

RAFAEL MACIEL IORIS

**Construção e triagem de uma biblioteca metagenômica de solo
da Floresta Atlântica Paranaense**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná como requerimento parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências-Bioquímica.

Orientador: Prof. Fábio de Oliveira Pedrosa
Co-Orientador: Prof. Emanuel Maltempi de Sousa

CURITIBA

2008

À minha mãe Cleonice

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores Prof. Fábio de Oliveira Pedrosa e Prof. Emanuel Maltempi de Souza pela confiança depositada em mim, pela oportunidade de realizar esse trabalho.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

Aos professores do laboratório.

Aos demais professores do departamento.

Ao CNPq e demais agências financiadoras pelo auxílio financeiro.

Ao pessoal do grupo de discussão de biodiversidade e metagenoma, Giovani, Giovana, Prof. Leonardo, Gustavo, Arnaldo e Helisson, pelo aprendizado que muito contribuiu para o meu crescimento científico.

Ao Helisson Faoro e ao Valter Baura pela amizade e auxílio na coleta dos solos e em várias outras etapas que ajudaram a concretizar esse trabalho.

À Roseli Prado e à Dona Julieta pela alegria e carinho com que sempre me trataram.

Aos amigos do Anexo com quem passei a maior parte do tempo e muitos momentos divertidos.

Aos colegas da turma de mestrado.

Aos demais colegas de laboratório.

À galera do futeba.

Aos meus amigos “extralaboratoriais”.

À minha família.

RESUMO

Técnicas padrões de microbiologia permitem identificar 1% ou menos da diversidade bacteriana na maioria das amostras ambientais. O volume de informações para a ecologia microbiana e o potencial biotecnológico presente na população microbiana, Domínios Bacteria e Archaea, ainda não cultivada, é estimado como sendo extremamente elevado. Para transpor as dificuldades e limitações associadas com as técnicas de cultivo tradicionais, vários métodos moleculares têm sido desenvolvidos para acessar diretamente o genoma desses organismos e também esforços para cultivá-los sob condições de laboratório. Metagenômica é um novo campo de investigação que utiliza ferramentas da Biologia Molecular para investigar a ecologia procariótica global assim como para acessar o vasto potencial biotecnológico oculto no mundo procariótico. Basicamente, Metagenômica compreende isolamento do DNA ambiental total e a produção e triagem de bibliotecas (meta)genômicas. Dois tipos de análises têm sido usados para obter informações de bibliotecas metagenômicas: uma abordagem baseada na seqüência do inserto de DNA e outra baseada na função de seus produtos. Neste trabalho, uma biblioteca metagenômica com DNA isolado diretamente do solo da Floresta Atlântica paranaense foi construída em um vetor pUC19R e analisada preliminarmente. O tamanho médio dos insertos está entre 9-10 Kpb de DNA. Todos insertos foram parcialmente seqüenciados e seus genes identificados pela comparação com o banco de dados do NCBI através do programa Blastx. O filo Proteobacteria predominou com 56,5%, seguido pelo filo Actinobacteria com 10,8% das seqüências. Os resultados apresentaram diferenças quando comparados com uma biblioteca de 16S rDNA, construída da mesma amostra de solo. Dois representantes do Domínio Archaea foram encontrados na biblioteca metagenômica, contrastando com a biblioteca de 16S rDNA onde nenhum representante foi encontrado. O resultado do sequenciamento também indicou similaridade para Bacterias e Archaea com potencial biotecnológico. Uma triagem funcional foi realizada com os meios específicos para aminoácidos descarboxilase, quitinase e celulase. Em adição, uma triagem funcional para celulase foi realizada em uma biblioteca construída em vetor fosmídeo, contendo 34.560 clones com insertos de tamanho entre 35-40 Kpb de DNA.

Palavras chave: Biblioteca metagenômica, diversidade microbiana, triagem de clones.

ABSTRACT

Standard microbiological techniques account for 1% or less of the bacterial diversity in most environmental samples. The amount of information for microbial ecology and the biotechnology potential held by the majority, not yet cultivated Bacteria and Archaea, not yet cultivated, is estimated to be extremely high. To overcome the difficulties and limitations associated with the traditional cultivation techniques, several molecular methods have been developed to access directly the genome of these organisms and also in attempts to cultivate them under laboratory conditions. Metagenomics is a new field of investigation that uses tools of Molecular Biology to investigate global prokaryotic ecology as well as to access the vast biotechnological potential concealed in the prokaryotic world. Basically, Metagenomics involves the isolation of whole environmental DNA and the construction and screening of (meta)genomic libraries. Two types of analysis have been used to obtain information from metagenomic libraries: a sequence approach and a function approach. In this work, a metagenomic library with DNA isolated directly from soil of paranaense Atlantic Forest was constructed in a pUC vector and preliminarily analysed. The average insert size ranged from 9 to 10 Kbp of DNA. All inserts were partially sequenced and their gene complement identified by comparison with the NCBI database through the Blastx program. The phylum Proteobacteria predominated with 56,5%, followed by the phylum Actinobacteria with 10,8% of the sequences. The results show differences when compared with a 16S rDNA library, which was constructed from the same sample of soil. Two representatives of the Archaea were found in the metagenomic library, contrasting with the 16S library where no representant was found. The results of sequencing also indicated to the presence of Bacteria and Archaea species with biotechnological potential. The functional screening was realized with specific media to aminoacid decarboxylases, chitinases and cellulases. In addition, a functional screening for cellulases was carried out in a metagenomic library construct in fosmid vector, which contain 34.560 clones with insert average between 35-40 Kpb of DNA.

Key words: Metagenomic library, microbial diversity, clone screening.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. COMPARAÇÃO ENTRE A TECNOLOGIA TRADICIONAL E A BIOTECNOLOGIA.....	5
FIGURA 2. N-ACETIL-1,4-B-D-GLUCOPIRANOSAMINA.....	17
FIGURA 3 - LIGAÇÕES B-1,4-GLUCOSÍDICAS ENTRE MONÔMEROS DE GLUCOSE.	18
FIGURA 4. ESQUEMA DO MECANISMO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE.	20
FIGURA 5 - PONTO DE COLETA DE SOLO.....	24
FIGURA 6. PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA EXTRAÍDO DO SOLO DA MATA ATLÂNTICA.....	33
FIGURA 7 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SAU3A PARA DIGESTÃO DO DNA METAGENÔMICO.....	34
FIGURA 8. PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA METAGENÔMICO CLIVADO COM A ENZIMA SAU3A.....	35
FIGURA 9. PERFIL ELETROFORÉTICO DA PARTE INFERIOR DA FAIXA SELECIONADA DEPOIS DA EXTRAÇÃO DO LMP.....	36
FIGURA 10. PERFIL DE RESTRIÇÃO COM AS ENZIMAS ECORI E HINDIII DE 12 CLONES DA BIBLIOTECA MAPUC.....	37
FIGURA 11. TESTES PARA DETECTAR AMINOÁCIDO DESCARBOXILASES.....	42
FIGURA 12. MEIO UTILIZADO PARA DETECTAR CLONES EXPRESSANDO CELULASE.....	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. VANTAGENS E DESVANTAGENS DAS BIBLIOTECAS DE INSERTOS MENORES QUE 20 KPB E MAIORES QUE 20 KPB.....	11
TABELA 2. TRIAGEM FUNCIONAL COM A TRIAGEM BASEADA NA SEQÜÊNCIA...	13
TABELA 3. SUBSTRATOS PARA ENSAIOS DE ATIVIDADE B-1,4-GLUCOSÍDICA E MÉTODOS DE DETECÇÃO.	21
TABELA 4. ESTIRPES BACTERIANAS E VETORES.	23
TABELA 5 - COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO (%) DOS MEIOS DESCRITOS PARA DESCARBOXILASES.	30
TABELA 6. COMPARAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO PARCIAL DOS INSERTOS DA BIBLIOTECA MAPUC COM O BANCO DE DADOS DO NCBI ATRAVÉS DO PROGRAMA BLASTX.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

16S rRNA – 16S Ácido ribonucléico ribosomal

16S rDNA – 16S Ácido desoxiribonucléico ribosomal

Agarose LMP – Agarose de baixo ponto de fusão

CMC – Carboximetil celulose

DNA – Ácido desoxiribonucléico

D. O. – Densidade Óptica

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

GET – Glucose-EDTA-tris

Gpb – Giga pares de bases

GPS – Sistema de posicionamento global

HEC – Hidroxietil celulose

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance

Kpb – mil pares de base

KoAc – Acetato de potássio

Mpb – Mega pares de base

PCR – Reação em Cadeia da DNA Polimerase

RNA – Ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TAE – Tris-Acetato-EDTA

TBE – Tris-Borato-EDTA

TLC – Cromatografia de camada delgada

SUMÁRIO

ABSTRACT	5
LISTA DE FIGURAS	6
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 MATA ATLÂNTICA.....	1
1.2 BIOTECNOLOGIA E DIVERSIDADE MICROBIANA	4
1.3 METAGENÔMICA	6
1.3.1 Extração do DNA.....	8
1.3.2. BIBLIOTECA METAGENÔMICA	10
1.3.3. TRIAGEM DAS BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS	12
1.4 AMINOÁCIDO DESCARBOXILASES.....	14
1.5 QUITINASE.....	15
1.6 CELULASE.....	17
2- OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 ESTIRPES BACTERIANAS E VETORES	23
3.2 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS DE SOLO	24
3.3 EXTRAÇÃO DO DNA DO SOLO	24
3.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO E DO VETOR PUC 19.....	25
3.5 MANIPULAÇÃO DE DNA	25
3.5.1 EXTRAÇÃO DO DNA DO gel de agarose LMP.....	25
3.6 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA METAGENÔMICA	26
3.6.1 Preparo de células eletrocompetentes	26
3.6.2 Transformação bacteriana.....	26
3.6.3 Coleta de clones transformantes.....	27
3.7 TAMANHO MÉDIO DOS INSERTOS	27
3.8 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PLACAS DE 96 POÇOS	27
3.9 SEQÜENCIAMENTO DE DNA PLASMIDIAL.....	28
3.10 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS.....	29
3.11 TRIAGEM FUNCIONAL DAS BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS	29
3.11.1 DETECÇÃO DE AMINOÁCIDO DESCARBOXILASE.....	29
3.11.2 DETECÇÃO DE QUITINASES.....	30
3.11.3. DETECÇÃO DE CELULASE	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
4.1. COLETA DO SOLO DA FLORESTA ATLÂNTICA	32
4.2 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DAS AMOSTRAS DE SOLO	32
4.3 QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO E DO VETOR PUC 19.....	33
4.4 RESTRIÇÃO DO DNA METAGENÔMICO COM SAU3A E SELEÇÃO DOS FRAGMENTOS	33
4.5 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA METAGENÔMICA	36
4.6 SEQÜENCIAMENTO DA BIBLIOTECA MAPUC.....	38
4.8 DETECÇÃO DE CLONES EXPRESSANDO QUITINASE.....	43
4.9 DETECÇÃO DE CLONES EXPRESSANDO CELULASE	44

5. CONCLUSÕES	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
APÊNDICE 1 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	61
APÊNDICE 2 – COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS NAS ELETROFORESES.....	62

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 MATA ATLÂNTICA

A Mata Atlântica, um ecossistema quase exclusivamente brasileiro, é a segunda maior formação florestal do Brasil, apresentando um alto número de espécies endêmicas (SICK, 1997; STOTZ et al., 1996). Originalmente recobria toda a costa atlântica do litoral brasileiro, ocupando uma área total de mais de 1.350.000 km², estendendo-se por 17 estados brasileiros, perfazendo cerca de 15% do território nacional (CÂMARA, 1991). Pela extensão que ocupa do território brasileiro, a Mata Atlântica apresenta um conjunto de ecossistemas com processos ecológicos interligados. As formações do bioma são as florestas Ombrófila Densa, Ombrófila Mista (mata de araucárias), Estacional Semidecidual e Estacional Decidual e os ecossistemas associados como manguezais, restingas, brejos interioranos, campos de altitude e ilhas costeiras e oceânicas (MMA, 1999).

A Mata Atlântica se distribui em faixas litorâneas, florestas de baixada, matas interioranas e campos de altitude. São nessas regiões que vivem também 62% da população brasileira, cerca de 110 milhões de pessoas. Um contingente populacional enorme que depende da conservação dos remanescentes de Mata Atlântica para a garantia do abastecimento de água, a regulação do clima, a fertilidade do solo, entre outros serviços ambientais. Obviamente, a maior ameaça ao já precário equilíbrio da biodiversidade é justamente a ação humana e a pressão da sua ocupação e os impactos de suas atividades (<http://www.sosmatatlantica.org.br/index.php?section=info&action=mata>).

A Mata Atlântica encontra-se em um estado de intensa fragmentação e destruição, iniciada com a exploração do pau-brasil no século XVI. Segundo a Fundação SOS Mata Atlântica, 93% da formação original da Mata Atlântica já foi devastado. Até hoje, ao longo do bioma são exploradas inúmeras espécies florestais madeireiras e não madeireiras - como o caju, o palmito-juçara, a erva-mate, as plantas medicinais e ornamentais, a piaçava, os cipós, entre outras. Se por um lado essa atividade gera emprego e divisas para a economia, grande parte da exploração da flora

atlântica acontece de forma predatória e ilegal, estando muitas vezes associada ao tráfico internacional de espécies (<http://www.sosmatatlantica.org.br/index.php?section=info&action=flora>).

A diversidade bacteriana da Mata Atlântica Paranaense, refletida pela diversidade do gene 16S rDNA, é grande e apresenta um amplo potencial biotecnológico (FAORO, 2006). Como conclui FAORO (2006), tal “diversidade e o potencial biotecnológico de espécies bacterianas encontradas nos solos da Mata Atlântica necessitam de urgente inclusão de estudos microbiológicos nas estratégias de preservação ambiental”.

Entre os biomas brasileiros é o que possui histórico de perturbação mais antigo (LINO, 1992), sendo considerado o bioma brasileiro mais ameaçado e o segundo do mundo, depois de Madagascar, na África (FONSECA, 1985) e um dos 25 hotspots prioritários para a conservação (MITTERMEIER et al., 1999; FONSECA, 1985). Um hotspots é definido como uma área de concentração excepcional de espécies endêmicas e que tenha sofrido uma grande perda de hábitat (SILVA & BATES, 2002). Juntamente com a floresta amazônica, este bioma confere ao Brasil o título de um país com megadiversidade (MITTERMEIER et al., 1999).

É fácil entender, portanto, porque a Mata Atlântica apresenta estruturas e composições florísticas tão diferenciadas. Uma das florestas mais ricas em biodiversidade no Planeta, a Mata Atlântica detém cerca de 20 mil espécies vegetais, sendo oito mil delas endêmicas. Para se ter uma idéia do que isso representa, em toda a América do Norte são estimadas 17.000 espécies existentes e na Europa cerca de 12.500 (<http://www.sosmatatlantica.org.br/index.php?section=info&action=flora>).

Dentre as espécies animais são, por exemplo, 261 espécies conhecidas de mamíferos, 1020 espécies de pássaros, 197 de répteis, 340 de anfíbios e 350 de peixes que são conhecidos até hoje no bioma. Sem falar de insetos e demais invertebrados e das espécies que ainda nem foram descobertas pela ciência e que podem estar escondidas bem naquele trecho intacto de floresta que você admira quando vai para o litoral (<http://www.sosmatatlantica.org.br/index.php?section=info&action=fauna>).

Outro número impressionante da fauna da Mata Atlântica se refere ao endemismo, ou seja, as espécies que só existem em ambientes específicos dentro do

bioma. Das 1711 espécies de vertebrados que vivem ali, 700 são endêmicas, sendo 55 espécies de mamíferos, 188 de aves, 60 de répteis, 90 de anfíbios e 133 de peixes. Os números impressionantes são um dos indicadores desse bioma como o de maior biodiversidade na Terra (<http://www.sosmatatlantica.org.br/index.php?section=info&action=fauna>).

Num bioma reduzido à cerca de 7% de sua cobertura original é inevitável que a riqueza faunística esteja pressionada pelas atividades antrópicas. A Mata Atlântica abriga hoje 383 dos 633 animais ameaçados de extinção no Brasil, de acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) (<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/>).

Vale destacar ainda a existência de sete das nove maiores bacias hidrográficas brasileiras neste bioma. Sendo assim, proteger a Mata Atlântica também é proteger os processos hidrológicos responsáveis pela quantidade e qualidade da água potável para cerca de 3,4 mil municípios, e para os mais diversos setores da economia nacional como a agricultura, a pesca, a indústria, o turismo e a geração de energia (<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/>).

Os rios e lagos da Mata Atlântica abrigam ainda ricos ecossistemas aquáticos, grande parte deles ameaçados pelo desmatamento das matas ciliares e conseqüente assoreamento dos mananciais, pela poluição da água, e pela construção de represas sem os devidos cuidados ambientais. Essa intrincada rede de bacias é formada por rios de importância nacional e regional, do São Francisco e Paraná, ao Tietê, Paraíba do Sul, Doce e Ribeira do Iguape (<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/>).

As principais causas da destruição desse bioma e conseqüentemente da sua biodiversidade, estão relacionados direta ou indiretamente as atividades humanas (influências antrópicas) (BROWN e BROWN, 1994; RODRIGUES, 1997). Na costa atlântica da América do sul há um grande número de espécies ameaçadas de extinção, merecendo prioridades de conservação e pesquisa de sua biodiversidade (ALBUQUERQUE, 2000; MMA, 1999).

1.2 BIOTECNOLOGIA E DIVERSIDADE MICROBIANA

Na sociedade moderna um grande número de processos industriais geram uma alta demanda por compostos específicos. O maior parte desses compostos é derivada de produtos naturais que são transformados subseqüentemente em novos produtos sintéticos. Portanto, para suprir a demanda por novos antibióticos, por exemplo, há a necessidade de explorar novas fontes para encontrar compostos novos, com diferentes características.

Enzimas e outros compostos bioativos são extremamente importantes para a indústria alimentícia, têxtil, de detergentes, de celulose, farmacêutica, agroindustrial e de biocombustível. Os gastos globais dos setores industriais com a compra de enzimas para os processos industriais ultrapassaram dois bilhões de dólares em 2003 e aumentam proporcionalmente ao aumento da demanda (GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS, 2004). Por exemplo, o potencial do mercado de celulase foi estimado em US\$400 milhões/por ano (VAN BEILEN e LI, 2002).

Atualmente existe uma política global dirigida para promover a *white biotechnology* como um aspecto central da futura economia sustentável da sociedade moderna industrializada (LORENZ e ECK, 2005). O termo *white biotechnology* foi proposto em 2003 pela Associação Européia para Bioindústria (EUROPABIO) e é relativo a todos processos industriais biotecnológicos, que não estão inclusos pelos rotulados *red biotechnology* (relativo à área médica) e *green biotechnology* (relativo a plantas). Entre estes estão os processos industriais que utilizam microrganismos ou seus derivados (SCHEPENS et al., 2003).

A partir do dia 1º de janeiro de 2008 e, sem a participação dos Estados Unidos da América, entrou em vigor o Protocolo de Kyoto, tratado internacional para proteção do clima mundial e único documento que prevê objetivos globais voltados para reduzir a emissão de gases de efeito estufa. Tais gases são, em sua maioria, emitidos pela queima de combustíveis fósseis. Não obstante, a busca por combustíveis alternativos e uso da biotecnologia em processos industriais, foram temas em evidência no protocolo de Kyoto. A FIGURA 1 representa uma estimativa de processos industriais utilizando a biotecnologia e a tecnologia tradicional.

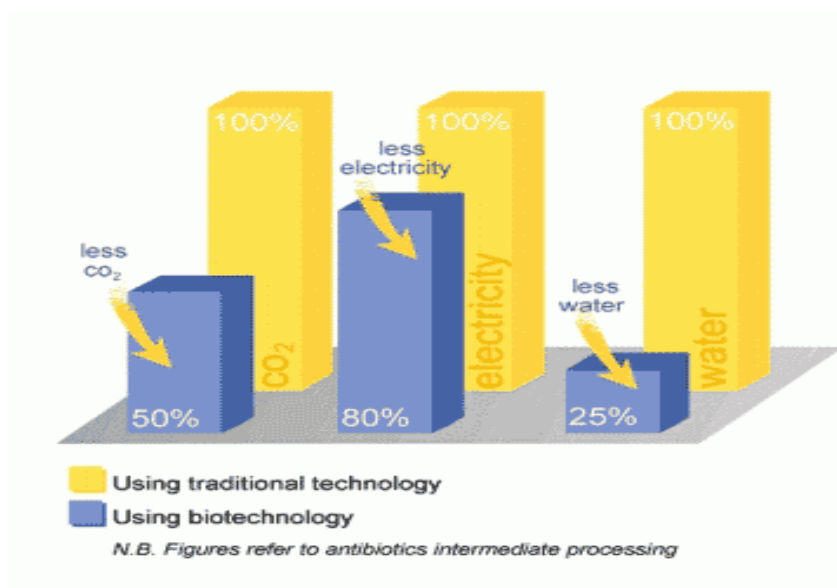


FIGURA 1. COMPARAÇÃO ENTRE A TECNOLOGIA TRADICIONAL E A BIOTECNOLOGIA - Utilizando como parâmetro a emissão de gás carbônico e o consumo de água e energia elétrica. FONTE: SCHEPENS *et al.* (2003).

Para ter aplicação industrial, produtos bioativos, principalmente enzimas, precisam funcionar suficientemente bem de acordo com vários parâmetros de performance (atividade, eficiência, estabilidade e especificidade) para aplicações específicas (LORENZ e ECK, 2005). No entanto, a descoberta de uma enzima com uma pequena superioridade funcional pode significar uma grande economia em processos industriais.

A capacidade dos procaríotos para se adaptar, ter sucesso e habitar todos os ambientes, de águas termais a solos ácidos, é devido à diversidade fisiológica e metabólica desses organismos (STEELE e STREIT, 2005). Microrganismos são responsáveis pela maior parte dos ciclos biogeoquímicos que formam o ambiente dos solos e dos oceanos (VENTER *et al.*, 2004). De acordo com o banco de dados taxonômicos do NCBI (National Center for Biotechnology Information, taxonomy browser statistics, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/txstat.cgi>) 13229 espécies de bactérias e 486 espécies de Archaea já foram descritas. Sendo que, somente no ano de 2007, 1151 espécies de bactérias e 30 espécies de Archaeas foram descritas. O número total de células de procaríotos na Terra tem sido estimado em $4-6 \times 10^{30}$ (WHITMAN *et al.*, 1998) e, a extrapolação de resultados obtidos em vários estudos

sugere que um grama de solo contém cerca de 10 bilhões de procariotos pertencentes a milhares de espécies diferentes (AMANN et al., 1995; ROSSELÓ-MORA e AMANN, 2001). Esses números apresentam uma enorme diversidade genética e biológica que pode ser explorada para procurar novos genes, vias metabólicas completas e seus produtos (COWAN, 2000). A microbiota incultivável, que deve realizar uma função vital nos processos do ambiente natural, é uma larga fonte de recursos para aplicação biotecnológica (RIESENFELD, GOODMAN e HANDELSMAN, 2004).

Mesmo que significantes descobertas têm resultado de recentes esforços para cultivar bactérias ainda não cultiváveis (ZENGLER et al., 2002; SAIT et al., 2002; RAPPE et al., 2002; JANSSEN et al. 2002), uma ampla proporção de microrganismos ainda não é cultivável (LEVEAU, 2007), apresentando uma dificuldade para acessar essa enorme diversidade.

1.3 METAGENÔMICA

Na proposta inicial de Carl Woese (WOESE, 1987) o domínio Bacteria era formado por 11 filos compostos principalmente por indivíduos cultivados e caracterizados. Estudos moleculares independentes de cultivo mostram que o domínio Bacteria contém mais filos, sendo que alguns apresentam pouco ou nenhum representante cultivável (COTTRELL et al, 2005).

Os microrganismos em seus ambientes naturais ainda são pouco compreendidos, uma vez que o estudo e a determinação do potencial metabólico desses organismos tem sido dificultados pela inabilidade para gerar culturas puras (VENTER et al., 2004). Técnicas de cultivo padrão abrangem 1% ou menos da diversidade bacteriana na maioria das amostras ambientais (TORSVIK et al.,1990, AMANN et al., 1995; AMANN e KÜHL, 1998). Para transpor algumas das limitações das abordagens de cultivo, métodos moleculares indiretos, baseados no isolamento e análise de ácidos nucleicos (principalmente DNA) de amostras do solo, sem cultivo de microrganismos, têm sido desenvolvidos (DANIEL, 2005; KENT et al., 2002; HEAD et al., 1998; PACE, 1997; AMANN et al., 1995; PACE et al., 1986).

A primeira abordagem foi seqüenciar clones de uma biblioteca 5S rRNA e cDNA derivada de uma comunidade simbiótica com o *Riftia pachyptila* (STAHL et al., 1984). O conceito de clonar DNA diretamente de um ambiente foi sugerido por PACE et al. (1985) e consolidado por Schmidt et al (1991), que construiu uma biblioteca de fago λ de uma amostra de água do mar e efetuou a triagem para genes 16S rDNA. Variações desse método geraram várias técnicas independentes de cultivo para reconstruir filogenia, comparar distribuição microbiológica entre amostras e, quantificar a relativa abundância de cada grupo taxonômico (AMANN et al., 1995; HEAD et al., 1998; KENT et al., 2002; PACE et al., 1986; PACE, 1997).

O termo metagenoma (descrevendo o campo conhecido como comunidade genômica, ecogenômica, ou ambiente genômico) foi proposto em 1998 por Handelsman et al. Para estudar o metagenoma, a metagenômica combina muito dos desenvolvimentos tecnológicos moleculares do último século, capacitando cientistas para investigar a ecologia procariótica e permitindo acesso ao vasto potencial biotecnológico oculto nesta população procariótica (STEELE e STREIT, 2005). A abordagem metagenômica elimina a etapa de cultivo, pois consiste na extração direta do DNA do ambiente e sua clonagem em um vetor apropriado (plasmídeo, cosmídeo, fosmídeo ou BAC, entre outros). Posteriormente, o DNA recombinante vetor-inserto é introduzido em um hospedeiro cultivável para a análise funcional dos genes e para determinação de sua seqüência (HANDELSMAN, 2004).

A abordagem metagenômica aumenta grandemente a diversidade genética da qual novos compostos biotecnológicos possam ser identificados e isolados (REES et al., 2003). A triagem de bibliotecas metagenômicas para detectar enzimas de potencial biotecnológico tem encontrado novas lipases, esterases, quitinases, amilases, celulases, policetídios sintase e sintetase de peptídios não-ribossomais (LORENZ et al, 2002).

A metagenômica explora o fato de que enquanto alguns organismos são cultiváveis e outros muitos incultiváveis, todos eles são formas vivas baseadas em DNA como portador da informação genética. Deste modo, a metagenômica dispõe de ferramentas para acessar, armazenar e analisar este DNA ambiental (LEVEAU, 2007).

1.3.1 EXTRAÇÃO DO DNA

Isolar o DNA de uma amostra ambiental é a primeira e a mais importante etapa para montar uma biblioteca metagenômica sendo que a qualidade da análise metagenômica é diretamente relacionada com a qualidade do DNA isolado (GREEN e KELLER, 2006).

Teoricamente, o DNA microbiano isolado de uma amostra ambiental representa todo o DNA da comunidade de microrganismos nativa (DANIEL, 2005). Porém, considerando a diversidade de espécies microbianas, a grande população de microrganismos no solo e a complexidade da matriz do solo, que contém muitos componentes (tais como ácidos húmicos) que ligam no DNA e interferem com as modificações enzimáticas do DNA, conseguir DNA microbial do solo que represente a comunidade total e seja adequado para reações de clonagem e PCR é ainda um desafio (DANIEL, 2005).

Muitos protocolos para isolar DNA microbiano derivado do solo têm sido publicado na literatura especializada, e sistemas comerciais para extração de DNA do solo estão disponíveis (OGRAM et al., 1987; HOLBEN et al., 1988; STEFFAN et al., 1988; JACOBSEN e RASMUSSEN, 1992; LINDAHL e BAKKEN, 1995; ZHOU et al., 1996; MILLER et al., 1999; FIANDT, 2000; HURT et al., 2001; LLOYD-JONES e HUNTER, 2001; BERRY et al., 2003; GABOR et al., 2003; HANDELSMAN et al., 2003; GILLESPIE et al., 2004). Alguns autores têm desenvolvido técnicas para distinguir DNA de células vivas daquele de células mortas (NOCKER e CAMPER, 2004) e também para distinguir entre DNA extracelular e intracelular (CORINALDESI et al, 2005).

Métodos para extração de DNA podem ser divididos em duas categorias: lise direta de células contidas na amostra seguido pela separação do DNA da matriz e do resto de células lisadas (OGRAM et al, 1987); ou separação das células da matriz do solo seguido por lise celular e purificação do DNA, caracterizado como lise indireta (HOLBEN et al, 1988).

Em geral, com a lise direta é obtida uma quantidade maior de DNA e uma maior representatividade da comunidade porque utiliza métodos mais rigorosos de extração (como o uso de pérolas para rompimento de células ou *beads*). Dessa forma células

microbianas aderidas a matriz do solo não são perdidas durante o processo de separação da matriz do solo. A lise indireta é recomendada para extração de solos com alta proporção de matéria orgânica os quais apresentam contaminantes fenólicos que podem ser co-extraídos com o DNA e interferir em reações enzimáticas posteriores (LEVEAU, 2007). A lise indireta também é aconselhável para construção de bibliotecas com insertos grandes de DNA (acima de 20 Kpb) pois não há necessidade do uso de pérolas, sendo efetuada apenas a lise química evitando a fragmentação excessiva do DNA (LEVEAU, 2007).

Portanto, na etapa de extração há quatro pontos principais a serem ponderados para cada objetivo específico: (i) quantidade de DNA extraído; (ii) pureza do DNA; (iii) integridade do DNA; e (iv) representatividade da comunidade ambiental.

(i) Quantidade de DNA extraído: aqui é preciso considerar que, em geral, para obter uma maior quantidade de DNA há necessidade de utilizar métodos rigorosos de extração. Tais métodos interferem na pureza e na integridade do DNA mas, tem um balanço positivo em relação a representatividade da comunidade microbiana (DANIEL, 2005).

(ii) Pureza: Solos ricos em matéria orgânica contêm contaminantes que são co-extraídos com o DNA e interferem em reações enzimáticas posteriores. Uma separação prévia das células da matriz do solo aumenta a pureza do DNA extraído. Entretanto, essa separação prévia pode diminuir a quantidade e representatividade do DNA ambiental (DANIEL, 2005).

(iii) Integridade: Os processos de extração rigorosos podem fragmentar excessivamente o DNA extraído. Estudos que procuram âncoras filogenéticas ou tem o objetivo de clonar grandes operons envolvidos na produção de certos antibióticos necessitam de grandes fragmentos de DNA ambiental (LEVEAU, 2007).

(iv) Representatividade: Métodos indiretos de extração podem acarretar em substancial perda da representatividade da flora microbiana. Microrganismos raros podem ser perdidos por métodos de lavagem. É preciso considerar que em uma diversidade de microrganismos há também uma diversidade de paredes celulares características que variam em suas suscetibilidades para lise (SCHMEISSER, STEELE e STREIT, 2007).

Extração de DNA total de uma amostra ambiental é necessariamente um balanço entre uma extração rigorosa requerida para a representação de todos os genomas microbianos da amostra (lise direta) e, a minimização da fragmentação do DNA e da coextração de contaminantes (COWAN, 2005).

1.3.2. BIBLIOTECA METAGENÔMICA

A construção de bibliotecas metagenômicas envolve as mesmas etapas que a construção de bibliotecas genômicas de microrganismos individuais. Estas são: 1) fragmentação do DNA extraído do solo por enzimas de restrição ou quebra mecânica, 2) inserção dos fragmentos de DNA em um sistema de vetor adequado e, 3) transformação do vetor recombinante em um hospedeiro apropriado. Embora a construção de bibliotecas metagenômicas seja conceitualmente simples, o tamanho do metagenoma do solo e o grande número de clones necessários para cobrir toda a comunidade nativa tornam esse trabalho tecnicamente complicado (DANIEL, 2005).

A escolha dos vetores depende da qualidade do DNA isolado, do tamanho médio dos insertos pretendidos na biblioteca, do número de cópias do vetor, do hospedeiro e da estratégia de triagem (DANIEL, 2005). Bibliotecas podem ser classificadas em dois grupos de acordo com o tamanho médio de seus insertos. Bibliotecas contendo insertos grandes de DNA (acima de 20 Kpb) são construídas em vetores como cosmídeo, fosmídeo, cromossomo bacteriano artificial e cromossomo de levedura artificial. Bibliotecas com insertos menores podem ser construídas em plasmídeos (menos que 10 Kpb) (RIESENFELD, GOODMAN e HANDELSMAN, 2004). Rondon et al. (2000) fez uma comparação entre os dois vetores mais utilizados para construção de bibliotecas de insertos grandes, fosmídeo e cromossomo bacteriano artificial. Segundo essa comparação, o fosmídeo apresenta um sistema de empacotamento que não aceita DNA acima de, aproximadamente, 40 Kpb e rejeita DNA menor que ~35 Kpb. Assim bibliotecas de fosmídeos apresentam uma taxa muito baixa de clones sem inserto ou com insertos pequenos. Os cromossomos bacterianos artificiais podem clonar fragmentos de até um Mpb (BERRY et al., 2003) mas tem uma forte seleção para

fragmentos pequenos o que torna a biblioteca muito variável com relação ao tamanho dos insertos.

Estratégias para construção da biblioteca variam de acordo com o alvo de estudo (RIESENFELD, GOODMAN e HANDELSMAN, 2004), para estudos filogenéticos há a necessidade em obter clones com insertos grandes de DNA em contraste, para o pirosequenciamento utilizam-se fragmentos pequenos de DNA. A TABELA 1 (DANIEL, 2005) compara as vantagens e desvantagens entre bibliotecas de inserto grande e inserto pequeno.

TABELA 1. VANTAGENS E DESVANTAGENS DAS BIBLIOTECAS DE INSERTOS MENORES QUE 20 KPB E MAIORES QUE 20 KPB.

	VANTAGENS	DESVANTAGENS
INSERTO PEQUENO (Plasmídeos)	<ul style="list-style-type: none"> -Grande número de cópias permite detecção de genes que são fracamente expressos. - Tecnicamente simples. 	<ul style="list-style-type: none"> -Tamanho do inserto não é adequado para clonar operons multicistrônicos. - Grande número de clones para triagem.
INSERTO GRANDE (Cosmídeo, Fosmídeo, cromossomo artificial)	<ul style="list-style-type: none"> - Número menor de clones para triagem. -Apropriado para clonar operons multicistrônicos. 	<ul style="list-style-type: none"> -Baixo número de cópias dificulta a detecção de genes que são fracamente expressos. - Requer DNA de alta pureza. - Tecnicamente difícil.

FONTE: DANIEL (2005).

A maioria das bibliotecas metagenômicas com insertos grandes de DNA contém pouco mais que 100.000 clones. Enquanto bibliotecas de inserto pequeno podem ter mais de 1 milhão de clones (GREEN e KELLER, 2006).

O hospedeiro utilizado para a construção da maioria das bibliotecas publicadas é *Escherichia coli*, mas outros hospedeiros tais como espécies de *Streptomyces*

(COURTOIS et al., 2003), *Pseudomonas* (MARTINEZ et al., 2004) e *Rhizobium* (LI et al., 2004) também são usados. Diferentes hospedeiros apresentam diferentes capacidades e sistemas para expressar genes heterólogos. GABOR et al. (2004) estima que somente 7% dos genes representativos da classe das Actinobacterias seriam expressos de maneira independente em uma *E.coli*, comparado com 73% dos genes de origem dos Firmicutes.

Para obter substancial representação de membros raros (>1%) da comunidade nativa, a biblioteca precisa conter insertos representando entre 100-1000 vezes o tamanho do metagenoma. Por exemplo, uma biblioteca de 500 Gbp poderia ser requerida para capturar a riqueza de espécies de 1 mL de água do mar, a qual contém 1 Gbp por mL ou, em média, 200 espécies por mL (CURTIS, SLOAN e SCANNELL, 2002). Assim para obter boa representatividade de DNA do solo com uma riqueza de espécies 20 vezes maior que da água do mar, seria necessário construir uma biblioteca com 10.000 Gbp (CURTIS, SLOAN e SCANNELL, 2002).

1.3.3. TRIAGEM DAS BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS

Duas abordagens gerais, análise funcional e análise baseada na seqüência, tem emergido para extrair informação biológica de bibliotecas metagenômicas (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2004). A TABELA 2 (DANIEL, 2005) compara os dois métodos.

A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é a técnica mais usada para triagem de bibliotecas baseada na seqüência (DUNBAR et al., 1999; ZHOU et al., 2002; COURTOIS et al., 2003; COURTOIS et al., 2001; QUAISER et al., 2002; GINOLHAC et al., 2004; LILES et al., 2003; BORNEMAN e TRIPLETT, 1997; PRECIGOU, GOULAS e DURAN, 2001). A Hibridização usando sondas alvo-específico tem também sido usada para triagem de bibliotecas metagenômicas (KNIETSCH et al., 2003). As abordagens, hibridização e PCR, requerem sondas e oligonucleotídeos iniciadores apropriados que são derivados de regiões conservadas de genes conhecidos, sendo a aplicabilidade limitada a identificação de novos membros de famílias conhecidas de genes. Esta abordagem pode ser usada para identificar âncoras filogenéticas tais como genes 16S rRNA (QUAISER et al., 2002; QUAISER et al., 2003; LILES et al., 2003) e genes que

codificam enzimas com domínios altamente conservados tal como policetídeos sintase (COURTOIS et al., 2003; GINOLHAC et al., 2004; SEOW et al., 1997), ácido gluconico redutase (ESCHENFELDT et al., 2001) e nitrila hidratase (PRECIGOU, GOULAS e DURAN, 2001), entre muitos outros.

TABELA 2. VANTAGENS E DESVANTAGENS DA TRIAGEM FUNCIONAL E DA TRIAGEM BASEADA NA SEQÜÊNCIA.

	Vantagens	Desvantagens
Triagem funcional	<ul style="list-style-type: none"> - Podem ser obtido genes e produtos gênicos completamente novos. -Seleciona gene completo. -Seleção de produtos gênicos funcionais. 	<ul style="list-style-type: none"> - Dependente da expressão dos genes clonados pela bactéria hospedeira. - Requer a produção de um produto de gene funcional e detectável pela bactéria hospedeira.
Triagem baseado na seqüência	<ul style="list-style-type: none"> -Independente da expressão do gene clonado pela bactéria hospedeira. -Estratégias similares para triagem podem ser usadas para diferentes alvos. 	<ul style="list-style-type: none"> -Não é possível obter genes completamente novos. -Podem ser clonados genes parciais. -Pode selecionar genes não funcionais.

FONTE: DANIEL (2005).

A análise de triagem funcional é baseada na identificação de um clone que expressa uma característica distinguível no meio de crescimento, seguido da caracterização dos clones ativos pelo sequenciamento de DNA e análises bioquímicas (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003).

A triagem funcional de bibliotecas metagenômicas tem identificado genes que codificam antibióticos previamente descritos e também alguns desconhecidos (RONDON et al., 2000; GILLESPIE et al., 2002; AUGUST et al., 2000; BRADY, CHAO e

CLARDY, 2002; BRADY et al., 1984; BRADY e CLARDY, 2000; MACNEIL et al., 2001; WANG et al., 2000; COURTOIS et al., 2003; PIEL et al., 2002), um gene de resistência a antibiótico (DIAZ-TORRES et al., 2003), lipases (RONDON et al., 2000; HENNE et al., 2000), quitinases (COTTRELL MOORE e KIRCHMAN, 1999), proteínas de membrana (MAJERNIK, GOTTSCHALK e DANIEL, 2001), genes codificando enzimas para o metabolismo de 4-hidroxibutirato (HENNE et al., 1999), e gene codificando via sintética da biotina (ENTCHEVA et al., 2001).

1.4 AMINOÁCIDO DESCARBOXILASES

Aminas biogênicas são compostos nitrogenados básicos formados principalmente pela descarboxilação de aminoácidos ou pela transaminação de aldeídos e cetonas (ASKAR e TREPTOW, 1986; MAIJALA et al., 1993). Elas são bases orgânicas com baixa massa molecular e são sintetizadas pelo metabolismo secundário de microrganismos, vegetais e animais (BRINK et al., 1990).

As aminas biogênicas podem ser alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina e espermidina), aromáticas (tiramina e feniletilamina), ou heterocíclicas (histamina e triptamina). Aminas tais como putrescina, espermina, espermidina e cadaverina são componentes indispensáveis das células animais, sendo importantes na regulação funcional de ácidos nucleicos, síntese protéica e, provavelmente, na estabilização de membranas (BARDÓCZ et al., 1993; MAIJALA et al., 1993; HALÁSZ et al., 1994). Também tem funções fisiológicas em humanos e animais, tais como: regulação da temperatura corporal, volume estomacal, pH estomacal e atividades cerebrais (BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994)

Pré-requisitos para formação de aminas biogênicas por microrganismos são: disponibilidade de aminoácidos (MARKLINDER e LÖNNER, 1992), presença de microrganismos produtores de enzimas aminoácidos descarboxilases (TIECCO et al., 1986; BRINK et al., 1990; HUIS IN'T VELD et al., 1990), e condições que permitem crescimento bacteriano, síntese e atividade de descarboxilase (BRINK et al., 1990).

Embora as enzimas aminoácido descarboxilases não sejam largamente distribuídas entre as bactérias, espécies de vários gêneros tal como *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*,

Shigella, *Photobacterium*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Streptococcus* são capazes de descarboxilar um ou mais aminoácidos (RICE et al., 1976; BRINK et al., 1990; HUIS IN'T VELD et al., 1990). Muitas enzimas aminoácidos descarboxilase necessitam do piridoxal-5-fosfato como co-fator. A especificidade dessas enzimas é variável, encontrando aminoácido descarboxilase capaz de degradar apenas um aminoácido enquanto algumas são capazes de degradar três ou mais aminoácidos (BOVER-CID e HOLZAPFEL, 1999).

Certas classes de aminas, as catecolaminas, indolaminas e histamina, executam importantes funções metabólicas em humanos, especialmente no sistema nervoso e no controle da pressão sanguínea (HALÁSZ et al., 1994). A feniletilamina e tiramina causam um aumento na pressão sanguínea, enquanto histamina reduz a pressão sanguínea. A histamina também controla importantes funções biológicas servindo como mediador primário de sintomas imediatos de respostas alérgicas (TAYLOR, 1986; STRATTON et al., 1991).

Vários métodos quantitativos e qualitativos para determinar a produção de aminas biogênicas por microrganismos tem sido descritos (SHAKILA, 2001; SHALABY, 1998; MAIJALA, 1993; JOOSTEN e NORTHOLD, 1989). Normalmente o meio tem uma composição básica (peptona, extrato de levedura e carne, sais e/ou glucose) a qual o aminoácido precursor e um indicador de pH (tal como púrpura de bromocresol) são adicionados (MAIJALA, 1993). Resultados positivos são indicados pela mudança de coloração do meio de cor amarelado para púrpura em resposta a mudança de pH. A mudança de pH é dependente da produção de aminas biogênicas mais alcalinas que os aminoácidos incluídos inicialmente no meio (BOVER-CID e HOLZAPFEL, 1999).

1.5 QUITINASE

As enzimas que lisam a parede celular de leveduras (quitinase, protease, lisozima) têm aplicações biotecnológicas na preparação de protoplastos para melhoramento genético de leveduras e no aproveitamento de massa celular de levedura para extração de proteínas, enzimas e pigmentos. A lise enzimática de células de microrganismos também tem potencial de aplicação no tratamento de massa celular

de levedura residual de indústrias de fermentação para preparação de ração animal, na obtenção de carboidratos funcionais da parede celular (glucana e manana) e no pré-tratamento para ruptura mecânica de células aumentando a eficiência e reduzindo o requerimento de energia (FLEURI e SATO, 2005).

As enzimas líticas têm sido utilizadas também como ferramenta para determinação da composição da parede celular de leveduras e no estudo do mecanismo da síntese da parede celular para controle de leveduras patogênicas (Fleuri e Sato, 2005).

As enzimas líticas são capazes de lisar a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp. e outros gêneros de leveduras, o que amplia o campo de utilização dessas enzimas (FLEURI e SATO, 2005).

Quitina, um homopolímero não ramificado de N-acetil-D-glucosamina unidos por ligação β -(1 \rightarrow 4) (FIGURA 2), é um polissacarídeo estrutural abundante produzido por muitos organismos. Estudos de difração de raios-X demonstraram que possui uma estrutura cristalina altamente ordenada e insolúvel em água (ROBERTS, 1992).

Quitina é constituinte do exoesqueleto de zooplâncton e larvas de invertebrados (BOOT et al., 2001), da parede celular de alguns clorofitos (TRONSMO e HARMAN, 1993) e do material extracelular de algumas diatomáceas (PARK et al., 1997; DE LA CRUZ et al., 1992). Na maioria dos fungos a quitina é o maior componente estrutural da parede celular, sendo, portanto, susceptível a inúmeras espécies de bactérias e fungos que podem agir como antagonistas devido à produção de enzimas quitinolíticas (SAHAI, 1993).

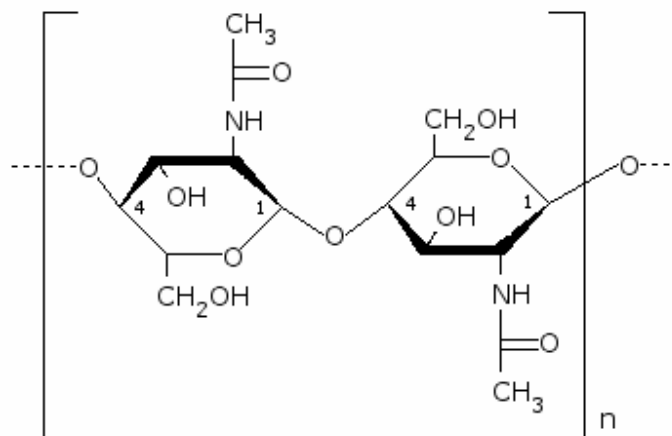


FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO DA N-ACETIL-1,4-B-D-GLUCOPIRANOSAMINA, UNIDADE FORMADORA DA QUITINA.

A primeira etapa na degradação da quitina, que é feita por microrganismos (BOOT et al., 2001), consiste na hidrólise da ligação glicosídica entre os resíduos N-acetil-D-glucosamina pelas quitinases. Quitinases podem ser divididas em duas categorias principais: endoquitinases e exoquitinases (GRAHAM e STICKLEN, 1994). Endoquitinases (EC 3.2.1.14) clivam quitina aleatoriamente em sítios internos, em polímeros de N-acetil-D-glucosamina de baixo peso molecular, tais como a quitotetraose, quitotriose, e diacetilquitobiose. Exoquitinases podem ser divididas em duas subcategorias: quitobiosidases e β -(1,4) N-acetil-D-glucosaminidases. Quitobiosidases (EC 3.2.1.29) ou quitino-1,4- β -quitobiosidases que catalisa a liberação progressiva de diacetilquitobiose começando na extremidade não redutora da cadeia de quitina. β -(1,4) N-acetil-D-glucosaminidases (EC 3.2.1.30) ou quitobiosidases quebra diacetilquitobiose, polímeros de quitina de alto peso molecular, quitotriose e quitotetraose, em monômeros N-acetil-D-glucosamina (LI, 2006).

A capacidade para degradar quitina ocorre em grande número de grupos taxonômicos de procariotos (VAN EIJK et al., 2005; BOOT et al., 2005). Bactérias empregam várias enzimas (quitina deacetilase, N-acetil- β -D-glicosaminidase e quitosanase) para degradar quitina (ROBERT e SELITRENNIKOFF, 1988; DE LISBOA et al., 2004), mas a hidrólise pelas quitinases é a etapa principal na solubilização e mineralização da quitina. Portanto, as quitinases em bactérias fazem uma função na digestão da quitina para utilização como fonte de carbono e energia, reciclando quitina na natureza (PARK et al., 1997; TSUJIBO et al., 1993; SVITIL et al., 1997; WANG e CHANG, 1997).

1.6 CELULASE

Celulose é um homopolímero de glucose unidos por ligações β -1,4-glicosídicas (FIGURA 3). O dissacarídeo constituído de duas glucoses unidas por tal ligação é

denominado de celobiose, a unidade repetitiva da celulose (ZHANG, HIMMEL e MIELENZ, 2006). Cadeias com mais de seis ou sete monômeros já são insolúveis, sendo que algumas cadeias podem conter centenas de monômeros (WARREN, 1996). A rigidez e a estabilidade das celuloses são conseqüências das ligações β -1,4 que formam um arranjo em zigue-zague (TOMME, WARREN e GILKES, 1995). Vários desses arranjos em zigue-zague podem ser sobrepostos formando arranjos paralelos unidos por pontes de hidrogênio e força de van der Waals (ZHANG, HIMMEL e MIELENZ, 2006).

Celulose é o polímero mais abundante na biosfera (~100 bilhões ton/ano, são produzidos) (ZHANG, HIMMEL e MIELENZ, 2006). Embora somente um tipo de reação, quebra da ligação β -1,4-glucosídica, seja requerida para converter celulose em produtos solúveis, a degradação é complicada devido a insolubilidade do substrato e a inacessibilidade da ligação glucosídica, especialmente nas regiões cristalinas (WARREN, 1996).

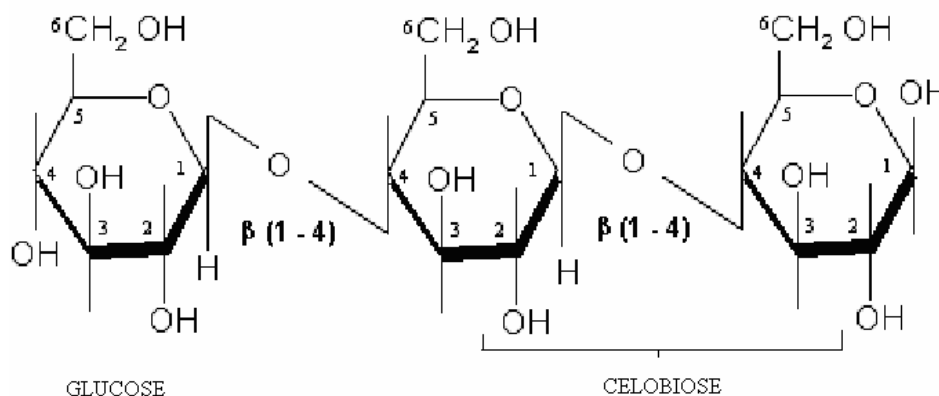


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DAS LIGAÇÕES β -1,4-GLUCOSÍDICAS ENTRE MONÔMEROS DE GLUCOSE FORMADORES DA CELULOSE.

Degradação biológica de componentes lignocelulosídicos é a chave do ciclo global de carbono (WOLIN e MILLER, 1987) e também é uma abordagem promissora para geração de fontes de energia alternativa (LYND et. al., 1991). Degradação de celulose é primariamente um processo microbiológico, onde microrganismos desenvolveram várias estratégias para isto. Celulases secretadas e/ou dispostas na superfície das células podem ser sintetizadas como, (i) apenas uma enzima, (ii)

polipeptídeos contendo vários domínios celulosídicos, ou (iii) complexo macromolecular multienzimático chamado celulosoma (DESVAUX, 2006).

O mecanismo de hidrólise enzimática de celulose envolve uma ação conjunta entre endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), e β -glucosidases (EC 3.2.1.21) (ZHANG e LYND, 2004). Endoglucanases hidrolisam aleatoriamente ligações β -1,4-glicosídicas intramoleculares acessíveis nas cadeias de celulose produzindo assim novas extremidades; exoglucanases clivam as cadeias a partir das extremidades, disponibilizando celobiose e glucose; e as β -glucosidases hidrolisam celobiose para formar glucose (ZHANG, HIMMEL e MIELENZ, 2006). Esses três processos de hidrólise ocorrem simultaneamente como mostrado na FIGURA 4.

A despolimerização enzimática feita por endoglucanases e exoglucanases é o passo limitante para degradação da celulose. Isso porque transforma um substrato altamente insolúvel (celulose com mais de seis monômeros) em dímeros e monômeros solúveis (celobiose e glucose) (ZHANG, HIMMEL e MIELENZ, 2006).

Substratos para detectar celulasas podem ser divididos em duas categorias, baseado na solubilidade em água. A TABELA 3 divide os substratos nas duas categorias, solúvel e insolúvel, e resume os métodos de detecção de celulasas de acordo com o substrato (ZHANG, HIMMEL e MIELENZ, 2006).

Alguns substratos derivados da celulose, como carboximetilcelulose (CMC), possuem substituições químicas que diminuem o grau de polimerização da celulose nativa, tornando a ligação β -1,4-glicosídica mais acessível a ação da enzima. Alguns polissacarídeos interagem de maneira não covalente com corantes. Esta interação pode ser usada para tornar um polissacarídeo visível em uma placa de meio. O corante mais utilizado para detectar celulase é o vermelho congo (RUIJSSENAARS e HARTMANS, 2001). Este corante interage com ligações β -1,4-glucanas, β -1,3-glucanas, β -(1,3)(1,4)-glucanas e β -1,4-xilanas (WOOD, 1980).

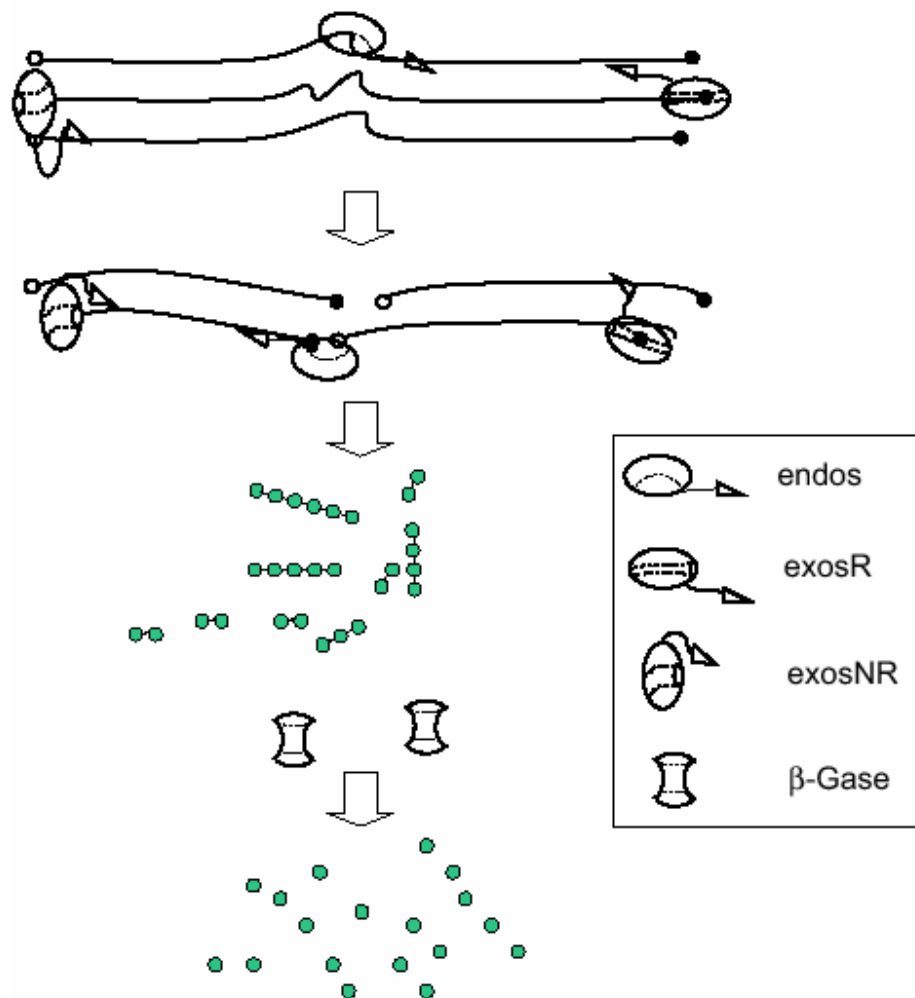


FIGURA 4. ESQUEMA DO MECANISMO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE. Endos, endocelulases; exosR, exocelulases; exosNR, exocelulases que age na extremidade redutora; β -Gase, β -glucosidases. FONTE: ZHANG, HIMMEL e MIELENZ, (2006).

TABELA 3. SUBSTRATOS PARA ENSAIOS DE ATIVIDADE B-1,4-GLUCOSÍDICA E MÉTODOS DE DETECÇÃO.

SUBSTRATOS		DETECÇÃO	ENZIMA
SOLÚVEIS	- Cadeias curtas (baixo grau de polimerização): Celodextrinas, β -methyllumbelliferyl-oligossarídeo	RS, HPLC, TLC.	Endocelulases Exocelulases β -glucosidases
	- Derivados de celulose de cadeia longa: CMC e HEC	RS, viscosidade, interação com corante.	Endocelulases
INSOLÚVEIS	Celulose cristalina Celulose amorfa	RS, HPLC, TLC, TSS	Total Endocelulases Exocelulases
	Celulose fluorescente	Liberação de fluorescência	Total
	α -celulose e Biomassa de lignocelulose pré-tratada	HPLC, RS.	Total

RS – Açúcar redutor; TSS – Açúcares solúveis totais. FONTE: ZHANG, HIMMEL e MIELENZ (2006).

2- OBJETIVOS

Considerando a diversidade bacteriana e o potencial biotecnológico de bactérias ainda não cultiváveis para a produção de novos compostos bioativos, em particular aminas biogênicas, celulasas e quitinases, esse trabalho tem como objetivos:

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir uma biblioteca metagenômica;
- Realizar triagem baseada na seqüência;
- Realizar triagem funcional de bibliotecas metagenômicas do solo da Floresta Atlântica visando à descoberta de novos compostos bioativos, tais como aminas biogênicas, celulasas e quitinases com potencial biotecnológico.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESTIRPES BACTERIANAS E VETORES

As estirpes e vetores utilizados neste trabalho são apresentados na TABELA 4.

TABELA 4. ESTIRPES BACTERIANAS E VETORES.

Estirpes Bacterianas	Genótipo / fenótipo	Referência/Fonte
<i>E. coli</i>		
DH10B	Sm ^R , F'[proAB+lacZΔM15]	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
DH 5 ALFA	F ⁻ φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1	INVITROGEN
TOP10	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	GRANT, 1990
RR1	F ⁻ mcrB mrr hsdS20(rB ⁻ , mB ⁻) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 .- leu mtl1.	BOLIVAR e BACKMAN 1979
EPI300™-TR	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ ⁻ rpsL nupG trfA dhfr	EPICENTRE
71.18	F lacI ^q (lacZ) M15 proA+proB+/ (lac-proAB) thi supE	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
S 17.1	Sm ^R , Tra ⁺	SIMON, PRIEFFER E PUHLER, 1983
XL- 1blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tetr)]	STRATAGENE
DH 5	F ⁻ φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1	INVITROGEN
Vetores		
pUC 19	Am ^R , lacZ	INVITROGEN
EpiFOS™	Chl R, lacZ, cos	EPICENTRE

3.2 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS DE SOLO

A biblioteca metagenômica foi construída a partir de uma amostra de solo da Floresta Atlântica localizada ao longo da rodovia PR 410, conhecida como “Estrada da Graciosa”, na Serra do Mar do Estado do Paraná.

No local da coleta foi demarcada uma área de 1 m² dentro da qual foram retiradas cinco amostras, representadas por círculos vermelhos (FIGURA 5). Após a retirada da camada superficial do solo, composta basicamente de folhas em decomposição, aproximadamente 500 g de solo foram coletados numa profundidade 0-10 cm com o auxílio de uma pá. O solo foi colocado em um saco plástico estéril e armazenado a 4°C até a manipulação. Uma fração das amostras de solo (400 g) foi separada e congelada (- 20°C) para análises físico-químicas e de material orgânico.



FIGURA 5 - PONTO DE COLETA DE SOLO - Os círculos vermelhos representam os cinco pontos de coleta dentro de uma área demarcada de 1m². As cinco amostras foram misturadas e homogenizadas para posterior extração do DNA metagenômico.

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA DO SOLO

O DNA metagenômico foi extraído e isolado utilizando os reagentes do *PowerMax™ Soil DNA Isolation Kit* de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (<http://www.mobio.com/files/protocol/12988-10.doc>).

3.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO E DO VETOR PUC 19

Para quantificar o DNA extraído da amostra de solo da Floresta Atlântica e do vetor pUC 19 foi utilizado o Kit Qubit Fluorometer (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante

(<https://catalog.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=viewCatalog.viewProductDetailseproductDescription=30354>).

3.5 MANIPULAÇÃO DE DNA

Os métodos de purificação de plasmídeos em tubos de 1,5 mL tipo eppendorf, digestão do DNA com endonucleases de restrição, eletroforese em gel de ágar e agarose, foram executados como descrito em SAMBROOK et al (1989). O gel de agarose de baixo ponto de fusão (LMP – Low Melting Point) foi feito em uma concentração de 0,8% de agarose LMP em tampão TAE 1X. A corrida também foi efetuada com tampão TAE 1X, 40V por 4h. Os demais géis foram feitos com tampão TBE 1X e a corrida foram efetuadas com o mesmo tampão. O apêndice 2 apresenta a composição dos tampões TAE e TBE.

3.5.1 EXTRAÇÃO DO DNA DO GEL DE AGAROSE LMP

A fatia de gel foi aquecida a 65 °C e foi adicionado NaCl (concentração final de 250 mM), Tris-HCl pH 8 (concentração final de 100 mM) e EDTA pH 8 (concentração final de 1 mM). Na etapa seguinte foi feito o aquecimento novamente, adicionado um volume de fenol equilibrado, o tubo então foi agitado cuidadosamente por inversão e centrifugado por 15' a 13,400 rpm. Após centrifugação, foi coletado o sobrenadante e adicionado a ele um volume de isopropanol e colocado no gelo por 20', depois foi centrifugado por mais 20' a 13,400 rpm. O sobrenadante foi então descartado e o pellet de DNA foi lavado com etanol 80%, novamente centrifugado (5' a 13,400 rpm), colocado na estufa a 37 °C por 30' para evaporação de resíduos de etanol e ressuspendido em 10 µL água de Milli-Q.

3.6 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA METAGENÔMICA

Duas bibliotecas foram construídas, designadas MAF 1 e MApUC. A biblioteca metagenômica MApUC utilizou o vetor pUC19 e a estirpe de *E.coli* DH10B como hospedeira. Clones desta biblioteca foram seqüenciados (primer reverso e universal do plasmídeo) e foi realizada a triagem para as enzimas aminoácido descarboxilase, quitinase e celulase (descrição dos meios no item 3.11.1, 3.11.2 e 3.11.3, respectivamente).

A biblioteca metagenômica MAF 1 foi construída por Helisson Faoro utilizando o kit comercial EpiFOS™ Fosmid Library Production Kit (EPICENTRE). Nesta biblioteca, MAF 1, foi efetuada a triagem para celulase.

3.6.1 PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES

A estirpe DH10B de *E.coli* foi crescida em 200 mL de meio SOB (Apêndice 1) até D.O. 600 entre 0,5 e 0,7. Em seguida a suspensão de células foi incubada em banho de gelo por 30 minutos e, posteriormente, transferidas para 4 tubos tipo Falcon de 50 mL os quais foram centrifugados a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C em centrífuga Eppendorf 5804R utilizando o rotor de ângulo fixo (Eppendorf, modelo F 34-6-38). O precipitado de células foi lavado duas vezes com água de Milli-Q (temperatura da água entre 1 e 4 °C) e uma terceira e última lavagem com glicerol 10% gelado. No final, as células foram ressuspensas em 1000 µL da mesma solução e transferidas para um tubo eppendorf de 1,5 mL.

3.6.2 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Para eletrotransformação na estirpe DH10B de *E.coli* alíquotas de 100 µL de células eletrocompetentes foram misturadas a 1 µL do sistema de ligação contendo o DNA a ser eletroporado. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm (BioRad) previamente resfriada e colocada na câmara de eletroporação. As amostras foram submetidas a um choque elétrico de 2,5 Kv utilizando o eletroporador

GenePulser II (BioRad). Às células de *E.coli* foi adicionado 1mL de meio SOC (Apêndice 1) e incubadas de 30-40 minutos em estufa a 37°C, tempo suficiente para permitir a recuperação das células mas não a replicação. Após o período de recuperação, as amostras foram plaqueadas em meio sólido LA contendo X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo) como substrato para a enzima β -galactosidase na concentração de 30 μ g/mL. Também foi adicionado ao meio o antibiótico ampicilina (250 μ g/mL). Em seguida as placas foram incubadas na estufa a 37 °C durante a noite.

3.6.3 COLETA DE CLONES TRANSFORMANTES

As colônias transformantes (brancas) foram coletadas aleatoriamente com o auxílio de palitos de madeira e organizadas em placa de 96 poços contendo 100 μ L do meio líquido TB (Apêndice 1) e ampicilina (250 μ g/mL). Após 20 h crescendo na estufa a 37 °C foi adicionado 100 μ L de glicerol 87 % gelado. As placas foram então seladas com adesivos e armazenadas em congelador a -20°C.

3.7 TAMANHO MÉDIO DOS INSERTOS

Para determinar o tamanho médio dos insertos na biblioteca M_{Ap}UC foi feita a purificação de DNA plasmidial de 12 clones dos 82 obtidos. Para isso foi utilizado o kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) seguindo o protocolo do fabricante (<http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/qiagen/27104.htm>). A partir da miniprep foi feita a digestão com as enzimas EcoRI e HindIII, que flanqueiam o sítio BamHI usado na clonagem. O sistema de restrição foi de 10 μ L, contendo 4 μ L de DNA (539 ng de DNA/ μ L), 1 μ L tampão (React2, INVITROGEN), 0,3 μ L de cada enzima, 1 μ L de RNase (20 mg/mL) e 3,4 μ L de água de Milli-Q.

3.8 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PLACAS DE 96 POÇOS

Para crescimento bacteriano foram utilizados blocos de 96 poços com capacidade de 2 mL por poço. Em cada poço da placa foi colocado 1,25 mL de meio TB

contendo 250 µg/mL de ampicilina. As colônias foram inoculadas com o auxílio de repicador de 96 pinos e o bloco selado com adesivo perfurado para permitir a aeração. As culturas foram incubadas durante 16 horas em estufa a 37°C sob agitação constante de 180 rpm.

O bloco contendo as culturas crescidas foi centrifugado por 7 minutos a 4000 rpm para sedimentar as células. O meio de cultivo foi retirado e o precipitado de células lavado com 180 µL de GET (glucose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L pH 8 e Tris-HCl 25 mmol/L pH 8). Após descartar o sobrenadante, foi adicionado 80 µL de GET contendo 2,5 µg/mL de RNase. As células foram ressuspensas por agitação e a suspensão transferida para uma microplaca (polipropileno) de 96 poços, com capacidade para 250 µL e fundo em V. A cada poço da placa foram adicionados 80 µL de solução de lise (NaOH 0,2 mol/L e SDS 1%). A placa foi selada, misturada por inversão e incubada em temperatura ambiente por 5 min. A seguir acrescentou-se a cada poço 80 µL de KoAc 3 mol/L pH 5,2 gelado e misturou-se por inversão. A placa foi deixada 10 minutos a temperatura ambiente e então incubada aberta em estufa a 90°C por 30 minutos. Após esse tempo, a placa foi resfriada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada mais 10 minutos (4000 rpm, 4°C). O sobrenadante foi então coletado e transferido para uma placa de 96 poços Millipore (MAGV N22), fixada sobre uma placa de fundo "V" de 250 µL e o conjunto centrifugado (sem a tampa) por 5 minutos a 4000 rpm. Ao filtrado que passou para a microplaca adicionou-se 100 µL de isopropanol e em seguida centrifugou-se por 45 minutos a 4000 rpm. O precipitado de DNA foi então lavado com 150 µL de etanol 70% e secado em estufa a 37°C por 15 minutos. Em seguida o DNA foi dissolvido em 30 µL de água ultra pura.

3.9 SEQUENCIAMENTO DE DNA PLASMIDIAL

O sequenciamento de DNA foi realizado em placas de 96 poços utilizando o método cujo princípio foi descrito por SANGER *et al* (1977). Foram utilizados dideoxinucleotídeos fluorescentes, separação em eletroforese capilar e detecção do fluoróforo após excitação com laser em seqüenciador automático MegaBACE 1000 (GE HealthCare). O sistema de reação foi constituído de aproximadamente 250 ng de DNA de fita dupla, 3,25 pmol de iniciador, 3 µL de reativo ET terminador mix (GE HealthCare)

e água ultra pura suficiente para 7,5 µL. A reação de sequenciamento foi conduzida em termociclador Eppendorf Master Cycler Gradient 5331 com as seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 1 minuto seguidos de 35 ciclos de 94°C por 20 segundos e 62°C por 2 minutos. A seguir o produto das reações foi purificado adicionando-se a cada poço 12,5 µL de água ultra pura, 2 µL de acetato de amônio 7,5 mol/L e 3 volumes de etanol 96%. O DNA foi coletado por centrifugação a 4000 rpm por 45 minutos, lavado com 150 µL de etanol 80% e seco em estufa à 37°C. O DNA seco e purificado foi dissolvido em água e aplicado no seqüenciador automático. Cada placa seqüenciada foi aplicada duas vezes no seqüenciador automático para aumentar o número leituras de cada clone.

3.10 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS.

As seqüências geradas foram comparadas com as do banco de dados GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando o programa Blastx (ALTSCHUL et al, 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) para identificação dos genes presentes nos insertos.

3.11 TRIAGEM FUNCIONAL DAS BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS

A análise funcional das bibliotecas metagenômicas foi realizada através da visualização das colônias crescidas em placas de Petri descartáveis (15 cm de diâmetro) contendo meio sólido capaz de identificar clones positivos através da formação de halo ou mudança na coloração do meio.

3.11.1 DETECÇÃO DE AMINOÁCIDO DESCARBOXILASE

Foi utilizado como base o meio descrito por Bover-Cid e Holzapfel (1999) (denominado como *improved medium*) (TABELA 5). As seguintes modificações foram introduzidas: 1- omissão de glucose (fonte de carbono); 2- omissão de carbonato de cálcio (utilizado para evitar declínio do pH causado pela fermentação da glucose); 3- Adição de um polivitamínico do complexo B (EMS complexo B) para suprir a

necessidade de piridoxal-5-fosfato. Os aminoácidos utilizados foram: L-Tirosina, L-Ornitina, L-Lisina e L-Histamina (VETEC). Para detectar clones produtores de aminoácido descarboxilase o meio continha o indicador de pH púrpura de bromocresol (pH 5,3 - 6,8).

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO (%) DO MEIO PARA DESCARBOXILASES.

COMPONENTES	IMPROVED MEDIUM
Triptona	0.5
Extrato de levedura	0.5
Extrato de carne	0.5
Cloreto de sódio	0.25
Glucose	0.05
Tween 80	0.1
MgSO ₄	0.02
MnSO ₄	0.005
FeSO ₄	0.004
Citrato de Amônia	0.2
Tiamina	0.001
K ₂ PO ₄	0.2
CaCO ₃	0.01
Piridoxal-5-Fosfato	0.005
Aminoácido	1.0
Púrpura de bromo cresol	0.006
Agar	2.0
pH	5.3

FONTE: BOVER-CID e HOLZAPFEL (1999)

3.11.2 DETECÇÃO DE QUITINASES

Ensaio para identificar a produção de quitinase foram feitos pelo monitoramento da degradação de quitina incorporados ao meio de cultura. Embora esses ensaios tenham uma limitada sensibilidade, eles representam um simples e acessível método para identificar microrganismos quitinolíticos.

A triagem funcional para quitinases foi feita através da adição de quitina em pó (0,5 % p/v) ao meio LB ágar (Lisogenic-Broth Agar) (RONDON *et al.*, 2000). Os clones

capazes de degradar quitina devem apresentar um halo claro ao redor da colônia, normalmente com 1-2 mm de diâmetro (HOWARD, 2003). As placas de triagem foram incubadas por 5 dias a 37°C.

3.11.3. DETECÇÃO DE CELULASE

Os clones da biblioteca metagenômica MAF 1 e da biblioteca MApUC foram repicados para placas de petri em meio LB ágar suplementado com 0,5% de CMC. Após 5 dias de incubação em estufa a 37°C, as placas foram cobertas com 15 mL de uma solução de vermelho congo (0,2%) e incubadas por 20 min sob agitação a temperatura ambiente para permitir a interação do corante com o polissacarídeo. Após isso, o excesso de corante foi retirado e foi adicionado uma solução de NaCl 1mol/L (15 mL por placa) e novamente as placas permaneceram sob agitação por 20 min. O NaCl foi adicionado para maximizar a interação do corante com o polissacarídeo (RUIJSSENAARS e HARTMANS, 2001). Após a retirada da solução salina as placas foram lavadas com água desmineralizada. Quando ocorre degradação de CMC é possível visualizar a formação de halos mais claros (alaranjados) contrastando com a cor vermelha da placa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. COLETA DO SOLO DA FLORESTA ATLÂNTICA.

Foram coletadas amostras de solo na Serra do Mar do Estado do Paraná a 5 km a partir do início da serra (Altitude de 900 m em relação ao nível do mar), adotando como marco zero o portal de entrada da Estrada da Graciosa. Foi preciso adentrar na floresta para coletar amostras em pontos onde a interferência antrópica fosse mínima.

Análises físico-químicas e de material orgânico revelaram um solo com acidez elevada (pH 3,70) e o teor de matéria orgânica foi considerado baixo (20,8 g/dm³) (FAORO, 2006).

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DAS AMOSTRAS DE SOLO

O DNA metagenômico foi extraído e isolado no mesmo dia da coleta utilizando o *PowerMax™ Soil DNA Isolation Kit* de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (<http://www.mobio.com/files/protocol/12988-10.doc>). Esse Kit de extração utiliza o método direto de extração. Comparando a faixa do DNA extraído com a do marcador de tamanho molecular de 5 Kpb (5Kb DNA Ladder, Invitrogen) é possível observar que a amostra apresentou quantidade significativa de DNA de alta massa molecular (> 40 Kb) (FIGURA 6). O DNA metagenômico extraído do solo apresentou elevada concentração (539 ng/μL), e razoável integridade (massa molecular > 40 Kpb).

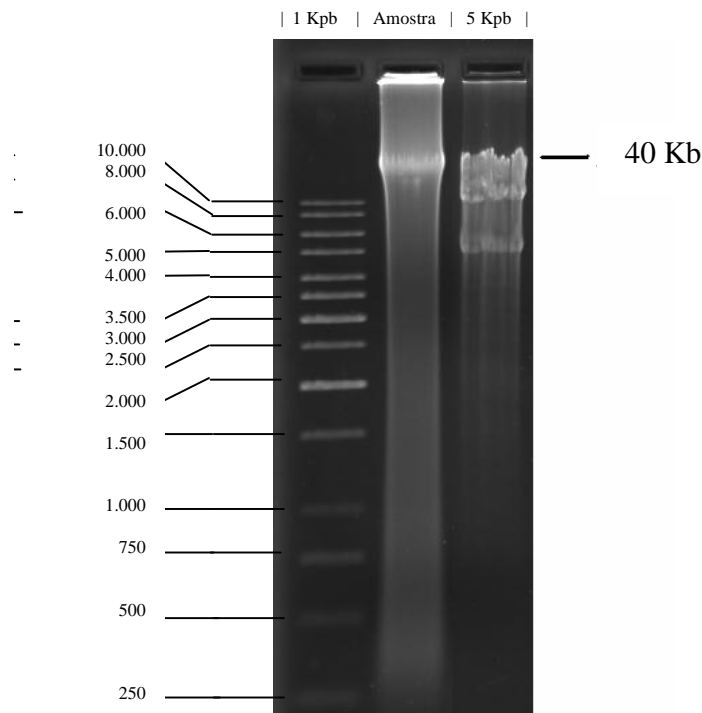


FIGURA 6. PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA EXTRAÍDO DO SOLO DA MATA ATLÂNTICA –O DNA foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 0,7%. Corrida a 30 V, 5 h de corrida em tampão TBE 1X. 5Kpb DNA Ladder (Invitrogen); GeneRuler 1Kpb DNA Ladder (Fermentas).

4.3 QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO E DO VETOR PUC 19

A concentração de DNA total após a extração foi de 269,5 µg diluído em 500 µL de água de Milli-Q. A concentração do vetor foi de 5 ng/µL.

4.4 RESTRIÇÃO DO DNA METAGENÔMICO COM SAU3A E SELEÇÃO DOS FRAGMENTOS

Foi efetuada uma curva de restrição com a enzima *Sau3a* para determinar a concentração necessária para clivar o DNA metagenômico total (FIGURA 7). O DNA metagenômico foi submetido à restrição com a enzima *Sau3a* (Invitrogen) com tampão React4 (Invitrogen). O método utilizado foi baseado em diluições seriadas da enzima, começando com 4 unidades (0,5 µL). O sistema de restrição de 20 µL continha no tubo número “1”, 2 µL de DNA (aproximadamente 1 µg de DNA), 2 µL de tampão (10x), 0,5

μL de enzima (4 unidades) e $15,5 \mu\text{L}$ de água de Milli-Q. Os demais tubos continham $1 \mu\text{g}$ de DNA, $1 \mu\text{L}$ de tampão (10x) e $7,7 \mu\text{L}$ de água Milli-Q, não contendo enzima. Do sistema do tubo inicial foi retirado $10 \mu\text{L}$ e passado ao segundo tubo. Após homogenizar, $10 \mu\text{L}$ do segundo foi retirado e passado ao terceiro tubo e assim até o décimo primeiro tubo, que no final continha $0,02$ unidades de enzima por μL . Concentrações de $0,04$ e $0,08$ unidades de enzima por μL apresentaram a maior concentração de DNA na faixa desejada ($8-10 \text{ Kpb}$).

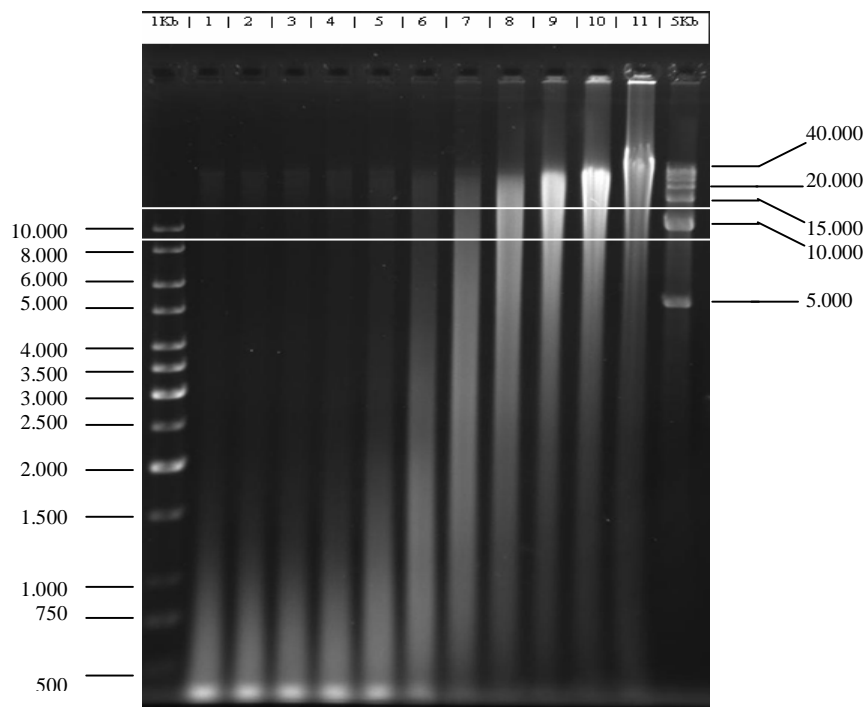


FIGURA 7 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SAU3A PARA DIGESTÃO DO DNA METAGENÔMICO - Eletroforese em gel de agarose 0,7%. Corrida a 30 V, 5 h de corrida em TBE 1X. 1) Sem diluição; 2) 2 x diluído; 3) 4 x diluído; 4) 8 x diluído; 5) 16 x diluído; 6) 32 x diluído; 7) 64 x diluído; 8) 128 x diluído; 9) 256 x diluído; 10) 512 x diluído; e 11) 1024 x diluído (não cortado). Tempo de restrição foi de 15 minutos. 5Kpb DNA Ladder (Invitrogen); 1Kpb DNA Ladder (Fermentas).

A clivagem do DNA metagenômico total para seleção dos fragmentos de tamanhos desejados foi feita com $0,08$ unidades de *Sau3a* por μL . Cada sistema de restrição de $100 \mu\text{L}$ continha $36 \mu\text{L}$ de DNA ($19,5 \mu\text{g}$ de DNA), $10 \mu\text{L}$ de tampão, $1 \mu\text{L}$ de enzima ($0,08$ unidades) e $53 \mu\text{L}$ de água de Milli-Q (FIGURA 8).

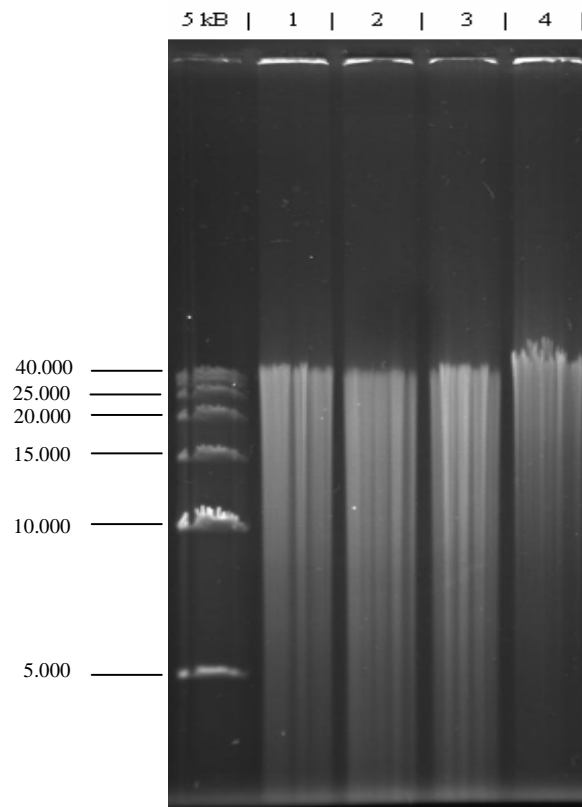


FIGURA 8. PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA METAGENÔMICO CLIVADO COM A ENZIMA SAU3A - O sistema de restrição foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,5%, 50 V, 4 h de corrida em tampão TBE 1X. 5Kpb DNA Ladder (Invitrogen); 1, 2 e 3 sistema de restrição incubado por 15 minutos; 4 Controle (DNA metagenômico não clivado).

Foi retirada uma faixa de DNA, entre 25-40 Kpb, para fazer a excisão no gel de agarose de LMP. A FIGURA 9 apresenta o perfil eletroforético do DNA metagenômico extraído do gel de agarose de LMP com tamanho na faixa de 10-15 Kpb, aproximadamente.

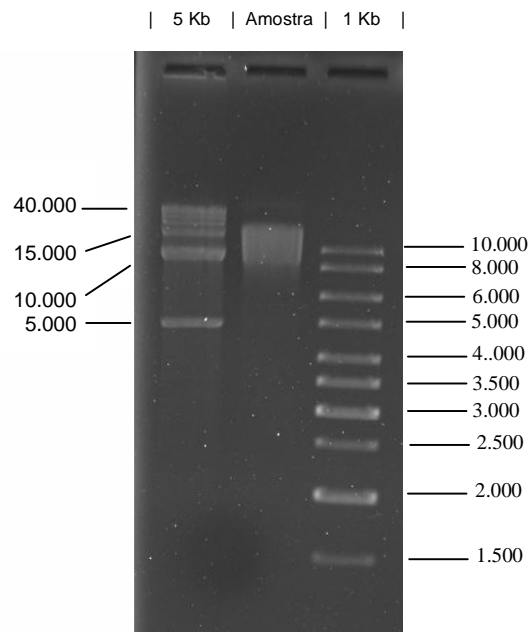


FIGURA 9. PERFIL ELETROFORÉTICO DEPOIS DA EXTRAÇÃO DO GEL DE AGAROSE DE LMP - Gel de agarose 0,8 %, 40 V, 4h de corrida em tampão TAE 1X. 5Kpb DNA Ladder (Invitrogen); 1Kpb DNA Ladder (Fermentas).

4.5 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA METAGENÔMICA

A biblioteca MApUC pode ser considerada como uma biblioteca metagenômica protótipo construída para testar o princípio da metagenômica, o acesso à informação genética dos microrganismos ainda não cultiváveis. A FIGURA 10 apresenta o perfil de restrição de doze clones da biblioteca MApUC. Através desse perfil foi possível estimar o tamanho médio dos insertos. Esta biblioteca é composta por 82 clones com insertos entre 9-10 Kpb e foi mantida em placa de Elisa (96 poços) a -20°C .

O baixo número de clones obtidos (82) pode ser devido ao fato dos utilizados fragmentos foram relativamente grandes (> 10 Kpb) para inserir em plasmídeos. Vetores do tipo plasmídeo geralmente são estáveis com insertos de até 5 Kpb. Outro fato que provavelmente tem relação com o fator do tamanho do inserto é que muitos dos 82 clones coletados inicialmente não cresceram quando repicados em meio de cultivo padrão com ampicilina (antibiótico que o plasmídeo pUC confere resistência). É possível que esses clones tenham perdido ou “expulsado” seus plasmídeos porque estes

podem ter se tornado instáveis. Outra possibilidade é que o inserto produza alguma substância tóxica para a bactéria hospedeira. Neste caso, mesmo o inserto produzindo substâncias com moderada toxicidade, o alto número de cópias do plasmídeo dentro da célula hospedeira poder ser letal.

A biblioteca MAF 1 contém 34.560 clones cujo tamanho de insertos varia entre 35-40 Kpb (FAORO, dados não publicados). Esta biblioteca foi utilizada para efetuar a triagem para celulase.

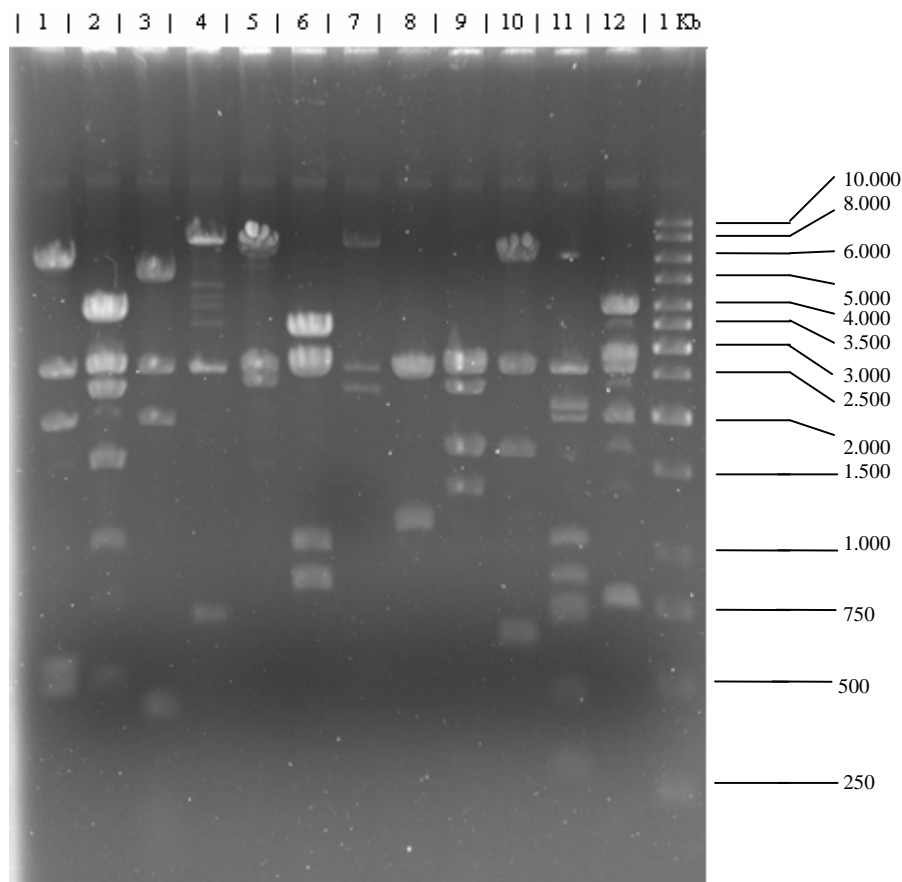


FIGURA 10. PERFIL DE RESTRIÇÃO COM AS ENZIMAS ECORI E HINDIII DE 12 CLONES DA BIBLIOTECA MAPUC - Eletroforese em gel de ágar 1%, 80 V, 1 h de corrida em tampão TBE 1X. 1) clone MapUC A1; 2) clone MapUC A2; 3) clone MapUC A3; 4) clone MapUC A4; 5) clone MapUC A5; 6) clone MapUC A6; 7) clone MapUC A7; 8) clone MapUC A8; 9) clone MapUC A9; 10) clone MapUC A10; 11) clone MapUC A11; e 12) clone MapUC A12. 1Kpb DNA Ladder (Fermentas).

4.6 SEQUENCIAMENTO DA BIBLIOTECA MAPUC

As extremidades dos insertos de 39 clones foram seqüenciadas. Obtivemos 47 seqüências as quais foram comparadas com o banco de dados do NCBI utilizando o programa Blastx. O resultado da comparação das seqüências obtidas com os bancos de dados (Swissprot protein sequences e Non-redundant protein sequences) é apresentado em detalhes na TABELA 6.

TABELA 6. COMPARAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO PARCIAL DOS INSERTOS DA BIBLIOTECA MAPUC COM O BANCO DE DADOS DO NCBI ATRAVÉS DO PROGRAMA BLASTX.

DOMÍNIO BACTERIA

Clone	FILO	Gênero/Espécie	Proteína/Enzima	Valor de e	G+C (%)	Tamanho do inserto seqüenciado
MApUC – C4u	Proteobacteria (β)	<i>Bordetella pertussis</i>	Protein bugT precursor	1e-16	58	093
MApUC – B11r	Proteobacteria (β)	<i>Hydrogenophaga sp</i>	CO dehydrogenase subunit	9e-40	60	176
MApUC – C10r	Proteobacteria (β)	<i>Thauera sp</i>	4-hydroxybenzoyl-CoA reductase subunit gamma	1e-27	60	149
MApUC – B5u	Proteobacteria (β)	<i>Burkholderia phymatum</i>	Alcohol dehydrogenase, zinc-binding	2e-62	57	327
MApUC – D2u	Proteobacteria (β)	<i>Ralstonia eutropha</i>	Twin-arginine translocation pathway signal	3e-56	62	187
MApUC – A5r	Proteobacteria (β)	<i>Ralstonia solanacearum UW551</i>	putative phosphohydrolases, lcc family	3e-09	60	226
MApUC – C6r	Proteobacteria (β)	<i>Comamonas testosteroni</i>	transcriptional regulator, LuxR family	4e-04	58	438
MApUC – B6u	Proteobacteria (β)	<i>Nitrosospira multiformis</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	5e-24	63	397
MApUC – C1u	Proteobacteria (α)	<i>Rhizobium meliloti</i>	Hypothetical protein R00370	8e-23	55	148
MApUC – A7u	Proteobacteria (α)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	hypothetical protein bll6470	4e-31	62	086
MApUC – C8r	Proteobacteria (α)	<i>Oceanicola granulosus</i>	vdcc protein	3e-32	56	179
MApUC – A9u	Proteobacteria (α)	<i>Agrobacterium vitis</i>	UPF0065 protein in the TAR-I ttuE-ttuC' intergenic region precursor	2e-16	54	374
MApUC – C1r	Proteobacteria (α)	<i>Sphingomonas sp.</i>	transposase	1e-18	57	417
MApUC – B10u	Proteobacteria (α)	<i>Stappia aggregata</i>	ribonuclease E	7e-58	60	619
MApUC – A3u	Proteobacteria (α)	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	Ribonuclease E and G	7e-61	64	539
MApUC – A10r	Proteobacteria (γ)	<i>Xanthomonas oryzae</i>	DNA-invertase	1e-42	58	136
MApUC – A1u	Proteobacteria (γ)	<i>Chromohalobacter salexigens</i>	Polyprenyl p-hydroxybenzoate decarboxylase	1e-19	53	196
MApUC – B12u	Proteobacteria (γ)	<i>Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila ATCC</i>	27 kDa antigen Cfp30B	4e-14	60	371
MApUC – A2u	Proteobacteria (γ)	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ribonuclease E (RNase E)	1e-27	58	289
MApUC – D10u	Proteobacteria (γ)	<i>Buchnera aphidicola (Baizongia pistaciae)</i>	Putative truncated ribonuclease E (RNase E)	2e-23	59	463
MApUC – C3r	Proteobacteria (γ)	<i>Saccharophagus degradans</i>	regulatory protein, LuxR	1e-18	56	236
MApUC – A11u	Proteobacteria (γ)	<i>marine gamma proteobacterium</i>	putative oxidoreductase	2e-29	63	451
MApUC – A12u	Proteobacteria (δ)	<i>Desulfovibrio sp</i>	Aldehyde oxidoreductase (Molybdenum iron sulfur protein)	4e-23	61	370
MApUC – E7u	Proteobacteria (δ)	<i>Myxococcus xanthus</i>	RNA polymerase sigma factor rpoD (Sigma-80)	5e-18	66	446
MApUC – C5r	Proteobacteria (δ)	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	UbiD family decarboxylases	3e-15	59	258
MApUC – B2u	Proteobacteria (ε)	<i>Campylobacter jejuni</i>	Catalase	1e-10	53	376

MApUC – B4u	Acidobacteria	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	major sigma factor RpoD	3e-23	62	160
MApUC – E5r	Acidobacteria	<i>Solibacter usitatus</i>	Glyoxalase/bleomycin resistance	1e-41	61	327
MApUC – B6r	Firmicutes	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	ref ZP_00779340.1 AAA ATPase, central region	7e-53	63	213
MApUC – B3r	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	Probable xanthine dehydrogenase subunit E	2e-20	59	099
MApUC – A4u	Firmicutes	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	uncharacterized ATPase	8e-46	65	196
MApUC – E6r	Firmicutes	<i>Moorella thermoacetica</i>	sigma 38 (RpoS)	7e-19	60	211
MApUC – D1u	Chloroflexi	<i>Roseiflexus castenholzii</i>	(2Fe-2S)-binding	1e-43	58	167
MApUC – A8u	Chloroflexi	<i>Roseiflexus sp. RS-1</i>	hypothetical protein	6e-14	60	459
MApUC – C3u	Bacteroidetes	<i>Microscilla marina ATCC 23134</i>	RoseRSDRAFT_4021	2e-18	62	243
MApUC – C8u	Deinococcus-Thermus	<i>Thermus thermophilus</i>	conserved hypothetical protein	4e-11	66	128
MApUC – E4r	Aquificae	<i>Aquifex aeolicus</i>	3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase UbiD	2e-11	56	275
MApUC – B8u	Cyanobacteria	<i>Synechococcus sp</i>	Hypothetical protein aq_1612	2e-13	59	341
MApUC – B11u	Cyanobacteria	<i>Gloeobacter violaceus</i>	amidohydrolase family protein	3e-23	55	171
MApUC – A8r	Cyanobacteria	<i>Anabaena variabilis</i>	glucose-6-phosphate isomerase	6e-25	60	452
MApUC – C4r	Cyanobacteria	<i>Nostoc sp</i>	UDP-glucose/GDP-mannose dehydrogenase	1e-10	57	129
MApUC – B4r	Actinobacteria	<i>Symbiobacterium thermophilum</i>	hypothetical protein alr3749	1e-18	63	280
MApUC – A6u	Actinobacteria	<i>Streptomyces avermitilis MA-4680</i>	RNA polymerase sigma factor	1e-28	59	341
MApUC – A7r	Actinobacteria	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	decarboxylase SCD6910	2e-12	66	115
MApUC – B7u	Actinobacteria	<i>Kineococcus radiotolerans</i>	Mycocerosic acid synthase	3e-12	61	168
			hypothetical protein			
			KradDRAFT_2500			

DOMÍNIO ARCHAEA

Clone	Filo	Gênero/Espécie	Proteína/Enzima	Valor de e	G+C (%)	Tamanho do inserto seqüenciado
MApUC – B7r	Crenarchaeota	<i>Aeropyrum pernix</i>	aldehyde dehydrogenase, small subunit	1e-41	69	234
MApUC – E3u	Euryarchaeota	<i>Methanosarcina barkeri</i>	NADPH:quinone reductase	6e-30	58	313

FONTE: O Autor.

Do total de clones seqüenciados da biblioteca MApUC, 45 continham similaridade com genes de membros do domínio Bacteria e 2 para o domínio Archaea (TABELA 6). Estes resultados contrastam com o seqüenciamento de uma biblioteca de 16S rDNA do solo da Floresta Atlântica Paranaense que não continham nenhum clone com similaridade para Archaea (FAORO, 2006). COTTRELL et al (2005) realizou um estudo sobre a diversidade bacteriana no rio Delaware (Estados Unidos) comparando uma biblioteca metagenômica e uma biblioteca de 16S rDNA. Segundo esse estudo, ambas bibliotecas falham em representar a diversidade bacteriana porque, por exemplo, certos grupos tal como cytophagas não estão representados. COTTRELL et al (2005) complementa que as diferenças entre as bibliotecas podem ser devido a fatores adicionais tal como variações no tamanho do genoma, número de cópias do gene rRNA e conteúdo ribossomal.

Enquanto as análises do gene 16S rDNA apresentam informações valiosas sobre diversidade e evolução da população de microrganismos, estas análises não cobrem toda a complexidade da diversidade procariótica (STEELE e STREIT, 2005). O gene 16S rDNA representa em média aproximadamente 0,05% do genoma e tem sido demonstrado que microrganismos com seqüências 16S rDNA idênticas podem ter seus genomas muito diferentes e mostrar diferenças marcantes na fisiologia como, por exemplo, temperatura ótima de crescimento (JASPERS e OVERMANN, 2004).

Seqüências similares a genes de organismos de interesse biotecnológico foram encontrados em ambas bibliotecas, MApUC e na biblioteca de 16S rDNA do solo da Mata Atlântica. Podemos destacar entre as seqüências da biblioteca MapUC representante das gama-Proteobacteria (*Saccharophagus degradans*) e Archaea (*Methanosarcina barkeri*, filo Euryarchaeota) que degradam celulose (TAYLOR et al., 2006; MILLER et al., 2000; respectivamente). A biblioteca de 16S rDNA do solo da Floresta Atlântica também continha um clone com seqüências 99 % de similar a do gênero *Chitinophaga*, filo Bacteroidetes (FAORO, 2006), que possui espécies capazes de degradar quitina (SANGKHOBOL e SKERMAN, 1981). A biblioteca MApUC analisada nesse trabalho contém seqüências similares as dos microrganismos termofílicos *Thermoanaerobacter sp.* (Firmicutes), *Symbiobacterium thermophilum* (Actinobacteria), *Thermus thermophilus* (Deinococcus-Thermus), *Aquifex aeolicus* (Aquificae), *Synechococcus sp* (Cyanobacteria), *Aeropyrum pernix* (Crenarchaeota) e *Roseiflexus castenholzii* (Chloroflexi). Microrganismos termofílicos possuem potencial para aplicação em processos biotecnológicos principalmente devido à estabilidade de seus produtos gênicos em altas temperaturas.

Podemos destacar clones com seqüências similares a genes de organismos patogênicos como, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose), *Bordetella pertussis* (coqueluche), *Ralstonia solanacearum* (patógenos de solanaceas). Também podemos destacar seqüências similares para enzimas como aminoácido descarboxilases, envolvidas na formação de aminas que executam importantes funções metabólicas em humanos, especialmente no sistema nervoso e no controle da pressão sanguínea (HALÁSZ et al., 1994).

4.7 DETECÇÃO DE CLONES EXPRESSANDO AMINOÁCIDO DESCARBOXILASE

O primeiro passo foi testar o meio para triagem de atividade para aminoácido descarboxilases utilizando estirpes de *E.coli* para selecionar estirpes hospedeiras mais adequadas para essa biblioteca metagenômica. Assim, estirpes que apresentarem mudança na coloração não poderiam ser utilizadas como hospedeiras, pois interfeririam gerando falsos positivos na triagem. As estirpes de *E.coli* utilizadas nos testes foram as seguintes: S 17.1, Top 10, XL 1 blue, DH 5, DH 5 α , RR 1, 71.18 e DH 10 B.

Foram utilizadas três variações do meio em placas de petri (9 cm de diâmetro): a primeira com o meio básico mais aminoácidos L-histidina, L-ornitina e L-lisina (FIGURA 11 A), a segunda com o meio básico mais aminoácidos L-histidina, L-ornitina, L-lisina e L-tirosina (em pó) (FIGURA 11 B) e uma terceira apenas com meio básico sem adição de aminoácido (meio controle) (FIGURA 11 C). As estirpes foram inoculadas e as placas permaneceram 24 h incubadas a 37 °C.

Os aminoácidos L-histidina, L-lisina e L-ornitina foram solubilizados em água e adicionados a partir de soluções concentradas (0,1 g/mL, 0,4 g/mL e 0,4g/mL, respectivamente) e o aminoácido tirosina foi adicionado diretamente ao meio na forma sólida. Devido a baixa solubilidade do aminoácido L-Tirosina (0,4g/l H₂O 25°C), houve a formação de um precipitado no meio que a continha. Segundo Bover-Cid e Holzapfel (1999) o consumo de tirosina poderia ser observado pela formação de um halo claro ao redor da colônia, que é o resultado do consumo da tirosina e remoção do precipitado. Houve apenas mudança na coloração do meio ao redor de algumas estirpes, não sendo possível visualizar formação de halo. Essa mudança na coloração indica aumento do pH (5,3 - 6,8) e possivelmente formação de aminas (Bover-Cid e Holzapfel, 1999).

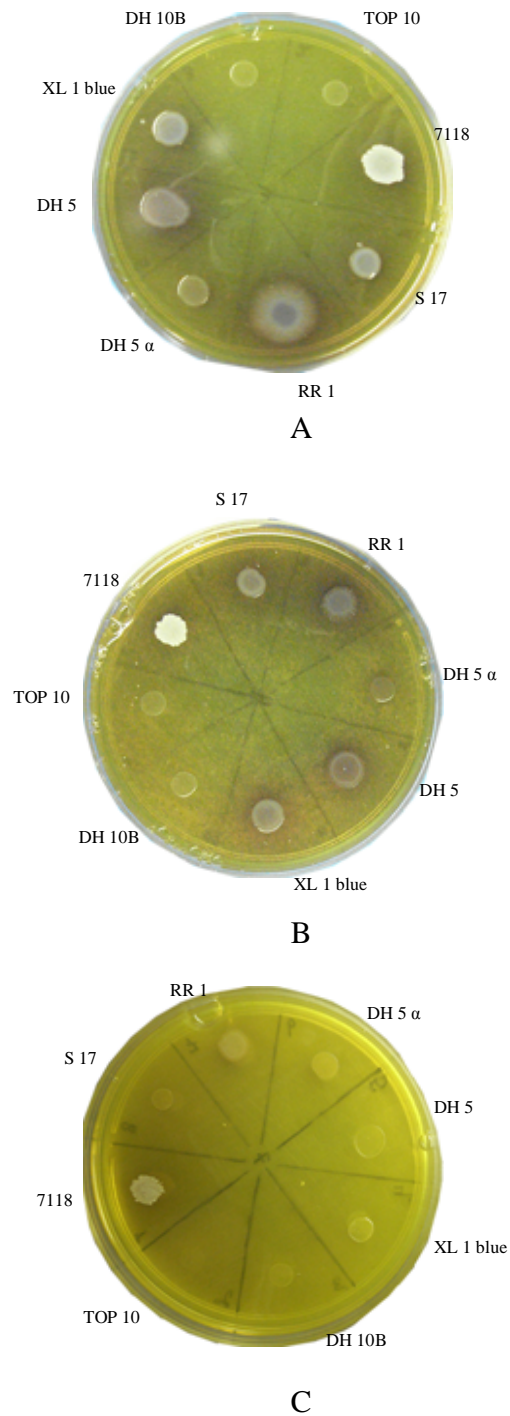


FIGURA 11. TESTES PARA DETECTAR AMINOÁCIDO DESCARBOXILASES - A) Meio básico com adição dos aminoácidos L-histidina, L-ornitina e L-lisina. B) Meio básico com adição dos aminoácidos L-histidina, L-ornitina, L-lisina e L-tirosina. C) meio básico sem adição de aminoácido (meio controle). Placas incubadas por 24 h a 37 °C.

Uma deficiência encontrada com o meio de referência está relacionada com o meio controle (FIGURA 11 C), o qual não contém aminoácido. Este meio controle também apresentou mudança na coloração. Esta mudança na coloração, entretanto, foi de menor intensidade em relação ao meio suplementado com aminoácidos. A presença de aminoácido no extrato de levedura, extrato de carne e triptona pode ter ocasionado essa mudança de coloração no meio controle. Outro detalhe é que algumas bactérias começam a apresentar mudança na coloração com 12 h de incubação e essa mudança pode se propagar pela placa e encobrir a mudança de coloração por outras bactérias ou, gerar falsos positivos. Nos testes iniciais este problema não foi marcante porque as estirpes estavam a uma boa distância entre si. Porém, a utilização desse meio para triagem em uma biblioteca metagenômica, onde geralmente 96 clones crescem por placa, apresenta dificuldades em detectar quais clones realmente são positivos. Em relação à triagem de bibliotecas metagenômicas outro agravante é a utilização de substratos insolúveis, neste caso a tirosina. Este agravante não é só pelo fato de que substratos insolúveis tornam mais difícil o acesso das enzimas, mas também por não ter como garantir uma distribuição de substrato homogênea. Dessa forma, não foi possível realizar a triagem para produção de aminas biogênicas utilizando o meio proposto Bover-Cid e Holzapfel (1999).

4.8 DETECÇÃO DE CLONES EXPRESSANDO QUITINASE

A triagem funcional para quitinases foi feita através da adição de quitina em pó (0,5 % p/v) ao meio LA (Lisogenic-Broth Agar) (RONDON *et al.*, 2000). Os clones da biblioteca metagenômica MApUC foram inoculados e a placa de triagem foi incubada por 5 dias a 37°C.

Degradar quitina a níveis detectáveis em placa de petri (formação de halo) é um processo lento devido ao fato de que os polímeros de quitina são estruturas cristalinas altamente ordenadas e insolúveis em água, o que torna difícil o acesso da enzima a ligação β -(1 \rightarrow 4) entre os monômeros de N-acetil-D-glucosamina. Com cinco dias de incubação a 37 °C a biblioteca MapUC não apresentou nenhum clone positivo para quitinase.

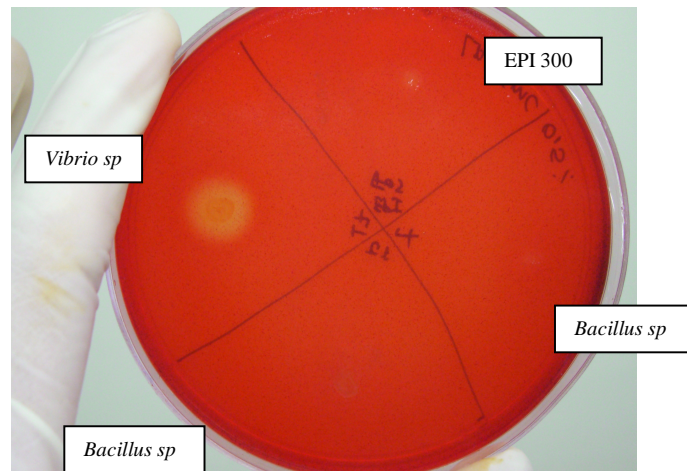
4.9 DETECÇÃO DE CLONES EXPRESSANDO CELULASE

Assim como no caso da quitina, a celulose também é um polímero insolúvel e compacto, sendo difícil o acesso da enzima ao sítio de hidrólise. Alguns substratos derivativos da celulose podem ser dissolvidos em água devido a modificações químicas. A CMC, que possui substituições polares, é um exemplo desses derivados. Neste caso foi utilizado um corante (vermelho congo) para aumentar a sensibilidade do experimento e tornar mais fácil a visualização de halo de degradação. Os testes iniciais para validação do meio para identificar celulase foram feitos como descrito no item 3.11.3. Bactérias isoladas do solo de mangue (Couto G. H., resultados não publicados) foram utilizadas como controle positivo. Um destes isolados, pertencente ao gênero *Vibrio*, apresentou atividade formando um halo característico de atividade celulolítica (FIGURA 12). Neste teste inicial foram usadas mais dois isolados do mangue (ambos do gênero *Bacillus*) e a estirpe de *E.coli* (EPI 300) utilizada como hospedeira na biblioteca MAF 1, mas nenhuma dessas formou halo de degradação (FIGURA 12).

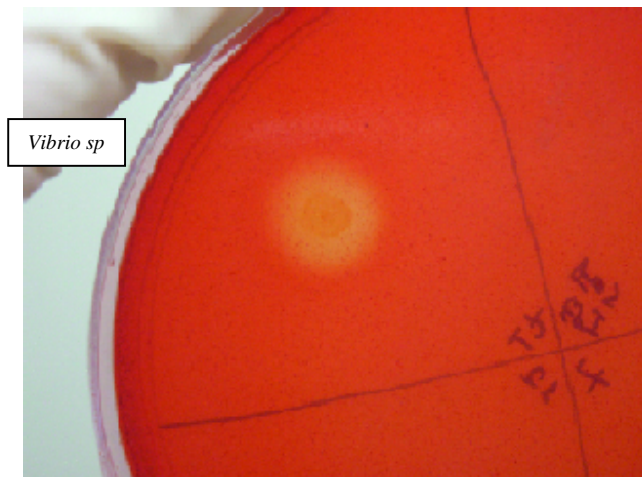
O sequenciamento parcial dos clones da biblioteca MapUC e o sequenciamento da biblioteca de 16S rDNA do solo da Floresta Atlântica Paranaense (FAORO, 2006) revelou que o solo da Floresta Atlântica possui microrganismos com potencial para degradar celulose. Todavia, entre os 34.540 clones da biblioteca MAF 1 e 82 clones da biblioteca MApUC testados para atividade celulolítica, nenhum apresentou atividade detectável. Quatro fatores podem influenciar na triagem de bibliotecas metagenômicas. Primeiro, o gene precisa estar completo no inserto para poder ser expresso. Considerando que um gene em média tem 1 Kpb, e cada inserto da biblioteca metagenômica MAF1 possui em média 40 Kpb, cada inserto pode conter cerca de 40 genes completos. Segundo, a bactéria hospedeira precisa ser capaz de expressar esse gene heterólogo. Estudos realizados com 32 genomas diferentes indicam que o nível de expressão de genes metagenômicos em *E.coli* é de aproximadamente 40 % (GABOR et al 2004). Os mesmos estudos indicam grande diferença na expressão de genes de diferentes filos, estimando que somente 7% dos genes representativos da classe das Actinobacterias seriam expressos de maneira independente em uma *E.coli*, comparado com 73% dos genes de origem dos Firmicutes (GABOR et al 2004). Terceiro, também é necessário que o produto da expressão do gene metagenômico seja exportado para o

meio onde está presente o substrato. Quarto, é imprescindível um método de triagem capaz de detectar um clone positivo, seja por formação de halo, interação com corante ou mudança de pH. Por causa desse fatores, há a necessidade da construção de bibliotecas metagenômicas com grande número de clones, aumentando a probabilidade de um fragmento de DNA heterólogo transpor essas etapas.

Uma estratégia para aumentar o índice de clones positivos em uma biblioteca metagenômica é fazer um enriquecimento da amostra ambiental antes da extração do DNA. REES et al (2003) construiu duas bibliotecas metagenômicas com DNA extraído de amostras enriquecidas do Lago Nakuru. As amostras foram enriquecidas em meio mínimo alcalino e para uma das amostras também foi adicionado CMC. A incidência de clones positivos foi quase três vezes maior na biblioteca que teve sua amostra enriquecida com CMC (1/57 Mpb contra 1/150 Mpb da amostra sem CMC no enriquecimento).



A



B

FIGURA 12. MEIO UTILIZADO PARA DETECTAR CLONES EXPRESSANDO CELULASE – O meio LB foi suplementado com 0,5 % de CMC. A atividade celulolítica foi revelada com vermelho congo (0,2%) e NaCl (1M). A) Após cinco dias de incubação a 37 °C. B) Em destaque o halo de degradação da CMC.

5. CONCLUSÕES

- Uma biblioteca metagenômica foi construída com DNA do solo da Floresta Atlântica Paranaense. Esta biblioteca, denominada MApUC, é composta por 82 clones com insertos entre 9-10 Kpb.

- Através da triagem baseada na seqüência verificou-se que o DNA metagenômico apresenta grande diversidade microbiológica e potencial para aplicação em processos biotecnológicos.

- A triagem de 34560 metaclones da biblioteca MAF 1 para celulase utilizando vermelho congo não revelou um único positivo.

- O método para detecção de aminoácido descarboxilase utilizando o indicador de pH púrpura de bromo cresol, embora indicado na literatura, revelou-se inadequado para triagem de bibliotecas metagenômicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, J.L.B. Observations of rare raptors in southern Atlantic Rainforest of Brazil. **J.Field Ornithol.** 66:363-369. (1995).
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.;SCHAFFER, *et.al.*. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, p. 3389-3402, (1997).
- AMANN, R.I.; LUDWING, W.; SCHLEIFER K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Rev.**, 59, 143-169 (1995).
- AMANN, RI; KÜHL, M. *In situ* methods for assessment of microorganisms and their activities. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 1, p. 352-358 (1998).
- ASKAR, A. AND TREPTOW, H. Biogene amine in Lebensmitteln. Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung, Eugen Ulmer GmbH and Co, Stuttgart, Germany. (1986)
- AUGUST PR, GROSSMAN TH, MINOR C, DRAPER MP, MACNEIL IA, PEMBERTON JM, CALL KM, HOLT D, OSBURNE MS: Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*. **J Mol Microbiol Biotechnol**, 2:513-519 (2000).
- BARDÓSZ, S., GRANT, G., BROW, D.S., RALPH, A. AND PUSZTAI, A. Polyamines in food - implications for growth and health. **J. Nutr. Behem.** 4, 66-7 1 (1993).
- BERRY A.E., CHIOCCHINI C., SELBY T., SOSIO M., WELLINGTON E.M.H.. Isolation of high molecular weight DNA from soil for cloning into BAC vectors. **FEMS Microbiol. Lett.** 223:15–20 (2003).
- BOOT RG, BLOMMAART EFC, SWART E, VAN DER VLUGT KG, BIJL N, MOE C, PLACE A, AERTS JMFG. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. **J Biol Chem**; 276: 6770–6778 (2001).
- BOOT RG, BUSSINK AP, VERHOEK M, DE BOER PAJ, MOORMAN AFM, AERTS JMFG. Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man. **J Histochem Cytochem**; 53: 1283–1292 (2005).
- BORNEMAN, J. E TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Appl. Environ. Microbiol.** 63, 2647–2653 (1997).
- BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W. H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbial** 53 33-41 (1999).

BRADY SF, CHAO CJ, HANDELSMAN J, CLARDY J: Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. **Org Lett**, 3:1981-1984 (2001).

BRADY, S. F. E CLARDY, J. Long-chain *N*-acyl amino acid antibiotics isolated from heterologously expressed environmental DNA. **J. Am. Chem. Soc.** 122, 12903–12904 (2000).

BRADY, S. F., CHAO, C. J. E CLARDY, J. Long-chain *N*-acyltyrosine synthases from environmental DNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 70, 46865–46870 (2004).

BRINK, B. TEN, DAMINK, C., JOOSTEN H.M.L.J. AND HUIS IN'T VELD, J.H.J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **Int. J. Food Microbiol.** 11, 73-84 (1990).

CÂMARA, I.de G. **Plano de ação para a Mata Atlântica**. São Paulo, Fundação SOS Mata Atlântica. 152 pp. (1991).

CHOUDHURY, N., HANSEN,W., ENGESSER, D., HAMMES,W.P., HOLZAPFEL,W.H. Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxylase medium. **Letts. Appl. Microbiol.** 11, 278–281(1990).

CORINALDESI C, DANOVARO R, DELL'ANNO A: Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies from marine sediments. **Appl Environ Microbiol**, 71:46-50 (2005).

COTTRELL, M. T., MOORE, J. A. E KIRCHMAN, D. L. Chitinases from uncultured marine microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.** 65, 2553–2557 (1999).

COTTRELL, M. T., W AidNER, L.A., YU, L. E KIRCHMAN, D.L. Bacterial diversity of metagenomic and PCR libraries from Delaware River. **Environmental Microbiology.** 7(12): 1883-1895, (2005).

COURTOIS, S. *ET AL.* Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. **Environ. Microbiol.** 3, 431–439 (2001).

COURTOIS, S. *ET AL.* Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. **Appl. Environ. Microbiol.** 69, 49–55 (2003).

COWAN DA: Microbial genomes – the untapped resource. **Trends Biotechnol**, 18:14-16 (2000).

CURTIS TP, SLOAN WT, SCANNELL JW. Estimating prokaryotic diversity and its limits. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99: 10494–99 (2002)

DANIEL, R. The Metagenomics of soil. **Nature**, v. 3, p. 471-478, (2005).

DE LA CRUZ J, REY M, LORA JM, HIDALGO-GALLEGO A, DOMINGUEZ F, PINTOR-TORO JA, LLOBELL A, BENITEZ T. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. **Eur J Biochem**; 206: 859–867 (1992).

DE LISBOA MARCO J, VALADARES-INGLIS MC, FELIX CR. Purification and characterization of an N-acetylglucosaminidase produced by a *Trichoderma harzianum* strain which controls *Crinipellis pernicios*a. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 64: 70–75.

DE LONG, E.F.; PACE NR. Environmental diversity of bacteria and archaea. **Syst Biol**. 50(4):470- 478 (2001).

DIAZ-TORRES ML, MCNAB R, SPRATT DA, VILLEDIEU A, HUNT N, ET AL.. Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. **Antimicrob. Agents. Chemother**. 47:1430–32 (2003).

DUNBAR, J., TAKALA, S., BARNS, S. M., DAVIS, J. A. E KUSKE, C. R. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. **Appl. Environ. Microbiol**. 65, 1662–1669 (1999).

ENTCHEVA, P., LIEBL, W., JOHANN, A., HARTSCH, T. E STREIT, W. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. **Appl. Environ. Microbiol**. 67, 89–99 (2001).

ESCHENFELDT, W. H. ET AL. DNA from uncultured organisms as a source of 2,5-diketo-D-gluconic acid reductases. **Appl. Environ. Microbiol**. 67, 4206–4214 (2001).

FAORO, H. **Determinação da biodiversidade de archaea e bactéria da mata atlântica paranaense**. 183 pág. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FIANDT M.. Construction of an environmental genomicDNAlibrary from soil using the EpiFOS fosmid library production kit. **Epicentre Forum** 7:6 (2000)

FLEURI, L. F. E SATO, H. H. Produção, Purificação, Clonagem e Aplicação de Enzimas Líticas. **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 5, 871-879, 2005

FONSECA, G.A.B. The vanishing Brazilian Atlantic forest. *BIOL. CONSERV.* Vol. 34, no. 1, pp. 17-34. 1985.

GABOR E.M., DE VRIES E.J., JANSSEN D.B.. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. **FEMSMicrobiol. Ecol**. 44:153–63 (2003).

- GABOR, E. M., ALKEMA, W. B. L., E JANSSEN, D. B. Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. **Environmental Microbiology**. 6, 879–886, (2004a).
- GILLESPIE, D. E. *ET AL.* Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 68, 4301–4306 (2002).
- GILLESPIE D.E. RONDON M.R., HANDELSMAN J.. Metagenomic libraries from uncultured microorganisms. In *Molecular Microbial Ecology*. **Bios Sci. Publ. In press** (2004).
- GINOLHAC, A. *ET AL.* Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. **Appl. Environ. Microbiol.** 70, 5522–5527 (2004).
- GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS. *Industrial enzymes — a global multi-client market research project.* (GIA, San José, California, USA, 2004).
- GRAHAM LS, STICKLEN MB. Plant chitinases. **Can J Bot**, 72: 1057–1083 (1994).
- GREEN, B. D. E KELLER, M. Capturing the uncultivated majority. **Current Opinion in Biotechnology**. v 17: p 236–240 (2006).
- HALÁSZ, A., BARATH. A., SIMON-SARKADI, L. AND HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends Food Sci. Technol.** 5, 42-48 (1994).
- HANDELSMAN J, RONDON MR, BRADY SF, CLARDY J, GOODMAN RM.. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chem. Biol.** 5:R245–49 (1998).
- HANDELSMAN J, LILES MR, MANN DA, RIESENFELD CS, GOODMAN RM.. Cloning the metagenome: culture-independent access to the diversity and functions of the uncultivated microbial world. In *Functional Microbial Genomics*, ed. B Wren, N Dorrell, pp. 241–55 (2003). New York: Academic
- HANDELSMAN J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 68, 669-685 (2004).
- HEAD IM, SAUNDERS JR, PICKUP RW. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microb. Ecol.** 35:1–21 (1998).
- HENNE, A., DANIEL, R., SCHMITZ, R. A. E 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.* 65, 3901–3907 (1999).

HENNE, A., SCHMITZ, R. A., BÖMEKE, M., GOTTSCHALK, G. E DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3113–3116 (2000).

HOLBEN, W. E., JANSSON, J.K., CHELM, B.K. AND TIEDJE, J. M. DNA probe method for detection of specific microorganism in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 703-711 (1988).

HOWARD, M. B.; EKPORG, N.A.; WEINER, R.M.; HUTCHESON, S. W. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30: 627–635 (2003).

HUIS IN'T VELD, J.H.J., HOSE, H., SCHAAFSMA, G.J., SILLA, H. AND SMITH, J.E. Health aspects of food biotechnology. In: P. Zeuthen, J.C. Cheftel, C. Ericksson, T.R. Gormley, P. Link and K. Paulus (Eds.). Processing and Quality of Foods. Vol 2. *Food Biotechnology*: avenues to healthy and nutritious products, Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 2.73-2.97 (1990).

HURT, R.A. ET AL. Simultaneous recovery of RNA DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4495-4503 (2001).

JACOBSEN, C. S. AND RASMUSSEN, O. F. Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacterial from soil with cation- exchange resin. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2458-2462 (1992).

JANSSEN PH, YATES PS, GRINTON BE, TAYLOR PM, SAIT M. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria* *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2391–96 (2002).

JASPERS, E. and OVERMANN, J. Ecological Significance of Microdiversity: Identical 16S rRNA Gene Sequences Can Be Found in Bacteria with Highly Divergent Genomes and Ecophysologies. *Appl Environ Microbiol.* 70(8): 4831–4839, (2004) .

JOOSTEN, H. M. L. J. AND NORTHOLT, M. D. Detection, growth and amine-producing capacity of lactobacilli in cheese. *Appl Environm Microbiol* 55:2356–2359 (1989).

KENT AD, TRIPLETT EW. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:211–36 (2002).

KNIETSCH, A., BOWIEN, S., WHITED, G., GOTTSCHALK, G. E 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.* 69, 3048–3060 (2003).

LEVEAU J.H.J. The magic and menace of metagenomics: prospects for the study of plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:279–300 (2007).

LI DC. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161: 345–360 (2006).

LIESACK, W. E STACKEBRANDT, E. Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.* 174, 5072–5078 (1992).

LILES, M. R., MANSKE, B. F., BINTRIM, S. B., HANDELSMAN, J. E GOODMAN, R. M. A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2684–2691 (2003).

LINDAHL, V. AND BAKKEN, L. R. Evaluation of methods for extraction of bacterial from soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16, 135-142 (1995).

LINO, CF. **Reserva da biosfera da Mata Atlântica. Plano de ação: referências básicas.** Campinas, SP. UNICAMP, 1992. v.1.

LLOYD-JONES, G. AND HUNTER, D. W. F. Comparison of rapid DNA extraction methods applied to contrasting New Zealand soils. *Soil Biol. Biochem.* 33, 2053-2059 (2001).

LORENZ, P., LIEBETON, K., NIEHAUS, F. E, ECK, J. Screening for novel enzymes or biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 572–577 (2002).

LORENZ, P. e ECK, J. Metagenomics and industrial applications. *Nature.* 3, 510-516 (2005).

LYND, L. R.; CUSHMAN, J. H.; NICHOLS, R. J.; WYMAN, C. E. Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science* 251, 1318-1323 (1991).

MACNEIL, I. A. *ET AL.* Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 301–308 (2001).

MAIJALA, R.L., EEROLA, S.H., AHO, M.A. AND HIRN, J.A. The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *J. Food Prot.* 50, 125-129 (1993).

MAJERNIK, A., GOTTSCHALK, G. E 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.* 183, 6645–6653 (2001).

Mantovani, W. A degradação dos biomas brasileiros. In: W.C.Ribeiro (ed.). Patrimônio ambiental Brasileiro. Editora Universidade de São Paulo, São Paulo. pp. 367-439 (2003).

- MARKLINDER, I. AND LIINNER, C. Fermentation properties of intestinal strains of *Lactobacillus*, of a sour dough and of a yoghurt starter culture in an oat-based nutritive solution. **Food Microbial.** 9, 197-205 (1992).
- MARTINEZ, A. *ET AL.* 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.** 70, 2452–2463 (2004).
- MILLER, D. N., BRYANT, J. E., MADSEN, E. L. AND GHIORSE, W. C. Evaluation and optimization of DNA extraction for soil and sediment samples. **Appl. Environ. Microbiol.** 65, 4715-4724 (1999).
- Miller T.L., Currenti E. and Wolin M. J. Anaerobic bioconversion of cellulose by *Ruminococcus albus*, *Methanobrevibacter smithii*, and *Methanosarcina barkeri*. **Appl Microbiol Biotechnol.** 54: 494-498, (2000).
- MITERMEIER, N.; MYERS, R.A. & MITTERMEIER, C.G. **HOTSPOTS – Earth’s Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions.** CEMEX – Conservation International. Mexico City. 430p. (1999).
- MMA. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos.** Brasília, Ministério do Meio Ambiente. 40 pp. (1999).
- MOELLER, V. Distribution of amino acid decarboxylase in producing. Enterobacteriaceae. **Acta Pathol. Microbiol.** Scand. 35, 259-277 (1954).
- NIVEN, C.F., JEFFREY, M.R., CORLETT, D.A. Differential plating medium for quantitative detection of histamine producing bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 41, 321–322 (1981).
- NOCKER A, CAMPER AK: Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. **Appl Environ Microbiol**, 72:1997-2004 (2006).
- OGRAM, A., SAYLER, G. S. AND BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **J. Microbiol Methods** 7, 57-66 (1987).
- PACE NR, STAHL DA, LANE DJ e OLSEN GJ Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. **ASM News**, 51: 4-12 (1985).
- PACE, N. R., STAHL, D. A., LANE, D. J. E OLSEN, G. J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Adv. Microbial Ecol.** 9, 1–55 (1986).

- PACE NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276:734–40 (1997).
- PARK JK, MORITA K, FUKUMOTO I, YAMASAKI Y, NAKAGAWA T, KAWAMUKAI M, MATSUDA H. Purification and characterization of the chitinase (ChiA) from *Enterobacter* sp. G-1. *Biosci Biotechnol Biochem*; 61: 684–689 (1997).
- PIEL J, HUI D, FUSETANI N, MATSUNAGA S. Targeting modular polyketide synthases with iteratively acting acyltransferases from metagenomes of uncultured bacterial consortia. *Environ. Microbiol.* In press (2004).
- PRECIGOU, S., GOULAS, P. E DURAN, R. Rapid and specific identification of nitrile hydratase (Nhase)-encoding genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 155–161 (2001).
- QUAISER, A. ET AL. First insight into the genome of an uncultivated crenarchaeota from soil. *Environ. Microbiol.* 4, 603–611 (2002).
- QUAISER, A. ET AL. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Mol. Microbiol.* 50, 563–575 (2003).
- RAPPE M.S., CONNON S.A., VERGIN K.L., GIOVANNONI S.J. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418:630–33 (2002).
- REES, H. C., GRANT, S., JONES, B., GRANT, W. D. E HEAPHY, S. Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. *Extremophiles* 7, 415–421 (2003).
- RICE. S.L., EITENMILLER, R.R. AND KOEHLER, P.E. Biologically active amines in food. A review. *J. Milk Food Technol.* 39, 353-358 (1976).
- RIESENFELD, C. S., GOODMAN, R. M. E HANDELSMAN, J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* 6, 981–989 (2004).
- ROBERT WK, SELITRENNIKOFF CP. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J Gen Microbiol*; 134: 169–176 (1988).
- ROBERTS, G. Em *Physical structures*; ROBERTS, G. A. F., ed.; MacMillian: London, 1992, p. 20.
- RODRIGUES, I.A.; PIRES, J.M.; WATRIN, O. dos S.; CORDEIRO, M. dos R. Levantamento fitossociológico em áreas **sob influencia da rodovia PA-150 nos municípios de Acara e Tailândia, PA**. Belem: EMBRAPA Amazonia Oriental, (1997).
- 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. Microbiol. Biotechnol.**, 66(6): 2541-2547 (2000).

ROSSELLÓ-MORA R., AMANN R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews** 25, 39-67 (2001).

RUIJSSENAARS, H.J., e HARTMANS S. Plate screening methods for the detection of polysaccharase-producing microorganisms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 55: 143-149 (2001)

SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S.; Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction **Microbiol. Rev.** **1993**, *11*, 317.

SAIT M, HUGENHOLTZ P, JANSSEN PH.. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation independent surveys. **Environ. Microbiol.** 4:654–66 (2002).

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

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 74, p. 5463-5467, (1977).

SANGKHOBOL, V., and SKERMAN, V.B.D. *Chitinophaga*, a new genus of chitinolytic myxobacteria. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 31, 285-293, (1981).

SCHEPENS, H. *ET AL. White Biotechnology: gateway to a more sustainable future* (www.mckinsey.com/clientservice/chemicals/pdf/BioVision_Booklet_final.pdf) (2003).

SCHLOSS, P. D. E HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Curr. Opin. Biotechnol.** 14, 303–310 (2003).

SCHLOSS, P. D. E HANDELSMAN, J. Status of the microbial census. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 68, 686–691 (2004).

SCHMEISSER, C., STEELE, H., and STREIT, W.R. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. **Appl. Microbiol Biotechnol.** 75: 955-962, (2007)

SCHMIDT TM, DELONG EF, PACE NR.. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. **J. Bacteriol.** 173:4371–78 (1991)

SEOW, K.-T. *ET AL.* A study of iterative type II polyketide synthases, using bacterial genes cloned from soil DNA: a means to access and use genes from uncultured microorganisms. **J. Bacteriol.** 179, 7360–7368 (1997).

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro, Nova Fronteira. (1997).

SHALABY, A.R. Simple, rapid and valid thin layer chromatographic method for determining biogenic amines in foods. **Food Chemistry**. v.65 p.117-121 (1998)

SHAKILA, R. J.; VASUNDHARA, T.S. E KUMUDAVALLY, K.V. **Food Chemistry**. v.75 p.255–259 (2001).

SILVA, JMC; BATES, JM. **Biogeographic Patterns and Conservation in the South American Cerrado: A Tropical Savanna Hotspot**. Bioscience. Vol. 52, no. 3, pp. 225-233. (2002).

STAHL DA, LANE DJ, OLSEN GJ, PACE NR. Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. **Science** 224:409–11(1984)

STEFFAN, R. J., GOKSOYR, J., BEJ, A. K. AND ATLAS, R. M. Recovery of DNA from soils and sediments. **Appl. Environ. Microbiol.** 54, 2908-2915 (1988).

STEELE H, STREIT WR Metagenomics: Advances in ecology and Biotechnology. **FEMS Microbiology Letters**, 247:105-111 (2005).

STOTZ DF, FITZPATRICK JW, PARKER TA, MOSKOVITS DK. Neotropical birds: ecology and conservation. Chicago (USA). University of Chicago Press (1996).

STRATTON, J.E., HUTKINS, R.W. AND TAYLOR, S.L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods, A review. **J. Food Prot.** 54, 460-470 (1991).

SVITIL AL, CHADHAIN SMN, MOORE JA, KIRCHMAN DC. Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. **Appl Environ Microbiol**; 63: 408–413 (1997).

TAYLOR, S.L. Histamine food poisoning, toxicology and clinical aspects. **Crit. Rev. Toxicol.** 17, 9 1- 128 (1986).

TAYLOR L. E., HENRISSAT B., COUTINHO P. M., EKPBORG N.A., Hutcheson S.W., and Weiner R.M. Complete Cellulase System in the Marine Bacterium *Saccharophagus degradans* Strain 2-40T. **Journal of Bacteriology**, p. 3849–3861, (2006).

TIECCO, G., TANTILLO, G., FRANCIOSO, E., PAPARELLA, A. AND DE NATALE, G. Ricerca quali-quantitativa di alcune amine biogene in insaccati nel torso della stagionatura. **Ind. Aliment.** 5, 209-213 (1986).

TOMME P., WARREN R.A.J., GILKES N.R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. **Adv. Microb. Physiol.** 37:1–81 (1995).

- TORSVIK V, GOKSOYR J, DAAE FL High diversity in DNA of soil bacteria. ***Appl. Environ. Microbiol.***, 56, 782-787 (1990a).
- TORSVIK V, SALTE K, SORHEIM R, GOKSOYR J Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. ***Appl Environ Microbiol.***,56(3):776-81 (1990b).
- TRONSMO A, HARMAN G. Detection and quantification of N-acetyl-b-D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. ***Anal Biochem***; 208: 74–79 (1993).
- TSUJIBO H, MINOURA K, MIYAMOTO K, ENDO H, MORIWAKI M, INAMORI Y. Purification and properties of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. ***Appl Environ Microbiol***; 59: 620–622 (1993).
- VAN BEILEN J.B., LI Z. Enzyme technology: an overview. ***Curr Opin Biotechnol***; 42:13:338 (2002).
- VAN EIJK M, VAN ROOMEN CPAA, RENKEMA GH, BUSSINK AP, ANDREWS L, BLOMMAART EFC, SUGAR A, VERHOEVEN AJ, BOOT RG, AERTS JMFG. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. ***Int Immunol***; 17: 1505–1512 (2005).
- VENTER, J. C. *ET AL.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. ***Science*** 304, 66–74 (2004).
- WAHL GM, LEWIS KA, RUIZ JC, ROTHENBERG B, ZHAO J, EVANS GA Cosmid vectors for rapid genome walking, restriction mapping, and gene transfer. ***Proc. Natl. Acad. Sci.***, 84:2160-2164 (1987).
- WANG SL, CHANG WT. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell power medium. ***Appl Environ Microbiol***; 63: 380–383 (1997).
- WANG, G. Y. *ET AL.* Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. ***Org. Lett.*** 2, 2401–2404 (2000).
- WARREN, R. A. J. Microbial hydrolysis of polysaccharides. ***Annu. Rev. Microbiol.*** 50, 183-212 (1996).
- WHITMAN, W. B., COLEMAN, D. C. E WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. ***Proc. Natl Acad. Sci. USA*** 95, 6578–6583 (1998).
- WOESE CR Bacterial evolution. ***Microbiol. Rev.***, 51:221–271 (1987).

- WOLIN, M. J.; MILLER, T. L. Bioconversion of organic carbon to CH₄ and CO₂. ***Geomicrobiol***, 5, 239-259. (1987).
- ZENGLER, K. *ET AL.* Cultivating the uncultured. ***Proc. Natl Acad. Sci. USA*** 99,15681–15686 (2002).
- ZHANG Y.H., LYND L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. ***Biotechnol Bioeng***. 88:797-824 (2004).
- ZHANG, Y. H., HIMMEL, M.E., MIELENZ, J. R. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. ***Biotechnology Advances***. 24, 452-481 (2006).
- ZHOU, J. M., BRUNS, M. A. AND TIEDJE, J. M. DNA recovery from soil of diverse composition. ***Appl. Environ. Microbiol.*** 62, 316-322 (1996).
- ZHOU, J. *ET AL.* Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. ***Appl. Environ. Microbiol.*** 68, 326–334 (2002).

APÊNDICE 1 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA**Meio Terrific Broth:**

Bacto-triptona	12 g/L
Extrato de levedura	24 g/L
Glicerol	4 mL/L

Meio Lisogenic-Broth Agar (LA):

Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L
Agar	15 g/L

Meio Lisogenic-Broth (LB):

Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L

Meio SOB:

Bacto triptona	20
Extrato de levedura	5
Cloreto de sódio	0,584 g/L
Cloreto de potássio	0,186 g/L
Água destilada q.s.p.	1L

Meio SOC:

Triptona	20 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	0,6 g/L
KCl	0,19 g/L
MgCl ₂	0,94 g/L
MgSO ₄	1,2 g/L
Glucose	3,6 g/L
Água destilada q.s.p.	1 L

APÊNDICE 2 – COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS NAS ELETROFORESES

Tris-borato-EDTA 10X (TBE):

Tris base	108 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	40 mL
Ácido Bórico	55 g
Água destilada q.s.q.	1000 mL

Tris-acetato-EDTA 10X (TAE):

Tris base	48,4 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 mL
Ácido Acético glacial	11,42 mL
Água destilada q.s.q.	1000 mL