob controle do promotor P_{BAD} e da proteína regulatória do metabolismo de arabinose AraC. Quando *L*-arabinose está presente ela se liga à proteína AraC causando uma mudança conformacional que permite sua ligação ao promotor P_{BAD} e a ativação da transcrição dos genes à jusante. O gene *trfA*, sob controle desse promotor, é transcrito e traduzido na proteína TrfA que permitiria a replicação do pBAC a partir da *oriV*. Esse sistema é capaz de aumentar o número de cópias do fosmídeo de 1 para até 200 permitindo maior rendimento de DNA (Wild et al., 2002). C

Os passos básicos para a construção e uso de uma biblioteca são: geração de fragmentos de DNA de tamanho apropriado, clonagem dos fragmentos num vetor e a triagem do gene de interesse. Estes passos têm sido amplamente utilizados nas últimas três décadas. Dado que não há limitações evidentes em trasladar técnicas de construção de bibliotecas genômicas para a construção de bibliotecas metagenômicas, pode resultar surpreendente que as primeiras bibliotecas metagenômicas tenham sido realizadas até meados da década dos 90

para metagenomas marinhos (Stein et al., 1996). Trabalhos posteriores em metagenômica feitos por Recombinant Biocatalysis (hoje Diversa Corporation) e vários laboratórios mostraram o sucesso no descobrimento de genes a partir de bibliotecas metagenômicas (Cottrell et al., 1999). Expressão funcional tem sido comumente usada como método de triagem para genes específicos. Entretanto, estas bibliotecas são apropriadas para qualquer método de triagem que seja adaptável ao tratamento de grandes populações.

As bibliotecas metagenômicas podem ser classificadas em dois grupos com respeito ao tamanho médio do inserto. As bibliotecas pequenas em vetores de plasmídeos com menos de 15kb e as bibliotecas grandes em cosmídeo, fosmídeo (até 40kb) ou vetores de BAC (mais de 40kb). O hospedeiro para a construção e manutenção de quase todas as bibliotecas publicadas é *E. coli*. Os cosmídeos ou vetores BAC podem ser usados para transferir bibliotecas que foram produzidas com *E. coli* a outros hospedeiros como *Streptomyces* ou *Pseudomonas* (Courtois et al., 2003; Martinez et al., 2004). A escolha de um sistema de vetores depende da qualidade do DNA isolado, da média desejada de inserção da biblioteca, do hospedeiro e da estratégia de triagem que será usada, considerando o objeto de estudo. DNA do solo contaminado com substâncias da matriz húmica depois da purificação ou DNA digerido durante a purificação pode ser adequado para a construção de bibliotecas de plasmídeos. Bibliotecas com inserções pequenas do solo são úteis para o isolamento de genes separados ou de operons que codifiquem novas funções metabólicas. Bibliotecas com inserções de grande tamanho são mais apropriadas para identificar longas seqüências codificadas através de clusters longos ou fragmentos de DNA maiores. Esta característica é útil para a caracterização de genomas de microrganismos de solo não cultiváveis. Tem sido estimado que mais de 10^7 clones (insertos de 5 Kb) ou 10^6 clones BAC (insertos de 100 Kb) são requeridos para representar os genomas de todas as espécies de procariotas presentes em um grama de solo. Estas estimativas são baseadas assumindo-se que todas as bactérias são igualmente abundantes. Para obter uma representatividade suficiente dos genomas dos membros menos freqüentes (inferior a 1%) da comunidade do solo, tem sido calculado que bibliotecas contendo 10.000Gb de DNA de solo (10^{11} clones BAC) podem ser necessários. (Riesenfeld et al., 2004)

3.6 Técnicas de triagem

Varias técnicas têm sido usadas para identificar e recuperar genes de bibliotecas genômicas/metagenômicas de diferentes habitats. Devido à complexidade do metagenoma do

solo, técnicas com alta capacidade e sensibilidade são necessárias. Nos estágios iniciais a triagem de bibliotecas metagenômicas derivadas do solo pode ser baseada tanto na atividade metabólica (abordagem segundo a função) quanto na seqüência de nucleotídeos (abordagem segundo a seqüência). O PCR é uma das técnicas empregadas para o screening baseado em seqüências específicas de oligonucleotídeos para a busca em bibliotecas dos genes de interesse a partir de DNA total de solo (Dunbar et al., 1999; Courtois et al., 2001; Zhou et al., 2002; Courtois et al., 2003; Ginolhac et al., 2004, Parachin e Gorwa-Grauslund, 2011). Também tem sido usada a hibridização para a triagem de bibliotecas com sondas marcadas especificamente (Knietsch et al., 2003, Ginolhac et al., 2004; Dimitrov, 2009; Demanèche et al., 2009; Angelov et al., 2009). As duas técnicas requerem iniciadores e sondas apropriadas que são derivados de regiões conservadas de genes conhecidos e de produtos gênicos; sua aplicabilidade é limitada à identificação de novos membros de famílias de genes conhecidos. Para recuperar exclusivamente os genes de ambientes de solo através de PCR, a construção de bibliotecas não é um pré-requisito (Daniel, 2005).

A maioria dos métodos de triagem que isolam genes ou clusters de genes para novos biocatalizadores ou pequenas moléculas, são baseados na detecção de expressão de atividades em bibliotecas de clones (Henne et al., 1999; Brady, Clardy, 2000; Rondon et al., 2000, Park et al., 2011, Fu et al., 2011). Dado que a informação da seqüência não é necessária, esta é a única estratégia que tem potencial de identificar novas classes de genes que codifiquem funções tanto conhecidas quanto desconhecidas. Esta estratégia tem sido validada através do isolamento de novos genes que codificam enzimas degradativas (Yun et al., 2004; Gabor et al., 2004), que conferem resistência a antibióticos (Riesenfeld et al., 2004) e seu efeito (Wang et al., 2000). A maioria das biomoléculas recuperadas através da triagem, baseada em função de bibliotecas de solo complexas, é relacionada leve ou fortemente a genes conhecidos e o redescobrimento de genes que não têm sido reportados na literatura. Isto mostra que a quantidade de DNA de solo que tem sido clonado e submetido à triagem, representa unicamente a ponta do iceberg com respeito ao descobrimento de novos produtos do metagenoma do solo. Atividades simples são favorecidas, pois a freqüência dos clones que expressam determinadas atividades é usualmente baixa, então grandes quantidades de clones devem ser avaliadas. Por exemplo, a triagem de 1186200 clones contendo DNA de solo resultou na identificação de 10 clones únicos que conferem resistência antibiótica (Riesenfeld et al., 2004). Abordagens orientadas à função incluem teste de atividades especificas diretamente nas colônias. A sensibilidade destas triagens faz possível a detecção de clones

pouco freqüentes (Gupta et al., 2002). Outra abordagem que permite a detecção de clones funcionais é o uso de linhagens hospedeiras ou mutantes de linhagens de hospedeiro que requerem complementação heterológa para o crescimento em determinadas condições (Majernik et al., 2001). Embora triagens baseadas em funções usualmente resultam na identificação de genes completos (e, portanto de produtos genômicos funcionais), uma limitante desta abordagem é confiança na expressão de genes clonados e o funcionamento das proteínas codificadas num hospedeiro exógeno. Portanto, a baixa detecção de genes pouco freqüentes ou a inabilidade de recuperar proteínas funcionais codificadas por DNA metagenômico durante a triagem baseada em funções, podem acontecer devido ao fato de que alguns genes ou produtos genômicos não são expressos ou não estão habilitados nas linhagens hospedeiras. Em muitos estudos, *E. coli* tem sido utilizada como hospedeira para triagens baseadas em funções. Recentemente, outras bactérias como *Streptomyces* e *Pseudomonas* têm sido utilizadas para expandir o alcance de genes derivados do solo que podem ser detectados por triagens baseados em funções (Courtois et al., 2003; Wang et al., 2000). A expressão em bactérias hospedeiras é usualmente limitada a genes de procariotas e DNA de solo, porém, dependendo do método de isolamento pode-se obter um componente importante de DNA eucariota, portanto o uso de hospedeiros eucariotas pode ser útil para a triagem de bibliotecas de solo.

A tecnologia de microarranjo de DNA pode ser útil para a análise do metagenoma do solo e para a caracterização de bibliotecas metagenômicas (Wu et al., 2001; Sebat et al., 2003). Por exemplo, genes que codificam reações importantes no ciclo do nitrogênio foram detectados usando microarranjos de DNA em amostras coletadas de solo que forneceram informação sobre a composição e atividade da sua complexa comunidade (Wu et al., 2001), embora os métodos de microarranjo de DNA para a detecção de genes mostrem sensibilidade entre 100 até 10000 vezes inferior à PCR (Zhou, Thompson, 2002). A melhora na sensibilidade e especificidade são alguns dos desafios no uso de DNA ou RNA de solo com a técnica de microarranjo.

3.7 Aprimoramento da freqüência de detecção de genes.

O número de clones e correspondentemente, o tamanho do DNA clonado do solo que requer ser triado para recuperar genes de interesse, é determinado pela freqüência dos microrganismos que contêm os genes desejados presentes na amostra de solo, usada para o isolamento ou para a construção de bibliotecas metagenômicas. Entretanto, a combinação de

enriquecimento tradicional e tecnologias em metagenômica pode ser uma ferramenta eficiente para incrementar a quantidade de clones positivos numa triagem e para isolar novas biomoléculas, quando as amostras de biomas complexos como o solo são usadas como material de início (Daniel, 2004; Daniel, 2005).

PCR específico visando certos genes tem sido extensamente usado para testar comunidades de microrganismos com determinadas características de biodegradabilidade. Por exemplo, a marcação de genes codificadores das enzimas metano monooxigenase, metanol desidrogease e amônia monooxigenase são usados para identificar bactérias metanotróficas. A capacidade biodegradável de populações bacterianas nativas tem sido identificada através da triagem de extratos metagenômicos na procura dos genes catecol 2,3 dioxigenase, clorocatecol dioxigenase e fenol hidroxigenase (Futamata et al., 2001). Entretanto, como ferramenta para descobrir biocatalizadores, o PCR específico por genes apresenta dois problemas. O primeiro é que o desenho dos iniciadores é dependente da informação existente das seqüências gênicas de interesse o que torna a busca limitada às seqüências conhecidas. Segundo, somente um fragmento do gene estrutural é tipicamente amplificado, requerendo mais passos para identificar o comprimento total dos genes. Amplicons podem ser usados como testes para identificar genes completos em bibliotecas metagenômicas convencionais. Alternativamente, abordagens baseadas em PCR para a recuperação tanto da seqüência à montante quanto a seqüência à jusante das regiões de acompanhamento incluindo “universal fast walking”, “panhandle PCR”, “random primer PCR”, “inverse PCR” e “adaptor ligation PCR” podem ser usadas para ter acesso aos genes completos quando não se tem uma biblioteca metagenômica (Cowan et al., 2005). Estes métodos são tecnicamente mais difíceis de aplicar no nível metagenômico devido à alta complexidade da amostra metagenômica do DNA, porém estas técnicas têm sido usadas com sucesso na identificação de novas variantes do gene da 2,5 diceto-*D*-ácido glicônico redutase dentro de um ambiente de DNA (Eschenfeldt et al., 2000). Como estas abordagens podem ser muito trabalhosas e demoradas, alternativas inovadoras têm sido propostas.

PCR por trascriptase reversa (RT-PCR) tem sido usada para descobrir genes de amostras ambientais, por exemplo, no isolamento de enzimas para degradação de naftalina achada em microrganismos presentes em rejeitos de carvão (Wilson et al., 1999). Entretanto, esta abordagem apresentam algumas dificuldades técnicas associadas ao descobrimento de mRNA em amostras ambientais; esta é vantajosa por fornecer maior acesso a genes

estruturais tanto para eucariotos básicos quanto para procariotos, além da facilidade para selecionar genes funcionais em resposta a alterações ambientais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos e plasmídeos

Na presente pesquisa foram empregados cerca de 5000 clones de *Escherichia coli* DH10B da biblioteca metagenômica construída por Massinni (2004), abrigando fragmentos de DNA de solo de Mata Atlântica. Também foram empregadas as linhagens bacterianas e os plasmídeos listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Bactérias e plasmídeos utilizados no desenvolvimento do presente trabalho.

Bactérias/Plasmídeo	Características	Referência
***Bacillus megaterium* M.A 3.3**	Isolado bacteriano produtor de PHA.	Lopes et al., 2009
***E. coli* DH10B**	Linhagem hospedeira do plasmídeo pBAC/oriV contendo os fragmentos de interesse. F^-, Stp^R, PHA^-	Invitrogen
LFM 695	*Ralstonia eutropha* PHB^- 4 pBBR1MCS1::*phaCAB*, Cm^r, PHA^+	Gomes, 2009
LFM 149	*E. coli S17-1*pBBR1MCS1, Cm^r	Gomes, 2009
pJM9131	Plasmídeo contendo os genes *phaCAB* de *Ralstonia eutropha*, Kan^r, *lac*Z, PHA^+	Valentin, Steinbüchel, 1994; Kidwell et al.,1995
pBHR71	Plasmídeo contendo o gene *phaC*1 de *Pseudomonas aeruginosa*, Amp^r, *lac*Z. PHA^-	Langenbach et al., 1997
pBAC/oriV	oriV, *lac*Zα, *par*A, *par*B, *par*C, *rep*E, Cm^r	Wild et al., 2002

PHA^+: acúmulo de polihidroxialcanoatos, PHA^-: ausência de acúmulo do polímero, Kan^R: resistência à canamicina, Amp^r: Resistente à ampicilina, Cm^r: Resistência ao cloranfenicol.

Fonte: Galindo, 2011.

4.2 Recuperação da biblioteca metagenômica e análise de viabilidade.

A biblioteca metagenômica (Massini, 2004) a partir de amostras de solo de Mata Atlântica foi construída pela obtenção do DNA total do solo e posterior digestão com a enzima *HindIII*. Após a otimização das condições de digestão, o DNA foi ligado com o vetor pBAC/oriV (~8kb). O resultado da ligação foi inserido por transformação, em células receptoras *E. coli* DH10B e semeadas em meio LBAC e incubado a 37°C, gerando cerca de 5000 clones. As células transformantes foram transferidas para meio de cultura liquido em

placas de polipropileno de 96 poços (Placas de ELISA) e crescidas em 150 µl de meio LBAC, a 37 ^{o}C por 16 horas e em seguida foram adicionados 50 µl de glicerol a 60 % em cada poço para preservação das células, sendo finalmente acondicionadas à temperatura de -80 ^{o}C.

Os clones da biblioteca metagenômica foram previamente removidos do freezer -80 ^{o}C e descongelados em banho de gelo por aproximadamente 5 minutos antes de serem recuperados em novo meio. Novas placas de polipropileno de 96 poços foram dispostas para o procedimento de recuperação, onde cada um dos poços continha 150 µL de meio LBAC, objetivando assim a avaliação da viabilidade dos clones. Para transferir as culturas para novo meio, foi utilizado um carimbo de 96 dentes metálicos, previamente esterilizado em autoclave e/ou sendo flambado após 2 minutos em álcool (este procedimento foi realizado 4 vezes). Posteriormente, as culturas foram incubadas a 37 ^{o}C durante 16 horas. Após este período, foi registrado o crescimento bacteriano em cada uma das placas recuperadas e feitas duas novas cópias, às quais após o período de cultivo foram adicionados 50 µl de glicerol ao 60 % a cada um dos poços para a preservação das células (como explicado no item 4.6) , sendo acondicionadas à temperatura de -80 ^{o}C. O crescimento de cada um dos clones das placas recuperadas foi comparado com a sedimentação visível de cada um dos clones na placa molde (placa original), sendo feita uma conta a partir desta comparação, determinando assim a porcentagem de clones recuperados.

4.3 Condições de cultivo

As culturas microbianas de *E. coli* contendo os diferentes plasmídeos, assim como de *Bacillus megaterium* M.A 3.3 e a linhagem LFM 695 (*Ralstonia eutropha* PHB^{-}4 pBBR1MCS1::*phaCAB*) foram cultivadas em meio líquido e/ou sólido de Luria Bertani, contendo os antibióticos e a arabinose quando necessários, de acordo com a literatura (Sambrook *et al.*, 1989). As linhagens de *E. coli* foram cultivadas a 37 ^{o}C, sob agitação de 150-200 rpm durante 20 horas. *Bacillus megaterium* M.A 3.3 e a linhagem LFM 695 foram cultivadas a 30 ^{o}C, com agitação de 150-200 rpm durante 24 horas.

4.4 Meio de Cultura

No presente estudo, foi utilizado o meio de cultura Luria Bertani - LB (Sambrook *et al.*, 1989) para o cultivo da maioria dos microrganismos empregados. Para o cultivo dos clones da biblioteca metagenômica foram adicionados ao meio LB, cloranfenicol e arabinose

(LBAC), após a esterilização e esfriamento do meio, evitando assim a inativação do antibiótico. A seguir é apresentada a composição dos meios:

Meio Luria Bertani - LB (Sambrok *et al.*, 1989)

- ✓ Triptona 10 g/L
- ✓ Extrato de levedura 5 g/L
- ✓ Cloreto de Sódio 10 g/L

Para obtenção do meio sólido, foram adicionados de 15- 20 g/L de ágar.

Meio Luria Bertani com adição de Arabinose e Cloranfenicol - LBAC

- ✓ Triptona 10 g/L
- ✓ Extrato de levedura 5 g/L
- ✓ Cloreto de Sódio 10 g/L
- ✓ Arabinose 2 g/L
- ✓ Cloranfenicol 0,0125 g/L

Para obtenção do meio sólido, foram adicionados de 15- 20 g/L de ágar.

Meio Luria Bertani com Glicose e Cloranfenicol - LBGC (meio de acúmulo)

- ✓ Triptona 10 g/L
- ✓ Extrato de levedura 5 g/L
- ✓ Cloreto de Sódio 10 g/L
- ✓ Glicose 20 g/L
- ✓ Cloranfenicol 0,0125 g/L

Para obtenção do meio sólido, foram adicionados de 15- 20 g/L de ágar.

4.5 Esterilização

A solução de arabinose e os meios de cultura foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 121 ºC. A solução de cloranfenicol foi esterilizada empregando um filtro estéril com porosidade de 0,22 µm (Millipore) e adicionado ao meio de cultura após, este ter sido esterilizado.

4.6 Preservação das linhagens bacterianas.

Para garantir a preservação da biblioteca metagenômica ao longo do desenvolvimento do presente trabalho e para estudos posteriores, foram feitas três cópias das culturas de cada uma das placas de 96 poços contendo os clones da biblioteca, pelo método de criopreservação. Cada uma das placas de polipropileno de 96 poços foi semeada com ajuda de carimbo em uma nova placa de 96 poços esterilizadas contendo 150 µL/poço de meio LBAC e incubada a 37 ^{o}C durante 16 horas, após este período foram adicionados 50 µL de glicerol a 60 % a cada um dos poços da biblioteca metagenômica. Cada uma das placas foi armazenada em congelador de refrigerador doméstico durante 30 minutos e após este período, as culturas foram conservadas em freezer -80 ºC.

As outras linhagens empregadas no trabalho foram também preservadas. Para a criopreservação, foi inoculada uma colônia bacteriana em 25 mL de meio LB, LBK ou LBC sendo posteriormente incubada cada uma das culturas por tempo definido à temperatura ótima de crescimento de cada um dos microrganismos. 5 ml da cultura foram diluídos em 5 mL de uma solução aquosa de glicerol ao 20 %. A suspensão de células na solução de glicerol foi distribuída em microtubos de polipropileno (500 µL por tubo) e mantida em congelador de refrigerador doméstico durante 30 minutos e após este período, as culturas foram transferidas para o freezer -80 ºC.

Os clones de interesse obtidos neste trabalho e as linhagens controle empregadas foram cultivadas em 25 mL de meio LB (24h), contendo o antibiótico quando necessário. Posteriormente, cada uma das culturas foi centrifugada durante 15 minutos a 4629 x *g* (modelo Eppendorf 5804 R) e ressupensas em solução preservante (leite desnatado ao 10 % e glutamato de sódio a 5 %). A suspensão de células foi distribuída em ampolas esterilizadas e posteriormente congeladas e liofilizadas. As células liofilizadas foram seladas a vácuo e estocadas em refrigerador (Silva *et al*., 1992).

4.7 Análise do tamanho dos fragmentos de DNA.

Para avaliar o tamanho dos diferentes fragmentos de DNA (tamanho de inserto) contidos na biblioteca metagenômica, foram selecionados 24 clones ao acaso. Os clones selecionados foram cultivados em meio LBA líquido a 37 ºC durante 18 horas. Após este período, foi feita a extração de DNA plasmidial de cada um dos clones com o QIAprep Spin *Miniprep* Kit (QIAGEN). A extração foi realizada conforme recomendado pelo fabricante

com uma pequena modificação na etapa de eluição do DNA, na qual o tampão EB (fornecido pelo fabricante) foi aquecido a 70 ºC e adicionado à coluna. Após este procedimento, a coluna foi deixada durante 5 minutos à temperatura ambiente e posteriormente levada à centrífuga a 17,400 *xg* durante 5 minutos. O DNA plasmidial obtido foi quantificado em NanoVue (item 4.9) e digerido com a endonuclease de restrição *Hind III* (Invitrogen) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Posteriormente, o DNA foi visualizado em fotodocumentador após separação por eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídio.

4.8 Triagem de genes da biossíntese de polímeros biodegradáveis na biblioteca metagenômica.

Foram empregas duas técnicas de triagem, sendo uma delas baseada na atividade metabólica (abordagem segundo a função) e uma segunda triagem baseada na seqüência de nucleotídeos (abordagem segundo a seqüência), para a identificação dos fragmentos de interesse. Para realizar a triagem de genes *phaC* pela atividade metabólica foi proposto empregar a técnica de *Sudan Black B*, para a visualização de possíveis clones capazes de produzir polímero pela coloração azul. Para a segunda triagem, foi proposta a técnica de PCR para a identificar genes responsáveis pela síntese de PHA a partir de seqüencias conhecidas.

4.8.1 Triagem de genes *phaC* pelos métodos de detecção fenotípica na biblioteca metagenômica.

Foi utilizado o teste qualitativo de coloração para a detecção de acúmulo de PHA nos clones da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica, colocando sempre um controle positivo e um controle negativo, para permitir a visualização do contraste da coloração.

A coloração de colônias por *Sudan Black B* foi realizada segundo Schlegel e colaboradores (1970). Os clones foram cultivados em meio sólido LBGC (composição mencionada no item 4.4) durante 5 dias a temperatura de 37 ºC, fornecendo assim as condições apropriadas para o acúmulo de PHA. Após o período de incubação, a placa foi corada até cobrir completamente as colônias formadas pelo crescimento de cada um dos clones, com solução 0,02% (m/v) de *Sudan Black B* em etanol 96 %. O tempo de espera para a ação do corante foi de 10 minutos, seguido de lavagem com etanol 96 % e posterior descarte do mesmo. Observou-se o resultado, baseado na coloração apresentada pelas

colônias, pois as que estão acumulando PHA apresentam coloração azul, enquanto aquelas que não acumulam, não se coram ou ficam levemente azuladas.

4.8.2 Triagem de genes *phaC* empregando seqüencias conhecidas na biblioteca metagenômica (Triagem primária).

Para realizar a triagem de genes da biossíntese de polímeros biodegradáveis na biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica, foi extraído o DNA plasmidial de cada uma das placas de polipropileno contendo 96 clones, e realizada posteriormente uma reação de PCR, utilizando oligonucleotídeos descritos na literatura referentes ao gene da PHA sintase (Ver Tabela 2, item 4.8.2.3). A seguir será detalhada a metodologia da triagem primária esquematizado no Anexo A. metodologia proposta foi baseada em Hrvatin e Piel, 2007.

4.8.2.1 Teste de Sensibilidade da Técnica de PCR para detecção de genes em biblioteca metagenômica.

Foi feita a extração de DNA plasmidial de cerca de 96 clones de uma das placas da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica, pelo método de Birnboim, Doly (1979), modificado, como mencionado no item a seguir. O DNA obtido foi quantificado (item 4.9), sendo que parte do volume foi diluído até obter uma concentração de 1000 ng/µL. As duas concentrações do DNA (aprox. 6000 e 1000 ng/µL) foram contaminadas em dois blocos: um com DNA genômico de *Bacillus megaterium* M.A 3.3 e outro com plasmídeo pBHR71, ambos em 15 concentrações variando de 10^{2} até 10^{-15} ng/µL. Estas misturas e os DNA contaminantes foram submetidos a reações de PCR como mencionado no item 4.8.2.3 para buscar o gene *phaC*.

4.8.2.2 Extração de DNA plasmidial

Foi utilizado o método de Birnboim, Doly (1979), modificado. Após o cultivo em duplicata de cada uma das placas de polipropileno de 96 poços (fundo U), contendo os clones pertencentes à biblioteca metagenômica durante 18 horas, foram montados grupos de clones para realizar extrações em forma de pools. Das duas placas inoculadas, uma delas foi destinada para extração Figura 5 em conjunto dos 96 clones, a qual foi nomeada extração total. A placa restante foi divida em 3 partes iguais (conjuntos), as quais foram nomeadas linhas (1-4), linhas (5-8) e linhas (9-12) de acordo ao conjunto de clones reunidos para a

extração. Para montar cada um dos conjuntos, foi transferido a placas de Petri de vidro esterilizadas o volume total de cada um dos poços que faziam parte da placa total ou de cada conjunto de clones acima definido. Posteriormente, os conjuntos de clones foram transferidos para microtubos em alíquotas de 2 mL até esgotar o volume total misturado em cada caso e centrifugados (centrífuga Eppendorf 5810) 10 minutos a 8960 *xg*, a 20 ºC. Na Figura 5 é apresentada uma figura que permite entender melhor a metodologia empregada, onde se pode visualizar o esquema da extração de DNA plasmidial de cada uma das placas de polipropileno de 96 poços contendo os clones da biblioteca metagenômica do solo de Mata Atlântica.

O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de tampão TE (pH:8,0) para retirar os restos de meio de cultura, logo foi centrifugado. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µL de solução de GET gelado, agitadas vigorosamente e incubadas em banho de gelo por 5 minutos. Adicionaram-se 200 µL da solução SDS a 10 % em NaOH (0,2M), misturou-se por inversão e incubou-se por 5 minutos em banho de gelo. Para a precipitação do DNA cromossomal e proteínas, foram adicionados 150 µL de solução de acetato de potássio (descrito a seguir) previamente gelada e, após nova incubação por 5 minutos em banho de gelo, centrifugou-se a amostra por 10 minutos a 8960 *xg* e 4 ºC. O sobrenadante, contendo o DNA plasmidial foi transferido para um novo microtubo, onde se procedeu à extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (250 µL de fenol e 250 µL de clorofórmio/álcool isoamílico), centrifugou-se por 10 minutos a 15142.4 *xg* e 4 ºC. Em seguida, foi feita a precipitação do DNA plasmidial com etanol absoluto (750µL), incubou-se por 60 minutos em banho de gelo e após este período, a amostra foi centrifugada por 20 minutos a 15142.4 *xg* e 4 ºC. Em seguida, o DNA foi lavado com etanol a 70 %, centrifugado por 10 minutos a 15142.4 *xg* e 4 ºC, seco a vácuo por 20-30 minutos e ressuspenso em água contendo 0,01 % do volume de solução de RNAse (20 mg/mL) e incubado por 1 hora a 37 ºC. O material extraído foi mantido em estoque a -20 ºC.

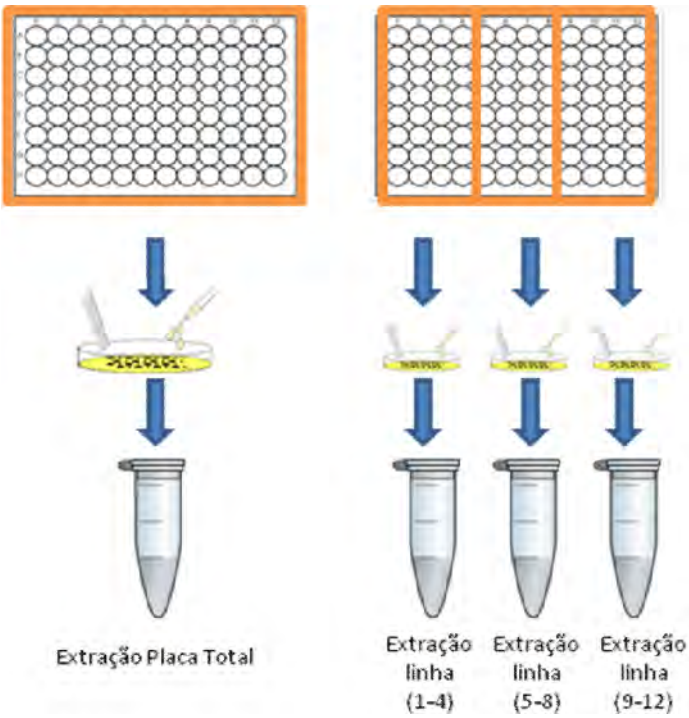


Figura 5 - Esquema da extração de DNA plasmidial de cada uma das placas de placas de polipropileno de 96 poços contendo os clones da biblioteca metagenômica do solo de Mata Atlântica.

Fonte: Galindo, 2011.

A seguir estão descritas as soluções utilizadas:

Solução de GET (Birnborim, Doly, 1979)

- ✓ Glicose 50mM
- ✓ EDTA de cálcio e sódio (etileno diamino tetracetato) 10mM
- ✓ Tris/HCL(Hidrocloreto de hidroximetil aminometano) 25mM

  pH 8,0.

Solução de acetato de potássio (Birnboim, Doly, 1979)

- ✓ Acetato de potássio 5M 60mL
- ✓ Ácido acético glacial 11,5mL
- ✓ H_2O 28,5mL

  pH 4,8

Tampão TE (Sambrook *et al*., 1989)

- ✓ Tris/HCl (hidrocloreto de hidroximetil aminometano) 10 mM
- ✓ EDTA (etilenodiamino tetra acetato de sódio) 1 mM

  pH 8,0

Solução de Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico.

Utilizou-se fenol saturado com Tris/HCl (0,1M e pH 8,0), o qual foi misturado em partes iguais com uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1).

4.8.2.3 Oligonucleotídeos e condições de amplificação de DNA.

Para a amplificação dos diferentes genes da PHA sintase, foram empregados oligonucleotídeos reportados na literatura como se mostra na Tabela 2.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos empregados na detecção dos genes *phaC*.

Nome	Seqüência 5´ → 3´	Classe PHA sintase	Tamanho amplicon	Referência
phaCF1 **phaCR4**	ATCAACAARTWCTACRTCYTSGACCT AGGTAGTTGTYGACSMRTAGKTCCA	I	~496 pb	Sheu *et al.*, 2000
I-179L(a) **I-179R(a)**	ACAGATCAACAAGTTCTACATCTTCGAN GGTGTTGTCGTTGTTCCAGTAGAGGATGTN	II	~540 pb	Solaiman *et al.*, 2000; Solaiman, 2002
DEV15L **DEV15R**	CCGATCATCATGAAGTTYC CCAGGTTGGCGCCGATGCC	II (Semi-nested PCR)	~500 pb	Solaiman, 2002
Haphapcr1 **Haphapcr2**	GTTTTAATCGATTACGCNYTNGTNAAYMGNCCNTAYATG CGGGACTATRAADATCCAYTTYTCCATNCKTAGAAAGTT	III	~600 pb	Hai *et al.*, 2001
P1 **P2**	ATNGAYTGGGGNTAYCCN RAADATCCAYTTYTCCAT	III	~536 pb	Hai *et al.*, 2004
phaC3F **phaC3R**	GTYTACGCCCTGGTVAAYC KGAAYTGRCGGWARGTYTCS	III	~574 pb	Presente trabalho
phaE3F **phaE3R**	GCVRASMCYKTSGCCWAMAY YCMDKRCDYYSAGRTTRTTYTYK	III	~563 pb	Presente trabalho
B1F **B1R**	AACTCCTGGGCTTGAAGACA TCGCAATATGATCACGGCTA	IV	~590 pb	Shamala *et al.*, 2003.

Fonte: Galindo, 2011.

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se como DNA molde os pools de DNA plasmidial extraídos de cada uma das placas da biblioteca metagenômica.

Para padronizar a reação de PCR, foi necessário realizar diferentes testes dos iniciadores em diferentes temperaturas de anelamento, para poder achar a temperatura na qual todos os iniciadores apresentassem amplicons dos tamanhos esperados empregando microrganismos controle. Todos os oligos foram testados para todos os microrganismos controle, para detectar possíveis pareamentos de mais de um iniciador para um mesmo

microrganismo controle. Os testes foram realizados com o material genético dos plasmídeos pJM9131, pBHR71, pBAC sem inserto, com *E. coli* DH10B (microrganismo hospedeiro) e finalmente com *Bacillus megaterium.* M.A. 3.3.

As diferentes reações de PCR foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient, marca Eppendorf), adotando as seguintes condições:

Para um volume de 5µL de reação:

- ✓ PCR GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA)* 3,0 µL
- ✓ Iniciador *foward* (10 µM) 0,5 µL
- ✓ Iniciador *reverse* (10 µM) 0,5 µL
- ✓ DNA (< 250 ng/ µL) 0,5 µL
- ✓ Água livre de nuclease 0,25 µL
- ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck) 0.25 µL

* 50U/mL Taq DNA polimerase, 400 µM de cada dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 3mM de MgCl2

As reações de amplificação foram realizadas a uma temperatura inicial de desnaturação de 94 °C por 2 minutos, e subseqüentes ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 58 °C por 2 minuto e extensão a 72 °C por 3 minutos, este ciclo foi repetido 35 vezes e incubação final a 4 °C.

4.9 Quantificação do DNA

Após a obtenção do DNA, a concentração e a pureza das amostras foram quantificadas por leitura de densidade ótica de 260 e 280 nm medida em espectrofotômetro Nanovue (GE). Para a medição no aparelho foram aplicados 2 µL de cada uma das amostras a serem quantificadas.

4.10 Visualização do DNA

Para visualização e análise do DNA foram realizadas corridas eletroforéticas em géis de agarose elaborados na concentração de 0,8% (m/v). As soluções TBE e TAE foram utilizadas para dissolver a agarose, bem como o tampão de corrida (Sambrook et al.,1989).

Após da homogeneização da amostra com o corante de corrida na proporção de 1/10 do volume total, as amostras de DNA foram aplicadas nos géis e estes submetidos a corridas eletroforéticas de 60-120V, 80mA, 80W por 1 hora. Ao final da corrida eletroforética, os

fragmentos de DNA puderam ser observados após coloração por 20 min do gel com brometo de etídeo (0,1mg/100mL de TBE), lavagem no mesmo tampão e visualização sob luz UV (254nm) em transluminador (Multidoc-It Digital Imaging system UV transilluminator, USA). Foi aplicado no primeiro poço da canaleta do gel, o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima Lambda/*Hind III* para orientação na seleção dos fragmentos obtidos.

A seguir estão descritas as soluções utilizadas:

Solução TBE

- ✓ Tris-base (hidroximetil aminometano) 54 g
- ✓ Ácido bórico 27,5 g
- ✓ EDTA de cálcio e sódio (etileno diamino tetracetato de cálcio e sódio) 0,5M 20 mL
- ✓ H_2O q.s.p 1000mL

Solução TAE

- ✓ Tris-base (hidroximetil aminometano) 242g
- ✓ Ácido acético glacial 57,1mL
- ✓ EDTA de cálcio e sódio (etileno diamino tetracetato de cálcio e sódio) 0,5M 100 mL
- ✓ H_2O q.s.p 1000 mL

Corante de corrida

- ✓ EDTA de cálcio e sódio (etileno diamino tetracetato de cálcio e sódio) 5M 2 mL
- ✓ Azul de bromofenol 0,5 g
- ✓ Glicerol 5 g
- ✓ H_2O q.s.p 100 mL

4.11 Identificação dos clones positivos para o gene phaC (Triagem secundária).

A seleção dos clones positivos foi feita conforme descrito abaixo e se tomou como base cada uma das placas da biblioteca metagenômica apresentando clones positivos para o gene *phaC*. As placas foram novamente removidas do freezer -80 ^{o}C e descongeladas em banho de gelo conforme já descrito (item 4.2). As culturas foram transferidas com carimbo de 96 dentes para uma nova placa contendo em cada poço 150 µL meio LBAC, substituindo assim

a placa retirada. Posteriormente, de cada um dos clones da placa foram transferidos 50 µL (com ajuda de micropipetador) a microtubos de 2 mL contendo 1,5 mL de meio LBAC. Seguidamente, os microtubos inoculados foram homogeneizados por inversão e logo vedados com uma tampa que contém uma membrana de 0,2 µm que permite a entrada de oxigênio para o crescimento celular. O conjunto microtubo-tampa com filtro é conhecido no mercado como "Eppendorf LidBac".Os microtubos inoculados foram incubados a 37 ^{o}C durante 20 horas. Após este período, foram centrifugados, descartando o sobrenadante e ressupendendo o sedimento em 50 µL de tampão TE. Imediatamente, foram colocados no agitador de tubos (Uniscience, USA) durante 30 segundos e em seguida colocados em banho maría (95 ^{o}C) durante 5 minutos objetivando a lise das células e a exposição do DNA. A partir destas células lisadas, foram realizadas reações de PCR testando os oligonucleotídeos para os quais tinha-se apresentado um resultado positivo na triagem primária. Às reações foram adicionadas as mesmas quantidades dos reagentes mencionados acima. O programa ao qual foram submetidas às reações de amplificação foi o seguinte: temperatura inicial de desnaturação de 94 °C por 5 minutos, e subseqüentes ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 58 °C por 2 minuto e extensão a 72 °C por 3 minutos, este ciclo foi repetido 35 vezes e incubação final a 4 °C.

Para visualização e análise dos produtos de PCR foram realizadas corridas eletroforéticas em géis de agarose como mencionado no item anterior. No Anexo B é apresentado um desenho a onde é resumida a metodologia de forma esquematizada para a identificação dos clones positivos.

4.12 Seleção dos clones de interesse

A partir da identificação dos clones positivos para cada uma das IV classes de PHA sintase, foi selecionada uma das classes tendo em mente fatores importantes como a capacidade para incorporar mais de um substrato e também que não tivesse sido muito explorada, com maior potencial para a descoberta de novos fragmentos de interesse que pudessem aportar novas informações na área de pesquisa. Pelo anteriormente mencionado, foram selecionados 67 clones aparentemente "positivos" para a classe III de PHA sintase, devido a que esta classe tem sido pouco estudada e gera um interesse particular porque consegue incorporar um amplo espectro de HA_{SCL} e HA_{MCL}.

Cada um dos 67 clones foi cultivado em 25 mL de meio LBAC e posteriormente incubados sob agitação rotativa (150 rpm) a 37 ºC durante 18 horas. Após este período, o volume total foi centrifugado por 15 minutos a 4ºC e 4629 x *g* (Eppendorf 5804 R). O sedimento de células obtido foi lavado com tampão TE para retirar os resíduos de meio e centrifugado novamente como mencionado acima. Posterior a este procedimento, o sedimento de células foi submetido à extração de DNA plasmidial empregando o QIAprep Spin *Miniprep* Kit (QIAGEN). A extração foi realizada conforme recomendado pelo fabricante com uma pequena modificação na etapa de eluição do DNA, na qual previamente foi esquentado a 70 ºC o tampão EB (fornecido pelo fabricante) e adicionado à coluna. Após este procedimento, a coluna foi mantida durante 5 minutos a temperatura ambiente e posteriormente levada à centrífuga a 17,400 *xg* durante 5 minutos. O DNA plasmidial obtido foi estocado no freezer para posterior uso.

4.13 Teste dos clones positivos para todas as classes de PHA sintase.

O DNA plasmidial dos 67 clones selecionados foi submetido a novas reações de PCR testando os oligos mencionados na Tabela 2 para a detecção de genes da PHA sintase. As reações de PCR foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient, marca Eppendorf), adotando as condições descritas no item 4.8.2.3.

4.14 Purificação dos produtos de PCR obtidos.

Para o isolamento e a purificação do produto de interesse de cada reação de PCR após a separação e visualização dos fragmentos por corrida eletroforética em gel de agarose, foram utilizados dois tipos de kits dependendo da presença de bandas inespecíficas. Para o isolamento a partir do gel de agarose foi utilizado o QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, USA) e para os produtos de PCR que só apresentavam o amplicon de interesse foi utilizado o QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, USA), conforme instruções dos fabricantes.

O DNA obtido foi analisado novamente em gel de agarose a 0.8% (p/v), de maneira idêntica à descrita anteriormente.

4.15 Reação de seqüenciamento

Após a extração dos fragmentos amplificados do gel de agarose ou da purificação dos produtos de PCR, estes foram utilizados para a reação de seqüenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano - USP, com o ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems,

USA). As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. As seqüências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

4.16 Análise das seqüências.

As seqüências obtidas foram analisadas empregando a ferramenta tblastx encontrada no programa do National Center for Biotechnology Information (NCBI), buscando o resultado de alinhamento com o gene *phaC* das diferentes classes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Recuperação e viabilidade da Biblioteca Metagenômica.

Durante o processo de subcultivo e recuperação para a avaliação da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica, foi observada visualmente uma diferença importante no desenvolvimento dos clones, pois nas placas originais os clones apresentavam sedimentação; assim, se acreditava que iriam apresentar um bom desenvolvimento no novo cultivo, o que, porém nem sempre ocorreu. Esta diferença pode ser atribuída a três fatores: o tempo que a biblioteca de solo de Mata Atlântica ficou armazenada a -80 ºC sem utilização, a existência de uma única cópia da biblioteca e à ausência de subcultivos periódicos para avaliar sua viabilidade, pois esta biblioteca foi construída em 2004 e só foi novamente subcultivada em 2009. Por outro lado, o congelamento a -80 ºC tem sido utilizado com sucesso para a preservação de bactérias por períodos relativamente longos (10 anos ou mais), o que depende das características de cada linhagem (Silva et al., 1992). Como resultado final, foram recuperados 3456 dos 5000 clones da biblioteca inicial. Para evitar a perda de mais clones foram geradas duas copias da biblioteca e armazenadas em freezer a -80 ºC, deixando uma delas como estoque fixo e a outra cópia foi designada para o desenvolvimento do presente trabalho. Cada vez que uma placa de trabalho é retirada, um subcultivo novo é feito, substituindo assim a placa retirada e confirmando a viabilidade dos clones.

5.2 Análise da diversidade de fragmentos.

A partir do gel de agarose a 0.6% (p/v) feito com as amostras de DNA plasmidial de 24 clones digeridos com a enzima de restrição *Hind III*, foram visualizados os diferentes tamanhos de fragmentos de DNA contidos na biblioteca metagenômica. Na Figura 6 é apresentado um perfil eletroforético no qual podem ser visualizados fragmentos de DNA com peso molecular aparentemente superior a 23 kb (caneleta 3) e fragmentos menores de até aproximadamente 1.3 kb (caneleta 16). Também podem ser visualizados clones sem insertos como aparece nas caneletas 8, 12 e 24 o que é de esperar devido ao processo de inserção de DNA no vetor de clonagem (*E. coli* DH10B). Em 23 dos 24 clones, pode ser visualizada um fragmento constante de aproximadamente 8 kb, correspondente ao plasmídio pBAC.

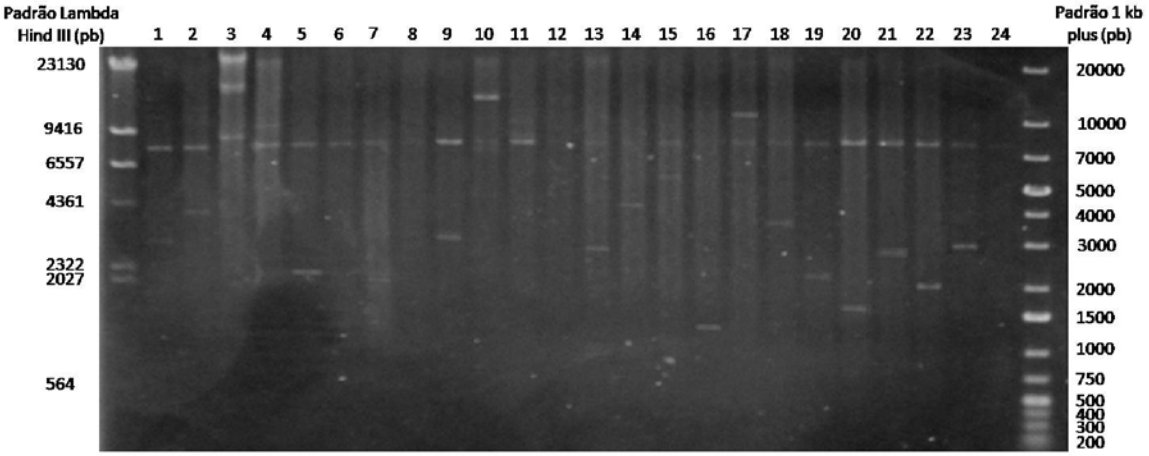


Figura 6 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.6% (p/v), mostrando nas 24 caneletas os diferentes tamanhos de DNA, obtidos da digestão do DNA dos clones da biblioteca metagenômica com enzima de restrição *HindIII* À esquerda do gel pode-se visualizar o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII* e à direita o marcador de peso molecular de 1kb plus (Fermentas).

Fonte: Galindo, 2011.

Ao analisar o gel acima apresentado, se pode visualizar e comparar o tamanho médio dos insertos da biblioteca metagenômica, como é apresentado a continuação na Tabela 3. Ao analisar o tamanho médio de inserto de 4767 pb dos 21 clones que apresentaram inserto e comparar com o tamanho médio de inserto maior do que 50 kb reportado por Massini, é observada uma ampla diferença; pois o maior tamanho de fragmento obtido na digestão destes 24 clones foi de aproximadamente 22000 pb (soma de dois fragmentos).

Tabela 3 - Tamanho médio de inserto de 24 clones da biblioteca metagenômica de Mata Atlântica selecionados ao acaso. Os fragmentos foram obtidos pela digestão do DNA plasmidial com a enzima *Hind III*.

Nº Clone	Tamanho aprox. de inserto (pb)	Nº Clone	Tamanho aprox. de inserto (pb)	Nº Clone	Tamanho aprox. de inserto (pb)
1	3000	**9**	3100	**17**	11000
2	4000	**10**	22000	**18**	3800
3	9400	**11**	10000	**19**	2100
4	2300	**12**	------	**20**	1600
5	2100	**13**	3000	**21**	2800
6	1300	**14**	4300	**22**	2000
7	2000	**15**	6000	**23**	3000
8	------	**16**	1300	**24**	------
Tamanho médio de Inserto			4767 pb		

Fonte: Galindo, 2011

Compara-se o tamanho de cada um dos genes *phaC* das diferentes classes de PHA sintase, tendo em mente que em média o tamanho dos genes é de 1300 pb e que os iniciadores relatados na literatura para detecção deste gene amplificam aproximadamente 570 pb, se sugere que é possível que nos insertos menores seja possível detectar os genes de interesse, assim como seria possível detectar o operon completo da biossíntese de PHA das diferentes classes que em média tem um tamanho de 4.8 kb, nos insertos maiores visualizados na biblioteca. Assim, os diferentes tamanhos de inserto contidos na biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica podem carregar fragmentos de interesse.

5.3 Triagem de genes phaC pela atividade fenotípica na biblioteca metagenômica.

A partir da triagem qualitativa empregando o corante lipofílico *Sudan Black B*, não foi encontrada nenhuma evidência que nos 3456 clones pertencentes à biblioteca metagenômica estivesse ativo um dos quatro genes para a PHA sintase e portanto tivesse a capacidade de produzir PHA, mesmo nas condições de acúmulo. Na Figura 7 são apresentadas duas figuras, sendo na parte A, uma placa de LBGC contendo os clones da placa 28 da biblioteca metagenômica com o corante *Sudan Black B*, na qual o controle positivo LFM 695 (*Ralstonia eutropha* PHB$^-$4 pBBR1MCS1::$phaCAB_{Re}$) apresenta uma coloração fortemente azulada e o controle negativo LFM 149 (*E. coli S17* pBBR1MCS1) apresenta uma coloração levemente azulada e um efeito visual de falta de acúmulo quando comparado com o controle positivo. Na parte B é apresentada a placa 28 sem adição do corante lipofílico, na qual se consegue visualizar claramente uma diferencia entre o crescimento do controle positivo e negativo após os 5 dias de cultivo. Na figura pode ser evidenciado que o controle positivo acumula PHA pela aparência opaca da colônia, sugerindo que é possível evidenciar o acúmulo sem necessidade do uso do corante. Como é apresentado na figura, pode-se evidenciar que nenhum dos clones apresenta características similares ao controle positivo, sugerindo assim a ausência de grânulos no interior das células. No anexo C são apresentados os clones das placas restantes da biblioteca metagenômica cultivadas nas mesmas condições dos clones da placa 28, sem a adição do corante *Sudan Black B*, nas quais se pode evidenciar a ausência de colônias opacas o que indica a ausência de clones positivos para o acúmulo de PHA.

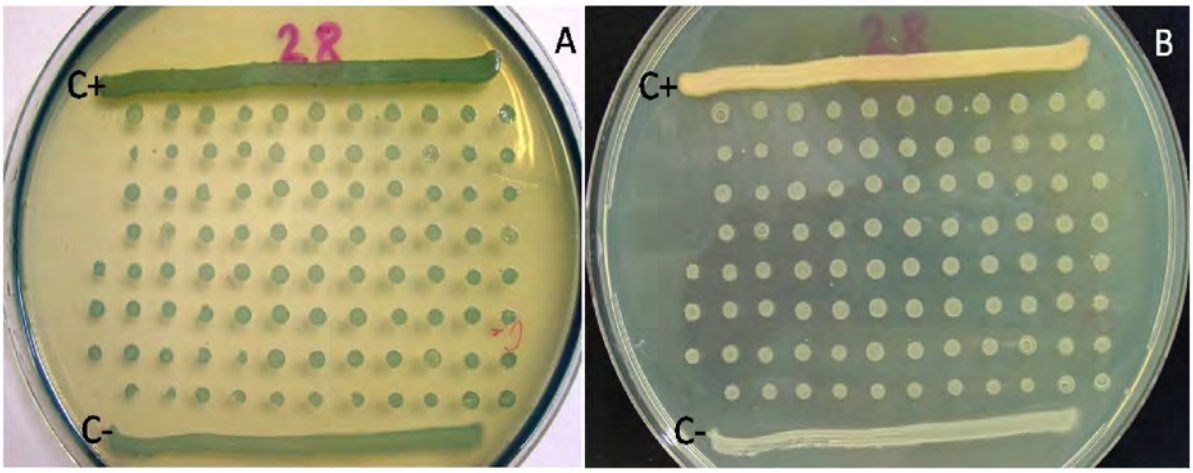


Figura 7 - Test fenotípico para o acúmulo de grânulos intracelulares de PHA, sendo A o cultivo em meio LBGC da placa 28 da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica empregando o corante lipofílico *Sudan Black B,* objetivando a detecção de clones positivo (azuis) para a produção de PHA. Na parte B, é apresentada a mesma placa sem adição do corante lipofílico, onde se pode evidenciar o acúmulo de PHA do controle positivo pela opacidade da colônia, sendo comparado com a ausência de colônias positivas para o acúmulo de PHA, devido à carência desta mesma característica, como acontece com o controle negativo.

Fonte: Galindo, 2011

Os resultados anteriores possivelmente se apresentaram pela impossibilidade de sintetizar polímero pela linhagem *E. coli* recombinante na ausência dos genes *phaA* e *phaB*, mesmo contendo o gene *phaC,* como relatado na literatura por Slater et al., (1988). Os autores mencionados anteriormente fizeram varias construções em *E. coli* DH5α, testando a presença só do gene *phaC* de *Ralstonia eutropha*, assim como contendo o operon inteiro da síntese de PHA, obtendo como resultado que só na presença dos três genes é possível que a linhagem recombinante produza PHA. Para que a *E. coli* recombinante contendo os gene da PHA sintase do tipo II possa produzir polímero são necessários diferentes genes e somente é produzido em circunstâncias muito particulares (Li et al., 2007). Desetty e colaboradores (2008) clonaram e analisaram o operon inteiro da biossíntese de PHA de *Bacillus thuringiensis* em *E.coli*, conferindo assim a capacidade de produzir PHA. No entanto, *E. coli* abrigando os genes *phaP*, *phaQ*, *phaR*, *phaB* e *phaC* teve uma produção de PHA muito baixa. Quando os autores complementam a linhagem recombinante com o gene *phaA* de *Ralstonia eutropha* aumentando a produção de PHA em *E. coli* recombinante aumentou de 3,0 % para 24 % da massa seca celular. Tomizawa e colaboradores (2011) clonaram o gene *phaC* de *Bacillus megaterium* NBRC15308 e de *Bacillus cereus* YB-4 em *E. coli* JM109, observando que o peso molecular do P(3HB) tinha uma diminuição com o aumento do tempo da cultura. A partir do mencionado acima, os resultados obtidos na triagem de genes *phaC* pela atividade fenotípica na biblioteca metagenômica foram os esperados pela incapacidade

da linhagem *E. coli* recombinante de produzir PHA mesmo contendo os genes da PHA sintase, como apresentado na literatura pelos autores.

5.4 Teste de Sensibilidade da técnica de PCR para triagem de genes phaC em biblioteca metagenômica.

O presente teste foi feito com o objetivo de detectar genes específicos em amostras com misturas de DNA como as bibliotecas metagenômicas e assim confirmar que a técnica de PCR a ser empregada na pesquisa era a adequada para a detecção dos genes de interesse, obtendo assim a concentração mínima de DNA necessária para gerar um amplicon alvo em misturas de DNA.

O DNA genômico e plasmidial utilizados como contaminantes foram detectados pela técnica até uma concentração de 10^{-3}ng/µL como se mostra na Figura 8 e Figura 9. Nas figuras, se pode visualizar a diminuição da intensidade do amplicon conforme o DNA vai sendo diluído. Nas penúltimas canaletas das figuras, pode-se visualizar o DNA genômico de *Bacillus megaterium* M.A. 3.3 (1220 ng/µL) e o DNA plasmidial do pBHR71 (1294 ng/µL), sem diluição da concentração inicial. Na última canaleta das duas figuras, foi colocado um controle negativo, para a detecção de contaminantes que apresentassem possíveis falsos positivos.

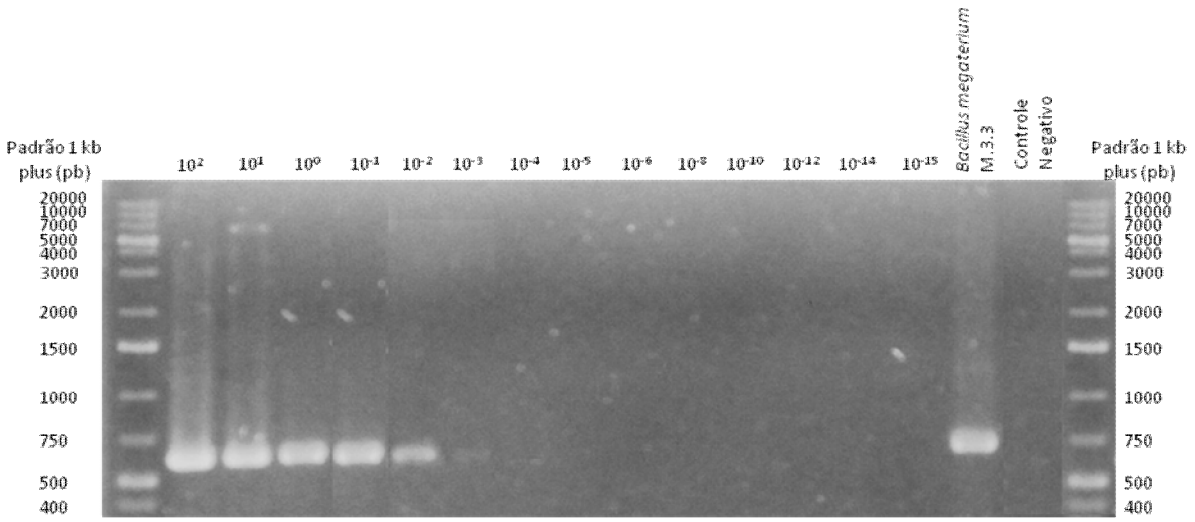


Figura 8 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando a sensibilidade da técnica de PCR para detectar a concentração mínima em ng/µL do gene da PHA sintase do tipo IV de *Bacillus megaterium* M.A 3.3 utilizando os iniciadores B1F/B1R na reação de PCR. A concentração mínima detectada pela técnica é de 0.001 ng/µL. Nos extremos do gel se pode visualizar o marcador de peso molecular de DNA de 1 kb plus (Fermentas).

Fonte: Galindo, 2011

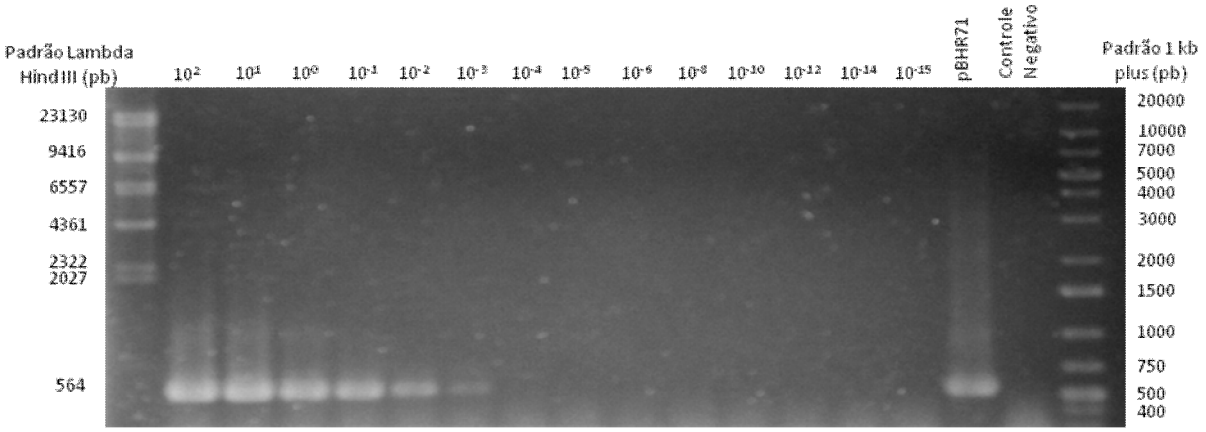


Figura 9 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando a sensibilidade da técnica de PCR para detectar a concentração mínima do gene em ng/µL da PHA sintase do tipo II no plasmídio pBHR71 utilizando os iniciadores I-179L(a)/I-179R(a) na reação de PCR. A concentração mínima detectada pela técnica é de 0.001 ng/µL. À esquerda do gel pode-se visualizar o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII* e à direita o marcador de peso molecular de 1kb plus (Fermentas).

Fonte: Galindo, 2011

Os DNA contaminantes na concentração de 100 ng/µL foram misturados com o DNA total (obtido de 96 clones da biblioteca) e o DNA total diluído. O resultado de amplificação mostrou que só se detectou a presença do DNA plasmidial contaminante (nas concentrações de 1000 ng/µL e 6000 ng/µL) até uma concentração de 10-2ng/µL (0.01 ng/µL) como é apresentado nas Figura 10 e Figura 11. Novamente, nas penúltimas colunas das figuras, pode-se visualizar o DNA do plasmídeo pBHR71 (1294 ng/µL), sem diluição da concentração inicial. Na última canaleta das duas figuras, foi colocado um controle negativo, para a detecção de contaminantes que apresentassem possíveis falsos positivos. O par de iniciadores I-179L(a)/I-179R(a) foi empregado na reação de teste de sensibilidade para o gene da PHA sintase tipo II no plasmídio pBHR71.

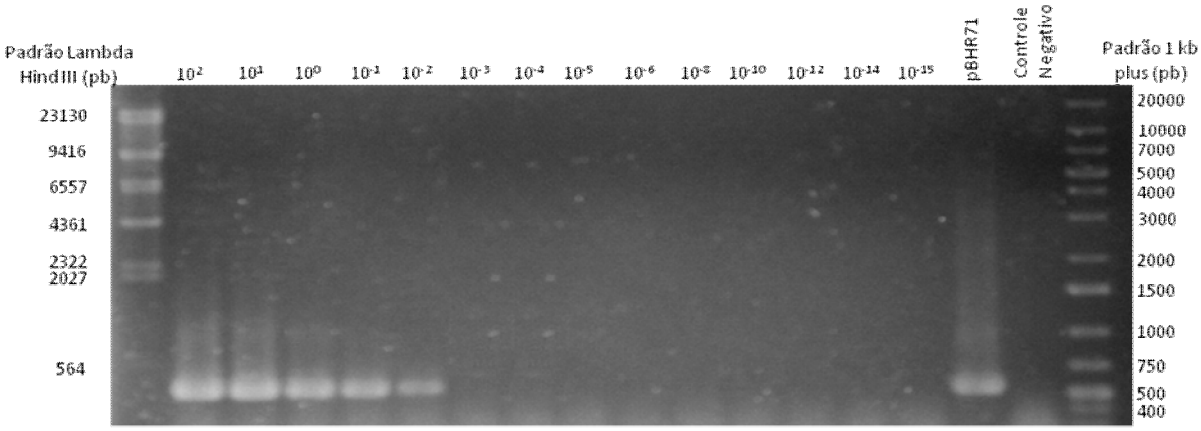


Figura 10 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando a sensibilidade da técnica de PCR para detectar a concentração mínima em ng/µL do gene da PHA sintase do tipo II do plasmídio pBHR71 quando adicionado a uma mistura de DNA de biblioteca metagenômica na concentração de ~1000 ng/µL. Foram empregados os iniciadores I-179L(a)/I-179R(a) na reação de PCR. A concentração mínima detectada pela técnica é de 0.01 ng/µL. À esquerda do gel pode-se visualizar o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII* e à direita o marcador de peso molecular de 1kb plus (Fermentas).

Fonte: Galindo, 2011

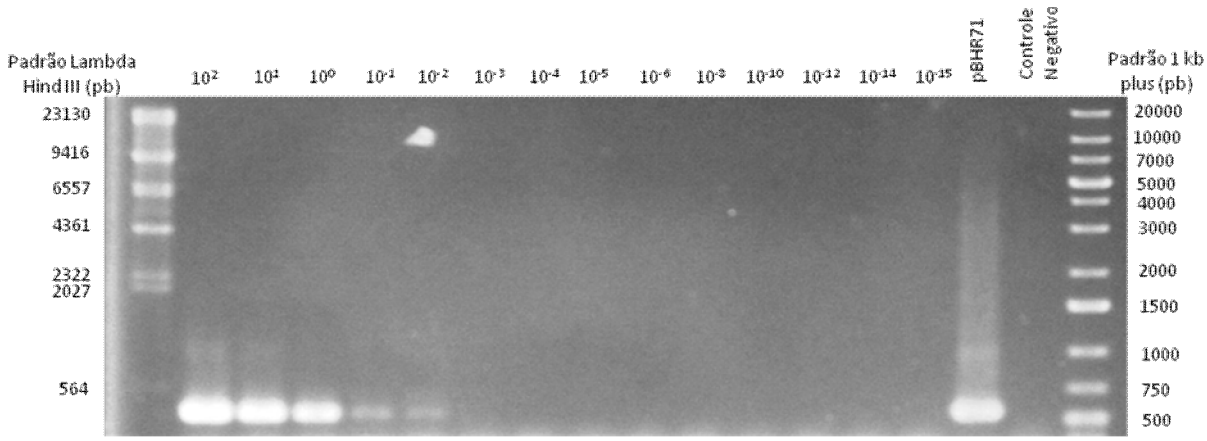


Figura 11 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando a sensibilidade da técnica de PCR para detectar a concentração mínima em ng/µL do gene da PHA sintase do tipo II do plasmídio pBHR71 quando adicionado a uma mistura de DNA de biblioteca metagenômica na concentração de 6000 ng/µL. Foram empregados os iniciadores I-179L(a)/I-179R(a) na reação de PCR. A concentração mínima detectada pela técnica é de 0.01 ng/µL. À esquerda do gel pode-se visualizar o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII* e à direita o marcador de peso molecular de 1kb plus (Fermentas).

Fonte: Galindo, 2011

Quanto ao DNA genômico, a técnica de PCR só conseguiu detectar a presença do gene de interesse (nas concentrações de 1000 ng/µL e 6000 ng/µL) até uma concentração de 10^1 ng/µL (10 ng/µL). Como é apresentado nas condições testadas, não foi possível confirmar que somente uma cópia do DNA possa ser detectada pela técnica de PCR em uma mistura de DNA, sugerindo que para triagem de bibliotecas metagenômicas pode ser necessário uma

quantidade maior do gene desejado junto ao DNA total da amostra. Na Figura 12 e Figura 13 são apresentados os resultados mencionados acima.

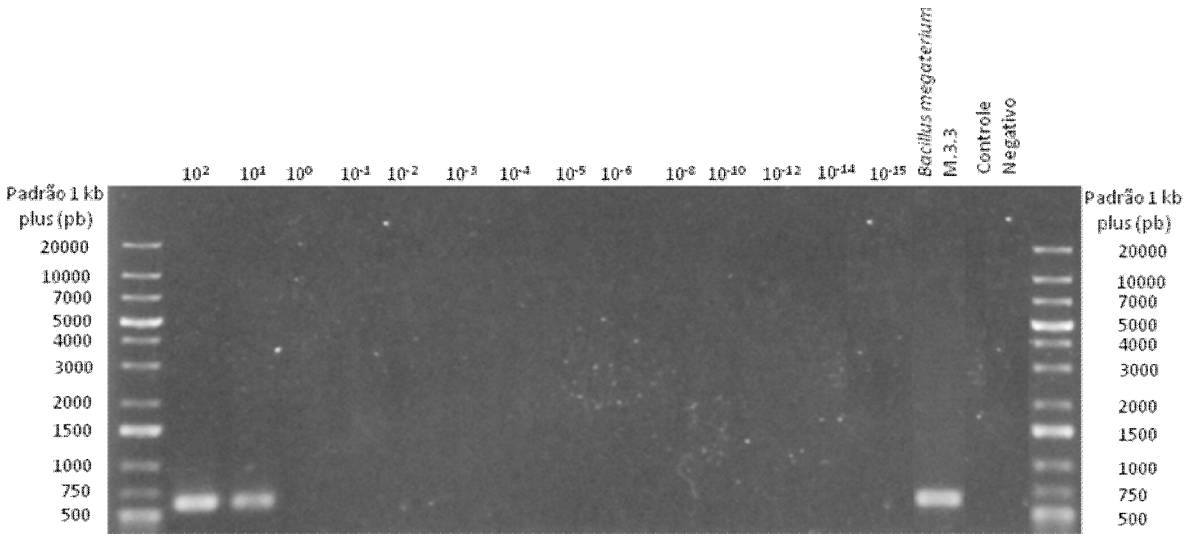


Figura 12 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando a sensibilidade da técnica de PCR para detectar a concentração mínima em ng/µL do gene da PHA sintase do tipo IV de *Bacillus megaterium* M.A 3.3, em uma mistura de DNA de 96 clones de uma biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica com concentração de 1000 ng/µL utilizando os iniciadores B1F/B1R na reação de PCR. A concentração mínima detectada pela técnica é de 10 ng/µL. Nos extremos do gel se pode visualizar o marcador de peso molecular de DNA de 1 kb plus (Fermentas).

Fonte: Galindo, 2011

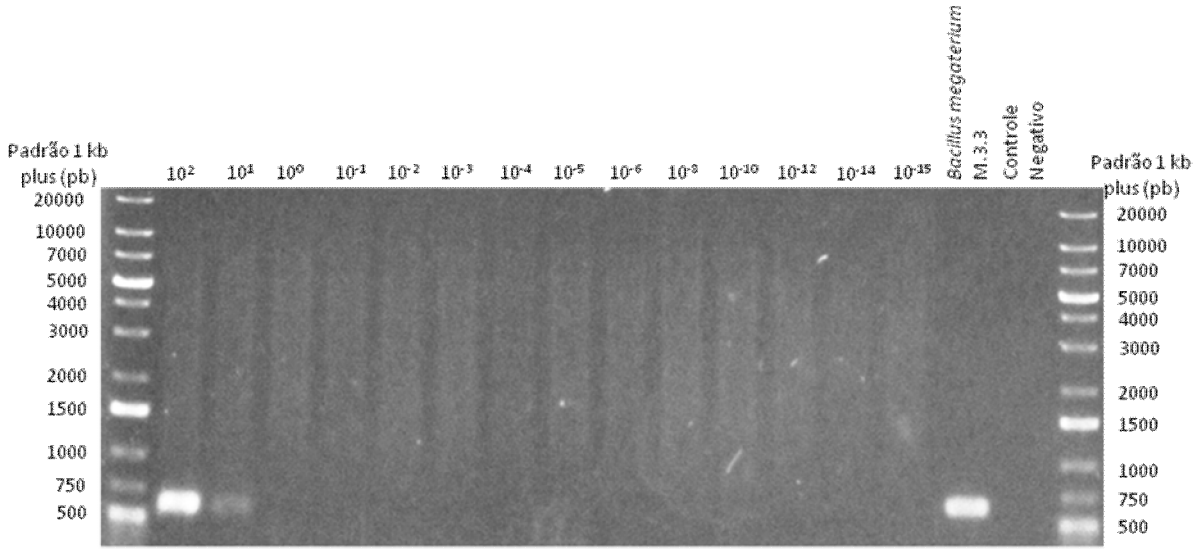


Figura 13 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando a sensibilidade da técnica de PCR para detectar a concentração mínima em ng/µL do gene da PHA sintase do tipo IV de *Bacillus megaterium* M.A 3.3, em uma mistura de DNA de 96 clones de uma biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica com concentração de 5000 ng/µL, utilizando os iniciadores B1F/B1R na reação de PCR. A concentração mínima detectada pela técnica é de 10 ng/µL. Nos extremos do gel se pode visualizar o marcador de peso molecular de DNA de 1 kb plus (Fermentas).

Fonte: Galindo, 2011

De acordo com os resultados observados quando realizado o teste de sensibilidade para a técnica de PCR, se pode concluir que, em uma mistura de DNA plasmidial de 96 clones de uma biblioteca metagenômica de Solo de Mata Atlântica, com concentração de aproximadamente 1000 ng/ µL, são necessários 0.01 ng/µL dos genes *phaC* das diferentes classes de PHA sintase para serem detectados pela técnica de PCR. Este valor é concluído tendo em mente que no presente trabalho são empregadas extrações de DNA plasmidial e não genômico.

5.5 Controle dos oligonucleotídeos.

Os oligonucleotídeos empregados no presente estudo foram desenhados pelos diferentes autores a partir de seqüências de regiões conservadas do gene *phaC*. Estes pares de iniciadores foram desenhados visando à identificação dos genes da PHA sintase e para detectar novos organismos produtores de PHA (Solaiman, Ashby, 2005), e não para triagem de bibliotecas metagenômicas.

Os oligonucleotídeos descritos na literatura para os quatro tipos propostos de PHA sintase são:

- phaCF1/phaCR4 (Sheu et al., 2000), conjunto utilizado na prospecção de enzima PHA sintase de classe I e II;
- I-179L(a)/ I-179R(a) (Solaiman et al., 2000; Solaiman, 2002), par de oligonucleotídeos empregados na prospecção de enzimas de classe II;
- I-179L(a)/DEV15R ou I-179R(a)/ DEV15L (Solaiman, 2002) são oligonucleotídeos descritos pelo autor como iniciadores que permitem fazer um protocolo de semi-nested PCR na detecção do gene da enzima PHA sintase de classe II, pois esta técnica melhora a especificidade e a eficiência da reação, amplificado os fragmentos de interesse quando são empregadas as combinações acima mencionadas, primeiro de forma abrangente, ou seja amplifica os genes *phaZ* e o gene *phaC* 1 ou 2, e utilizando-se este primeiro produto, segue-se à amplificação da real seqüência-alvo utilizando os iniciadores I-179L(a)/ I-179R(a): *phaC1* ou *phaC2* garantindo um melhor resultado de amplificação e permitindo confirmar a presença do gene *phaZ*, flanqueado pelas *phaC* 1 e 2, como apresentado na Figura 14.

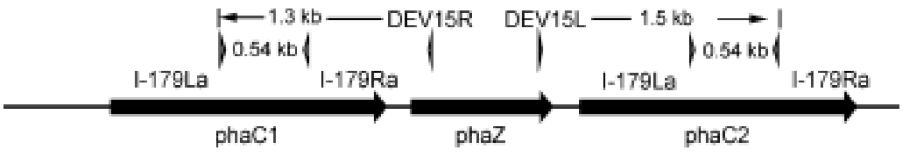


Figura 14 - Regiões flanqueadas pelos iniciadores utilizados na detecção de PHA sintase da classe II.

Fonte: Solaiman, Ashby, 2005.

- Haphapcr1/Haphapcr2 (Hai et al., 2001) e P1/P2 (Hai et al., 2004) são um conjunto de oligonucleotídeos utilizados na prospecção de genes codificadores de enzimas de classe III;
- B1F/B1R (Shamala et al., 2003) são iniciadores empregados na prospecção de genes codificadores de enzimas de classe IV.

Para comprovar a ausência de DNA contaminante nos oligonucleotídeos, foi feita uma reação de PCR sem material genético, a qual apresentou ausência de amplicons para cada par de iniciadores testado, o que era esperado. O resultado pode ser observado na Figura 15.

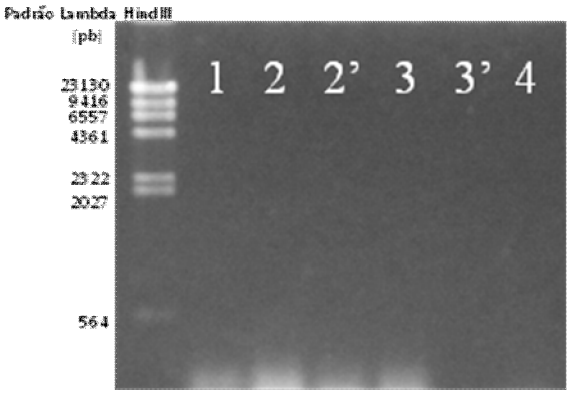


Figura 15 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando ausência de amplicons obtidos em reações de PCR quando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase são testados sem DNA molde. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*; Coluna 1: iniciadores phaCF1/phaCR4; Coluna 2: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); Coluna 2': iniciadores I-179L(a)/DEV15R; Coluna 3: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; Coluna 3': iniciadores P1/P2 e Coluna 4: iniciadores B1F/B1R.

Fonte: Galindo, 2011

Para a confirmação do funcionamento dos conjuntos de oligos previamente descritos, foi realizado o teste dos oligos com as linhagens controle, antes de realizar a triagem de genes *phaC* na biblioteca metagenômica, como descrito nos materiais e métodos. Quando o DNA plasmidial do pBAC/oriV sem inserto e o DNA genômico da *E. coli* DH10B foi testado com respeito aos pares de iniciadores phaCF1/phaCR4 (1), I-179L(a)/I-179R(a) (2), I-179L(a)/DEV15R (2'), Haphapcr1/Haphapcr2 (3), P1/P2 (3') e B1F/B1R (4) (Figura 16 e

Figura 17, respectivamente) não foram observados amplicons para nenhum dos iniciadores. Estes resultados eram esperados, pois para o plasmídeo pBAC/oriV nem a linhagem *E. coli* DH10B tem relatado na literatura a presença de genes *phaC*.

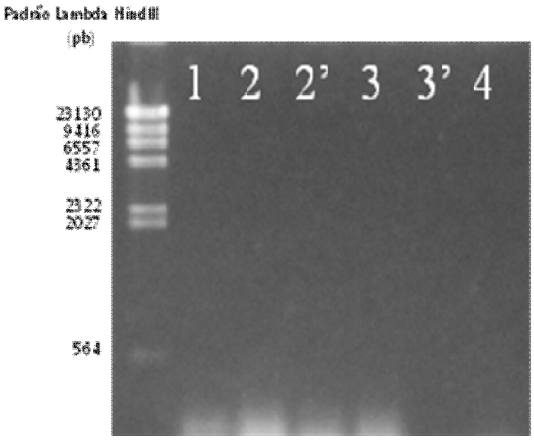


Figura 16 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando ausência de amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase quando testado com o DNA do plasmídeo pBAC/oriV sem inserto. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com *HindIII*; *Coluna 1:* pBAC/oriV com iniciadores phaCF1/phaCR4; *Coluna 2:* pBAC oriV com iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *Coluna 2':* pBAC/oriV com os iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *Coluna 3:* pBAC/oriV com os iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *Coluna 3':* pBAC oriV com os iniciadores P1/P2; *Coluna 4:* pBAC/oriV com os iniciadores B1F/B1R.

Fonte: Galindo, 2011

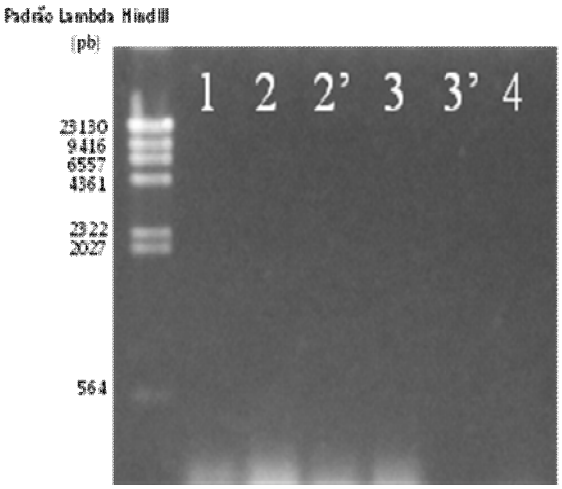


Figura 17 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando ausência de amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase quando testados com o DNA genômico da *E. coli* DH10B. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*; *Coluna 1*: *E. coli* DH10B com iniciadores phaCF1/phaCR4; *Coluna 2*: *E. coli* DH10B com iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *Coluna 2'*: *E. coli* DH10B com os iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *Coluna 3*: *E. coli* DH10B com os iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *Coluna 3'*: *E. coli* DH10B com os iniciadores P1/P2; *Coluna 4*: *E. coli* DH10B com os iniciadores B1F/B1R.

Fonte: Galindo, 2011

Como pode ser observado na Figura 18, quando o DNA plasmidial do pJM9131(Kidwell *et al.* 1995) é testado com o par de iniciadores phaCF1/phaCR4 gera um amplicon de aproximadamente 500 pb, o qual era esperado pois ele abriga o operon de biossíntese de P3HB de *R. eutropha*. A ausência de amplicons quando testados os iniciadores das outras 3 classes de PHA sintase, se pode explicar pois ao comparar 59 PHA sintases de várias bactérias Schubert et al., 1991 e Rehm et al., 2002 observaram que essas enzimas apresentam forte semelhança na região C-terminal (8-96% aminoácidos idênticos), enquanto a porção N-terminal é altamente variável é essencial para a funcionalidade enzimática, confirmando que um dos iniciadores desenhados pelos pesquisadores se encontra a região N-terminal, impossibilitando gerar amplicons quando testados para o DNA do plasmídeo pJM9131.

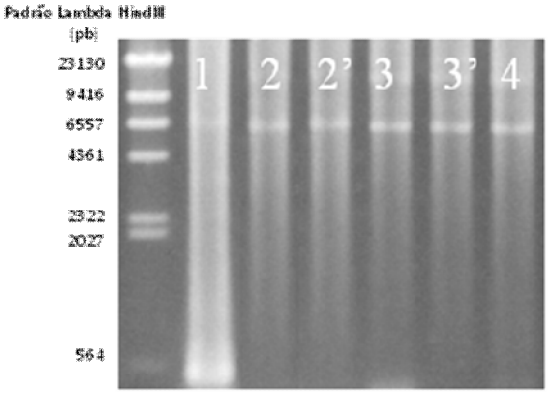


Figura 18 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando o amplicon obtido na reação de PCR utilizando como DNA molde o plasmídio pJM9131, testando os iniciadores phaCF1/phaCR4 para detecção de genes de PHA sintase tipo I (*Coluna 1*). À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*; *Coluna 2*: pJM9131 com iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *Coluna 2'*: pJM9131 com os iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *Coluna 3*: pJM9131 com os iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *Coluna 3'*: pJM9131 com os iniciadores P1/P2; *Coluna 4*: pJM9131 com os iniciadores B1F/B1R.

Fonte: Galindo, 2011

Quando o DNA plasmidial do plasmídeo pBHR71 (Langenbach *et al.* 1997), que abriga o gene *phaC1* de *Pseudomonas aeruginosa*, foi testado com todos os pares de iniciadores phaCF1/phaCR4 e I-179L(a)/I-179R(a), foram obtidos amplicons de aproximadamente 500 e 540 pb respectivamente, como mostrado na Figura 19, o que era esperado pois o par de iniciadores para a classe 1 da PHA sintase, foram desenhados por Sheu *et al.*(2000), a partir do alinhamento de seqüências da classe I e II do gene *phaC*. A ausência de amplicons para o par de oligonucleotídeos I-179L(a)/DEV15R que também é relatado para PHA sintase do tipo II, apresentou o resultado esperado, pois o plasmídio empregado como controle só contém o

gene *phaC1*. Para que tivesse se apresentado um amplicon, o gene *phaZ* necessariamente deveria estar presente no DNA plasmidial, onde o iniciador DEV15R anelaria.

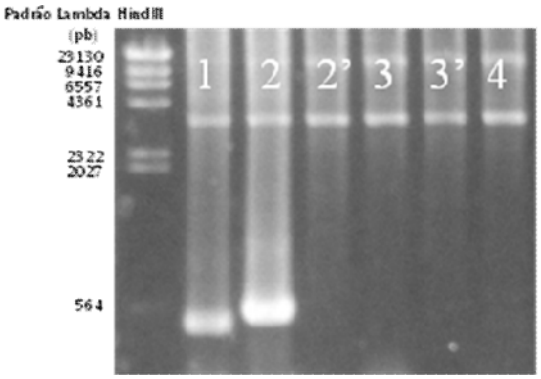


Figura 19 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando os amplicons obtido nas reações de PCR utilizando os iniciadores phaCF1/phaCR4 (*Coluna 1*) e I-179L(a)/I-179R(a) (*Coluna 2)* para detecção de genes de PHA sintase tipo I e II respectivamente quando testado com o DNA plasmidial do pBHR71. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*; *Coluna 2'*: pBHR71 com os iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *Coluna 3*: pBHR71 com os iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *Coluna 3'*: pBHR71 com os iniciadores P1/P2; *Coluna 4*: pBHR71 com os iniciadores B1F/B1R.

Fonte: Galindo, 2011

Na Figura 20, pode-se observar a presença de um amplicon de aproximadamente 590 pb quando o DNA genômico do *Bacillus megaterium.* M.A. 3.3 foi testado com o par de iniciadores B1F/B1R. Ao serem testados os outros iniciadores com o DNA genômico não foram observados amplicons. Este par de iniciadores é o único que não contém degenerações, assim espera-se que gere um dos resultados mais confiáveis para a PHA sintase do tipo IV.

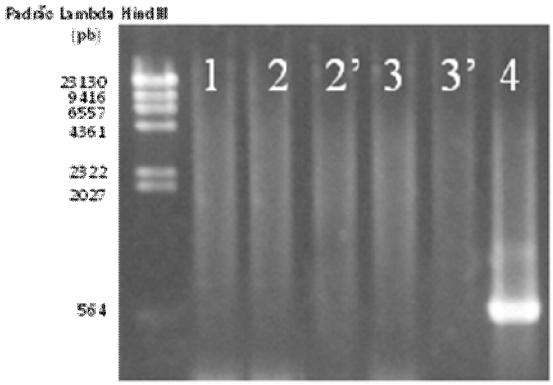


Figura 20 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando o amplicon obtido na reação de PCR utilizando os iniciadores B1F/B1R para detecção de genes de PHA sintase tipo IV (*Coluna 4*) quando testado com o DNA genômico de *Bacillus* M.A. 3.3. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*; *Coluna 1: Bacillus* M.A. 3.3 com iniciadores phaCF1/phaCR4; *Coluna 2*: *Bacillus* M.A. 3.3 com iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *Coluna 2'*: *Bacillus* M.A. 3.3 com os iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *Coluna 3*: *Bacillus* M.A. 3.3 com os iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2 e *Coluna 3'*: *Bacillus* M.A. 3.3 com os iniciadores P1/P2.

Fonte: Galindo, 2011

5.6 Triagem do gene phaC na biblioteca metagenômica.

A seguir são apresentados os resultados obtidos da triagem primária de cada uma das placas da biblioteca metagenômica como é mostrado no anexo D. Cada uma das placas foi dividida em 4 extrações como é apresentado na Figura 21 (assim como no anexo D), sendo T a extração em conjunto dos 96 clones de cada placa, as linhas 1-4, 5-8 e 9-12, correspondem à extração do conjunto de clones correspondente a cada uma das frações da placa. Os números indicam o par de oligonucleotídeos empregados na reação sendo: *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.

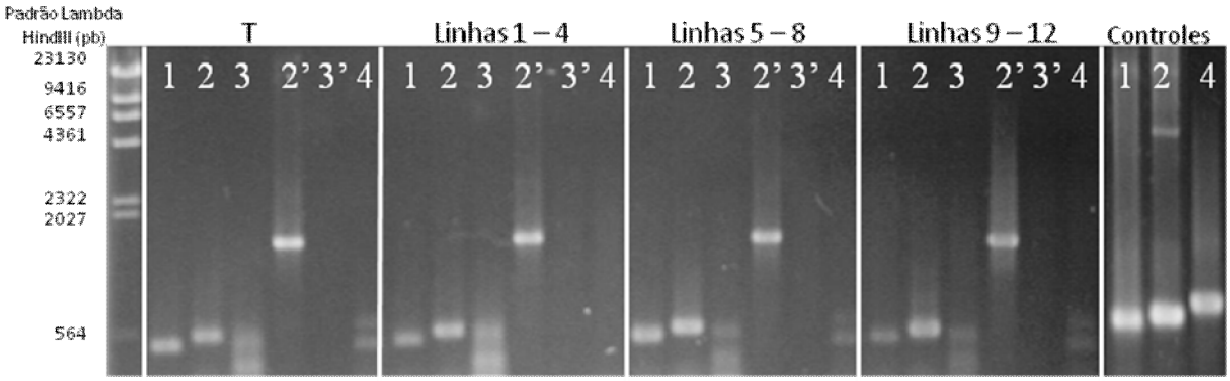


Figura 21 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da PLACA 38 da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 38; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os microrganismos controle para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras, sendo empregados na linha 1: iniciadores phaCF1/phaCR4; 2: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); 2': iniciadores I-179L(a)/DEV15R; 3: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; 3': iniciadores P1/P2 e 4: iniciadores B1F/B1R.

Fonte: Galindo, 2011

O conjunto de oligonucleotídeos phaCF1/phaCR4, I-179L(a)/I-179R(a), I-179L(a)/DEV15R, Haphapcr1/Haphapcr2, P1/P2 e B1F/B1R empregados no presente estudo, mostraram-se eficientes na amplificação parcial do gene *phaC* quando utilizados na triagem da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica, como é mostrado no Anexo D. Os fragmentos de DNA amplificados por estes conjuntos de iniciadores foram comparados visualmente com o padrão Lambda Hind*III* e os conjuntos de amplicons apresentaram tamanhos compatíveis com os relatados pelos autores na literatura (Ver Tabela 2 no item 4.8.2.3).

Ao finalizar a etapa de screening primário, pode-se observar que a metodologia empregada foi adequada, pois se só tivesse sido feita a extração de DNA plasmidial da placa total, muitos clones não teriam sido detectados como foi observado na maioria dos géis de agarose apresentados no anexo D.

Ao comparar a quantidade de clones encontrados na biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica com outros estudos realizados em diferentes ambientes nos quais são procuradas diversas enzimas de interesse industrial e medicinal (Voget et al., 2003; Rees et al., 2003; Elend et al., 2006; Kim et al., 2006; Li et al., 2009; Massini, 2009), foi observado que, dependendo das condições do ambiente estudado, é encontrados um maior número de clones positivos para o gene de interesse, independentemente do número de clones, sugerindo que não existe uma proporção direta entre o tamanho da biblioteca e o número de clones positivos, um exemplo é o trabalho de Rees et al.,(2003), no qual foram encontrados 4 clones positivos para celulases de um total de 114000 clones analisados a partir de uma biblioteca metagenômica de amostras de água de um lago localizado no oeste da África. Na amostra de solo de Mata Atlântica, a partir da qual foi construída a biblioteca metagenômica e pelos resultados obtidos, confirma-se que é um ambiente rico em matéria orgânica que permite aos microrganismos que habitam este ambiente acumular reservas de carbono em forma de grânulos de PHA, já que pode ser observada uma grande diversidade de genes *phaC* neste estudo, dos quais pode existir uma porcentagem ainda não conhecida e um alvo importante a ser estudado.

Outro aspecto muito importante na triagem de bibliotecas metagenômicas e pelo qual consideramos que foi encontrado um importante número de clones positivos para a enzima PHA sintase, é o uso da técnica de PCR empregada no presente estudo. Daniel (2005) e Sharma et al., (2008) mencionam em seus trabalhos as diferentes técnicas usadas na triagem de bibliotecas metagenômicas, explicando que ao realizar uma análise baseada na seqüência do gene de interesse é melhor realizar a triagem empregando a técnica de PCR, porque esta é uma técnica rápida e mais sensível que a técnica de hibridização por sonda ou que técnicas baseadas na atividade do gene de interesse.

Para resumir melhor os resultados obtidos em todas as placas, na Tabela 4 são apresentados os resultados em forma de presença ou ausência de amplicons para cada uma das classes de PHA sintase, independente da localização em determinada extração. Embora a avaliação da Tabela 4 seja animadora, o surgimento de sinais positivos para mais de um gene

em uma mesma placa poderia indicar contaminação durante o procedimento, razão pela qual, retomou-se a biblioteca original e foi feita a lise celular de cada um dos clones (item 4.11) isoladamente em tubos vedados e posterior amplificação.

Tabela 4 - Resumo dos resultados obtidos no screening primário da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica empregando a técnica de PCR. Os xis indicam a presença de amplicons para esta classe de PHA sintase em cada placa avaliada.

PLACA	CLASSE I (1)	CLASSE II (2)	CLASSE II (2')	CLASSE III (3)	CLASSE III (3')	CLASSE IV (4)
1			X	X		X
2			X	X		
3		X	X	X		X
4		X	X	X		X
5		X	X	X		X
6		X		X		X
7			X			X
8		X				X
9	X	X		X		X
10			X			X
11						X
12		X				X
13						X
14						
15		X				
16		X		X		X
17		X				X
18		X				X
19		X				X
20		X		X		X
21	X	X				X
22				X		X
23	X	X		X		X
24	X	X		X		X
25	X	X				X
26	X	X		X		X
27	X	X				X
28	X	X				X
29		X				X
30		X	X	X		X
31		X	X	X		X
34		X	X			X
37		X			X	X
38	X	X	X	X		X
39		X	X	X		X
40		X	X	X		X

Outro aspecto a ser analisado foi o elevado número de sinais positivos para o gene *phaC* de classe IV, o que poderia ser justificado pelo fato de ser o único par de iniciadores sem degenerações e desenhado a partir da seqüência de *Bacillus megaterium*. Este par de iniciadores posteriormente foi testado com outros microrganismos pertencentes ao mesmo gênero, apresentando, para algumas espécies, o amplicon esperado com exceção do *Bacillus cereus*, pelo que foi sugerida uma subdivisão da classe IV (Solaiman, Ashby, 2005). O elevado número de sinais positivos para esta classe de PHA sintase pode simplesmente ser uma confirmação de que o solo é um dos maiores reservatórios do gênero *Bacillus*.

O uso destes oligos, em conjunto, aplicados à busca de genes *phaC* em bibliotecas metagenômicas foi reportado somente por Dimitrov (2009), mesmo assim o PCR com esses oligos só foi empregado em uma segunda etapa. Neste trabalho, foi realizada uma triagem de 3 bibliotecas metagenômicas de diferentes amostras de solo, com um total de aproximadamente 20.000 clones empregando a técnica de hibridização com sondas. Como resultado prévio desta pesquisa, foram obtidos 14 clones positivos para as classes I ou II de PHA sintase. Nestes clones, foi feita uma posterior confirmação por técnica de PCR empregando os mesmos oligonucleotídeos, tendo sido obtidos apenas cinco clones que possuíam o gene *phaC* no fragmento de DNA clonado. O autor não apresenta nem compara a similaridade das seqüências com as classes de PHA sintases descritas nos bancos de dados, o que impossibilita identificar se eram possíveis "novas" PHA sintases. A partir destes resultados, o autor considerou que o restante dos clones poderiam ser falsos positivos. Assim mesmo, ele menciona que os falsos positivos poderiam ser obtidos devido à ocorrência de algum tipo de amplificação inespecífica durante a confecção das sondas. Outra justificativa foi que outras porções de DNA, não necessariamente correspondentes ao gene *phaC,* podem ter sido amplificadas de forma inespecífica no preparo da sonda levando a erro durante os procedimentos de hibridização (Dimitrov, 2009).

5.7 Seqüenciamento e análise das seqüências.

Sete dos amplicons obtidos no screening primário da biblioteca metagenômica, foram purificados e seqüenciados para avaliar a confirmação de similaridade com a seqüência do gene *phaC* e a que classe estes pertenciam.

Uma vez que, para cada uma das reações apresentadas não foi realizada a reação de seqüenciamento com o outro iniciador, não foi possível corrigir as seqüências. Os resultados obtidos são apresentados a seguir:

- ***Amostra Placa 5 T***

> Iniciador B1F

GGGAAGGTGCTCCATAGCTTATTTCTCCCWTGCCGAAATGAGGASACCACACATCTAAATCTCCTSACCTGTTTG
GTAGGGCCTACTGCCGGGWGGCACCATGAATCTCTCTTCGATGGCTAATTGAACACWTGCCGATTACAACTTCTT
TTTATGACRGTCCMTTTGATTTCTCGRATACGGGTTTATACGGGGCATTCCCGACSATCGCTACTTTAATTMAGA
TAAAGCACTAGATACTTTGGAAAYATCCCTCCWGAGATGATTGACTTTTGAAACAGATGTTAAAGCCAATCACWA
ATTTCTACGGTCCATATGTAACATTGGTGGATCGTTCGGAAAATCASCSTTTTGTTGAAAGTTGGAAGCTCTTGC
AAAAGTGGGCTGCTGACGGCATCCCWTTYGCTGGTGAAGCTTATCTTTGTGTATTCSTGACYCCMTCCACCAAAC
AAATTAAYAGGGGYGAACTTGC

Assim, a seqüência obtida foi analisada pelo programa tblastx encontrado na pagina do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/). A seqüência de aminoácidos obtida (QMLKPITNFYGPYVTLVDRSENXXFVESWKLLQKWAADGIPFAGEAY) apresentou como resultado final 89 % de identidade e 94 % de similaridade com a subunidade do gene phaC da PHA sintase de Bacillus megaterium QM B1551.

- ***Amostra Placa 5 Linha 9-12.***

> Iniciador I-179 L(a)

TMRWGWMMAAAKCTYGSWSMWGRAAMCAMCACMACAMCAMCWKGMRGACCTYCATCKYCAGTTGGCGCAACCCGA
CCAAGTCGCAKCGCGAATGGGGCCTGACCACCTATATCGAGGCGCTCAAGGAGGCCATCGAGGTAGTCCTGTCGA
TCACCGGCAGCMAARACCTCAACCTCCTCGGCGCCTGCTCCGGCGGGATCACCACSGCSACCCTGGTCGGCCACT
ACSTGGCCMGCGGSSAGAAGAASGWCAACGCCTTCRCCCMACTGGTGAGCGTGCTCSACTTCRAACTGAATACCC
RSGYCGCGCTGTTCKCCGACGASAAGACTCTGGAGGCCGCCAASMGKCGCTCCTACCASTCCGGCGTGSTGSAGG
GCAAGGACATGRTCRAGGTGTTCKCCTGGATGCKCCCCACCRACKTGATGTGGAACTACTGSTGKAACAACTACY
TGCTGSGCRACCAGCCGCCGGCGTTCTWCATCMTCTACTGSAGSAACRACRACACCACMA

A seqüência mencionada anteriormente também foi analisada pelo programa tblastx, obtendo como resultado uma seqüencia de aminoácidos (TXIXSWRNPTKSXREWGLTTYIEALKEAIEVVLSITGSXBLNLLGACSGGITTATLVGHYXAXGZKX XNAFXXLVSVLXFXLNTXXALFXDXKTLEAAXXRSYXSGVXZGKDMXXVFXWMXPTBXMWNYXXNNYL LXBQPPAFXIJYXXNBBT) com similaridade de 78 % e identidade de 73% para o gene *phaC*1 envolvido na síntese de PHA, referente a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* M18.

- ***Amostra Placa 10 T***

> Iniciador B1R

CCAGACAWCAACTGRCGGAAGCTGGKCGYTGCAATATGCRTGTWACGCTGGCAGATGAGCGGCACTATGCTTGTG
CCACGGTAATTATTGAAAGTTAAAAATAATACCGTTCTCTTTAAAAAGTAAAACCCCCGAACTGGTAAGGAACGG
GGGTTTTACTTTTTAACTTTAATTTTGTGCAGCATGCACCCTCWACAACARCGATTATGGATCAGTGTACTTATC

TTTTACAAGCAACTTGCAATCTTTAGCATAAAAACTCGAGCCTTTACGAAGAAAGCAATATTGATGGAAAGATTA
ACGTGACCGCYAATTCGTAAGTACATTAAAATTGGCTTCGTTATTGAARATTTTGCTGTGCTTTACACCATGCCA
CAGAATTCCCCCATTGAAACGAGTGGTGTCTTCAAGCCCAGGAGTTATCGGTTTTTTTTTTTTTTGAWCCAAGA
ACARACAACTCGGGGGGTGGGGGGGGAGGCGMACCACCTTTTTCSYCKCTTTAGGAATATAATCCACAATATAAT
CATCTARSTTCATAKTGCTGYSTTCAAGCCCAGGAGWTAG

Assim, a seqüencia obtida foi analisada pelo programa tblastx, na qual foram obtidos dos resultados importantes. Numa primeira abordagem, foi obtida uma seqüencia de aminoácidos (GRCNMXVTLADERHYACATVIIES*K*YRSL*KVKPPNW*GTGVLLFNFNFVQHAPSTTXIMDQCTY LLQATCNL*HKNSSLYEESNIDGKINVTANS*VH*NWLRY*XFCCALHHATEFPH*NEWCLQA), que apresento 95 % de identidade e similaridade para o gene da sintase holo proteína carreadora de acil (holo-[acyl-carrier-protein] synthase) pertencente a *Escherichia coli* UMNF18. Ao analisar o restante do relatório do programa, foi encontrado que uma das seqüências de aminoácidos (PFSXL*EYNPQYNHLXSXCCXQAQE) codificava para o gene da PHA sintase (*phaC*) pertencente a *Bacillus megaterium* WSH-002.

- ***Amostra Placa 21 Linha 1-4***

> Iniciador I - 179 L (a)

GGTTGCGCKGGTCKCGTGTTACCTGCGTCTTTATTTATTRCGACSTTCATSGTSAGTTGGCGCACCCTTTTTAGT
CSCAKCGCGAATGGGGYCTGACCACCTATATCSAGGCRCTSAAGGARGCCMTCGAGGTMKKCCTGKCGATCACCG
GCAGCAAAGACCTCAACCTCCTCGGCGCCTGYTCCGGCGGGATCACCACCGCSACCCTGGTCGGCCACTACSTGG
CCAGCGGSSAGAAGAASGTCRACGCCTTCRCCCAACTGGTCAGCGTGCTCSACTTCRAACTGAATACCCACGTCG
CGCTGTTCGCCGACRASAAGACTCTGGAGGCCGCCAAGCRTCKYTCCTACCAKTCCSGCGTGCTGGAGGGCAAGG
ACATGGCCAAGGTGTTCKCCTGGATGCKCCCCAACRACCTGATCTGGAACTACTGGKTCAACAACTACCTGCTCG
GCAACCAGCCGCCGGCGTTCWACATCCTCTACTGGAACAACGACRACACCACCA

O resultado do seqüenciamento apresentou uma similaridade e identidade de 84 % a partir da seqüência de aminoácidos (VXSLFQ*RMXNAGGWLPSR*LLXQ*FQIRXLGXIQXNTLAMSLPSSTXXW*ERXLAASRVXXSANSA TWVFSXKXSTLTSWXKAXTFFXPLAX*WPTRVAVVIPPEQAPRRLRSLLPVIXRXTSXASXSAXI*VV RPHSRXD) para o gene da PHA sintase de *Pseudomonas aeruginosa* LESB58, assim como para outros microrganismos do mesmo gênero, quando analisada a seqüência com a ferramenta tblastx do NCBI.

- ***Amostra Placa 38 Linha 1-4***

> Iniciador phaCF1

GCAAGGTTCATCTGCGAAGGCGAYGAGMGTAYACCTGCCTGTGTGCCGGRCTGCACCCGWWWWWKRRMRGGGCSR
GGGGGCCTGKGAGACAACWGCARGCACTCGGACAAGCGCTCCATGSAAGCCGCACGCGCCRCCGCAGCCCMGGCC
CCGACCTGATGGCTGCCTGTCTGGGCGGCCTGACCAKGGCCGCGACCGCGGTGGCGGGGATGGCCGCCMGCGGCT
GGGKCCCGTGCGCCRCCCCCCCTACCCGGACCGCCTTGCGGGAAGTTGGCTARACAGCCCCCCCCGCCTGCTCTG
TCAASAASGGACATGTGCAGCCGCCCARCGCCRCTCCKGGCGGSCGGCCKGCACGACGGGCCGATGCTGCGCGGA

TCTTCGCCTGGCTGCRGCCCCTCGATCTTGCTGGAACTTATSTGTTGTGAACTAACTGSGTCAACAACTACCTAG
G

Foi obtido como resultado a seqüência de aminoácidos (CAXPPTRTALREVG*TAPPACS) após ter submetido a seqüência de nucleotídeos acima mencionada na ferramenta tblastx, obtendo uma identidade de 59 % e 64 % de similaridade para a PHA sintase da classe II, pertencendo a linhagem *Pseudomonas entomophila* L48.

- ***Amostra Placa 38 Linha 1-4***

> Iniciador I - 179 L (a)

GGCCCMCACTCCTCGTCGCCCTGCGCACCCGGTCGGTATCCGATCGGTCGTTGGSCCGCATCCAGGCGAGAYCCS
SGCCAYSTCGGCGCCATCMAGYACGCCGCGTTGGTAGGAGCGGCGCTTGGCGGCTTCAAKGGTCTGCTCGTCGGC
RAACAGGCTGGCGGGGCTTTCSAACTTGCTGTCCAGAAGGCTGACCAGGTAGGTGGCGCTGCKCACCCGACSCAS
CTGGKGCTTGGCCTGSAGGTGACCCTGCAGCGCGGCCATGGTCAGGCCGCCGGMGCAGGCACCCATCAGGTTGGG
GTCGCGGTTGCCGCTRATGCTGCGGCAAGCGTTGASCGCTTCTTCCAGGGCCTGCACKTAKCTCGRCAGGCCCCA
TTCSCGGTGTCKCGGGTCGGGGTTGCRCCAGCTCACCATGAACWCTTTTTTTGCCGCTCTTGAKMATGKACTGGA
CRAASCTGTTGGTCSAGCTGARATCRAARATGTAACACTTGYTRATCTGT

A seqüência mencionada anteriormente também foi analisada pelo programa tblastx, obtendo como resultado uma seqüencia de aminoácidos (RAAKKXFMVSWXNPDPRHREWGLXXXVQALEEAXNACRSISGNRDPNLMGACXGGLTMAALQGHLQA KXQXXRVXSATYLVSLLDSKXESPASLFADEQTJEAAKRRSYQRGVLDGAXXA) com similaridade de 86 % e identidade de 83% para o gene da PHA sintase, referente a linhagem *Pseudomonas putida* S16.

- ***Amostra Placa 16 Linha 9-12***

> Iniciador I - 179 R (a)

AYATYCGATCTGWTYGCMGWGYAGGWMKTTGTWAKWCMYWRTAGTTCCAGATCAGGTCGTTGGGGCGCMTCCAGG
CGAACACCTTGGCCATGTCCTTGCCCTCCAGCACGCCGGACTGGTAGGAACGACSCTTGGCGGCCTCCAGAGTCT
TCTCGTCGGCGAACAGCGCGACCTGGGTATTCAGTTCGAAGTCGAGCACGCTGACCAGTTGGGTGAAGGCGTTGA
CCTTCTTCTCGCCGCTGGCCACGTAGTGGCCGACCAGGGTCGCGGTGGTGATCCCGCCGGAGCAGGCGCCGAGGA
GGTTGAGGTCTTTGCTGCCGGTGATCGACRGGACTACCTCRATGGCCTCCTTGAGCGCCTCGATATAGGTGGKCA
GGCCCCATTCGCGCTGCGACTTGGTSGGGTTGCSCCAACTGACGATGAAGGTCTGCACGCCGTTGCGCAGGCAGA
AGCGCGCCAGGCTCTTGTCCGGCGACAGRTCGAAGATGTAGAATTGTTG

A seqüencia obtida foi analisada pelo programa tblastx obtendo uma seqüência de aminoácidos (QFYIFDLSPDKSLARFCLRNGVQTFIVSWXNPTKSQREWGLXTYIEALKEAIEVVXSITGSKDLNLL GACSGGITTATLVGHYVASGEKKVNAFTQLVSVLDFELNTQVALFADEKTLEAAKXRSYQSGVLEGKD MAKVFAWXRPNDLIWNY) que apresentou como resultado final 95 % de identidade e 97 % de similaridade com a PHA sintase de *Pseudomonas aeruginosa* PA7.

De acordo com os relatórios gerados pelo programa tblastx, pode-se observar que os conjuntos de iniciadores para as classes II e IV propiciaram uma correta amplificação parcial do gene *phaC* correspondente a cada uma das classes. Ao analisar os diferentes relatórios obtidos dos amplicons seqüenciados, se pode observar que o resultado das seqüências de aminoácidos é diferente, mesmo utilizando o mesmo par de iniciadores, o que sugere que podem ser encontradas novas PHA sintases que sejam próximas utilizando estes oligonucleotídeos, devido ao fato de que as PHA sintases têm uma região conservada (porção C-terminal) e uma região variável (porção N-terminal), a qual permite uma diversificação nas seqüências de genes codificadores desta enzima.

Também é possível concluir que os iniciadores desenhados por Sheu e colaboradores (2000) são capazes de amplificar genes *phaC* pertencentes à classe II da PHA sintase, como observado quando analisada a seqüência de aminoácidos da amostra Placa 38 Linha 1-4 empregando o iniciador phaCF1. Este resultado confirma a amplificação obtida quando testado o DNA do plasmídeo pBHR71 com o par de iniciadores phaCF1/phaCR4 como mostrado na Figura 19.

5.8 Identificação dos clones positivos.

Diferentes metodologias foram testadas para realizar a identificação de cada um dos clones das diferentes placas da biblioteca metagenômica. Em microplaca de polipropileno para PCR de 96 poços foram feitas reações de PCR de cada um dos clones cujas placas ou conjuntos que haviam apresentado um resultado positivo. Além disso, foram testados diferentes tempos de cultivo de cada um dos clones de cada placa, sendo testadas diferentes temperaturas de desnaturação, para a identificação dos clones positivos. A metodologia não foi a melhor, pois não foram obtidos amplicons. De igual maneira, foram observados outros problemas como a evaporação das amostras devido à quantidade de reação preparada (5 µL) e à tampa de silicone recomendada para este tipo de microplacas, que não vedava a placa, permitindo a evaporação. A partir deste resultado, partimos para a estratégia de realizar o mesmo procedimento, mas em microtubos de 0,2 mL, obtendo também resultados negativos para os amplicons esperados. Devido aos resultados negativos como comentado anteriormente, foi decidido aplicar a metodologia descrita no item 4.11, a qual nos permitiu identificar os clones positivos de todas as placas analisadas da biblioteca metagenômica, assim como confirmar se os resultados obtidos no screening primário, poderiam ser resultado de uma possível contaminação, proveniente da manipulação da biblioteca. Para isso, foi

empregada a metodologia de cultivo separado de cada um dos clones em microtubos de 2 mL como mencionado no item 4.11, que permitiu descartar a hipótese de contaminação das placas da biblioteca.

A partir dos resultados obtidos com a triagem primária, foi proposta a seguinte etapa, que consistiu na identificação de cada um dos clones que contêm o gene ou genes de interesse. Na Tabela 5 podem ser observados os clones positivos de cada uma das placas contendo a localização exata de cada um dos deles. Assim, nas placas 9 os clones A2 e G1 apresentaram amplicon tanto para a classe I quanto para classe II, sugerindo que estes clones pertencem à classe II, pelo fato dos iniciadores desenhados por Sheu et al. (2000) amplificarem os genes *phaC* das classes 1 e 2, como mencionado anteriormente. Resultados similares são observados na placa 21 (E6, G12 e H5), placa 23 (B6 e H8), placa 24 (A10e F9), placa 25 (A8), placa 27 (C3, C5, E6, G3 e H1) e na placa 28 (B9, C8, D11, F4, H2, H12), como se pode observar na Tabela 5.

Outro resultado observado nos dados apresentados na Tabela 5 é o fato dos iniciadores para classe I não terem detectados todos os clones positivos para a classe II, sugerindo que estes iniciadores nem sempre conseguem amplificar o gene da PHA sintase da classe II nos diferentes microrganismos que possuem este gene. Outro resultado analisado foi a possibilidade de que os iniciadores desenhados por Sheu et al. (2000) tenham detectado genes da PHA sintase da classe I, pela ausência destes amplicons quando testados com os oligos desenhados para classe II, o que deve ser confirmado por seqüenciamento dos amplicons obtidos a partir de cada um dos clones.

Como resultado final, foram obtidos 50 clones que apresentaram amplicon do tamanho esperado para a classe I da PHA sintase, aclarando que 21 deles possivelmente pertencem à classe II, como apresentado na Tabela 5 destacando-os com a cor vermelha. Se fossem descontados os 21 clones que apresentaram amplicon para as duas classes, o resultado real seria de 29 clones positivos para a classe I.

Para a classe II foram obtidos 120 clones que apresentaram amplicon quando testados com os iniciadores para a classe II de PHA sintase, incluindo os 21 clones mencionados acima. 67 clones apresentaram amplicon com o tamanho esperado para a classe III de PHA sintase quando testados com os iniciadores desenhados por Hai et al. (2001). Para a classe IV,

foram detectados 153 clones positivos na triagem da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica.

Em conclussão, foram detectados 390 clones positivos para PHA sintase das quatro classes de PHA sintase reportadas.

Tabela 5 - Localização dos clones (linha e coluna) contendo o gene *phaC* nas diferentes placas da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica.

(continua)

PLACA	CLASSE I (1)	CLASSE II (2)	CLASSE III (3)	CLASSE IV (4)
1			A1, A9, H5	A2, A7, E7, F1
2			G2	
3		E10, F6, F11, G7, G10, H3, H6, H12	F1, H4	
4		B11, G8, H4	G12, H2	D4, H5
5		F11, G5	A1	E1, E6
6		C10	A1, A6, A9, D10, E8, G1, G11, H6, H9, H12	C12, D7, D12, E7, E9, G9, H5, H7, H11
7				G7, G8, F6, F10, H1, H12
9	A2, B3, G1	A2, C10, E4, G1	A8, A9, A11	D6, F7
10				B2, C3, C11, D9, E7, F2, F8, F12, G2, G6, G10, H4, H7, H10, H12
11				C6, E1, F4, G10, H3
12		B5, D6, F10, H9		E3, G4
13				C5, C10, G3, F6
14				
15		C10, C12, E6, E10, F9		
16		B4, D6, F7, H9		A10, C2, C7, E3, G2, H5
17		B7, C3, C9, D6, E3, G6, H10		B6, G9, G3
18		A2, A11, C11, E6, H3		B2, B5, F11, G3, G8
19		B3, E10, G1, G9		A5, B2, D10, D12, F3, G7
20		B8, F3, G8, G11	D4, F10, H9	A3, C7, F12, H7
21	A3, A6, B12, B10, E6, D7, G12, E11, H5	C6, D4, D7, E6, F2, G12, H5		A9, B5, G9, G4, F6, F8, F10
22		A2, A7, B2, D4, F6, G11, H11	C3, E1, E4, E7	E5, C6, C12, D12, E11, F12, G2
23	A4, B6, C2, E6, D12, F4, H8	A8, B6, E2, F5, H8	A6, D5, G8	B9, D6, F6, G5, H9
24	A10, B9, F9, G5, H9	A7, A10, C10, D2, F8, F9	B9, D12, E12, H7	B7, C10, G11, F12, H11

* As letras indicam a linha e o numero na coluna em que o clone está posicionado na placa.
* Os clones que amplificaram tanto para classe I quanto para a classe II estão destacados em vermelho.
Fonte: Galindo, 2011

Tabela 5 - Localização dos clones (linha e coluna) contendo o gene *phaC* nas diferentes placas da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica.

(conclusão)

PLACA	CLASSE I (1)	CLASSE II (2)	CLASSE III (3)	CLASSE IV (4)
25	A8, B4, E3, F9, G10	A3, A8, A10, D12, E3, F9		A5, B10, C2, E7, D10, D11, H8
26	B2, B7, D4, D8, F10, G9	C3	E4, F3,	A3, A5, A8, E10
27	C3, C5, E6, G3, H1	C3, C5, E6, G3, H1		C8, C12, E4, H12
28	B9, C8, D11, F4, H2, H12	B9, C8, D11, E11, F4, H2, H12		E10, F6, F3
29		D8, D10, H6, H8, H10		A7, B8, F7, G7, G9, H2
30		B6, D2, F3, G7, G12	C12, D3, G10	B2, C12, D3, H12
31			A3, B11, C8, D4, E10	D12, H6, H12
34		E9, F10, H1, H3		A3, B2, C12, D5, D9, E9, F4, G1, G7, H2
37		A10, B10, C9, D7, E5, G3, G5, H12	C11, E3, E10, G3, G6	A4, B5, B7, D9, F11
38	E2, E4, F2, H3	B1, B2 e E11	A1, B9, E2, F4	A1, A3, A4, A12, C4, C8, D6, H2
39			C8, E2, E6, E12, F10, G1, G11, H11	
40			E3, E8, G11, H1	
TOTAL	**50**	**120**	**67**	**153**
TOTAL DE CLONES NA BIBLIOTECA			**390**	

* As letras indicam a linha e o numero na coluna em que o clone está posicionado na placa.
* Os clones que amplificaram tanto para classe I quanto para a classe II estão destacados em vermelho.
Fonte: Galindo, 2011

5.9 *Teste dos clones positivos para todas as classes de PHA sintase.*

A partir dos resultados observados acima, foram selecionados os 67 clones que apresentaram amplicon para a classe III da PHA sintase, tendo em mente que poucos trabalhos relatados na literatura têm empregado este gene para clonagem em microrganismos com fenótipo PHA$^-$ para posterior avaliação da produção de PHA; gerando assim um grande interesse por explorar esta classe de PHA sintase.

No presente trabalho foram desenhados 2 iniciadores para o gene *phaC* e 2 para o gene *phaE*, correspondentes à classe III da PHA sintase. Tais iniciadores foram construídos pela necessidade de diminuir o índice de degeneração apresentado pelos oligos desenhados por Hai et al. (2001), pois o iniciador Haphapcr1 apresenta um índice de degeneração de 16384 e de 192 para o oligo Haphapcr2. Na literatura há vários autores um índice máximo de 128 (Old and Primrose, 1994 e Linhart e Shamir, 2005), tentando aumentar a especificidade dos iniciadores pela seqüência alvo. Outro dos objetivos da construção destes iniciadores foi conseguir detectar a possível presença do gene *phaE* (Subunidade do heterodímero da classe três da PHA sintase) nos genes selecionados para classe III.

Os iniciadores foram construídos a partir do alinhamento das seqüencias de *Allochromatium vinosum* DSM 180 (NCBI: NC_013851.1), *Thiocystis violacea* (NCBI: L01113.1 GI:1389672) e *Synechocystis sp*. PCC 6803 (NCBI: NC_000911.1 GI: 16329170). A partir do alinhamento das três seqüencias para cada um dos genes, foram selecionadas duas regiões conservadas para cada um deles. Os iniciadores para o gene *phaC* foram nomeados como phaC3F e phaC3R, obtendo um amplicon de aproximadamente 574 pb quando utilizados em reações de PCR em *sílico* empregando o programa FastPCR. Os iniciadores phaE3F e phaE3R, foram construídos para a amplificação parcial do gene *phaE* da PHA sintase da classe III e para a confirmação da presença do gene nos insertos dos clones selecionados. A importância de detectar a presença do gene *phaE* nos clones é o fato de confrimar a organização do operon da síntese de PHA da classe III, confrimando assim que o gene *phaC* se encontra ativo, pois a atividade da PHA sintase tipo III requera expressão de ambas as subunidades PhaE e PhaC. A informação mencionada anteriormente se explica melhor na Figura 22, a onde são mostradas as regiões flanqueadas pelos iniciadores desenhados no presente trabalho e os relatados por Hai e colaboradores (2001).

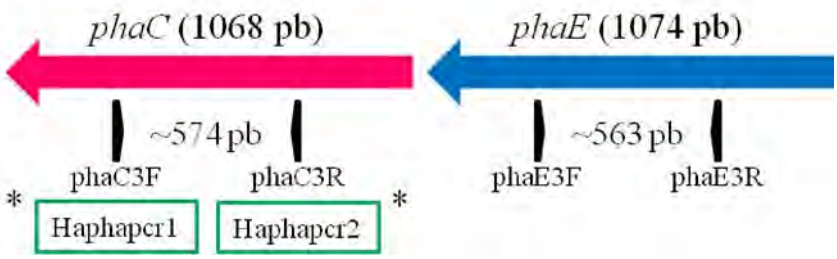


Figura 22 - Regiões flanqueadas pelos iniciadores phaC3F e phaC3R para detectar o gene *phaC*, e localização dos iniciadores phaE3F e phaE3R para amplificação do gene *phaE*, nos clones da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. Localização dos iniciadores desenhados por Hai et al., 2001, estão colocados nas caixas de texto cor verde com o símbolo *.

Fonte: Galindo, 2011

Cada um dos 67 clones selecionados foi testado com o par de iniciadores phaCF1/phaCR4, I-179L(a)/I-179R(a) e B1F/B1R, buscando a confirmação da presença/ausência de um amplicon para mais de um par dos iniciadores testados. Como resultado, não foram obtidos amplicons para nenhuma das outras classes de PHA sintase o que indicou uma única amplificação para PHA sintase da classe III. A partir disto foi feita uma nova reação de PCR testando os primers para a classe III relatados na literatura e os desenhados no presente trabalho.

As reações de amplificação foram realizadas a uma temperatura inicial de desnaturação de 94°C por 2 minutos, e subseqüentes ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 3 minutos, este ciclo foi repetido 35 vezes e incubação final a 4 °C, as diferentes temperaturas de anelamento de cada uma das metodologias testadas estão apresentadas na Tabela 6, assim como o tamanho do amplicon esperado.

Tabela 6 - Combinações de iniciadores para PHA sintase do tipo III para seleção de clones de interesse.

METODOLOGIA	INICIADORES	TEMPERATURA DE ANELAMENTO	TAMANHO DO AMPLICON ESPERADO
A	Haphapcr1/Haphapcr2	49.3 ºC	~ 600
B	phaC3F/phaC3R	52.2 ºC	~ 574
C	phaE3F/phaE3R	57.1 ºC	~ 563
D	phaE3F/phaC3R	62.5 ºC	~ 1684
E	phaE3F/Haphapcr2	59.8 ºC	~ 1653
F	Haphapcr1/phaC3R	53.0 ºC	~ 540
G	phaC3F/Haphapcr2	52.5 ºC	~ 543

Fonte: Galindo, 2011

Após realizar este teste, foram selecionados setes clones que apresentaram amplicons do tamanho esperado para as condições A, B, F e G acima descritas. Os sete clones selecionados são apresentados na Tabela 7. As condições C, D e E não apresentaram nenhum amplicon e por isso não foram consideradas na hora da seleção dos clones. Isto pode ter ocorrido pela ausência do gene *phaE*, fazendo que os o iniciadores não funcionassem e assim não gerassem um amplicon.

Tabela 7 - Identificação dos clones positivos para PHA sintase de classe III.

NUMERAÇÃO INTERNA	PLACA	CLONE	NÚMERO DO BANCO DE CEPAS
5	3	F1	LFM 508
17	6	H6	LFM 520
23	20	D4	LFM 526
24	20	F10	LFM 527
36	24	H7	LFM 549
40	30	D3	LFM 556
48	37	E3	LFM 564

Fonte: Galindo, 2011

Destes sete clones foram selecionados os clones 23, 24, 40 e 48 e foram enviados para seqüenciamento no centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo,

para a confirmação da seqüencia para PHA sintase do tipo III. Os resultados obtidos foram os seguintes:

- ***Amostra: 23***

> Iniciador F (phaC3F)

```
CTWTTWGCGCTGGTCCGGGCTATGAGCACCGGTATGCTGGCTTACTCTGCGCGTAACCGTTCTGCGTCTATCCGT
ATTCCGGTGGTTTCTTCTCCGAAAGCACGTCGTATCGAAGTACGTTTCCCGGATCCGGCAGCTAACCCGTACCTG
TGCTTTGCTGCCCTGCTGATGGCCGGTCTTGATGGTATCAAGAACAAGATCCATCCGGGCGAAGCCATGGACAAA
AACCTGTATGACCTGCCGCCAGAAGAAGCGAAAGAGATCCCACAGGTTGCAGGCTCTCTGGAAGAAGCACTGAAC
GAACTGGATCTGGACCGCGAGTTCCTGAAAGCCGGTGGCGTGTTCACTGACGAAGCAATTGATGCGTACATCGCT
CTGCGTCGCGAAGAAGATGACCGCGTGCGTATGACTCCGCATCCGGTAGAGTTTGAGCTGTACTACAGCGTCTAA
GTGTTTTAGTTGCCGTGGARACCTWCGSCCMAATTCCA
```

> Iniciador R (phaC3R)

```
TSTTATAACCTGTAGTAAGCTCAACTCTACCGGATGCGGAGTCATACGCACGCGGWCATCTTCTTCGCGACGCAG
AGCGATGTACGCATCAATTGCTTCRTCAGTGAACACGCCACCGGCTTTCAGGAACTCGCGGTCCAGATCCAGTTC
GTTCAGTGCTTCTTCCAGAGAGCCTGCAACCTGTGGGATCTCTTTCGCTTCTTCTGGCGGCAGGTCATACAGGTT
TTTGTCCATGGCTTCGCCCGGATGGATCTTGTTCTTGATACCATCAAGACCGGCCATCAGCAGGGCAGCAAAGCA
CAGGTACGGGTTAGCTGCCGGATCCGGGAAACGTACTTCGATACGACGTGCTTTCGGAGAAGAAACCACCGGAAT
ACGGATAGACGCAGAACGGTTACGCGCAGAGTAAGCCAGCATTACCGGTGCTTCATAGCCCGGGACCAGACGCTT
ATAAGAGTTGGTGGTCGGRTTCACCAGGCGGKWAAMA.
```

As seqüências forward e reverse da amostra 23 foram alinhadas, buscando uma seqüência consenso pela confirmação de cada um dos oligonucleotídeos a partir da análise dos picos visualizados no cromatograma, como se explica a seguir:

Alinhamento das seqüências forward e reverse da amostra 23

```
Query  10   CTGGTCCCGGGCTATGAAGCACCGGTAATGCTGGCTTACTCTGCGCGTAACCGTTCTGCG  66
            ||||||| |||||||| |||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  444  CTGGTCCCGGGCTATGAAGCACCGGTAATGCTGGCTTACTCTGCGCGTAACCGTTCTGCG  385

Query  67   TCTATCCGTATTCCGGTGGTTTCTTCTCCGAAAGCACGTCGTATCGAAGTACGTTTCCCG  126
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  384  TCTATCCGTATTCCGGTGGTTTCTTCTCCGAAAGCACGTCGTATCGAAGTACGTTTCCCG  325

Query  127  GATCCGGCAGCTAACCCGTACCTGTGCTTTGCTGCCCTGCTGATGGCCGGTCTTGATGGT  186
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  324  GATCCGGCAGCTAACCCGTACCTGTGCTTTGCTGCCCTGCTGATGGCCGGTCTTGATGGT  265

Query  187  ATCAAGAACAAGATCCATCCGGGCGAAGCCATGGACAAAAACCTGTATGACCTGCCGCCA  246
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  264  ATCAAGAACAAGATCCATCCGGGCGAAGCCATGGACAAAAACCTGTATGACCTGCCGCCA  205

Query  247  GAAGAAGCGAAAGAGATCCCACAGGTTGCAGGCTCTCTGGAAGAAGCACTGAACGAACTG  306
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  204  GAAGAAGCGAAAGAGATCCCACAGGTTGCAGGCTCTCTGGAAGAAGCACTGAACGAACTG  145

Query  307  GATCTGGACCGCGAGTTCCTGAAAGCCGGTGGCGTGTTCACTGACGAAGCAATTGATGCG  366
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct  144  GATCTGGACCGCGAGTTCCTGAAAGCCGGTGGCGTGTTCACTGAYGAAGCAATTGATGCG  85

Query  367  TACATCGCTCTGCGTCGCGAAGAAGATGACCGCGTGCGTATGACTCCGCATCCGGTAGAG  426
            |||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  84   TACATCGCTCTGCGTCGCGAAGAAGATGWCCGCGTGCGTATGACTCCGCATCCGGTAGAG  25

Query  427  TTTGAGCTGTACTACAG  443
             ||||||| ||||||||
Sbjct  24   -TTGAGCT-TACTACAG  10
```

A seqüência consenso obtida foi a seguinte:

Seqüência final amostra 23

```
CTGGTCCCGGGCTATGAAGCACCGGTAATGCTGGCTTACTCTGCGCGTAACCGTTCTGCGTCTATCCGTATTCCG
GTGGTTTCTTCTCCGAAAGCACGTCGTATCGAAGTACGTTTCCCGGATCCGGCAGCTAACCCGTACCTGTGCTTT
GCTGCCCTGCTGATGGCCGGTCTTGATGGTATCAAGAACAAGATCCATCCGGGCGAAGCCATGGACAAAAACCTG
TATGACCTGCCGCCAGAAGAAGCGAAAGAGATCCCACAGGTTGCAGGCTCTCTGGAAGAAGCACTGAACGAACTG
GATCTGGACCGCGAGTTCCTGAAAGCCGGTGGCGTGTTCACTGACGAAGCAATTGATGCGTACATCGCTCTGCGT
CGCGAAGAAGATGACCGCGTGCGTATGACTCCGCATCCGGTAGAGTTTGAGCTGTACTACAG
```

A seqüência anterior foi submetida ao programa tblastx, obtendo como resultado a seguinte seqüência de aminoácidos, que apresentou uma similaridade e identidade de 100% com o gene codificador da enzima glutamina sintetase tipo I de diferentes bactérias gram negativas, sendo na sua maioria enterobactérias. A seqüência de aminoácido obtida foi a seguinte:

Seqüência de aminoácidos amostra 23

```
CSTAQTLPDAESYARGHLLRDAERCTHQLLRQ*TRHRLSGTRGPDPVRSVLLPESLQPVGSLSLLLAAGHTGFCP
WLRPDGSCS*YHQDRPSAGQQSTGTG*LPDPGNVLRYDVLSEKKPPEYG*TQNGYAQSKPALPVLHSPGP
```

- ***Amostra: 24***

> Iniciador F (phaC3F)

```
CATAASCGTCTGTCCCGGCTATGAGCAYCGGTATGCTGGCTTACTCTGCGCGTACCGTTCTGCGTCTATCCGTAT
TCCGGTGGTTTCTTCTCCGAAAGCACGTCGTATCGAAGTACGTTTCCCGGATCCGGCAGCTAACCCGTACCTGTG
CTTTGCTGCCCTGCTGATGGCCGGTCTTGATGGTATCAAGAACAAGATCCATCCGGGCGAAGCCATGGACAAAAA
CCTGTATGACCTGCCGCCAGAAGAAGCGAAAGAGATCCCACAGGTTGCAGGCTCTCTGGAAGAAGCACTGAACGA
ACTGGATCTGGACCGCGAGTTCCTGAAAGCCGGTGGCGTGTTCACTGACGAAGCAATTGATGCGTACATCGCTCT
GCGTCGCGAAGAAGATGACCGCGTGCGTATGACTCCGCATCCGGTAGAGTTTGAGCTGTACTACAGCGTCTAAGT
GTTTTAGTTGCCGTGGARACCTWCGSCCCAATTCCA
```

> Iniciador R (phaC3R)

```
GCTTTTAKCGCTGTGTAAKCTCAACTCKACCGGATGCGGAGTCATACGCACGCGGWCATCTTCTTCGCGACGCAG
AGCGATGTACGCATCAATTGCTTCRTCAGTGAACACGCCACCGGCTTTCAKGAACTCGCGGTCCAGATCCAGTTC
GTTCAGTGCTTCTTCCASAGAGCCTGCAACCTGTGGGATCTCTTTCGCTTCTTCTGGCGGCAGGTCATACAGGTT
TTTGTCCATGGCTTCGCCCGGATGGATCTTGTTCTTGATACCATCAAGACCGGCCATCAGCAGGGCAGCAAAGCA
CAGGTACGGGTTAGCTGCCGGATCCGGGAAACGTACTTCGATACGACGTGCTTTCGGAGAAGAAACCACCGGAAT
ACGGATAGACGCAGAACGGTTACGCGCAGAGTAAGCCAGCATTACCGGTGCTTCATAGCCCGGGACCAGACGCTT
ATAAGAGTTGGTGGTCGGRTTCACCAGGCSGTAAAACA
```

As seqüências forward e reverse obtidas da amostra 24 também foram alinhadas, para obter uma seqüência consenso pela confirmação de cada um dos oligonucleotídeos a partir do analise dos picos visualizados no cromatograma, como se explica a seguir:

Alinhamento das seqüências forward e reverse amostra 24

```
Query  2    ATAASCGTCTGGTCCCGGGCTATGAAGCAYCGGTAATGCTGGCTTACTCTGCGCGTAACC  56
            |||| |||||| |||||| |||||| ||| ||||| |||||||||||||||||||| ||
Sbjct  452  ATAAGCGTCTGGTCCCGGGCTATGAAGCACCGGTAATGCTGGCTTACTCTGCGCGTAACC  393
```

```
Query  57   GTTCTGCGTCTATCCGTATTCCGGTGGTTTCTTCTCCGAAAGCACGTCGTATCGAAGTAC  116
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  392  GTTCTGCGTCTATCCGTATTCCGGTGGTTTCTTCTCCGAAAGCACGTCGTATCGAAGTAC  333

Query  117  GTTTCCCGGATCCGGCAGCTAACCCGTACCTGTGCTTTGCTGCCCTGCTGATGGCCGGTC  176
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  332  GTTTCCCGGATCCGGCAGCTAACCCGTACCTGTGCTTTGCTGCCCTGCTGATGGCCGGTC  273

Query  177  TTGATGGTATCAAGAACAAGATCCATCCGGGCGAAGCCATGGACAAAAACCTGTATGACC  236
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  272  TTGATGGTATCAAGAACAAGATCCATCCGGGCGAAGCCATGGACAAAAACCTGTATGACC  213

Query  237  TGCCGCCAGAAGAAGCGAAAGAGATCCCACAGGTTGCAGGCTCTCTGGAAGAAGCACTGA  296
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct  212  TGCCGCCAGAAGAAGCGAAAGAGATCCCACAGGTTGCAGGCTCTSTGGAAGAAGCACTGA  153

Query  297  ACGAACTGGATCTGGACCGCGAGTTCCTGAAAGCCGGTGGCGTGTTCACTGACGAAGCAA  356
            |||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct  152  ACGAACTGGATCTGGACCGCGAGTTCMTGAAAGCCGGTGGCGTGTTCACTGAYGAAGCAA  93

Query  357  TTGATGCGTACATCGCTCTGCGTCGCGAAGAAGATGACCGCGTGCGTATGACTCCGCATC  416
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||
Sbjct  92   TTGATGCGTACATCGCTCTGCGTCGCGAAGAAGATGWCCGCGTGCGTATGACTCCGCATC  33

Query  417  CGGTAGAGTTTGAGCTGTACTACAGCG  443
            |||| ||| ||||| | ||| ||||||
Sbjct  32   CGGTMGAG-TTGAGMT-TAC-ACAGCG  9
```

A seqüência consenso obtida foi a seguinte:

Seqüência final amostra 24

```
ATAASCGTCTGGTCCCGGGCTATGAAGCAYCGGTAATGCTGGCTTACTCTGCGCGTAACCGTTCTGCGTCTATCC
GTATTCCGGTGGTTTCTTCTCCGAAAGCACGTCGTATCGAAGTACGTTTCCCGGATCCGGCAGCTAACCCGTACC
TGTGCTTTGCTGCCCTGCTGATGGCCGGTCTTGATGGTATCAAGAACAAGATCCATCCGGGCGAAGCCATGGACA
AAAACCTGTATGACCTGCCGCCAGAAGAAGCGAAAGAGATCCCACAGGTTGCAGGCTCTCTGGAAGAAGCACTGA
ACGAACTGGATCTGGACCGCGAGTTCCTGAAAGCCGGTGGCGTGTTCACTGACGAAGCAATTGATGCGTACATCG
CTCTGCGTCGCGAAGAAGATGACCGCGTGCGTATGACTCCGCATCCGGTAGAGTTTGAGCTGTACTACAGCG
```

A seqüência da amostra 24 também apresentou similaridade com o gene glutamina sintetase tipo I com 99% de identidade e similaridade para *E. coli* UMNF18, assim como para outras bactérias gram negativas, sendo na sua maioria enterobactérias. Este resultado pode ter se apresentado por ter sido empregado o mesmo par de iniciadores (phaC3F/phaC3R) ou porque o fragmento de DNA era similar para ambos clones. A seqüência de aminoácido obtida foi a seguinte:

Seqüência de aminoácidos amostra 24

```
RCSTAQTLPDAESYARGHLLRDAERCTHQLLRQ*TRHRLSGTRGPDPVRSVLLPESLQPVGSLSLLLAAGHTGFC
PWLRPDGSCS*YHQDRPSAGQQSTGTG*LPDPGNVLRYDVLSEKKPPEYG*TQNGYAQSKPALPXLHSPGPDXY
```

- ***Amostra: 40***

> Iniciador F(Haphapcr1)

```
CGGACGCRCGGTTCTCGCAATCACATTAATTTTATGGCTAAGGAAAAGTTGTGTCYGGRAAATGCRKGCAATTCG
GGMTGGCAATATACACCGYGTCAATGGCRTCKCTTTCCGCCATCGCTTCCMGCGAGGKAAACAGATGCTCGACAG
AAAAATCATTGGSGAAGTGCTGGGCCTGTTCAAGGCTGCRGGAATATACGGYGGKTAACTTGWATTTACCGCTCT
```

CATGGGYGGCCTCGACSAACTGGSGAGTGATCCAKTTCGTACCAMTCACASCGAAMCGYATCMTAACSCGTGGAT
ACTCCMTAAAGGGATTCTGTCKKCMATGWARCACGCCTTTTTCATCTTCRACSKGCGCARATACGCATTATTTCT
GCKCCGGACAGSCATGCTCACTAARCGGSCCAATCATGACCGARGGCCCRASATATTTCRTYTGGCKATGGAGGA
TTTTGGCGTCWATCMCGGCKCTGACACGAGCGAGTTTCTCCCGCAKKTGAGTATAAMAMCCGTGCTTCATATTGA
GGTCTGGCGCGTTAAAACCGATAGCGTCGATGCCGTACTGTTTTGCCMGCCAKATRTCGCGGAACTCSGTSCGAG
WAAATWSA

> Iniciador R(Haphapcr2)

GRKMGRCATCGGAGTCTATCGGTTTTACGCGCCRGACSTCAATATGRAGSACGGTTTTTATACTCRACTGCCGGA
GAAACTCGYTCGTGTCAGCGCCGTGATTGACGCCAAARTCCTCCATCGCCAGCCGAAATATCTCGGGCCTTCGGT
CATGATTGGGCCGTTTAGTGAGCATGGCTGTCCGGCGCAKAAATAATGCGTATCTGCGCACGTCSAARATGAAAA
AGGCGTGCTACATTGACGACAGAATCCCTTTATGGAGTATCCACGCGTTATGATACGTTTCGCTGTGATTGGTAC
GAACTGGATCACTCGCCAGTTCGTCSAGGCCGCCCATGAGAGCGGKAAATACAAGTTAACCGCCGTATATTCCCG
CAGCCTTGAACAGGCCCAGCACTTCGCCAATGATTTTTCTGTCGAGCATCTGTTTACCTCGCTGGAATTGATGGC
GGAAAGCGATGCCMTTGACKCGGTGTATATTGSCAGSCCGAATTCCCTGCATTTTTCCCAGACACMACTTTTCCT
TAGCCATAAAATTAATGTGATTTGCGAGAAACCGCTGGCGTCGAATCTGGCGGARYTMGAAMGCCGCCAGCACGC
AMAAAACMYTTTATTTTATGGYWAAGAATAGTTGTTTCGGGAAAATGCMSGGATTTCGGTTGKYATATWYCCCCC
GC

Alinhamento das seqüências forward e reverse amostra 40

```
Query  12   TTCTCGCAAATCACATTAATTTTATGGCTAAGGAAAAGTTGTGTCYGGRAAAAATGCRKG  68
            ||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||| ||||| || |||  |||  |
Sbjct  555  TTCTCGCAAATCACATTAATTTTATGGCTAAGGAAAAGTKGTGTCTGGGAAAAATGCAGG  496

Query  69   CAATTCGGGCTGGCAATATACACCGYGTCAATGGCATCGCTTTCCGCCATCGCTTCCAGC  128
             |||||||  || ||||||||||| ||||| ||| || ||||||||||||  |||| ||
Sbjct  495  GAATTCGGSCTGSCAATATACACCGMGTCAAKGGCATCGCTTTCCGCCATCAATTCCAGC  436

Query  129  GAGGTAAACAGATGCTCGACAGAAAAATCATTGGCGAAGTGCTGGGCCTGTTCAAGGCTG  188
            |||| |||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct  435  GAGGTAAACAGATGCTCGACAGAAAAATCATTGGCGAAGTGCTGGGCCTGTTCAAGGCTG  376

Query  189  CGGGAATATACGGCGGTTAACTTGTATTTACCGCTCTCATGGGCGGCCTCGACGAACTGG  248
            | ||||||||||| || ||||||| |||| ||||||||||||| ||||| ||| ||||||
Sbjct  375  CGGGAATATACGGCGGTTAACTTGTATTTMCCGCTCTCATGGGCGGCCTSGACGAACTGG  316

Query  249  CGAGTGATCCAGTTCGTACCAATCACAGCGAAACGTATCATAACGCGTGGATACTCCATA  308
             |||||||||| ||||||||| ||||| |||| || ||| |||| ||||||||||||  ||
Sbjct  315  CGAGTGATCCAGTTCGTACCAATCACAGCGAAACGTATCATAACGCGTGGATACTCCATA  256

Query  309  AAGGGATTCTGTCGTCMATGTARCACGCCTTTTTCATCTTCGACGTGCGCAGATACGCAT  368
            |||||||||||||  | ||| | |||||||||||||||  ||  ||  ||||| ||||||||
Sbjct  255  AAGGGATTCTGTCGTCAATGTAGCACGCCTTTTTCATYTTSGACGTGCGCAGATACGCAT  196

Query  369  TATTTCTGCGCCGGACAGCCATGCTCACTAAACGGCCCAATCATGACCGAAGGCCCGAGA  428
            ||||| ||| |||||||| ||||||||||| ||| |||||||||||||| ||||| | |
Sbjct  195  TATTTMTGCGCCGGACAGCCATGCTCACTAAACGGCCCAATCATGACCGAAGGCCCGAGA  136

Query  429  TATTTCGGCTGGCGATGGAGGATTTTGGCGTCAATCMCGGCGCTGACACGAGCGAGTTTC  488
            ||||||   |||| |||||||| ||||||||| ||| |||| ||||||||| ||||||||
Sbjct  135  TATTTCGGCTGGCGATGGAGGAYTTTGGCGTCAATCACGGCGCTGACACGARCGAGTTTC  76

Query  489  TCCCGCAGTTGAGTATAAAAAACCGTGCTTCATATTGAGGTCTGGCGCGTTAAAACCGATA  548
            ||| |||   |||||||| | |||| || |||||||| ||| |||||| |||||||||||
Sbjct  75   TCCGGCAGTYGAGTATAAAAACCGTSCTYCATATTGASGTCYGGCGCG-TAAAACCGATA  17

Query  549  G  549
            |
Sbjct  16   G  16
```

A seqüência consenso obtida foi a seguinte:

Seqüência final amostra 40

```
TTCTCGCAAATCACATTAATTTTATGGCTAAGGAAAAGTTGTGTCYGGRAAAAATGCRKGCAATTCGGGCTGGCA
ATATACACCGYGTCAATGGCATCGCTTTCCGCCATCGCTTCCAGCGAGGTAAACAGATGCTCGACAGAAAAATCA
TTGGCGAAGTGCTGGGCCTGTTCAAGGCTGCGGGAATATACGGCGGTTAACTTGTATTTACCGCTCTCATGGGCG
GCCTCGACGAACTGGCGAGTGATCCAGTTCGTACCAATCACAGCGAAACGTATCATAACGCGTGGATACTCCATA
AAGGGATTCTGTCGTCMATGTARCACGCCTTTTTCATCTTCGACGTGCGCAGATACGCATTATTTCTGCGCCGGA
CAGCCATGCTCACTAAACGGCCCAATCATGACCGAAGGCCCGAGATATTTCGGCTGGCGATGGAGGATTTTGGCG
TCAATCMCGGCGCTGACACGAGCGAGTTTCTCCCGCAGTTGAGTATAAAAACCGTGCTTCATATTGAGGTCTGGC
GCGTTAAAACCGATAG
```

Ao utilizar os iniciadores Haphapcr1 e Haphapacr2 para a reação de seqüenciamento empregando a amostra 40 como DNA molde, foi obtida uma seqüência com 97% de similaridade e identidade para uma proteína hipotética conservada conhecida como codificadora para a família de enzimas oxidoredutases de diferentes bactérias gram negativas, sendo na sua maioria enterobactérias. A seqüência de aminoácido obtida foi a seguinte:

Seqüência de aminoácidos amostra 40

```
LANHINFMAKEKLCXXKMXAIRAGNIHRVNGIAFRHRFQRGKQMLDRKIIGEVLGLFKAAGIYGG*LVFTALMGG
LDELASDPVRTNHSETYHNAWILHKGILSSM*HAFFIFDVRRYALFLRRTAMLTKRPNHDRRPEIFRLAMEDFGV
NXGADTSEFLPQLSIKTVLHIEVWRVKTD
```

Este resultado sugere que os iniciadores desenhados por Hai e colaboradores (2001) amplificam outros genes, podendo explicar este fato pelo número elevado de degenerações que os oligos apresentam e que estes não foram desenhados com o objetivo de realizar a triagem de bibliotecas metagenômicas e sim para identificação de PHA sintase do tipo III na bactéria *Allochromatium vinosum*, restringindo assim sua aplicação. Ao comparar este resultado com o obtido quando empregados os iniciadores phaC3F e phaC3R desenhado no presente trabalho, pode-se observar que nenhum dos dois pares de oligos foi capaz de amplificar o gene da PHA sintase, mesmo contendo um número inferior de degenerações, o que pode explicar o fato de se encontrarem poucas seqüencias nos bancos de dados referentes a este tipo de gene, impossibilitando uma melhor construção de iniciadores.

- ***Amostra: 48***

> Iniciador F (phaC3F)

```
TGAAGMACGTTTGCGCTAGCGCGATGAGCGAGTTACACGGCGACGCACGTTATCTGGTTTATGGCGGCATCCTGT
TTGCCGCGTGGGGGAAATCGGCCCAGCTACCGATGCAAGCGTGGCTACCGGACGCAATGGAAGCGCCAACACCGA
TCAGCGCCTATCTCCACGCCGCATCGATGGTGAAAGTGGGCGTTTACATTTTTGCCCGCGCTATTATCGACGGCG
GCAATATCCCGCATGTGATTGGCGGCGTTGGCATGGTCATGGCACTGGTCACCATTCTTTATGGCTTTCTGATGT
ATTTGCCACAGCAGGATATRAAGCGGTTGCTAGCCTGGTCGACCATCACTCAACTTGGCTGGATGTTCTTCGGCT
TGTCGCTCTCCATCTTCGGCTCGCGGCTGGCGCTGGAGGGCAGCATCGCCTACATCGTCAACCACGCGTTCGCTA
```

AAAGCTTRTTCTCCTTGTAGARAAMSGTCRGWAAAAGTGGACGCACATTASGTTKACGCTTTGGGCTCCACGCGT
TTACGCGGGACYAYGCSCTCGGGTTKAGGAGGCTCTGATTTGCCGAGGGGGGGAAACCCCGCTTCCAGGRMGGTG
GGGTGCCTTTYCRGGGGGCAACCAGTAGCCMGCCT

> Iniciador R (phaC3R)
CGACGCGTGATGACGATGTAGGCGATGCTGCCCTCCAGCGCCAGCCGCGAGCCGAAGATGGAGAGCGACAAKCCG
AAGAACATCCAGCCAAGTTGAGTGATGGTCGACCAGGCTAGCAACCGCTTCATATCCTGCTGKGGCAAATACATC
AGAAAGCCATAAAGAATGGTGACCAGTGCCATGACCATGCCAACGCCGCCAATCACATGCGGGATATTGCCGCCG
TCGATAATAGCGCGGGCAAAAATGTAAACGCCCACTTTCACCATCGATGCGGCGTGGAGATAGGCGCTGATCGGT
GTTGGCGCTTCCATTGCGTCCGGTAGCCACGCTTGCATCGGTAGCTGGGCCGATTTCCCCCACGCGGCAAACAGG
ATGCCGCCATAAACCAGATAACGTGCGTCGCCGTGTAACTCGCTCATCGCGCTAAGCGCAAACGTTCCGGTCTGC
AAAAAYTGCGTMGACGTCKYCCGCGACMCAAAATCTKGGGCCSACAGMAYKTTTGGCCCTTTCGCSTGACGRGTT
ATGGGGTKACMAGGTCTCTGGGTTTYCCGGGCCTCTGTTCTGGCCGGGGGGGAAAACSGCCGCTACCGGCCAGGG
GGGTCCCSAACCARGGAAGCCCACCCCTCCCCTGCAT

Alinhamento das seqüências forward e reverse amostra 48

```
Query  5    GAACGTTTGCGCTTAGCGCGATGAGCGAGTTACACGGCGACGCACGTTATCTGGTTTATG  63
            | ||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  442  GAACGTTTGCGCTTAGCGCGATGAGCGAGTTACACGGCGACGCACGTTATCTGGTTTATG  383

Query  64   GCGGCATCCTGTTTGCCGCGTGGGGGAAATCGGCCCAGCTACCGATGCAAGCGTGGCTAC  123
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  382  GCGGCATCCTGTTTGCCGCGTGGGGGAAATCGGCCCAGCTACCGATGCAAGCGTGGCTAC  323

Query  124  CGGACGCAATGGAAGCGCCAACACCGATCAGCGCCTATCTCCACGCCGCATCGATGGTGA  183
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  322  CGGACGCAATGGAAGCGCCAACACCGATCAGCGCCTATCTCCACGCCGCATCGATGGTGA  263

Query  184  AAGTGGGCGTTTACATTTTTGCCCGCGCTATTATCGACGGCGGCAATATCCCGCATGTGA  243
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  262  AAGTGGGCGTTTACATTTTTGCCCGCGCTATTATCGACGGCGGCAATATCCCGCATGTGA  203

Query  244  TTGGCGGCGTTGGCATGGTCATGGCACTGGTCACCATTCTTTATGGCTTTCTGATGTATT  303
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  202  TTGGCGGCGTTGGCATGGTCATGGCACTGGTCACCATTCTTTATGGCTTTCTGATGTATT  143

Query  304  TGCCACAGCAGGATATGAAGCGGTTGCTAGCCTGGTCGACCATCACTCAACTTGGCTGGA  363
            |||| |||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  142  TGCCMCAGCAGGATATGAAGCGGTTGCTAGCCTGGTCGACCATCACTCAACTTGGCTGGA  83

Query  364  TGTTCTTCGGCTTGTCGCTCTCCATCTTCGGCTCGCGGCTGGCGCTGGAGGGCAGCATCG  423
            |||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  82   TGTTCTTCGGMTTGTCGCTCTCCATCTTCGGCTCGCGGCTGGCGCTGGAGGGCAGCATCG  23

Query  424  CCTACATCGTCAACCACGCGT  444
            ||||||||||| | |||||||
Sbjct  22   CCTACATCGTC-ATCACGCGT  3
```

A seqüência consenso obtida foi a seguinte:

Seqüência final amostra 48

GAACGTTTGCGCTTAGCGCGATGAGCGAGTTACACGGCGACGCACGTTATCTGGTTTATGGCGGCATCCTGTTTG
CCGCGTGGGGGAAATCGGCCCAGCTACCGATGCAAGCGTGGCTACCGGACGCAATGGAAGCGCCAACACCGATCA
GCGCCTATCTCCACGCCGCATCGATGGTGAAAGTGGGCGTTTACATTTTTGCCCGCGCTATTATCGACGGCGGCA
ATATCCCGCATGTGATTGGCGGCGTTGGCATGGTCATGGCACTGGTCACCATTCTTTATGGCTTTCTGATGTATT
TGCCACAGCAGGATATGAAGCGGTTGCTAGCCTGGTCGACCATCACTCAACTTGGCTGGATGTTCTTCGGCTTGT
CGCTCTCCATCTTCGGCTCGCGGCTGGCGCTGGAGGGCAGCATCGCCTACATCGTCAACCACGCGT

Finalmente, foi avaliado o resultado do seqüenciamento da amostra 48, na qual depois de ter analisado a seqüencia no software tblastx, foi obtido 100 % de similaridade e identidade para o componente D do gene hidrogenase-4 . A seqüência de aminoácidos obtida foi a seguinte:

Seqüência de aminoácidos amostra 48

RVVDDVGDAALQRQPRAEDGERQAEEHPAKLSDGRPG*QPLHILLWQIHQKAIKNGDQCHDHANAANHMRDIAAV
DNSAGKNVNAHFHHRCGVEIGADRCWRFHCVR*PRLHR*LGRFPPRGKQDAAINQITCVAV*LAHRAKRKR

Ao serem analisadas as quatro seqüências em conjunto, se pode observar que nem sempre foi obtido o mesmo resultado quando empregado o mesmo par de iniciadores, o que sugere que os oligos não são específicos para a detecção do gene da PHA sintase do tipo III, pois com este é possível amplificar outros genes.

A partir dos resultados apresentados, cada um dos iniciadores empregados para a triagem da PHA sintase foi procurado em cada uma das seqüencias inteiras com as quais foi obtida uma maior similaridade, buscando a visualização de um possível pareamento. Nas seqüências das amostras 23 e 24, se visualizou um pareamento para o iniciador phaC3F mas para as outras duas não, mesmo empregando o mesmo oligo. Estas análises foram feitos em *sílico* empregando o programa FastPCR.

Ao analisar as possíveis causas para os resultados apresentados, foi discutida a possibilidade de ter ficado resíduos de DNA genômico em cada uma das extrações de DNA plasmidial o que possibilitaria um pareamento deste iniciador, apresentando um falso positivo. Mas, também foi analisado, que só um dos iniciadores pareou com a seqüência molde, sugerindo a ausência de um possível amplicon quando feita a reação de PCR pela impossibilidade de fechar uma seqüencia. A possível contaminação com o DNA genômico também é refutada pela Figura 17, que sugere que os amplicons obtidos com os iniciadores para a classe III são da biblioteca e não fragmentos de DNA de *E. coli* contaminante.

Ao avaliar se nesta biblioteca de solo de Mata Atlântica haveria a possibilidade de encontrar genes codificadores do tipo III da PHA sintase, foi observado que microrganismos portadores de tais genes são encontrados em ambientes aquáticos, como lagoas, lagos, águas salobras, lagoas de esgoto, restingas, estuários e habitats marinhos diversos, onde o sulfeto de hidrogênio é exposto à luz (Shabeb et al., 2008). Assim, seria pouco provável a presença destes microrganismos neste amostra de solo.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.

Os resultados apresentados neste trabalho permitiram as seguintes conclusões:

O corante *Sudan Black B* não se apresentou como uma técnica de triagem suficiente para a detecção de clones produtores de PHA na biblioteca metagenômica de solo de mata Atlântica empregando *E. coli* como microrganismo hospedeiro.

A técnica de PCR foi muito eficiente na detecção de genes codificadores da enzima PHA sintase da classe I (50 clones), classe II (120 clones) e da classe IV (153 clones), a partir de seqüências conhecidas.

Os oligos desenhados por Solaiman et al., 2002 são específicos para a detecção de genes da PHA sintase da classe II, enquanto os iniciadores desenhados por Sheu et al., 2000 não são específicos para a detecção de genes de PHA sintase do tipo I, pois também detectam genes da classe II.

A técnica de PCR nas condições testadas neste trabalho permitiu detectar genes de interesse em misturas de DNA, com nível de detecção de 0,01 ng/µL do gene de interesse.

Os iniciadores empregados na triagem de genes *phaC* permitem a detecção dos genes da PHA sintase do tipo I, II e IV mesmo que não tenham sido desenhados para a triagem em biblioteca metagenômicas.

Os iniciadores para a detecção de genes da PHA sintase do tipo III desenhados por Hai e colaboradores (Haphapcr1/Haphapcr2), assim como os oligos desenhados no presente trabalho (phaC3F/phaC3R) não foram eficientes para a detecção dos genes de interesse.

Foram encontradas as três classes de PHA sintase na biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica, sugerindo que ainda há uma considerável diversidade de genes a ser explorada. Os iniciadores I-179 L(a)/I-179R(a) e B1F/B1R desenhados por Solaiman e Shamala respectivamente, são recomendados para a triagem de genes da PHA sintase da classe II e IV.

Como perspectivas futuras para a continuação do presente trabalho são sugeridos os seguintes passos:

A partir dos resultados obtidos, se sugere o estudo dos mais de 300 clones portadores de genes codificadores de outras classes de PHA sintase, assim como o estudo dos outros 63

amplicons correspondentes à classe III da PHA sintase, para a identificação de novos genes de interesse industrial e biotecnológico. Sugerindo também o desenho de novos iniciadores mais espeçificos capazes de amplificar o gene da PHA sintase do tipo III.

Também se sugere o estudo dos amplicons codificadores de enzimas pertencentes às classes I, II e IV de PHA sintase, visando à clonagem e expressão em linhagens deficientes na produção de PHA, avaliando assim o tipo de PHA produzido e as possíveis melhoras em sua composição.

REFERÊNCIAS

Abe H, Doi Y, Fukushima T, Eya H. Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. 61-3. Int J Biol Macromol. 1994;16:115-9.

Almeida WB. Estudos das propiedades termomecânicas e morfológicas de blendas biodegradáveis de poli (ε-caprolactona) (PCL) com amido de milho natural e modificado, plastificada com alquel epóxi estearato, com e sem póde fibra de coco [Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)]. Campinas. Facultade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas; 2005.

Angelov A, Mientus M, Liebl S, Liebl W. A two-host fosmid system for functional screening of (meta)genomic libraries from extreme thermophiles. Syst Appl Microbiol. 2009;3:177-185.

Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol Rev. 1990;54:450- 472.

Antonio RV, Steinbüchel A, Rehm BHA. Analysis of *in vivo* substrate specificity of the PHA synthase from *Ralstonia eutropha*: formation of novel copolyesters in recombinant *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 2000;182:111-7.

Atlas RM, Bartha R. Microbial Evolution and Biodiversity. Microbial ecology: fundamentals and applications 4th.ed. Menlo Park,California: Book News, 1997. 704p.

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979;7(6):1513–23.

Borneman J, Triplett EW. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforastation. Appl Environ Microbiol. 1997;63(07):2647-53.

Brady SF, Clardy J. Long-chain *N*-acyl amino acid antibiotics isolated from heterologously expressed environ mental DNA. J Am Chem Soc. 2000;122:12903–04.

Bueno Netto CL, Craveiro AM, Pradella JGC, Oliveira MS, Maiorano AE, Pinto AG, Saito RM. Processo para produzir polihidroxialcanoatos a partir de açúcares extraídos da cana-de-açúcar. Brasil: Patente brasileira PI 9103116-8. 1993.

Buffoni E, Gomez JGC, Silva LF. Avaliação da composição de polímeros biodegradáveis produzidos por *Burkholderia sacchari* a partir de diferentes substratos. Em: Simpósio Nacional de Bioprocesso. Recife - PE, 2005.

Buffoni E. Avaliação da Composição de Polímeros Biodegradáveis Produzidos por *Burkholderia sacchari* a partir de Diferentes Substratos [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, Universidade de São Paulo; 2006.

Cottrell MT, Moore JA, Kirchman DL. Chitinases from uncultured marine microorganisms. Appl Environ Microbiol. 1999;65:2553–57.

Courtois S, Frostegård A, Göransson P, Depret G, Jeannin P, Simonet P. Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. Environ Microbiol. 2001;431–439.

Courtois S, Cappellano CM, Ball M, Francou FX, Normand P, Helynck G, Martinez A, Kolvek SJ, Hopke J, Osburne MS, August PR, Nalin R, Guérineau M, Jeannin P, Simonet P, Pernodet JL. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. Appl Environ Microbiol. 2003;69:49–55.

Cowan D, Meyer Q, Stafford W, Muyanga S, Cameron R, Wittwer P. Metagenomic gene discovery: past, present and future. Trends Biotechnol. 2005; 23(6):321-9.

Daniel R. The soil metagenome: a rich resource for the discovery of novel natural products. Curr Opin Microbiol. 2004;15:199 – 204.

Daniel R. The metagenomics of soil. Nat Rev Microbiol. 2005;3:470-8.

Demanèche S, Philippot L, David MM, Navarro E,CVogel TM, Simonet P. Characterization of denitrification gene clusters of soil bacteria via a metagenomic approach. Appl Environ Microbiol. 2009;75:534-7.

Desetty RD, Mahajan VS, Khan BM, Rawal SK. Isolation and heterologous expression of PHA synthesising genes from *Bacillus thuringiensis* R1. World J. Microbiol. Biotechnol. 2008; 24(9):1769-74.

Dimitrov MR. Construção de biblioteca metagenômica e prospecção de genes para a síntese de polihidroxialcanoatos [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

Dunbar J, Takala S, Barns SM, Davis JA, Kuske CR. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. Appl Environ Microbiol. 1999;65:1662–9.

Elend C, Schmeisser C, Leggewie C, Babiak P, Carballeira JD, Steele HL, Reymond JL, Jaeger KE, Streit WR. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases**.** Appl Environ Microbiol. 2006;72:3637-45.

Eschenfeldt WH, Stols L, Rosenbaum H, Khambatta ZS, Quaite-Randall E, Wu S, Kilgore DC, Trent JD, Donnelly MI**.** DNA from Uncultured Organisms as a Source of 2,5-Diketo-D-Gluconic Acid Reductases. Appl Environ Microbiol. 2001;67:4206–14.

Fu C, Hu Y, Xie F, Guo H, Ashforth EJ, Polyak SW, Zhu B, Zhang L. Molecular cloning and characterization of a new cold-active esterase from a deep-sea metagenomic library. Appl Microbiol Biotechnol. 2011; 90:961–970

Futamata H, Harayama S, Watanabe K. Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethyrene bioremediation, Appl Eviron Microbiol. 2001;67:4671-7.

Gabor EM, Vries EJ, Janssen DB. Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. Environ Microbiol 2004;6:948–8.

Gillespie DE, Brady SF, Bettermann AD, Cianciotto NP, Liles MR, Rondon MR, Clardy J, Goodman RM, Handelsman J. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. Appl Environ Microbiol. 2002;68(9):4301-6.

Ginolhac A, Jarrin C, Gillet B, Robe P, Pujic P, Tuphile K, Bertrand H, Vogel TM, Perriere G, Simonet P, Nalin R. Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. Appl Environ Microbiol. 2004; 70:5522–5527.

Gomes RS. Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para o controle da sua composição monomérica [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

Gomez JGC, Bueno Netto CL. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. Rev Bras Eng Quim. 1997; 17(2):24-9.

Gomez JGC. Produção por *Pseudomonas sp* de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: Avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes [Tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2000.

Gupta R, Berg QK, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol. 2002;59:15–32.

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* PCC6912 and *Synechococcus* sp. strain MA19. Microbiol 2001;147**:**3047-60.

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*. Appl Environ Microbiol. 2004;4440 - 8.

Henne A, Daniel R, Schmitz RA, Gottschalk G. Construction of environmental DNA libraries in Escherichia coli and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. Appl Environ Microbiol. 1999;65:3901– 07.

Holmes PA. Applications of PHB – a microbially produced biodegradable thermoplastic. Phys Technology. 1985;16:32-6.

Huisman GJ, De Leeuw O, Eggink G, Witholt B. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. Appl Environ Microbiol. 1989;55:1949-1954.

Hrvatin S, Piel J. Rapid isolation of rare clones from highly complex DNA libraries by PCR analysis of liquid gel pools. J Microbiol Meth. 2007;68:434-436.

Jia Y, Kappock TJ, Frick T, Sinskey AJ, Stubbe J. Lipases Provide a New Mechanistic Model for Polyhydroxybutyrate (PHB) Synthases: Characterization of the Functional Residues in *Chromatium vinosum* PHB Synthase. Biochemestry. 2000;39:3927-3936.

Kidwell J, Valentin HE, Dennis D. Regulated expression of the *Alcaligenes eutrophus* PHA biosynthesis genes in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 1995;6(4):1391-8.

Kim YJ, Choi GS, Kim SB, Yoon GS, Kim YS, Ryu YW. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. Protein Expr Purif. 2006;45:315-23.

Knietsch A, Bowien S, Whited G, Gottschalk G, Daniel R. Identification and characterization of genes encoding coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures. Appl Environ Microbiol. 2003;69:3048–60.

Langenbach S, Rehm BHA, Steinbüchel A. Functional expression of the PHA synthase gene *pha*C1 from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. FEMS Microbiol Lett. 1997;150:303-309.

Lee S. Plastic bacteria. Progress and prospects for polyhydroxyalkanoates production in bacteria. Trends Biotech. 1996b;14:431-8.

Lee IY, Kim GJ, Choi DK, Yeon BK, Park YH. Improvement of hydroxyvalerate fraction in poly(β-hydroxybutyrate-*co*-β-hydroxyvalerate) by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*. J Ferm Bioeng. 1996;81:255-8.

Lee SY. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Biotechnol Bioeng. 1996;49:1-14.

Lefevre F, Robe P, Jarrin C, Ginolhac A, Zago C, Auriol D, Vogel T, Simonet P, Nalin R. Drugs from hidden bugs: their discovery via untapped resources. Res Microbiol. 2008;159:153–161.

Li L, McCorkle SR, Monchy S, Taghavi S, Leile D. Bioprospecting metagenomes: glycosyl hydrolases for converting biomass. Biotech Biofuels. 2009;2:10.

Li R, Zhang H, Qi Q. The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli* (Review). Biores Technol. 2007;98:2313-2320.

Liebergesell M, Mayer F, Steinbüchel A. Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacteria reveals synthesis of polyester exhibiting an unusual composition. Appl Microbiol Biotechnol. 1993;40:292-300.

Linhart C, Shamir R. The degenerate primer design problem: theory and aplications. J Comput Biol. 2000; 12(4): 431-56.

Lopes MSG, Rocha RCS, Zanotto SP, Gomez JGC, Silva LF. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. World J Microb Biotech. 2009;25:1751-6.

Madison LL, Huisman FW. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. Microbiol Mol Biol Rev. 1999;63:21-53.

Majernik A, Gottschalk G, Daniel R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring Na+(Li+)/H+ antiporter activity on *Escherichia coli*: characterization of the recovered genes and the corresponding gene products. J Bacteriol. 2001;183:6645–53.

Martinez A, Kolvek SJ, Yip CLT, Hopke J, Brown KA, MacNeil IA, Osburne MS. Genetically modified bacterial strains and novel bacterial artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple expression hosts. Appl Environ Microbiol. 2004;70:2452–63.

Massini KC. Bioprospecção de Compostos Bioativos em uma Biblioteca Metagenômica [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2004.

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

Old RM, Primrose SB. Principles of gene manipulation An introduction to genetic engineering. *Blackwell Science*, ed. 5, p. 183, cap. 10, 1994.

Parachin NS, Gorwa-Grauslund MF. Isolation of xylose isomerases by sequence- and function-based screening from a soil metagenomic library. Biotechnol Biofuels. 2011; 4:9.

Park SY, Shin HJ, Kim, GJ. Screening and Identification of a Nolvel Esterase EstPE from a Metagenomic DNA library. J Microbiol. 2011; 49(1):7-14

Pereira RM. Diversidade bacteriana de um latos solo sob cultivo intensivo e floresta através da análise metagenômica [Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária)]. São Paulo: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Campus Jaboticabal; 2003.

Pradella JGC. Biopolímeros e intermediários químicos. Relatório técnico no. 84396-205, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Ciência Tecnologia e Inovação, <http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06_biopolimeros.pdf> [2010.jun.20].

Ramsay BA, Saracovan I, Ramsay JA, Marchessault RH. Continuous production of poly-β-hydroxyalkanoates with longside-chains by Pseudomonas oleovorans. Appl Environ Microbiol. 1991;57:625–9.

Rappé MS, Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority. Annu Rev Microbiol. 2003; 57:369-94.

Rees HC, Grant S, Jones B, Grant WD, Heaphy S. Detecting cellulose and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. Extremophiles. 2003;**7:**415-21.

Rehm, BHA.Polyester synthases: Natural catalysts for plastics. J Biochem. 2003;376:15-33.

Rehm BHA, Antonio RV, Spiekermann P, Amara AA, Steinbüchel A. Molecular characterization of the poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: invitro evolution, site-specific mutagenesis and development of a PHB synthase protein model. Biochim. Biophys. 2002; Acta 1594:178–190.

Rehm BHA, Steinbüchel A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. Int J Biol Microbiol. 1999;25:3-19.

Rehm BHA, Steinbüchel A. PHA synthases: key enzymes of PHA biosynthesis. Steinbüchel, A. and Doi, Y. E. Biopolymers. Weinheim: Wiley-VCH; 2001. 173–215, ,.

Riesenfeld CS, Goodman RM, Handelsman J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. Environ Microbiol. 2004;6:981–9.

Riesenfeld CS, Scholoss PD, Handelsman J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. Annu Rev Genet. 2004;38:525-52.

Rondon MR, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, Loiacono KA, Lynch BA, MacNeil IA, Minor C, Tiong CL, Gilman M, Osburne MS, Clardy J, Handelsman J, Goodman RM. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. Appl Environ Microbiol. 2000;66:2541–47.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2 ed., New York: Cold Spring Harbor Lab. Press.1989.

Schlegel HG, Lafferty R, Krauss I. The isolations of mutants not accumulating poly-β-hydroxybutyric acid. Arch Microbiol. 1970;71:283-94.

Schmidt TM, DeLong EF, Pace NR: Analysis of a marine picoplankton community by 165 rRNA gene cloning and sequencing. J Bacteriol. 1991;4371-8.

Schubert P, Krüger N, Steinbüchel A. Molecular analysis of the Alcaligenes eutrophus poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic operon: identification of the N-terminus of poly(3-hydroxybutyrate) synthase and identification of the promoter. J Bacteriol. 1991;173:168–175

Sebat JL, Colwell FS, Crawford RL. Metagenomic profiling: microarray analysis of an environmental genomic library. Appl Environ Microbiol. 2003;69:4927–34.

Shabeb M, Azim N, Shoreit A. Ecological and Physiological Studies on Purple Sulphur Bacteria (Chromatiaceae) at Aswan High Dam Lake. American-Eurasian Journal Agriculture & Environmental Science. 2008;4:462-7.

Shamala TR, Chandrashekar A, Vijayendra SVN, Kshama L. Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA) – Producing *Bacillus spp* using the polymerase chain reaction (PCR). J Appl Microb. 2003;94:369-74.

Sharma P, Kumari H, Kumar M, Verma M, Kirti K, Malhorta S, Khurana J, Lal R. From bacterial genomics to metagenomics: concept, tools and recent advances. Indian J Microbiol. 2008;48:173–194.

Sheu DS, Wang YT, Lee CY. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. Microbiol. 2000;146:2019–25.

Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y,Simon M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobasepair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. Proc Natl Acad Sci. 1992;89:8794-97.

Silva LF, Gomez JGC, Oliveira MS, Alterthum F. Freeze-drying of industrial yeast strains: influence of growth conditions, cooling rates and suspending media on the viability of the recovered cells. Revista de Microbiologia (Impresso) (Cessou em 1999. Cont. ISSN 1517-8382 Brazilian Journal of Microbiology; Impresso). 1992; 23: 117 - 122.

Silva LF, Taciro MK, Michelin MER, Carter JM, Pradella JGC, Gomez JGC. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xilose, glucose and sugarcane bagasse hydrolisate. J Ind Microbiol Biotechnol. 2004;31:245-54.

Silva LF, Gomez JGC, Rocha RCS, Taciro MK, Pradella JGC. Produção biotecnológica de polihidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. Quim Nova. 2007;30:1732-43.

Slater SC, Voige WH, Dennis DE. Clonning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-β-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. J. Bacteriol. 1988;170:4431-6.

Solaiman DKY, Ashby RD, Foglia TA. Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. Appl Microbiol Biotechnol. 2000;53:690–94.

Solaiman DKY. Polymerase-chain-reaction-based detection of individual polyhydroxyalkanoate synthase *phaC1* and *phac2* genes. Biotech Lett. 2002;24:245–50.

Solaiman DKY, Ashby RD. Rapid Genetic Characterization of Poly(hydroyalkanoate) Synthase and Its Applications. Reviews from ISBP 2005, Biomacromol. 2005;6:532-7.

Stein JL, Marsh TL, Wu KY, Shizuya H, DeLong EF. Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. J Bacteriol. 1996;178:591–599.

Steinbüchel A. Polyhydroxyalcanoic acids. In: Biomaterials from biological sources. Basingstoke: MacMillan Publishers; 1991. p 123-213.

Steinbüchel A, Füchtenbusch B. Bacterial and other biological systems for polyester production. Trends Biotechnol. 1998;16(10):419-427.

Steinbüchel A, Valentin HE. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. FEMS Microbiol Lett. 1995;128:219-228.

Steinbüchel A, Hein S. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2001;71:81–123.

Tomizawa S, Hyakutake M, Saito Y, Agus J, Mizuno K, Abe H, Tsuge T. Molecular Weight Change of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Caused by the PhaC Subunit of PHA Synthase from *Bacillus cereus* YB-4 in Recombinant *Escherichia coli*. Biomacromolecules. 2011; 12,2660–66.

Torsvik VL, Daae FL, Sandraa RA, Ovreas L. Novel tecnics for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. J Biotech. 1998;64:53-62.

Valentin HE, Lee EY, Choi CY, Steinbüchel A. Identification of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria. Appl Microbiol Biotechnol. 1994;40(5):710-6.

Valentin HE, Steinbüchel A. Application of enzymatically synthesized short-chain-length hydroxy fatty acid coenzyme A thioesters for assay of polyhydroxyalkanoic acid syntheses. Appl Microbiol Biotechnol.1994;39:309–17.

Voget S, Leggewie C, Uesbeck A, Raasch C, Jaeger KE, Streit WR. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. Appl Environ Microbiol. 2003;69:6235-42.

Wang GY, Graziani E, Waters B, Pan W, Li X, McDermott J, Meurer G, Saxena G, Andersen RJ, Davies J. Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. Org Lett. 2000;2:2401–2404.

Wild J, Hradecna Z, Szybalski W. Conditionally Amplificable BACs: Switching From Single-Copy to High-Copy Vectors and Genomic Clones. Genome Res. 2002;12:1434-44.

Wilson MS, Bakermans C, Madsen EL. In situ, real-time catabolic gene expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. Appl Environ Microbiol. 1999;65:80–7.

Wu L, Thompson DK, Li G, Hurt RA, Tiedje JM, Zhou J. Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. Appl Environ Microbiol. 2001;67:5780–90.

Yilmaz S. Diversity and molecular identification of polyhydroxyalkanoate synthases in a mixed culture perfoming enhanced biological phosphorus removal [Doctoral Thesis (Engineering Civil and Enviromental Engineering)]. Berkely: University of California; 2006.

Yun J, Kang S, Park S, Yoon H, Kim MJ, Heu S, Ryu S. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. Appl Environ Microbiol. 2004;70:7229–35.

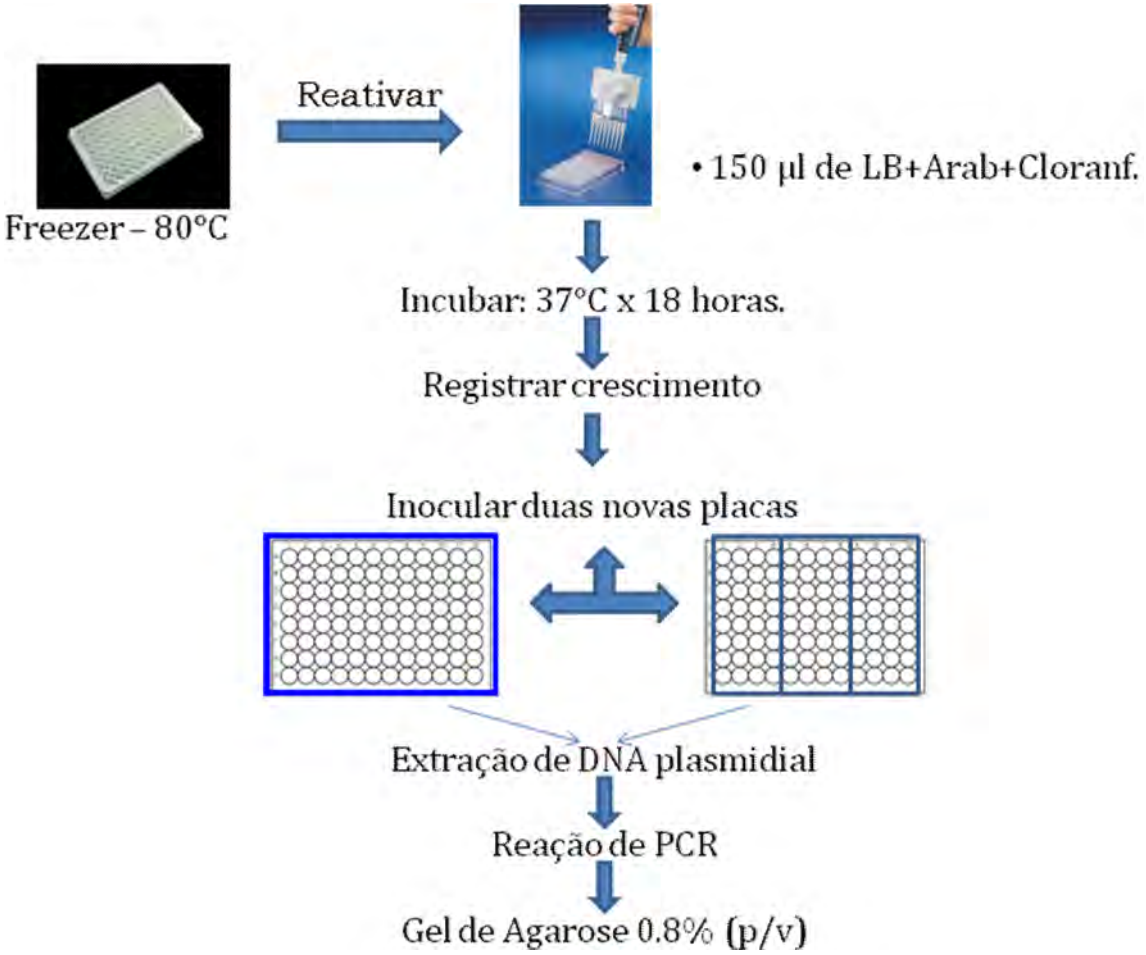
Zhou J, Thompson DK. Challenges in applying microarrays to environmental studies. Curr Opin Biotechnol. 2002;13:204–7.

Zhou J**,** Xia B, Treves DS, Wu LY, Marsh TL, O'Neill RV, Palumbo AV, Tiedje JM. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. Appl Environ Microbiol. 2002;68:326–34.

ANEXO A

SCREENING PRIMÁRIO

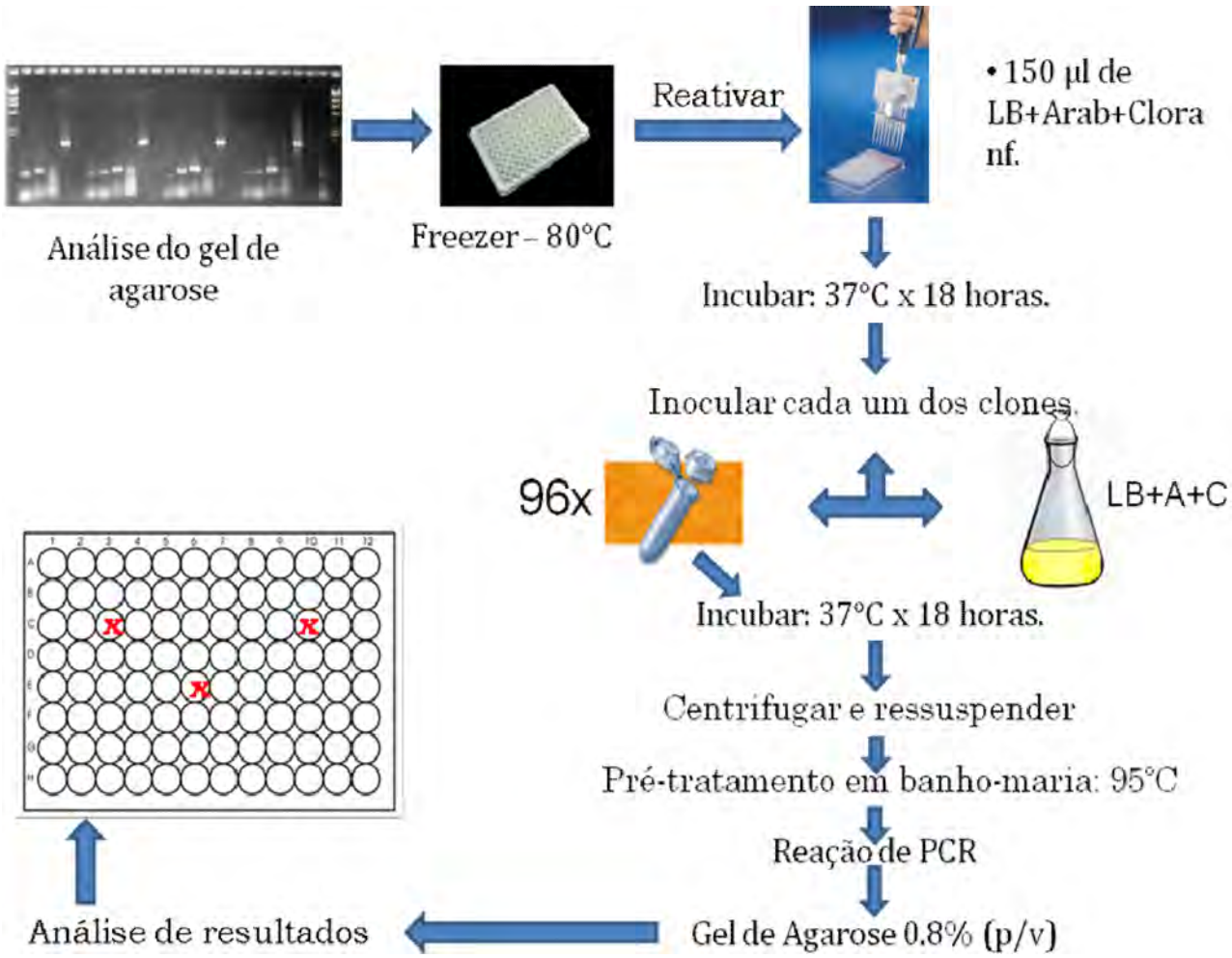
Esquema geral da metodologia empregada para realizar a triagem do gene *phaC* das diferentes classes da enzima PHA sintase na biblioteca Metagenômica de solo de Mata Atlântica.



ANEXO B

Identificação dos clones

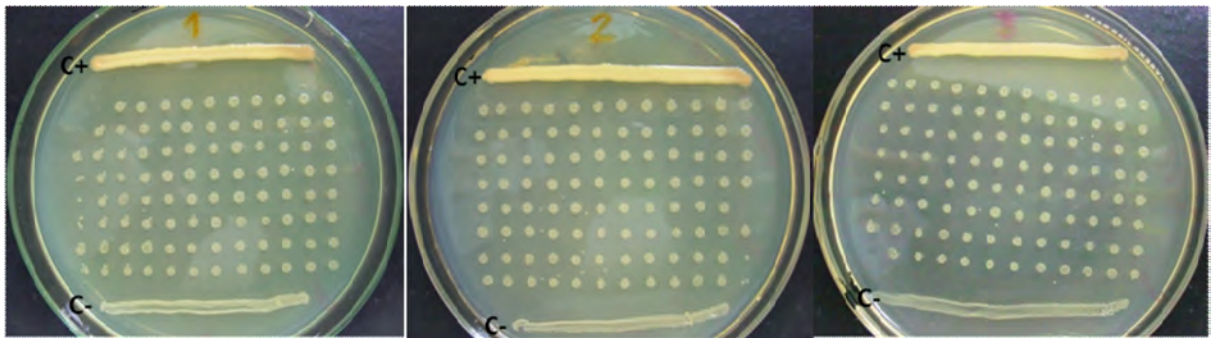
Esquema geral da metodologia empregada para realizar a localização e identificação dos clones contendo gene *phaC* das diferentes classes da enzima PHA sintase na biblioteca



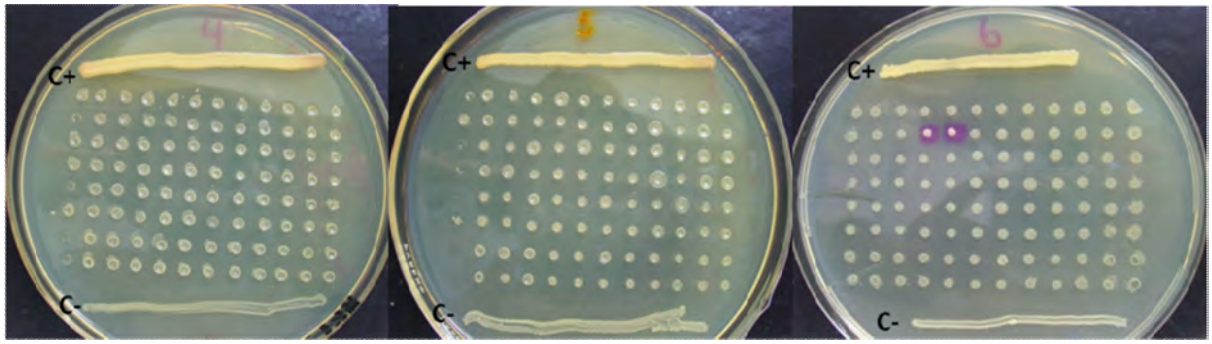
Metagenômica de solo de Mata Atlântica.

ANEXO C

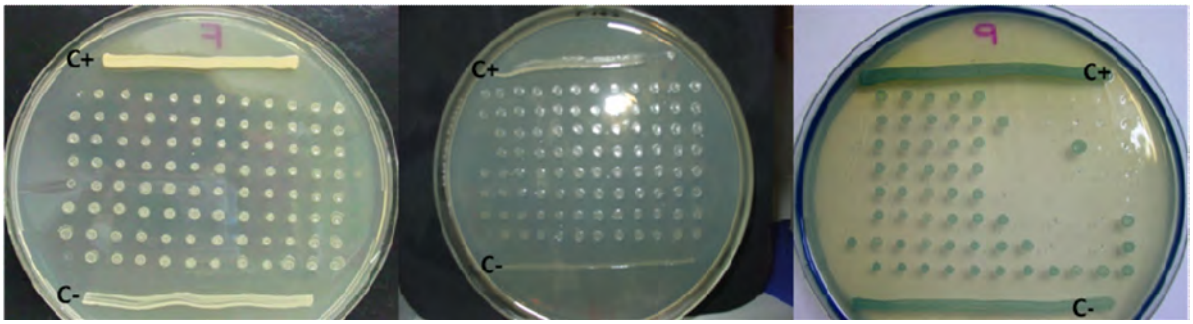
Triagem de genes phac pela atividade fenotípica na biblioteca metagenômica.



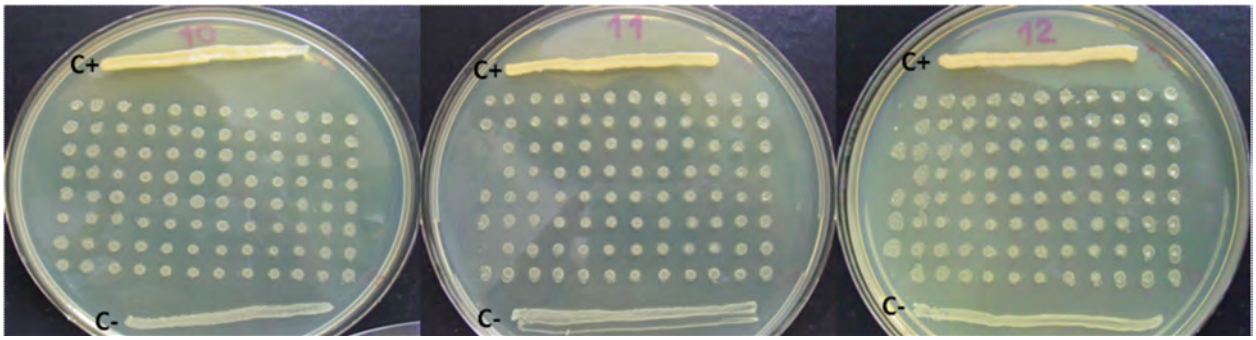
Test fenotípico para o acúmulo de grânulos intracelulares de PHA, sendo apresentado o cultivo em meio LBGC das placas 1, 2 e 3 da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica sem adição do corante lipofílico *Sudan Black B*, onde se pode evidenciar o acúmulo de PHA do controle positivo pela opacidade da colônia, sendo comparado com a ausência de colônias positivas para o acúmulo de PHA, devido a carência desta mesma características, como acontece com o controle negativo.



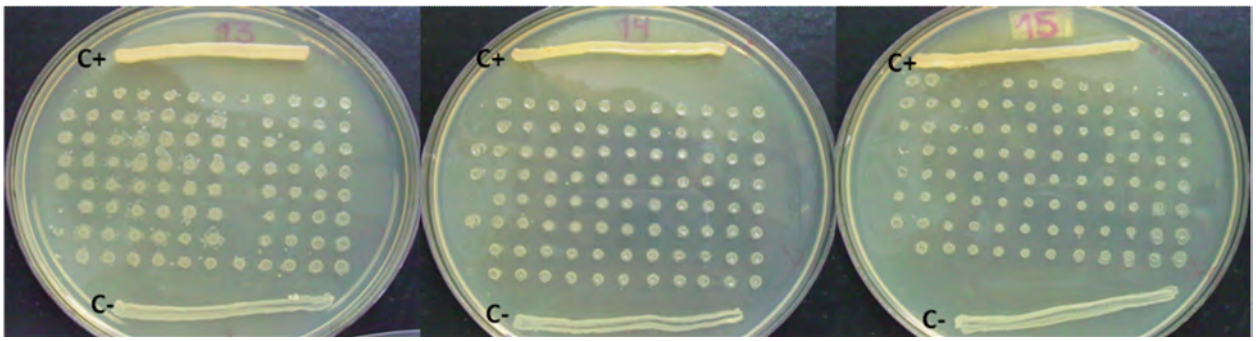
Test fenotípico para o acúmulo de grânulos intracelulares de PHA, sendo apresentado o cultivo em meio LBGC das placas 4, 5 e 6 da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica sem adição do corante lipofílico *Sudan Black B*, onde se pode evidenciar o acúmulo de PHA do controle positivo pela opacidade da colônia, sendo comparado com a ausência de colônias positivas para o acúmulo de PHA, devido a carência desta mesma características, como acontece com o controle negativo.



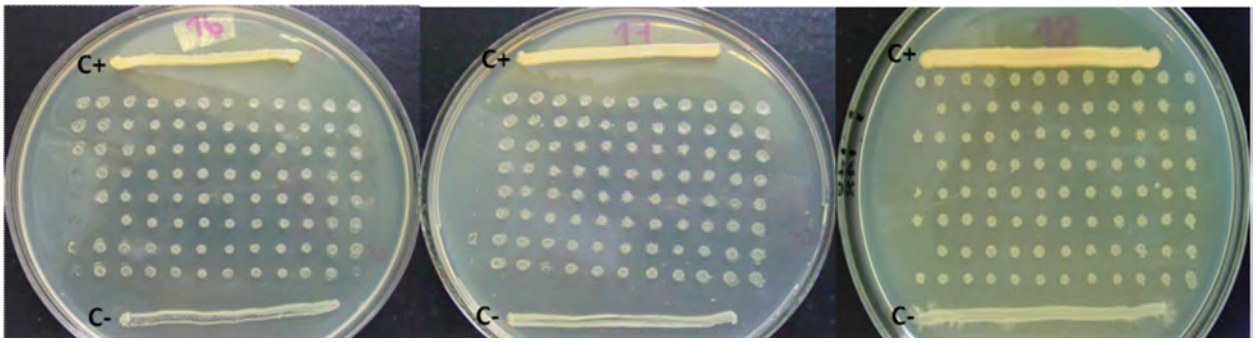
Test fenotípico para o acúmulo de grânulos intracelulares de PHA, sendo apresentado o cultivo em meio LBGC das placas 7, 8 e 9 da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica sem adição do corante lipofílico *Sudan Black B*, onde se pode evidenciar o acúmulo de PHA do controle positivo pela opacidade da colônia, sendo comparado com a ausência de colônias positivas para o acúmulo de PHA, devido a carência desta mesma características, como acontece com o controle negativo.



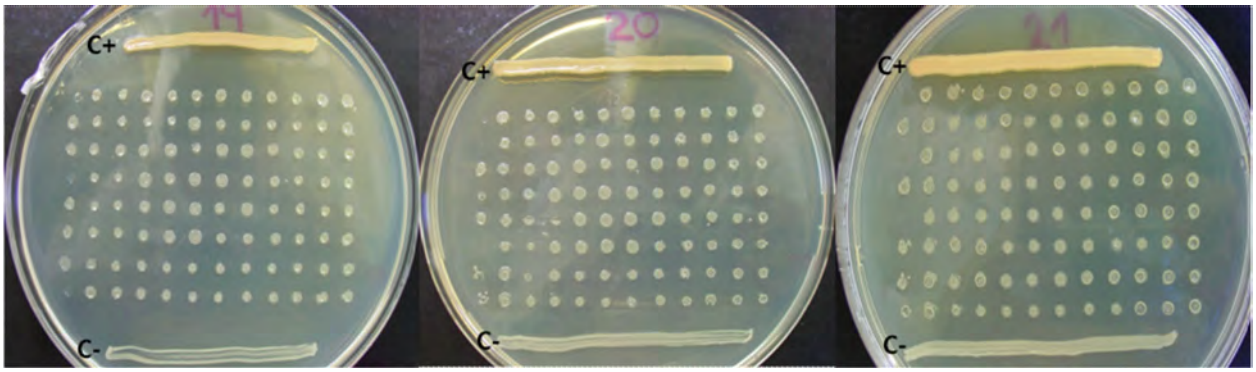
Test fenotípico para o acúmulo de grânulos intracelulares de PHA, sendo apresentado o cultivo em meio LBGC das placas 10, 11 e 12 da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica sem adição do corante lipofílico *Sudan Black B*, onde se pode evidenciar o acúmulo de PHA do controle positivo pela opacidade da colônia, sendo comparado com a ausência de colônias positivas para o acúmulo de PHA, devido a carência desta mesma características, como acontece com o controle negativo.



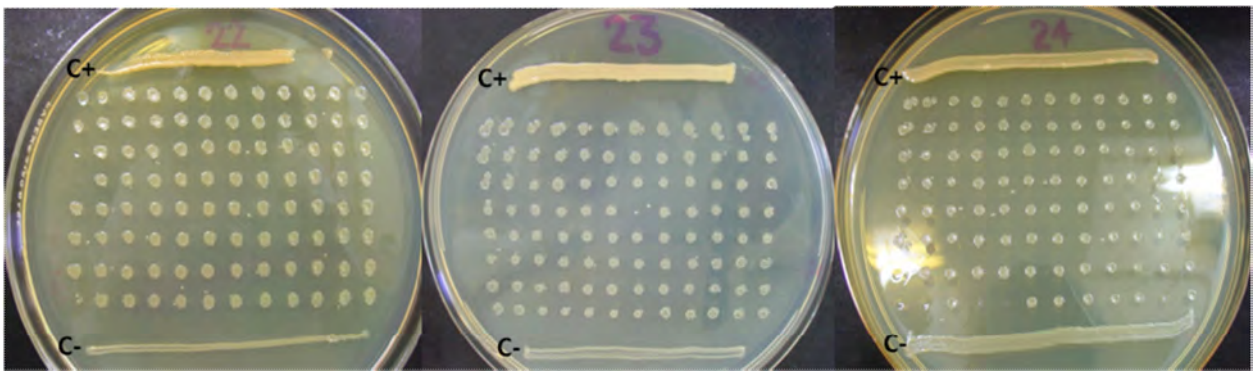
Test fenotípico para o acúmulo de grânulos intracelulares de PHA, sendo apresentado o cultivo em meio LBGC das placas 13, 14 e 15 da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica sem adição do corante lipofílico *Sudan Black B*, onde se pode evidenciar o acúmulo de PHA do controle positivo pela opacidade da colônia, sendo comparado com a ausência de colônias positivas para o acúmulo de PHA, devido a carência desta mesma características, como acontece com o controle negativo.



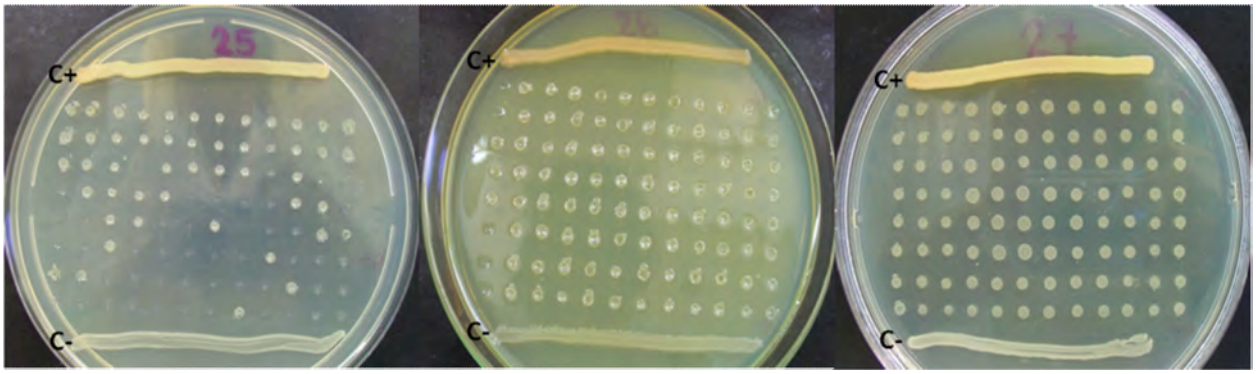
Test fenotípico para o acúmulo de grânulos intracelulares de PHA, sendo apresentado o cultivo em meio LBGC das placas 16, 17 e 18 da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica sem adição do corante lipofílico *Sudan Black B*, onde se pode evidenciar o acúmulo de PHA do controle positivo pela opacidade da colônia, sendo comparado com a ausência de colônias positivas para o acúmulo de PHA, devido a carência desta mesma características, como acontece com o controle negativo.



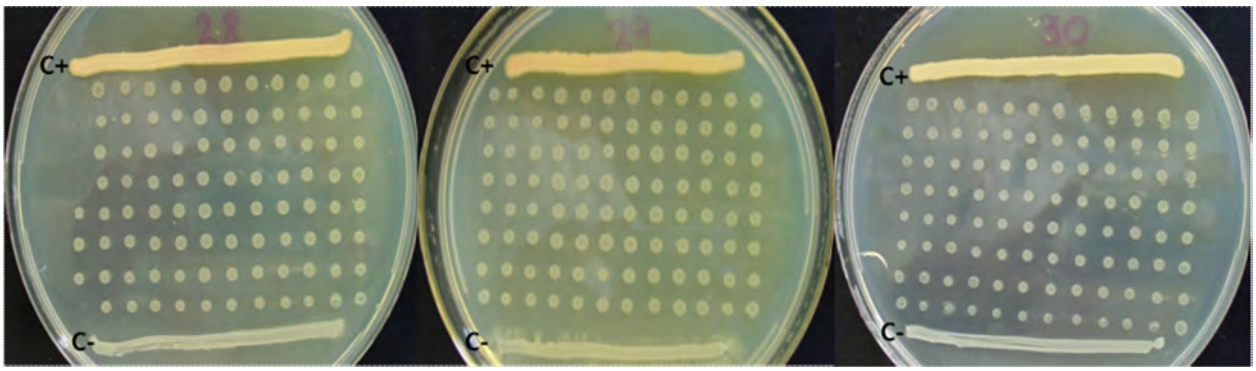
Test fenotípico para o acúmulo de grânulos intracelulares de PHA, sendo apresentado o cultivo em meio LBGC das placas 19, 20 e 21 da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica sem adição do corante lipofílico *Sudan Black B*, onde se pode evidenciar o acúmulo de PHA do controle positivo pela opacidade da colônia, sendo comparado com a ausência de colônias positivas para o acúmulo de PHA, devido a carência desta mesma características, como acontece com o controle negativo.



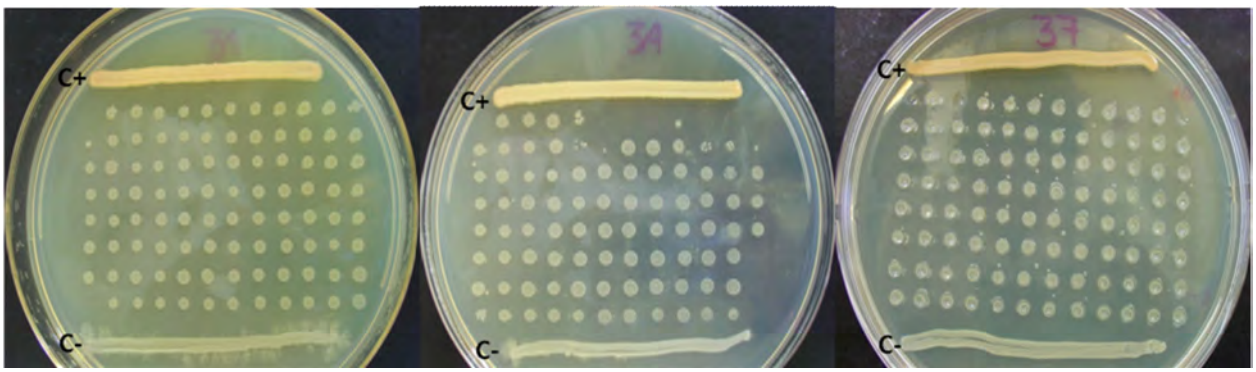
Test fenotípico para o acúmulo de grânulos intracelulares de PHA, sendo apresentado o cultivo em meio LBGC das placas 22, 23 e 24 da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica sem adição do corante lipofílico *Sudan Black B*, onde se pode evidenciar o acúmulo de PHA do controle positivo pela opacidade da colônia, sendo comparado com a ausência de colônias positivas para o acúmulo de PHA, devido a carência desta mesma características, como acontece com o controle negativo.



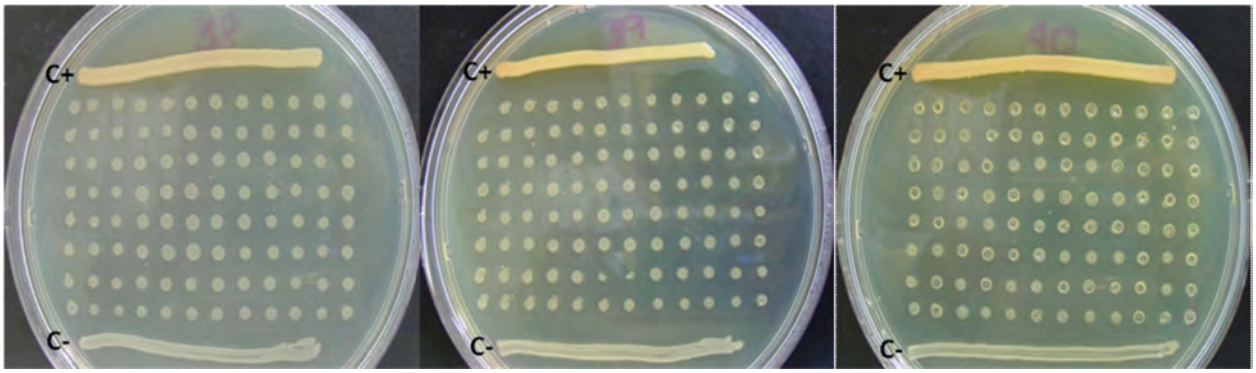
Test fenotípico para o acúmulo de grânulos intracelulares de PHA, sendo apresentado o cultivo em meio LBGC das placas 25, 26 e 27 da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica sem adição do corante lipofílico *Sudan Black B*, onde se pode evidenciar o acúmulo de PHA do controle positivo pela opacidade da colônia, sendo comparado com a ausência de colônias positivas para o acúmulo de PHA, devido a carência desta mesma características, como acontece com o controle negativo.



Test fenotípico para o acúmulo de grânulos intracelulares de PHA, sendo apresentado o cultivo em meio LBGC das placas 28, 29 e 30 da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica sem adição do corante lipofílico *Sudan Black B*, onde se pode evidenciar o acúmulo de PHA do controle positivo pela opacidade da colônia, sendo comparado com a ausência de colônias positivas para o acúmulo de PHA, devido a carência desta mesma características, como acontece com o controle negativo.



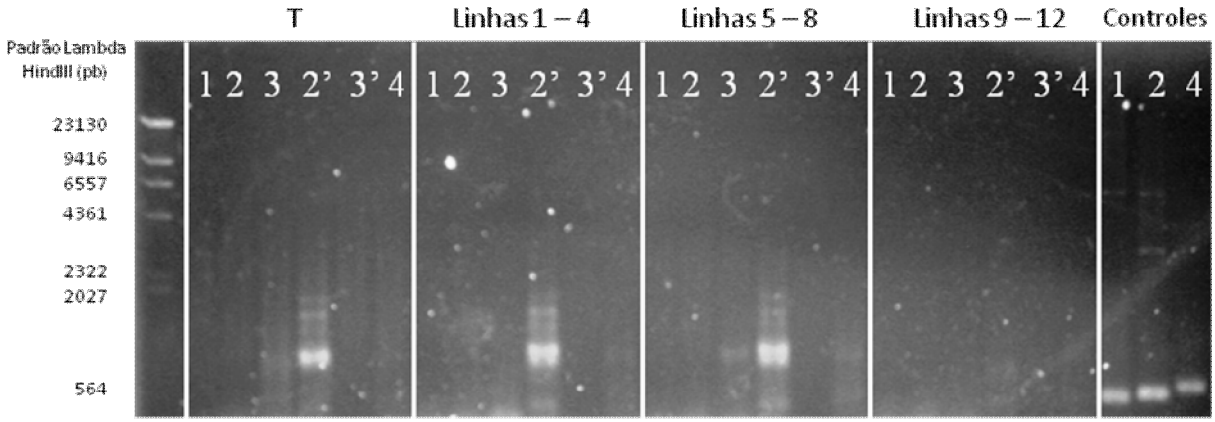
Test fenotípico para o acúmulo de grânulos intracelulares de PHA, sendo apresentado o cultivo em meio LBGC das placas 31, 34 e 37 da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica sem adição do corante lipofílico *Sudan Black B*, onde se pode evidenciar o acúmulo de PHA do controle positivo pela opacidade da colônia, sendo comparado com a ausência de colônias positivas para o acúmulo de PHA, devido a carência desta mesma características, como acontece com o controle negativo.



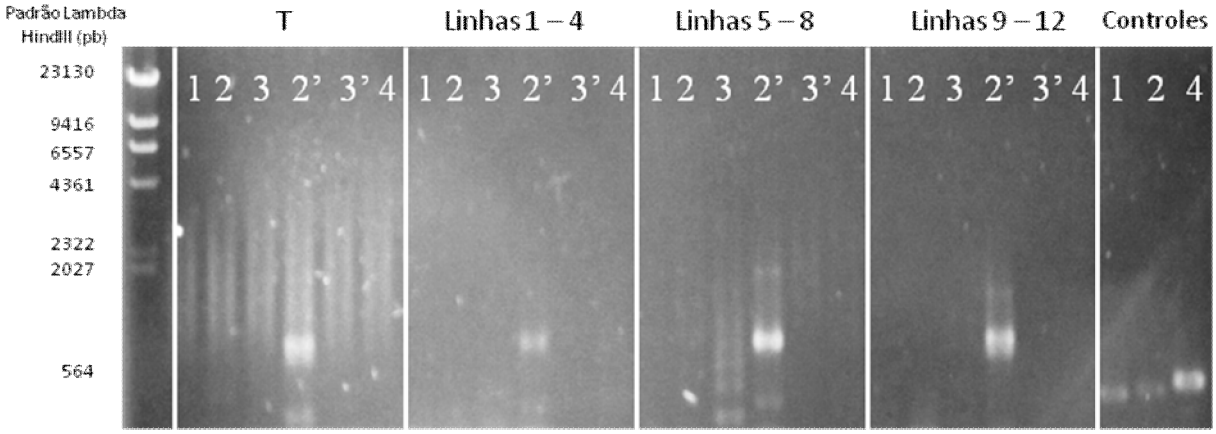
Test fenotípico para o acúmulo de grânulos intracelulares de PHA, sendo apresentado o cultivo em meio LBGC das placas 38, 39 e 40 da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica sem adição do corante lipofílico *Sudan Black B*, onde se pode evidenciar o acúmulo de PHA do controle positivo pela opacidade da colônia, sendo comparado com a ausência de colônias positivas para o acúmulo de PHA, devido a carência desta mesma características, como acontece com o controle negativo.

ANEXO D

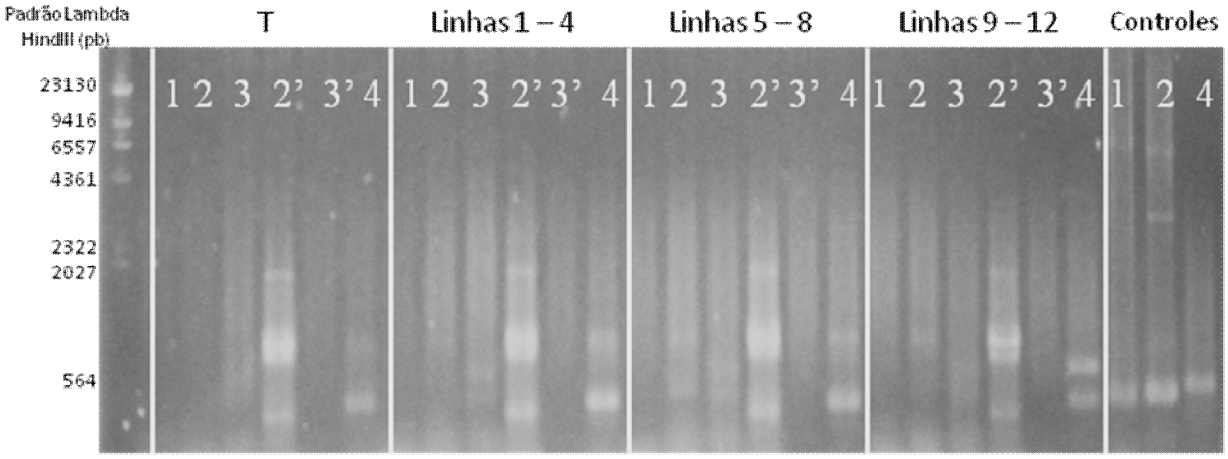
Identificação dos clones positivos pela técnica de PCR.



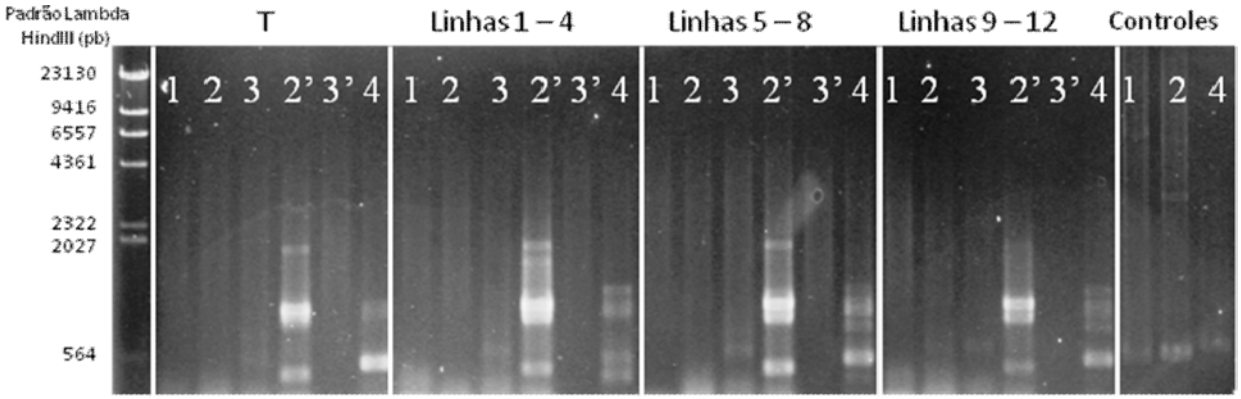
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 1** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



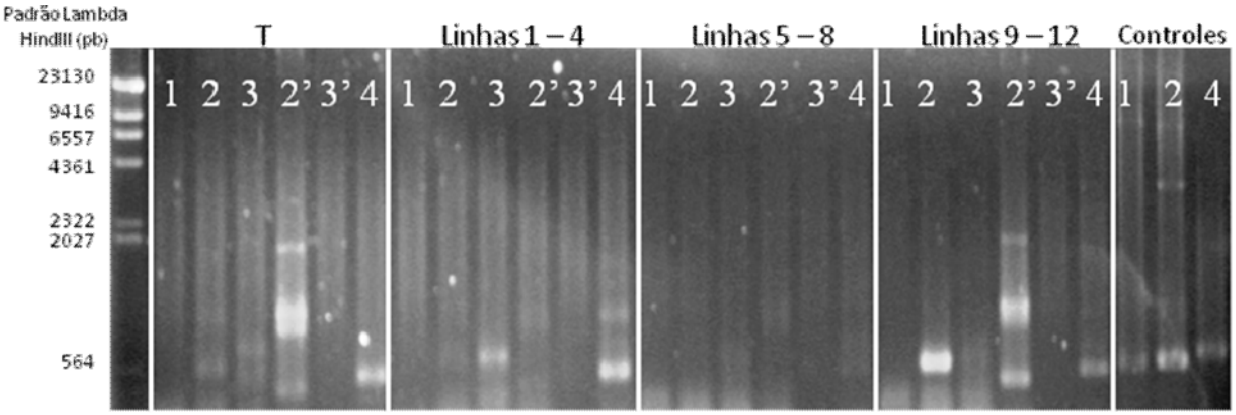
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 2** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



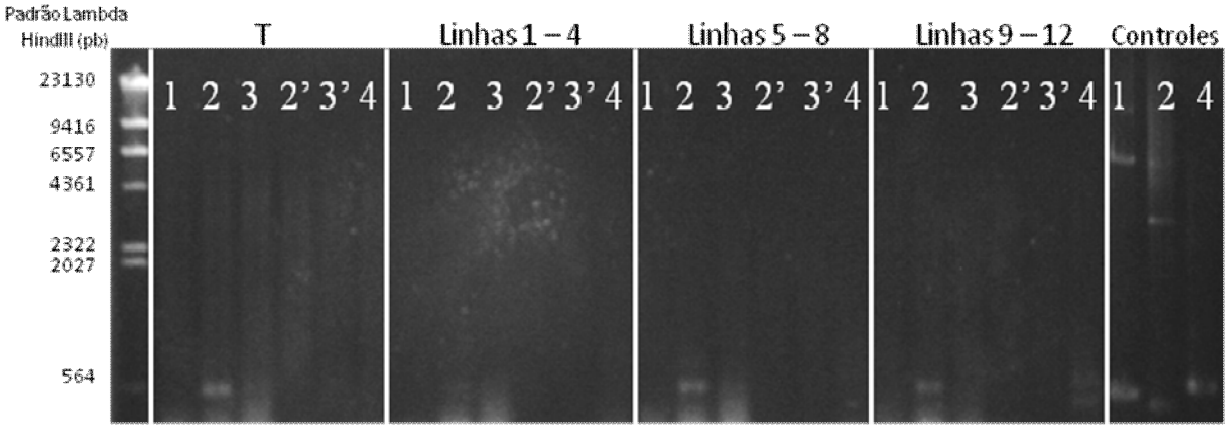
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 3** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



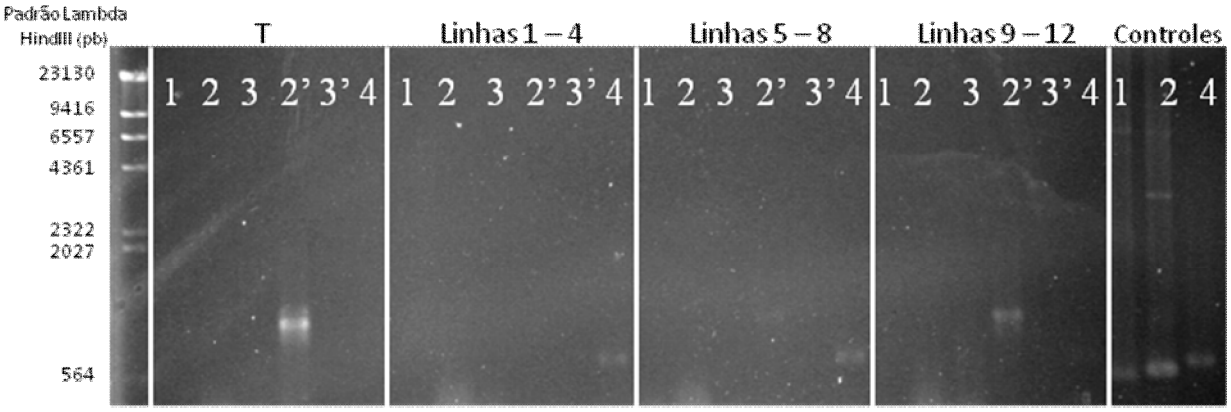
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 4** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



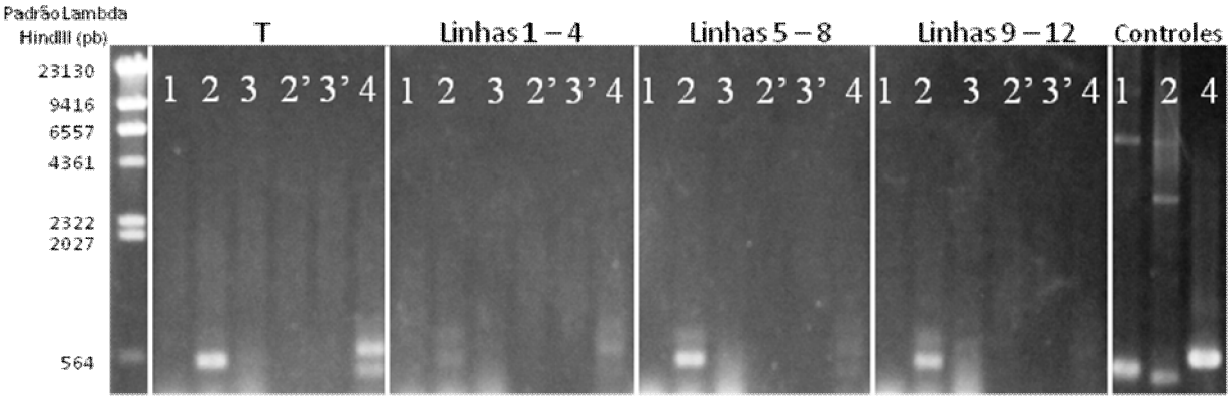
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 5** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



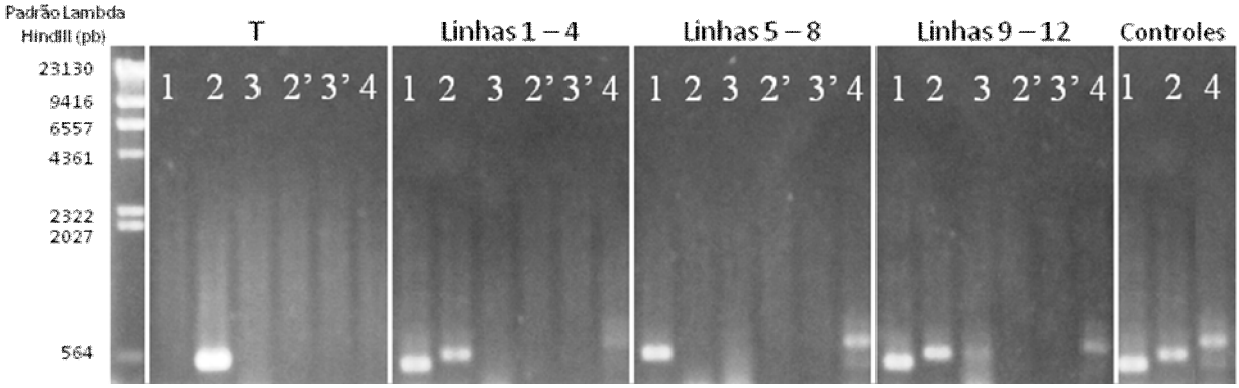
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 6** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



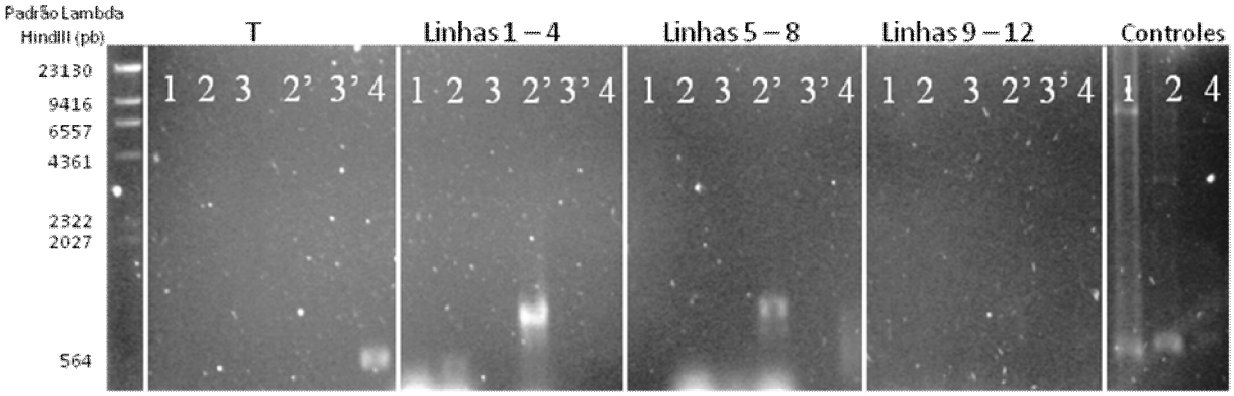
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 7** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



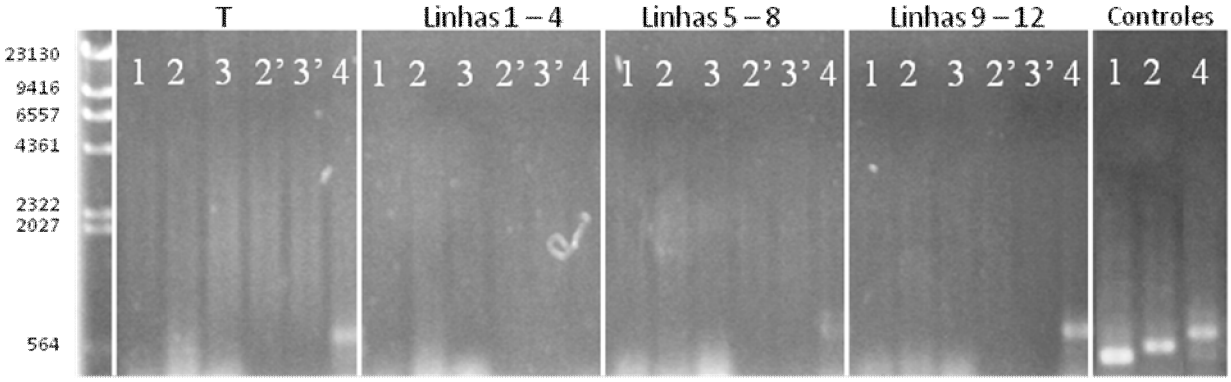
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 8** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



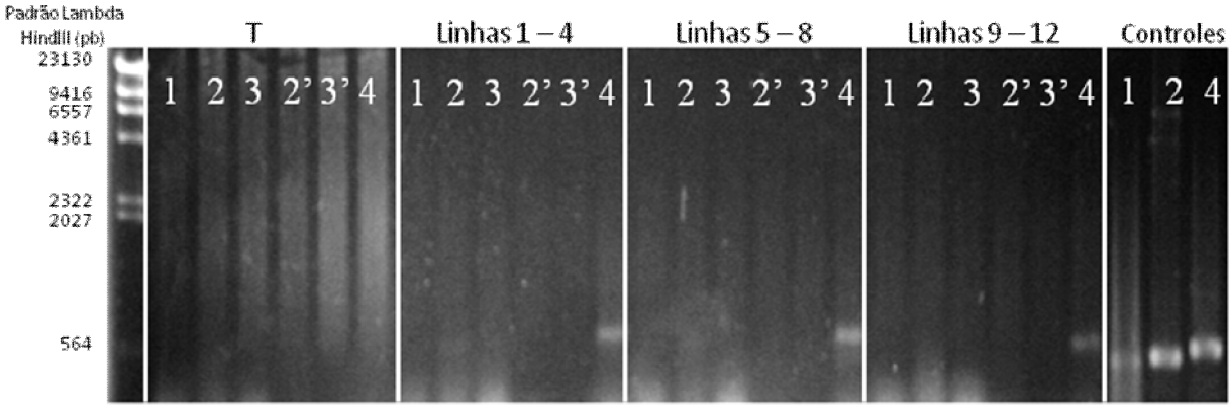
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 9** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



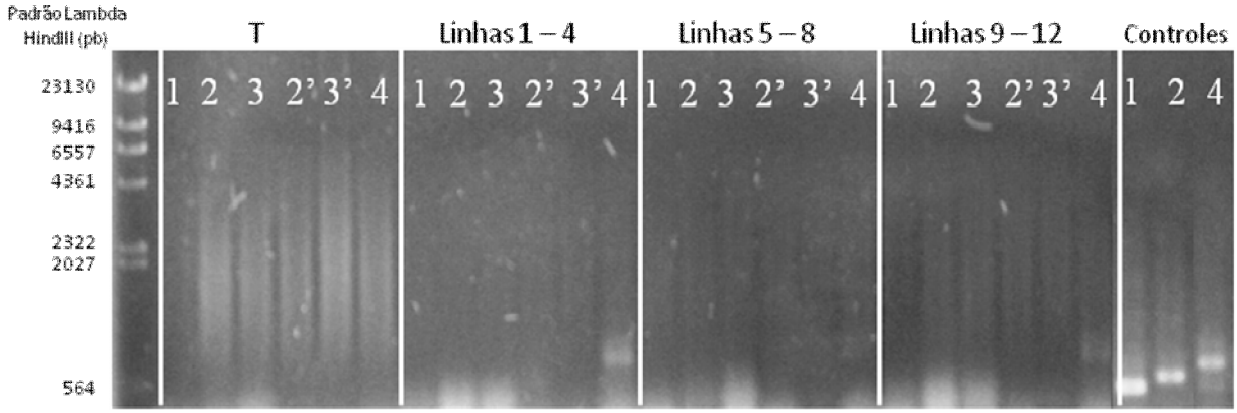
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 10** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



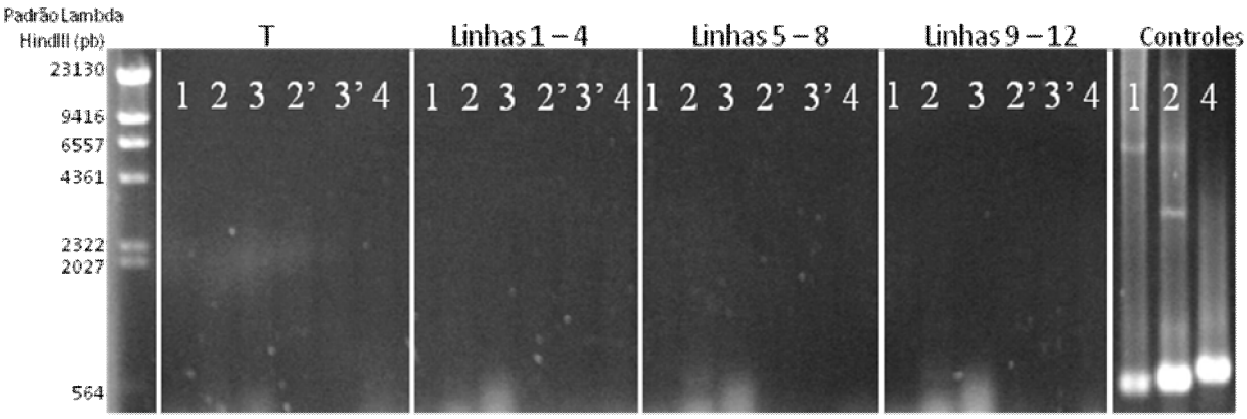
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 11** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



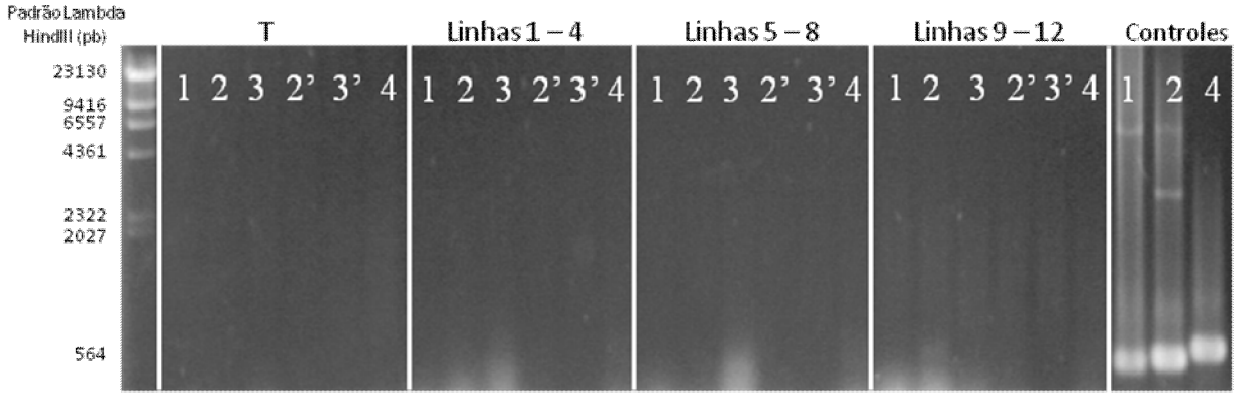
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 12** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



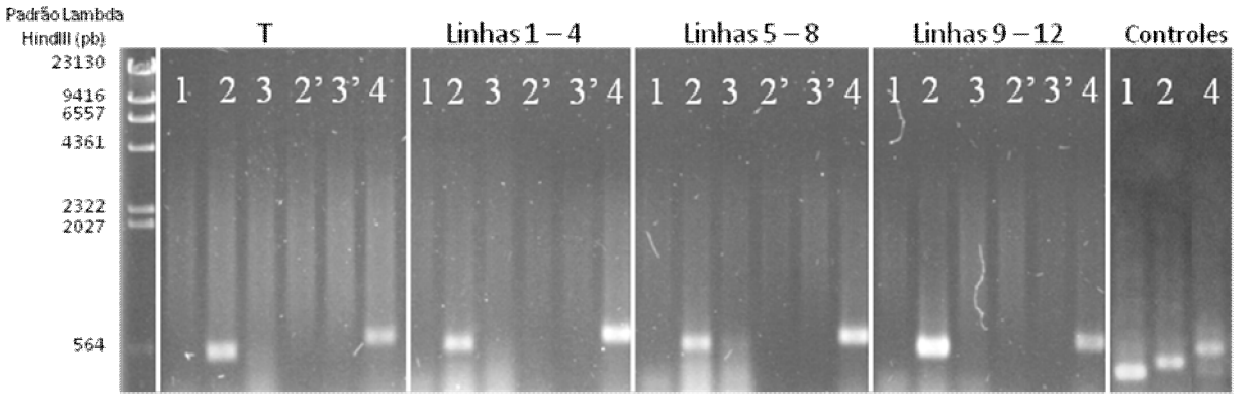
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 13** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



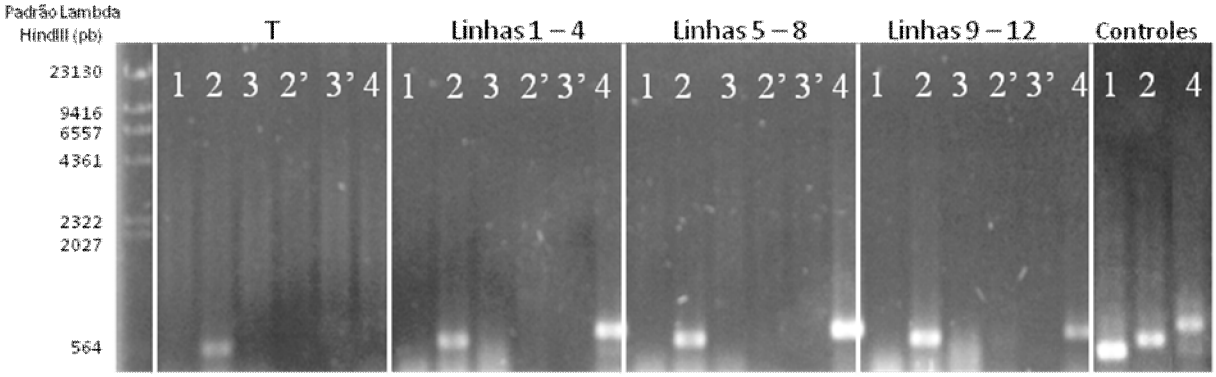
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra a ausência de amplicons nas reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 14** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



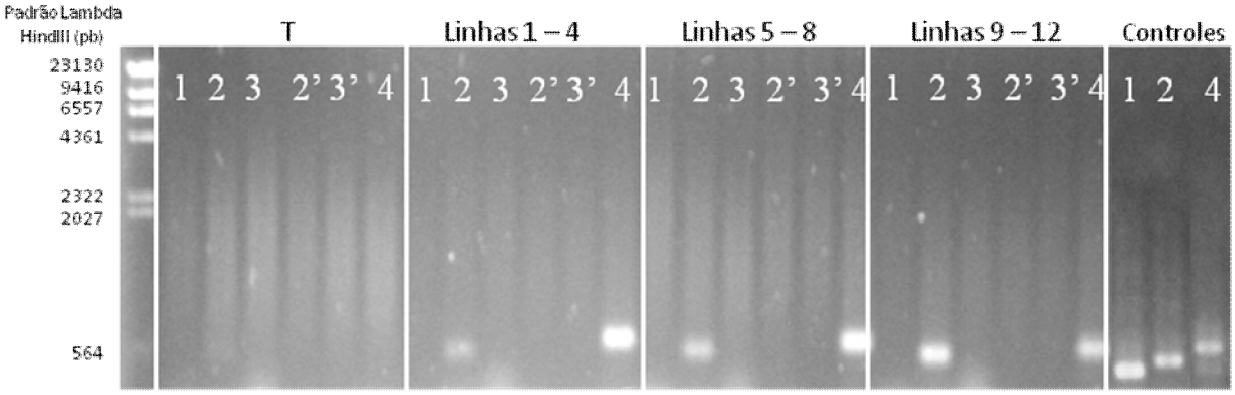
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 15** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



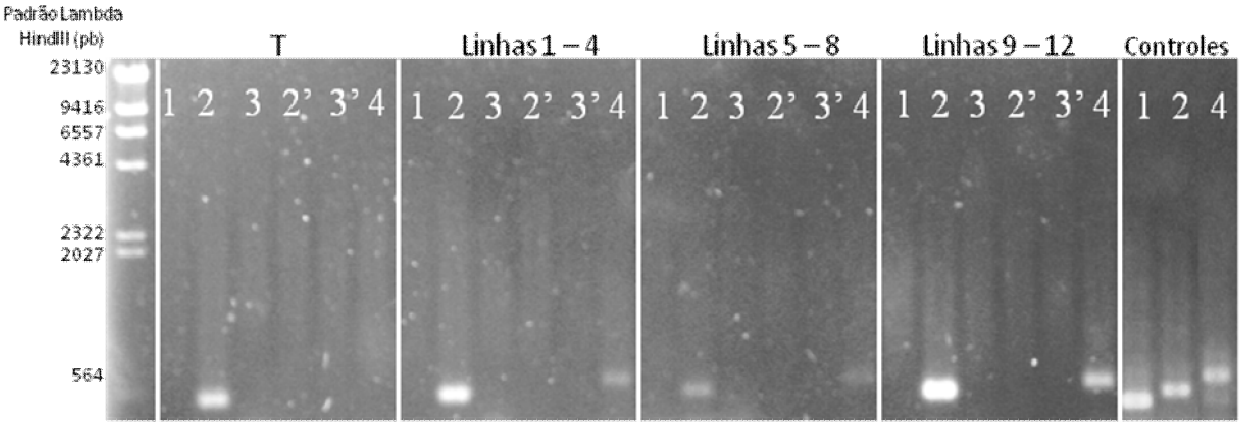
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 16** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



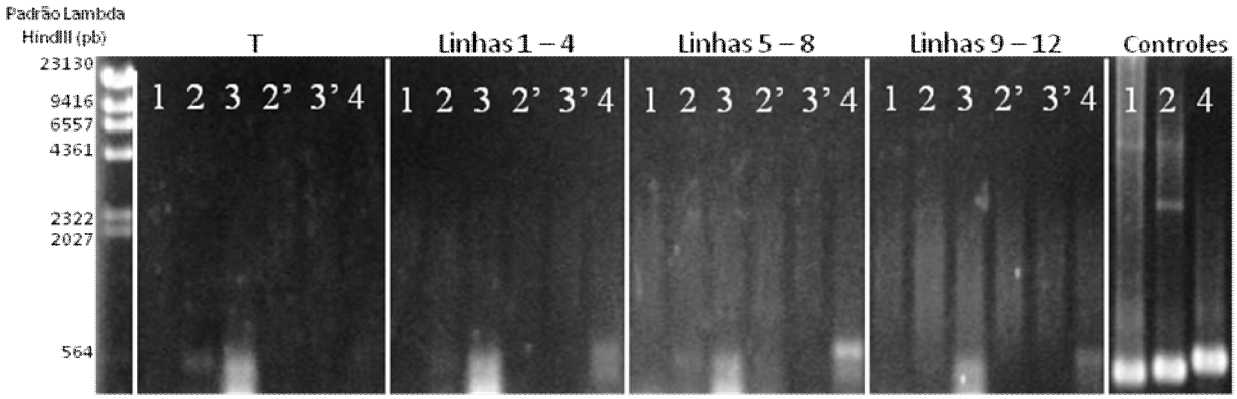
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 17** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



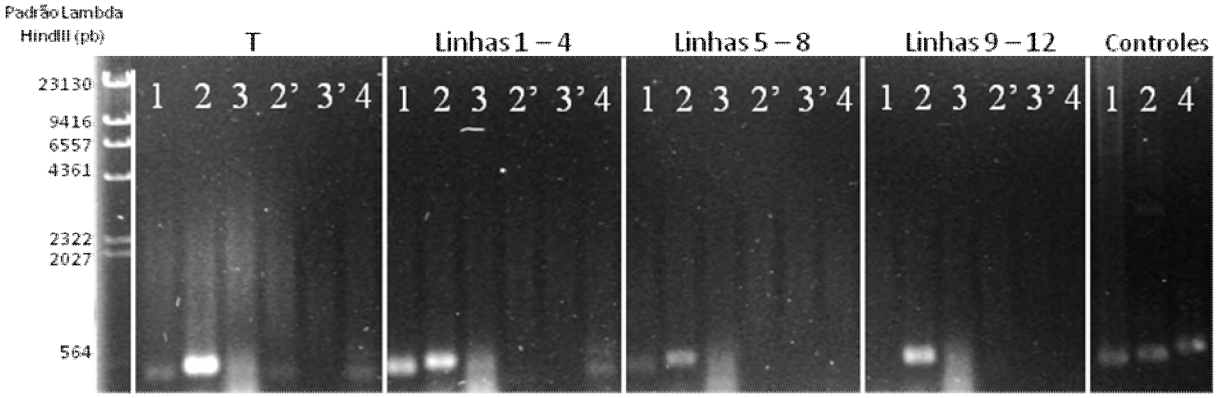
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 18** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



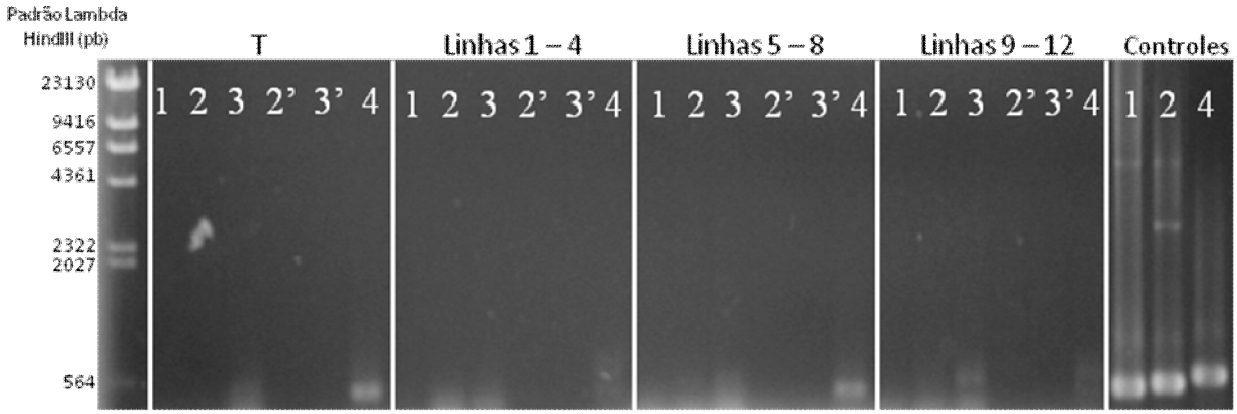
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 19** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



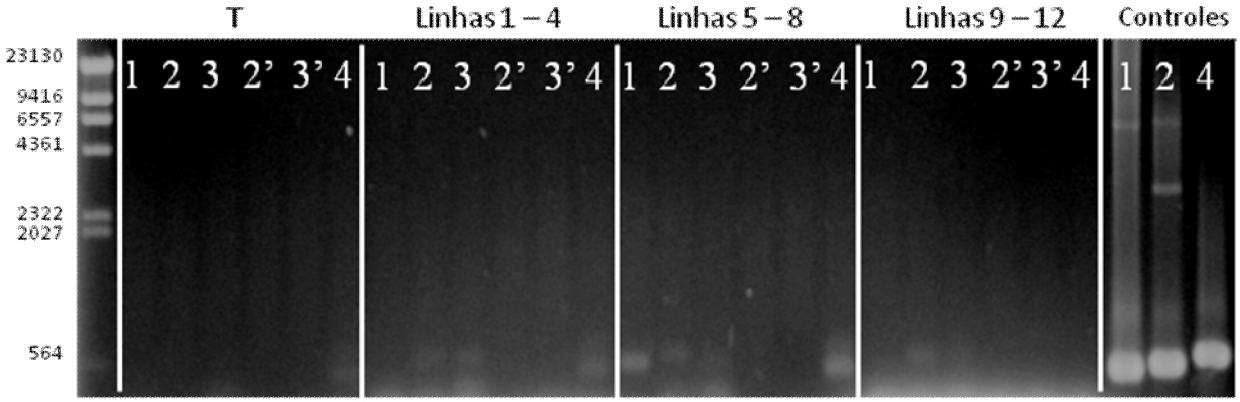
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 20** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



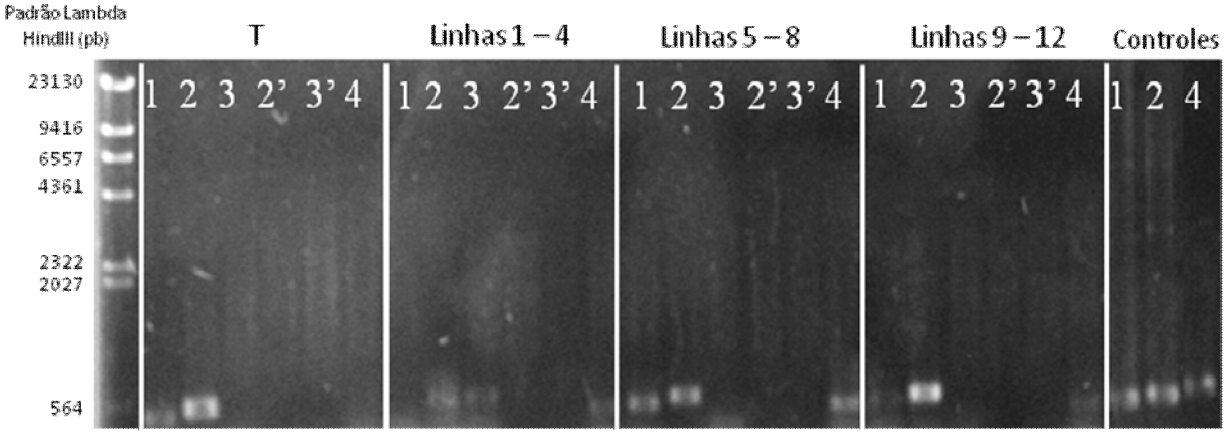
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 21** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 22** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.

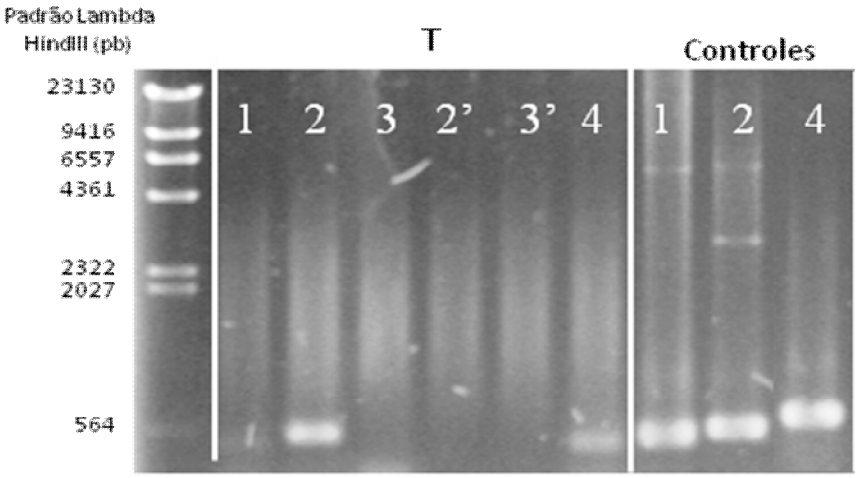


Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 23** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.

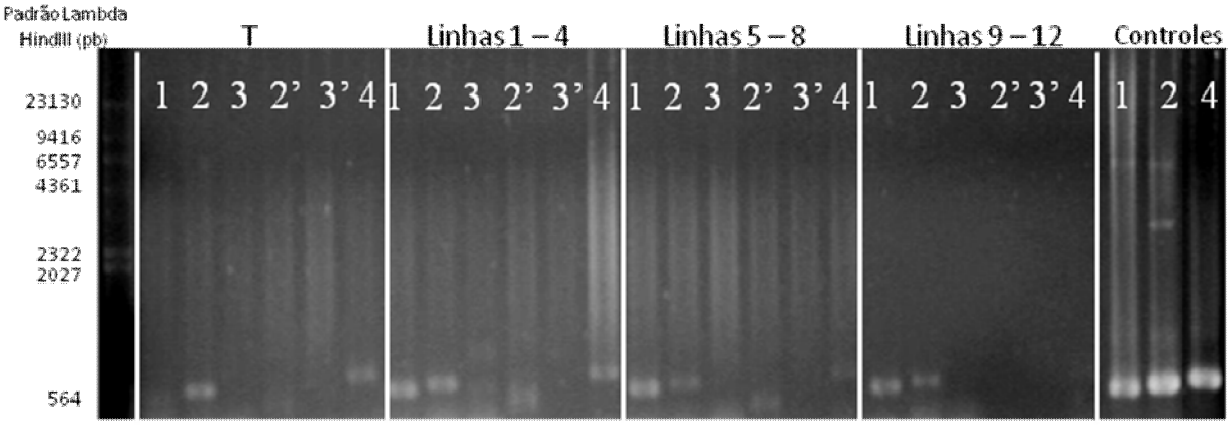


Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 24** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.

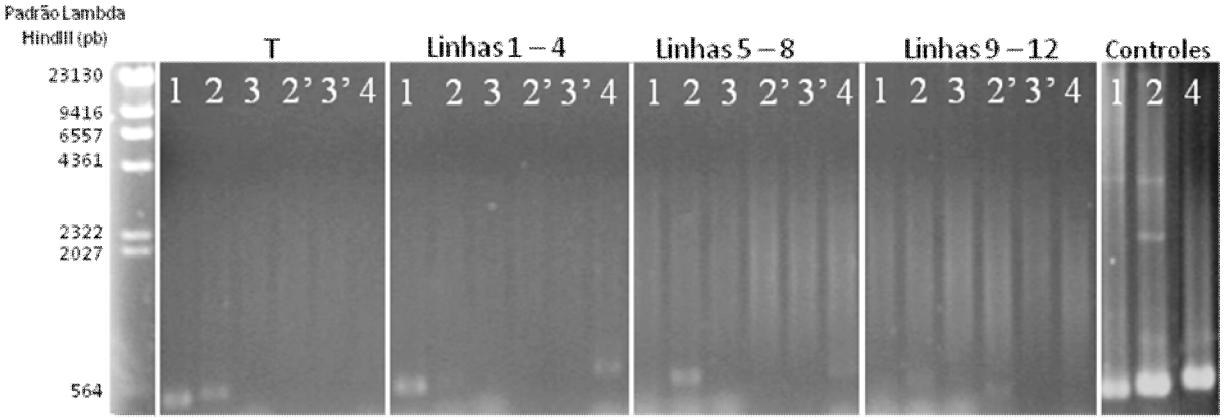
Na seguinte figura, só foi realizada a extração total devido aos poucos clones viáveis que continha esta placa.



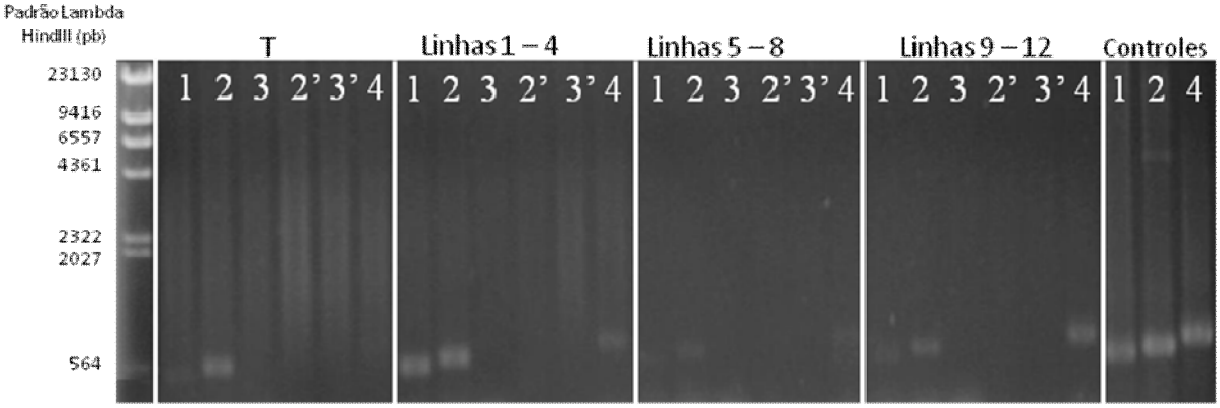
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 25** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



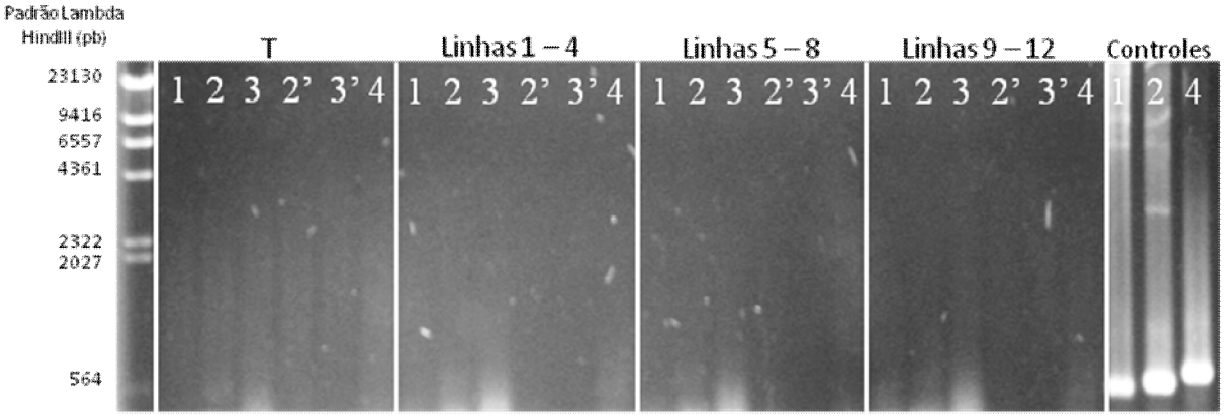
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 26** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



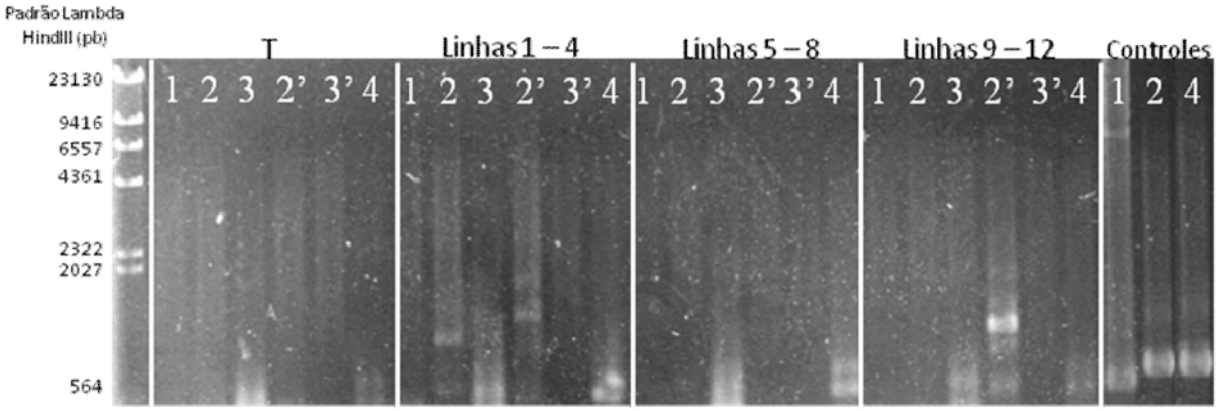
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 27** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



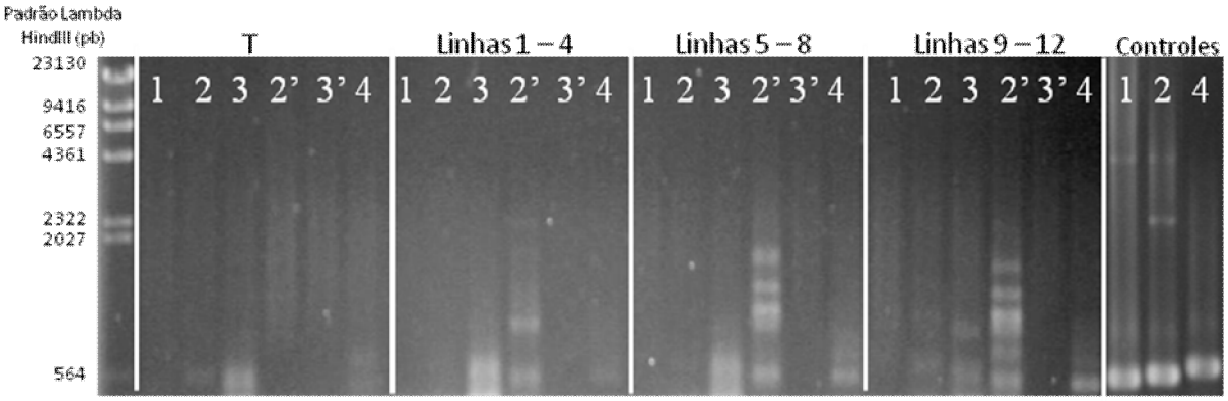
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 28** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



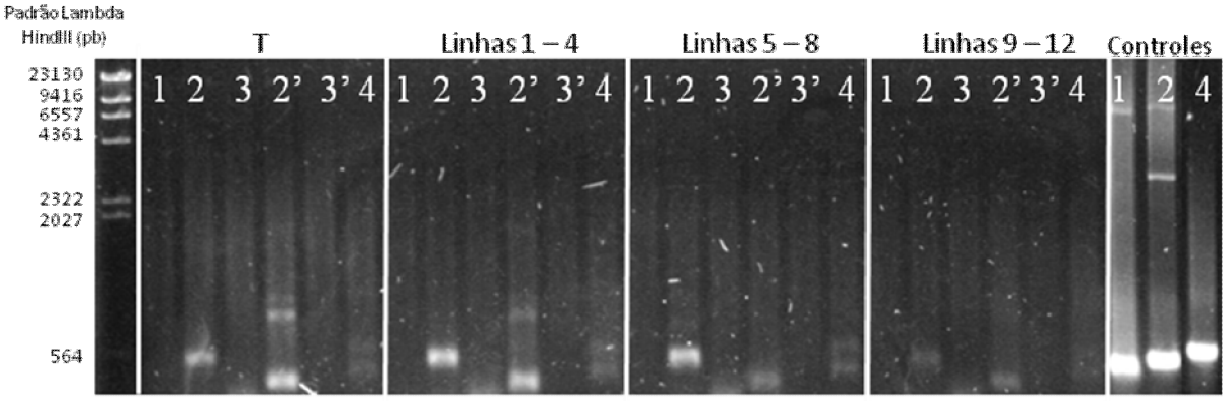
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 29** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



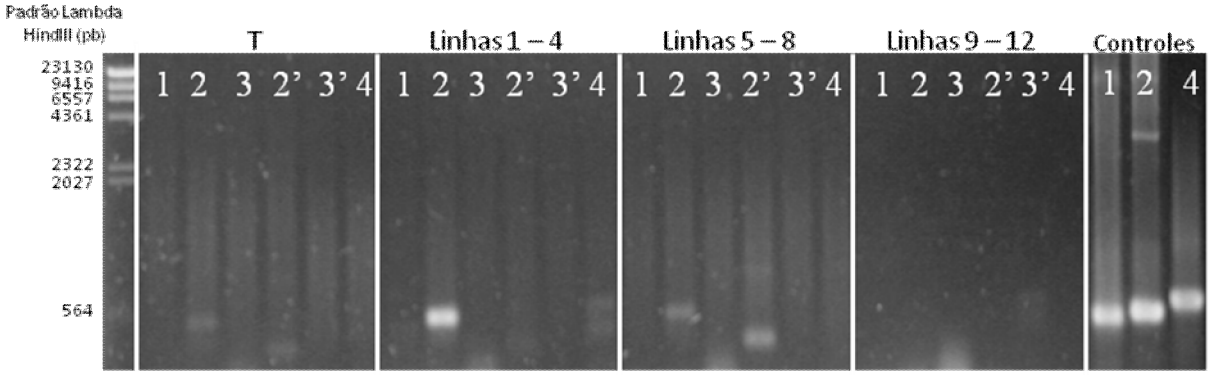
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 30** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



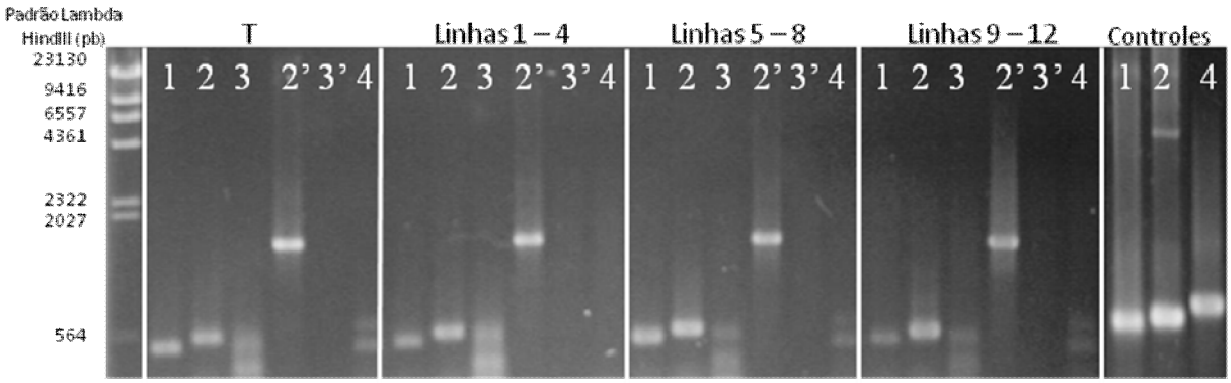
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 31** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



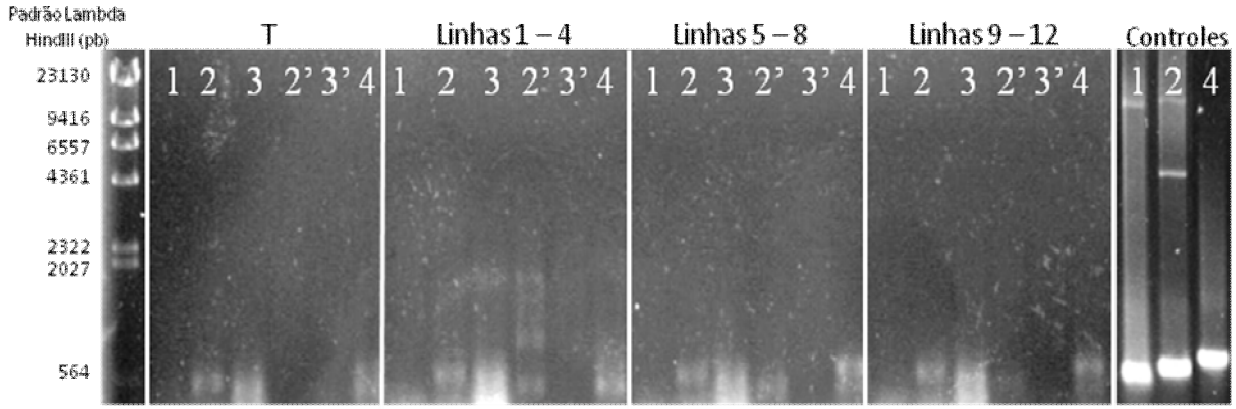
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 34** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



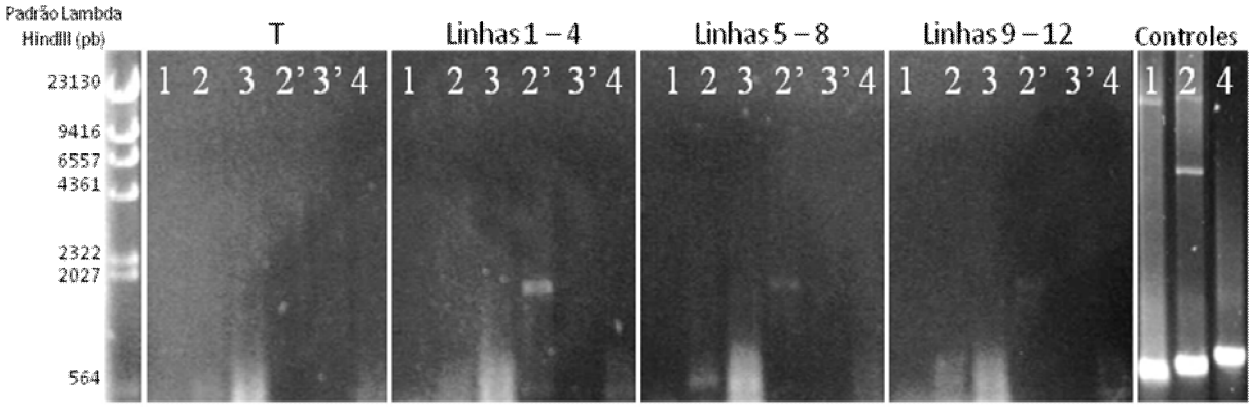
Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 37** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 38** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 39** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.



Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostra os amplicons obtidos em reações de PCR utilizando iniciadores para detecção de genes de PHA sintase empregando como molde as diferentes extrações de DNA plasmidial da **PLACA 40** da biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica. À esquerda do gel esta o marcador de peso molecular de DNA do fago Lambda digerido com a enzima *HindIII*. T: Extração total da placa 1; Linhas 1 - 4: extração de DNA plasmidial destas linhas; Linhas 5- 8: extração de DNA plasmidial destas linhas, Linhas 9 - 12: extração de DNA plasmidial destas linhas e os Controles para classe 1, 2 e 4 como mencionado nas anteriores figuras. *1*: iniciadores phaCF1/phaCR4; *2*: iniciadores I-179L(a)/I-179R(a); *2'*: iniciadores I-179L(a)/DEV15R; *3*: iniciadores Haphapcr1/Haphapcr2; *3'*: iniciadores P1/P2 e *4*: iniciadores B1F/B1R.