

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

LÍVIA MARIA CABRAL BITENCOURT

ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA DE
SEDIMENTO DE MANGUE E CONSTRUÇÃO DE
BIBLIOTECA METAGENÔMICA COM DNA DE ALTO PESO
MOLECULAR

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Abril de 2009

LÍVIA MARIA CABRAL BITENCOURT

ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA DE
SEDIMENTO DE MANGUE E CONSTRUÇÃO DE
BIBLIOTECA METAGENÔMICA COM DNA DE ALTO PESO
MOLECULAR

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Genética e Biologia
Molecular.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Abril de 2009

LÍVIA MARIA CABRAL BITENCOURT

ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA DE
SEDIMENTO DE MANGUE E CONSTRUÇÃO DE
BIBLIOTECA METAGENÔMICA COM DNA DE ALTO PESO
MOLECULAR

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Genética e Biologia
Molecular.

Área de concentração: Biotecnologia e
Genômica.

Aprovada em 13 de fevereiro de 2009.

Dra. Lucymara Fassarella Agnez Lima
(UFRN)

Dr. Rachel Passos Rezende
(UESC)

Dr. Eduardo Gross
(UESC)

Dr. Martin Brendel
(UESC – Orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho e tudo alcançado em minha vida a Deus, que além de conceder a oportunidade, nos capacita para superar os obstáculos encontrados no caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que é o autor da minha vida e tudo quanto há.

A todos meus familiares, em especial, meus pais e meus irmãos, pela dedicação.

À Lucas, meu esposo, por todo apoio e compreensão.

À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade.

À FAPESB pela concessão da bolsa.

À RENORBIO pelo apoio em equipamentos e materiais.

Ao orientador Martin Brendel, pela paciência, confiança e por todo conhecimento.

Ao co-orientador Júlio Cascardo, pelo caminho aberto e por todo apoio.

Aos Professores Rachel Rezende e Eduardo Gross, pelo ensino e críticas que contribuíram para nortear este projeto.

À Tharcilla, grande amiga, por me ensinar e me acompanhar em grande parte deste trabalho.

Ao Ramon Vidal, pela contribuição na bioinformática.

À Luciana, secretária do PPGGBM, por estar sempre disposta a nos ajudar.

À Ângela, Candice e Edílson, pela amizade.

A todos os colegas do mestrado e laboratório, que direta ou indiretamente, contribuíram para o meu crescimento profissional.

ÍNDICE

EXTRATO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Os Manguezais	3
2.2. Os microrganismos e o solo.....	4
2.3. Os organismos vivos e sua diversidade	6
2.4. Uso da seqüência 16S RNA como marcador molecular	8
2.5. Estrutura secundária do 16S rRNA	10
2.6. Extração de DNA	10
2.7. Vetores de clonagem.....	11
2.8. Biotecnologia	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Descrição do local de coleta e amostragem.....	15
3.2. Análise físico-química do solo	15
3.3. Extração de DNA.....	15
3.3.1. Extração direta.....	16
3.3.2. Extração indireta	16
3.4. Amplificação e clonagem dos genes de RNA ribossômico 16S	17
3.5. Sequenciamento e análises de bioinformática	19
3.6. Construção da biblioteca metagenômica	20
3.7. Bioensaios	21
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Análise físico-química do solo	24

4.2. Extração de DNA	24
4.3. Amplificação e clonagem dos genes de RNA ribossômico 16S	25
4.4. Distribuição dos clones	26
4.5. Construção da biblioteca metagenômica em fosmídeo	40
5. DISCUSSÃO	21
5.1. Diversidade bacteriana do solo de mangue da Baía de Camamu	41
5.2. Construção e análise da biblioteca metagenômica em fosmídeo.....	45
6. CONCLUSÕES GERAIS	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

EXTRATO

BITENCOURT, Livia Maria Cabral. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Fevereiro de 2009. **Análise da diversidade bacteriana de solo de mangue da Baía de Camamu e construção de biblioteca metagenômica com DNA de alto peso molecular.** Orientador: Martin Brendel. Co-orientador: Júlio Cezar de Mattos Cascardo. Conselheira: Cristina Pungartnik

O mangue é um ecossistema costeiro, de transição entre os ambientes terrestre e marinho, característico de regiões tropicais e subtropicais, que apresenta solo salino e deficiência de oxigênio. Esse trabalho mostra as primeiras descrições de diversidade bacteriana de sedimento de Mangue da Baía de Camamu/BA através de métodos moleculares independentes de cultivo, e construção de biblioteca metagenômica com DNA de alto peso, visando aplicações biotecnológicas. As amostras de sedimento de Mangue foram coletadas em 25 pontos na Baía de Camamu e agrupadas, formando uma amostra única. Para análise de diversidade construíram-se duas bibliotecas, uma através de extração direta e outra por extração indireta do DNA. Os genes 16S rDNA da comunidade bacteriana total foram amplificados por PCR e clonados no vetor pTZ57R/T (*Inst/Aclone PCR Product cloning kit*). Todos os clones foram seqüenciados e analisados utilizando o classificador Bayesiano de seqüências 16S de bactérias (<http://rdp.cme.msu.edu>). A análise de biodiversidade do sedimento de Mangue mostrou que os filótipos foram dominados por seqüências relacionadas a *Proteobacteria* e *Acidobacteria*. De acordo com os dados analisados os dois métodos de extração foram eficientes em relação à representatividade. Para a construção da biblioteca metagenômica com DNA de alto peso, o DNA metagenômico foi extraído com *Mega Power SoilTM DNA*

Isolation Kit (MOBIO) e clonado com *Copy Control™ Fosmid Library Production Kit* (EPICENTRE), gerando uma biblioteca com 6.048 clones. Dentre estes, alguns foram selecionados aleatoriamente para extração de DNA e posterior restrição com *NotI*. Esta digestão mostrou que os fragmentos inseridos possuem entre 25-40 Kbp, o que confirma a restrição de tamanho de fragmento de DNA no empacotamento do fosmídeo vetor. A clonagem com fragmentos grandes permite aumentar a chance de encontrar novos genes e óperons com aplicação biotecnológica. Para tanto, foram realizados bioensaios enzimáticos e antimicrobianos. Porém, não foi possível detectar nenhum clone com atividade em potencial, devido à dificuldade de expressão heteróloga em fosmídeo. Embora os dados filogenéticos e moleculares coletados neste estudo não possam identificar a função de cada microrganismo no ambiente em estudo, eles são de fundamental importância para o conhecimento da complexidade do ecossistema de mangue e fornece subsídios para trabalhos posteriores.

Palavras-chave: Diversidade bacteriana, 16S rDNA, fosmídeos, metagenoma, biotecnologia.

ABSTRACT

BITENCOURT, Livia Maria Cabral. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Fevereiro de 2009. **Analysis of bacterial diversity of mangrove soil in the Bay of Camamu, and construct a metagenomic DNA library of high molecular weight.** Advisor: Martin Brendel. Co-advisors: Júlio Cezar de Mattos Cascardo and Cristina Pungartnik.

Mangrove soil is a coastal ecosystem typical for tropical and subtropical regions that constitutes a transition between land and sea and, therefore, is characterized by presence of salt and oxygen-deficiency. This work describes the first isolation and characterization of the bacterial diversity of Brazilian mangrove sludge, collected in the Bay of Camamu, Bahia, with the help of culture-independent molecular methods. Five mangrove sludge samples were collected at each of five locations in the Bay area of Camamu and the 25 samples were pooled to represent the mangrove sludge of the region. Bacterial diversity was established by analyzing two DNA libraries that were constructed using DNA that was either directly or indirectly extracted from mangrove sludge. The 16S rDNA genes from both libraries were amplified via PCR and cloned into vector pTZ57R/T (Inst/Aclone PCR Product cloning kit). All 16S rDNA containing clones were sequenced and analyzed with the help of Bayesian classification tool of bacterial 16S rDNA sequences (<http://rdp.cme.msu.edu>). The biodiversity analysis of the mangrove soil showed a predominance of *Proteobacteria* and *Acidobacteria*. The analyzed data yielded no significant differences in composition of bacterial diversity in relation to

the method of DNA extraction. In order to construct a metagenomic DNA library of high molecular weight, DNA was extracted from sludge by using the Mega Power Soil™ DNA Isolation Kit (MOBIO) and by cloning it with the help of Copy Control™ Fosmid Production Kit (EPICENTRE). The resulting DNA library consisted of 6,048 clones that, by *NotI* restriction of a random sample, showed an average size of the cloned DNA fragments to be in the order of 25 to 40 kbp. This confirmed the maximal size of DNA fragments to be accepted for ligation into the fosmid vector. These large DNA fragments will enhance the chances to isolate new genes and operons encoding proteins of biotechnological interest. First tests aiming at recognizing selected enzyme activities and anti-microbial properties did not yield any positive results. This may reflect problems of gene expression in the host bacteria. The phylogenetic and molecular data obtained with the mangrove sludge DNA libraries did not allow to study the function of the identified bacteria in this habitat. Further research is needed to elucidate this information that is important for our understanding of the microbial functions in such a complex ecosystem.

Key words: Bacterial diversity, 16S rDNA, fosmids, metagenomics, biotechnology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise de fertilidade da amostra de sedimento da Baía de Camamu.

Tabela 2. Composição granulométrica (g/Kg) da amostra de sedimento da Baía de Camamu, com dispersão com NaOH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore filogenética universal em forma de raiz mostrando os três domínios.

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE 1x dos fragmentos de rDNA 16S amplificados por PCR.

Figura 3. Distribuição dos clones de rDNA 16S derivados de solo de Mangue da Baía de Camamu.

Figura 4. Distribuição dos clones de 16S rDNA derivados de solo de Mangue da Baía de Camamu.

Figura 5. Distribuição em classes dos clones de 16S rDNA obtidos de sedimento de Mangue da Baía de Camamu.

Figura 6. Distribuição em ordem dos clones de 16S rDNA obtidos de sedimento de Mangue da Baía de Camamu.

Figura 7. Distribuição em família dos clones de 16S rDNA obtidos de sedimento de Mangue da Baía de Camamu.

Figura 8. Distribuição em gênero dos clones de 16S rDNA obtidos de sedimento de Mangue da Baía de Camamu.

Figura 9. Dendograma contendo os clones obtidos de DNA metagenômico extraído pelo método indireto.

Figura 10. Dendograma contendo os clones obtidos de DNA metagenômico extraído pelo método método direto.

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 0,8% a 50V/ 1h.

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 0,8% de DNA de fosmídeos da biblioteca de Mangue após restrição com *NotI*.

1. INTRODUÇÃO

Conceitualmente, metagenômica é a análise baseada em seqüência e função de genomas microbianos coletivos contidos em uma amostra de determinado ambiente (HANDELSMAN et al., 1998). Este campo foi desenvolvido como conseqüência da descoberta de que a diversidade procariótica é muito maior que a previamente conhecida. A metagenômica tem sido utilizada para elucidar o genoma de microrganismos não cultiváveis, com o objetivo de por um lado conhecer melhor a ecologia microbiana global e por outro lado, tem sido dirigida pelo aumento da demanda biotecnológica de biomoléculas (SCHMEISSER et al., 2007).

A nova era da ecologia microbiana foi iniciada através da análise de seqüências de DNAs ribossomais dos microrganismos de determinado ambiente, através da aplicação de *primers* universais para amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase. A análise da subunidade ribossomal de procariotos e arqueas (16S rDNA) e de eucariotos (18S rDNA), combinada com técnicas de clonagem e sequenciamento ou *fingerprinting*, tem gerado uma vasta quantidade de dados, permitindo redefinir completamente a diversidade procariótica (REISENFELD et al., 2004).

A análise de bibliotecas metagenômicas por seqüência é o *screening* de genes de interesse baseando-se em suas seqüências conservadas. Esta análise é efetiva para identificação de âncoras filogenéticas e genes codificando enzimas com domínios altamente conservados (REISENFELD et al., 2004). A análise baseada em função é a busca de clones ativos dentre o total de clones da biblioteca (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003).

O *screening* funcional tem o potencial de identificar e caracterizar um grande número de biocatalisadores e outras biomoléculas. A lista de biocatalisadores de interesse industrial inclui enzimas lipolíticas, proteases,

celulases, agarases, entre outros. O *screening* de bibliotecas metagenômicas é também efetivo para descoberta de novas agentes terapêuticos. Um exemplo é o isolamento dos antibióticos turbomicina A e B (DANIEL, 2004).

Existe uma vasta quantidade de informação presente no genoma dos microrganismos que pode ser valiosa para o conhecimento e desenvolvimento em áreas de ecologia, medicina e biotecnologia, e a metagenômica é uma promissora ferramenta para acessar este potencial.

Esse trabalho objetivou extrair DNA de sedimento de mangue com duas metodologias distintas, e construir bibliotecas de rDNA 16S, para realizar um estudo inicial da diversidade bacteriana. Além disso, construir uma biblioteca metagenômica com DNA de alto peso molecular em vetor fosmídeo, visando a identificação de novos genes/enzimas, envolvidos na rota de produção de antibióticos e outros compostos, oriundos de microrganismos que habitam este ambiente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Os manguezais

Os manguezais são ecossistemas costeiros, característicos de regiões tropicais e subtropicais, que apresentam solo salino e deficiência de oxigênio, que estão desaparecendo mundialmente (DUKE et al., 2007).

Este ecossistema é associado a terrenos baixos, planos e regiões estuarinas, às margens de lagunas ou ao longo de rios e canais naturais, em áreas encharcadas, salobras e calmas, com influência das marés; porém, não atingidos pela ação direta das ondas. Nesses locais, a força das marés é branda e a velocidade das correntes é baixa, favorecendo intensa deposição de sedimentos finos e matéria orgânica. Torna-se o elo de ligação entre os ambientes marinho, terrestre e de água doce, caracterizando-se por uma constante conquista de novas áreas pelo acúmulo de grandes massas de sedimentos e detritos trazidos pelos rios e pelo mar. O substrato assim originado é pouco compactado, alagadiço, rico em matéria orgânica, pouco oxigenado e sujeito a períodos alternados de inundação e drenagem, conforme variação das marés (ROSSI, 2002).

Embora muitos estudos de composição microbiana ambiental tenham sido conduzidos, os estuários, especialmente as comunidades microbianas de sedimentos de mangue são raramente estudadas (GOMES et al., 2008).

Um dos principais objetivos da ecologia microbiana hoje é identificar os diferentes microrganismos presentes em um ambiente e associar aos processos metabólicos que eles realizam (STEELE; STREIT, 2005). Estudos da composição e diversidade microbiana em solos de mangue são importantes para um melhor conhecimento da diversidade bacteriana e detecção de taxa bacterianas que possam atuar em importantes rotas ecológicas em muitos processos ambientais, incluindo a degradação de poluentes (GOMES et al., 2008).

A baía de Camamu, importante pólo turístico, pesqueiro e mineiro, está localizada na Região Litoral Sul do Estado da Bahia. Esse corpo hídrico é bordejado por extensa floresta de manguezal e tem se tornado alvo de uma série de estudos geoambientais (OLIVEIRA et al., 2002).

2.2. Os microrganismos e o solo

A biodiversidade, um termo usado no contexto científico para referir ao catálogo de espécies vivas que existem em determinado ambiente, é comumente mensurada em termos de diversidade genética, identidade e número de diferentes espécies, comunidades e processos bióticos, e a quantidade e estrutura de cada um deles (VALERA, 2002). Entretanto, embora este termo seja bastante utilizado na microbiologia, há dificuldade de se obter um estudo mais profundo a respeito da diversidade, principalmente por muitos microrganismos serem ainda não cultiváveis (RAPPÉ ; GIOVANNONI, 2003).

Os procariontes são os organismos mais ubíquos na terra. Eles são encontrados em diversos ambientes, incluindo solos, sedimentos, tecidos animais e vegetais, e são a chave dos ciclos biogeoquímicos da biosfera. Eles representam uma enorme fonte de novas moléculas para avanço da biotecnologia (ROBE et al., 2003).

Como resultado da análise do gene 16S rRNA, o solo é agora conhecido como um dos habitats mais ricos em diversidade genética microbiana e pode ser considerado como um complexo ambiental (BUCKLEY; SCHMIDT, 2002). Um grama de solo pode conter 10 bilhões de microrganismos, representando milhares de espécies (ROSSELÓ-MORA; AMANN, 2001).

A complexidade do solo resulta de múltiplos parâmetros de interação, incluindo estrutura e textura do solo, conteúdo de água, pH, variações climáticas e bioatividade. A estrutura e textura do solo são principalmente determinadas pelo conteúdo de areia, silte, argila e matéria orgânica através da organização em micro e macro-agregados. Os microrganismos são heterogeneamente distribuídos

dentro dos micro-agregados e em macro-poros por fora dos micro-agregados (ROBE et al., 2003).

As bactérias, que têm um diâmetro aproximado de 0,5 a 2 μm , localizam-se nos *pellets* fecais, na matéria orgânica, nos poros e no interior de agregados. A ocupação dos poros é função de seu tamanho e conteúdo de água. Poros com alguns micrometros (2 a 6 μm) são adequados para a entrada de bactérias (BAKKEN; LINDAHL, 1995).

As partículas do solo variam bastante com relação a sua área superficial específica e suas propriedades, como a capacidade de troca de cátions e o tipo dominante de carga, importantes em sua interação com microrganismos. Estes, por sua vez, têm propriedades superficiais específicas relacionadas ao tipo de carga dominante, à natureza dos compostos orgânicos liberados e à existência de grupos ionogênicos na superfície celular que determinam o tipo de ligação com as partículas. Muitos microrganismos ligam-se fortemente com partículas do solo através de uma variedade de mecanismos de ligação (BAKKEN; LINDAHL, 1995). A interação entre superfícies de microrganismos e colóides afeta aspectos importantes da ecologia microbiana, como sobrevivência, sucessão e interações entre organismos, além de sua atividade. A adesão de organismos a superfícies permite-lhes explorar melhor os nutrientes que os não aderidos. Além disso, os microrganismos ficam de certo modo, protegidos e menos sujeitos à remoção do habitat, como, por exemplo, pela água (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A composição da comunidade microbiana em um ambiente é fortemente influenciada pelas propriedades biogeográficas e ecológicas do ambiente, tais como a dinâmica da cadeia alimentar, a ciclagem de nutrientes, e a presença de matéria orgânica e inorgânica (LIAO et al., 2007). As comunidades microbianas do solo possuem características específicas que irão alterar a forma como tais microrganismos serão aderidos ao solo e sua susceptibilidade à lise celular, em consequência de características da parede celular (KAUFFMANN et al., 2004).

2.3. Organismos vivos e sua diversidade

Seguindo a taxonomia Lineana, tradicional sistema de classificação, baseada em dados morfológicos e fisiológicos, todas as formas de vida na Terra podem ser classificadas em 5 reinos: *Animalia*, *Plantae*, *Fungi*, *Protista* e *Monera*. Pode-se também dividir a vida em dois tipos fundamentais: aqueles que possuem uma membrana nuclear (eucariotos) e aqueles que não a possuem (procariotos), de modo que a maior diversidade da vida na terra era devida aos eucariotos, particularmente às suas formas multicelulares (WHITTAKER, 1969).

Os procariotos (Reino *Monera*) eram considerados simples, primitivos e relativamente uniformes em suas características (HUGENHOLTZ et al., 1998b). Esses sistemas perduraram até 1990 quando Carl Woese utilizou as comparações de seqüências de 16S e 18S rRNA para propor uma nova classificação universal para a grande diversidade de vida na Terra. Pela primeira vez uma proposta completa de classificação foi baseada em dados moleculares e não morfológicos (WOESE et al., 1990). Os autores propuseram a criação de um novo nível taxonômico denominado Domínio, sendo a vida no planeta dividida em três Domínios: Bacteria, Archaea e Eucarya (Figura 1), já que o sistema de 5 Reinos era insuficiente e não refletia a filogenia natural dos seres vivos.

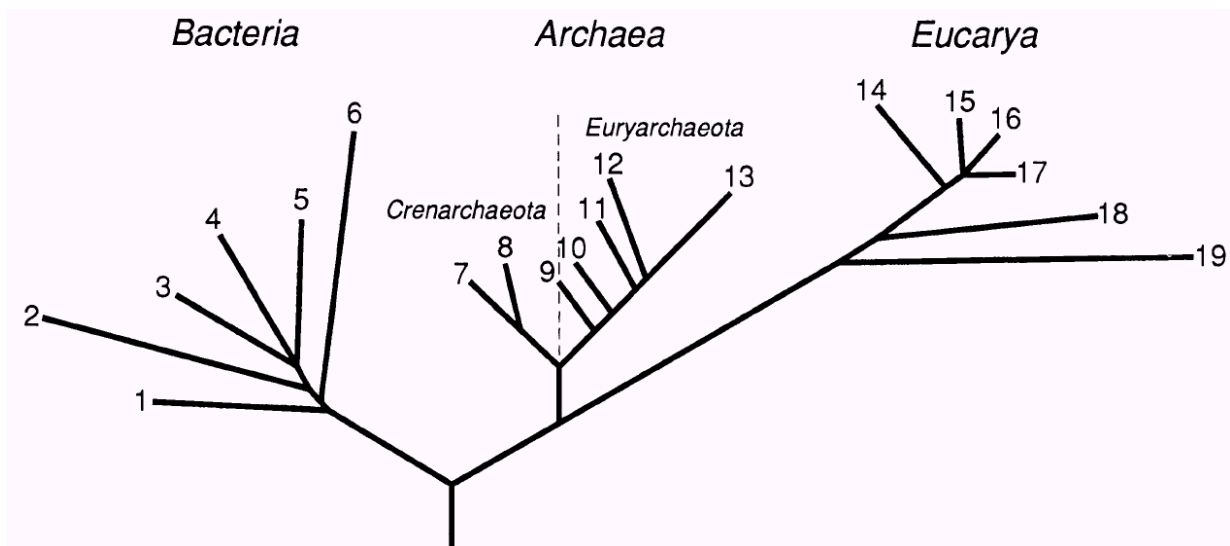


Figura 1. Árvore filogenética universal em forma de raiz mostrando os três domínios. A ordem e o tamanho dos braços são baseados na comparação de seqüências de 16S e 18S rRNA. Os números nos braços correspondem a: Domínio Bacteria: 1) Thermotogales, 2) Flavobacterias e relacionados, 3)

Cyanobacteria, 4) Bactérias púrpuras, 5) Bactérias gram-positivas e 6) Bactéria verde-não sulfurosas. Domínio Archaea, Reino Crenarchaeota: 7) Gênero Pyrodictium, 8) Gênero Thermoproteus, Reino Euryarchaeota: 9) Thermococcales, 10) Methanococcales, 11) Methanobacteriales, 12) ethanomicrobiales e 13) Halofilas extremas. Domínio Eucarya: 14) Animais, 15) Ciliados, 16) Plantas verdes, 17) Fungos, 18) Flagelados e 19) Microsporídia. Adaptado de WOESE e colaboradores, (1990).

Na proposta inicial de Carl Woese (WOESE, 1987) o domínio Bacteria era formado por 11 filos compostos principalmente por indivíduos cultivados e caracterizados. Entretanto, estudos moleculares independentes de cultivo demonstraram que o Domínio Bacteria possui mais filos, sendo que alguns apresentam poucos ou nenhum representante cultivável (DE LONG; PACE, 2001). Uma nova classificação, incluindo seqüências de 16S rRNA de organismos retirados diretamente do ambiente, feita por HUGENHOLTZ e colaboradores (1998a), aumentou o número de filos bacterianos para 36.

A partir de então, muitos pesquisadores vêm descobrindo que o domínio Bacteria possui muito mais filos do que Woese e colaboradores descreveram em sua proposta inicial (1987), sendo que muitos representantes são não cultiváveis (DELONG; PACE, 2001). Mais recentemente RAPPÉ e GIOVANNONI (2003),

também utilizando seqüências 16S rDNA amplificadas de DNA total de diversos ambientes, aumentaram esse número para 52 filós.

Embora sejam menos estudados e caracterizados, muitos grupos de microrganismos são essenciais para a sobrevivência de formas de vida na Terra. Estima-se que menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (TORSVIK, 2002). A perspectiva de uma vasta diversidade de microrganismos não-cultiváveis no solo estimulou o desenvolvimento de técnicas que permitissem o estudo dessas comunidades microbianas independente de cultivo, em laboratório (NEE, 2004).

2.4. Uso da seqüência 16S rRNA como marcador molecular

Em virtude de sua longa história evolutiva e da necessidade de adaptação aos ambientes mais distintos, os microrganismos acumularam uma impressionante diversidade genética, que excede, em muito, a diversidade dos organismos eucariotos (HUGENHOLTZ et al., 1998a). A principal razão para o baixo número de espécies formalmente descritas era a necessidade de cultivo celular no processo de identificação dos microrganismos, o que na grande maioria das vezes não é possível (PACE et al., 1986).

A aplicação de metodologias de biologia molecular, especialmente aquelas baseadas na pesquisa de genes após amplificação por PCR, combinadas com análises filogenéticas, têm permitido que investigações independentes de cultivo da comunidade microbiana de solos sejam feitas (REISENFELD et al., 2004).

O uso de marcadores moleculares para investigar a estrutura e a diversidade de comunidades microbianas tem possibilitado o desenvolvimento de uma nova metodologia no estudo dos aspectos característicos da ecologia desses organismos (WARD et al., 1992).

Um marcador molecular confiável para análises filogenéticas deve ser distribuído universalmente, conter seqüências conservadas e, as mudanças nas

seqüências devem ocorrer proporcionalmente à distância evolucionária. Desse modo, os marcadores moleculares atuam como relógios moleculares. Um relógio molecular pode ser definido como uma molécula cuja seqüência muda aleatoriamente com o tempo segundo uma velocidade constante de mudança (número de nucleotídeos por milhão de anos). Baseados no produto, tempo vezes taxa de velocidade de mudança, pode-se determinar a relação filogenética entre duas seqüências de organismos diferentes provindas de um ancestral comum (WOESE, 1987).

Estudos baseados em genes da subunidade menor do rRNA, que seqüência funções altamente conservadas, têm refinado e expandido o nosso conhecimento da diversidade microbiana (PACE, 1997). Em particular, o rRNA 16S e seus genes, têm sido utilizados para estimar a abundância relativa e a diversidade de grupos bacterianos em determinado ambiente permitindo redefinir completamente a diversidade procariótica (BUCKLEY; SCHMIDT, 2002). Recentes análises de genes de rRNA 16S amplificados diretamente do solo indicaram a presença de novos filos de Bactéria e Archaea (GILLESPIE et al., 2002).

PACE e colaboradores (1986) foram os primeiros autores a sugerirem o uso do gene 16S rDNA como um marcador molecular para o estudo de populações microbianas em amostras do ambiente, independente do seu cultivo. Análises de macromoléculas envolvidas no processamento da informação contida nos ácidos nucléicos (replicação do DNA, transcrição, e tradução) geralmente produzem uma árvore filogenética apresentando a topologia dividida nos três domínios (Bactéria, Archaea e Eucarya). Por outro lado, análises filogenéticas baseadas em genes metabólicos ou regulatórios não atingem o mesmo resultado (DOOLITTLE, 1999). Além disso, os RNA ribossômicos e outros genes centrais envolvidos na transferência de informações, aparentemente não sofreram uma ampla transferência lateral, produzindo uma linha coerente para entender e inter-relacionar os principais ramos evolutivos da árvore da vida (OCHMAN et al., 2000).

As seqüências de 16S rDNA tornaram-se padrão na determinação de relações filogenéticas, na avaliação da diversidade em amostras ambientais e na detecção e quantificação de populações específicas (HEAD et al., 1998).

2.5. Estrutura secundária do 16S rRNA

O 16S rRNA é uma das moléculas que compõe, juntamente com outras 21 proteínas, a subunidade menor do ribossomo 70S nos domínios *Archaea* e *Bacteria*. Sua estrutura secundária possui pareamentos diferentes do proposto por Watson-Crick (A-U e C-G) e várias hélices oriundas do pareamento intracadeia que são numeradas a partir da extremidade 5' da molécula (WOESE et al., 1983). O número total de hélices e suas localizações são características usadas para separar grupos filogenéticos. O 16S rRNA possui também 9 regiões variáveis, alternadas com regiões conservadas, denominadas de V1 a V9. Estas regiões podem, juntamente com as regiões das hélices, ser utilizadas para determinação de filogenia (DAMS et al., 1988). Áreas variáveis podem ser usadas para estudar as relações evolutivas entre dois organismos muito próximos. Já as áreas conservadas podem ser usadas para revelar relações antigas entre duas moléculas (WOESE et al., 1983).

Baseado no modelo da estrutura secundária do 16S rRNA de *E. coli*, VAN DER PEER e colaboradores (1996) determinaram um mapa de substituição para cada base nitrogenada da molécula. A variabilidade de cada sítio nucleotídico é definida como sua taxa evolutiva relativa à média da taxa evolutiva de todos os sítios nucleotídicos da molécula. Assim os autores demonstraram que os sítios mais variáveis possuem uma taxa de substituição até sete mil vezes maior do que aqueles com a menor taxa de substituição e também, que existem bases em certas posições que são absolutamente conservadas entre diferentes filos bacterianos.

2.6. Extração de DNA

A maioria dos métodos utilizados para extração de DNA metagenômico de solos apresenta deficiências no que diz respeito a manter a representatividade da amostra, uma vez que, na tentativa de livrar o DNA dos contaminantes orgânicos e inorgânicos, realizam-se etapas de purificação e/ou lavagens que resultam em perda de DNA (DANIEL, 2004; ROBE et al., 2003).

Entre os métodos convencionais de extração, existem basicamente duas vertentes: a extração direta ou *in situ* e a extração indireta ou *ex situ* (ROBE et al., 2003). Na extração direta, a lise celular ocorre com os microrganismos ainda aderidos às partículas de solo, liberando o DNA metagenômico (FROSTEGARD et al., 1999). Todos os métodos baseados neste princípio derivam do trabalho de OGRAM e colaboradores de 1987 (ROBE et al., 2003). Na extração indireta, as células são separadas das partículas de solo e depois sofrem lise celular para expor o DNA (ROH et al., 2006; ROBE et al., 2003). As duas técnicas apresentam vantagens e desvantagens relacionadas à produção de DNA, pureza, e representatividade da diversidade microbiana (COURTOIS et al., 2003).

2.7. Vetores de clonagem

As estratégias de clonagem dependem do objetivo do estudo. Na maioria das vezes, a preferência é clonar seqüências com o máximo de tamanho possível, para aumentar a probabilidade de encontrar óperons e vias metabólicas funcionais inteiras (BERTRAND et al., 2005).

Bibliotecas metagenômicas de solo, com DNA de alto peso, têm sido construídas utilizando cosmídeos (Courtois et al., 2003), cromossomo artificial de bactéria (Rondon et al., 2000) ou fosmídeos (Quaiser et al., 2002; Treusch et al., 2004).

O sistema fosmídeo, que foi desenvolvido por KIM e colaboradores em 1992 (KIM et al., 2006) tem algumas vantagens significantes. Primeiro, são similares em tamanho aos cosmídeos e são mais fáceis de manusear que o cromossomo artificial de bactéria BAC e o cromossomo artificial de levedura (YAC). Segundo, o vetor fosmídeo é baseado na origem de replicação fator-F, o que permite a manutenção e estoque das construções em simples cópia para aumentar a estabilidade dos clones, sendo que, para realização das análises o sistema pode ser induzido a um alto número de cópias (ZHANG et al., 2007)

2.8. Aplicações biotecnológicas da metagenômica

O *screening* de isolados microbianos nos últimos 50 anos tem resultado na comercialização de numerosas biomoléculas, que são produto do metabolismo secundário dos microrganismos (COURTOIS et al., 2003).

Os microrganismos do solo têm sido a mais valiosa fonte de produtos naturais, fornecendo antibióticos e biocatalisadores muito importantes industrialmente (HANDELSMAN et al., 1998). A análise da cultura pura de microrganismos do solo revela que eles são uma rica fonte de novos componentes terapêuticos como antibióticos (RAAIJMAKERS et al., 1997) e imunossupressores (SKOKO et al., 2005).

É bem sabido que a biotecnologia tem uma contínua demanda por novos compostos, genes ou enzimas, e a diversidade natural fornece tais novas moléculas. Entretanto, a taxa de descobertas de novas moléculas com interesse biotecnológico, utilizando as técnicas tradicionais de cultivo, está diminuindo significativamente. A técnica dependente de cultivo é limitada pelo fato de que a grande maioria dos microrganismos presentes no solo ainda não pode ser cultivada sob as condições laboratoriais estabelecidas (SCHMEISSER et al., 2007). Em um estudo realizado por Kellenberger (2001), em 1 grama de solo existiam aproximadamente 10^7 células, mas somente 0,1% das células foram

cultiváveis. Ou seja, 99,9% da potencial diversidade genética presente nesta população foi perdida em consequência das dificuldades de enriquecimento e isolamento dos microrganismos.

A metagenômica foi construída com os recentes avanços em genômica microbiana e na amplificação, por reação em cadeia da polimerase (PCR), e clonagem de genes diretamente de amostras ambientais. Enquanto a amplificação por PCR requer o conhecimento da seqüência do gene para desenhar os primers para amplificação, a extração direta e clonagem do DNA genômico podem teoricamente acessar genes com qualquer seqüência ou função. A clonagem genômica direta oferece a oportunidade de capturar óperons ou genes codificando rotas que podem direcionar a síntese de moléculas complexas (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003).

Duas técnicas, a análise baseada em função e a análise baseada em seqüência, têm emergido para extrair informações das bibliotecas metagenômicas. A análise da biblioteca metagenômica baseada em seqüência é o *screening* de genes de interesse através de *primers* baseando-se nas seqüências conservadas de genes conhecidos (REISENFELD et al., 2004). Esta análise tem-se mostrado efetiva na identificação de âncoras filogenéticas e genes de enzimas com domínios altamente conservados (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003).

A análise baseada em função é a busca de clones ativos dentre o total de clones da biblioteca metagenômica, ela é iniciada pela identificação de clones expressando algo desejado, seguindo-se a caracterização dos clones ativos por sequenciamento e análises bioquímicas. Este screening tem o potencial de identificar e caracterizar um grande número de biocatalisadores e outras biomoléculas (DANIEL, 2004). A lista de biocatalisadores de interesse industrial inclui esterases (KIM et al., 2006), amilases (YUN et al., 2004), lipases (HENE et al., 2000), celulases e agarases (VOGET et al., 2003). Uma adaptação da análise baseada em função é o SIGEX, uma técnica baseada no conhecimento que a expressão de genes catabólicos é geralmente induzida por substratos (UCHIYAMA, et al., 2005).

O *screening* de bibliotecas metagenômicas de solo é também efetivo para descoberta de novos fármacos (DANIEL, 2004). Um exemplo é o isolamento dos antibióticos turbomicina A e B por GILLESPIE et al. (2002). A pesquisa por novos genes antimicrobianos e seus componentes é, provavelmente, o campo que está avançando mais rapidamente em metagenoma (DANIEL, 2004).

Outra forma de *screening* é o sequenciamento aleatório da biblioteca metagenômica, esta técnica tem fornecido uma vasta quantidade de dados, incluindo relações filogenéticas, novos genes, e rotas metabólicas de bactérias não cultiváveis (Yun; Ryu, 2005).

A maioria dos antibióticos utilizados na clínica provém de Actinomicetos presentes no solo. Mas o potencial de prover novos agentes antimicrobianos não está concentrado apenas nesta classe de bactérias, pois também nos solos existe uma intensa disputa por espaço e nutrientes que leva os microrganismos a secretarem antimicrobianos contra seus competidores. Esses processos envolvem elementos de resistência que quase sempre estão agrupados nos mesmos óperons de antibióticos (WRIGHT, 2007).

O agrupamento de todos os genes requeridos para a função, e a expressão da molécula de interesse pela célula hospedeira são as principais limitações da técnica baseada em função (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Descrição do local de coleta e amostragem

A coleta de sedimento (2-10 cm de profundidade) foi realizada em 5 mangues diferentes dentro da Baía de Camamu – BA, com o auxílio de espátulas estéreis. De cada mangue foram coletadas amostras em 5 pontos distintos, formando assim uma amostra composta de 25 pontos diferentes. As amostras foram acondicionadas em caixa térmica com gelo e transportadas até o Laboratório de Monitoramento Ambiental - UESC – Ilhéus-BA. As amostras foram agrupadas e peneiradas, formando uma amostra composta, a qual foi estocada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2. Análise de textura e fertilidade do sedimento

A análise físico-química da amostra composta do sedimento da baía de Camamu foi realizada no Laboratório de Solos e Nutrição de plantas da EMBRAPA, Cruz das Almas – BA.

3.3. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada por duas metodologias distintas, extração direta e indireta.

3.3.1. Extração direta (MACIEL, 2004)

Em um Erlenmeyer de 250 mL, 30 g da amostra composta do sedimento de Mangue foi mantido sob agitação durante 15 min a 150 rpm (rotações por min), em tampão fosfato de sódio ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) pH 8. Em seguida, a amostra foi transferida para tubos de centrífuga de fundo cônico e centrifugada. O sobrenadante dos tubos foi descartado. Adicionou-se 5 mL de TE (50/50) (Tris-HCl + EDTA) pH 8,1 em cada tubo contendo o sedimento e homogeneizou-se. As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 min, e descartou-se o sobrenadante dos tubos. Em seguida, adicionou-se 3 mL de TE (50/50) em cada tubo contendo o sedimento e homogeneizou-se. As amostras foram transferidas para um cadinho para lise das células do sedimento através de maceração em nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para dois tubos de 15 mL contendo 3 mL de TE (50/50) e adicionou-se igual volume de fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (24:25:1, V/V), agitou-se em vortex em baixa velocidade, e centrifugou-se a 5.000 rpm por 10 min. Coletou-se o sobrenadante dos dois tubos e adicionou-se 70% de isopropanol gelado e 10% acetato de sódio 3 M. O tubo foi invertido suavemente e mantido a -20°C por 2 h. A amostra foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 min e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se etanol 70% gelado para lavar o pellet, e descartou-se o sobrenadante. O tubo foi mantido a temperatura ambiente por 20 min para secar o pellet e ressuspendido em 100 μL de TE clássico. Em seguida, para uma melhor purificação as amostras foram passadas em uma coluna com resina Sephadex G-200 (Pharmacia, Sweden).

3.3.2. Extração indireta (MACENA, 2007 - modificado)

Em um Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 30 g da amostra composta de sedimento de mangue a 100 mL de tampão fosfato de sódio (PBS: $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) pH 7,4 + Tween 80 a 0,1%. A mistura foi mantida sob agitação

durante 16h a 180 rpm, para separação das células microbianas das partículas do sedimento. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para tubos de centrifuga de fundo cônico, centrifugou-se a 5.000 rpm por 10 min, e descartou-se o sobrenadante. Fez-se quatro lavagens com 3 mL de PBS com centrifugação de 5 min a 5.000 rpm. Fez-se quatro lavagens com 3 mL TE 50/50 mM (Tris-HCl + EDTA) pH 8,1 com centrifugação de 5 min a 5.000 rpm, descartando-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o material em 3 mL de TE (50/50) e adicionou-se 200 µL de SDS 20% e manteve-se a temperatura ambiente por 15 min. A lise das células foi feita por choque térmico (três ciclos de 1 min no nitrogênio líquido e 4 min em água em fervura). Incubou-se a amostra a temperatura ambiente por 5 min e adicionou-se fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (24:25:1) na proporção de 1:1 v/v, agitou-se em vortex em baixa velocidade, e centrifugou-se a 5.000 rpm por 10 min. Coletou-se o sobrenadante e adicionou-se 70% de isopropanol gelado e 10% acetato de sódio 3 M. O tubo foi invertido suavemente e mantido a -20 °C por duas horas. A amostra foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 min e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se etanol 70% gelado para lavar o pellet, e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se etanol 95% gelado para lavar o pellet, e descartou-se o sobrenadante. O tubo foi mantido a temperatura ambiente por 20 min para secar o pellet, o qual foi ressuspendido em 100 µL de água ultra-pura. Em seguida, para uma melhor purificação, as amostras foram passadas em uma coluna com resina Sephadex G-200 (Pharmacia, Sweden).

3.4. Amplificação e clonagem dos genes de RNA ribossômico 16S

O DNA metagenômico extraído do sedimento de Mangue foi utilizado como molde para PCR (Reação em cadeia da Polimerase). A amplificação dos genes 16S rDNA foi feita por PCR utilizando o par de iniciadores F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e R1525 (5'-AAGGAGGTCTCCARCC-3'), com obtenção de produtos com aproximadamente 1.500 pb.

A amplificação foi feita em uma reação de 25 μL contendo: 3,7 mM MgCl_2 , 0,4 mM de BSA, 0,4 pmol/L de cada dNTP, 0,4 pmol/ μL de cada iniciador, 10 ng de DNA, 2,5 μL de tampão 10x de reação e 3 U de Taq DNA polimerase (Fermentas). A PCR foi conduzida em termociclador MJC Research PTC200 (Eppendorf). Na reação foram utilizadas as seguintes condições de tempo e temperatura: 1 ciclo 94 °C por 5 s; 34 ciclos de 94 °C por 1 min, 59 °C por 1 min e 72 °C por 2 min e um 1 ciclo de 72 °C por 10 min. O controle positivo continha 10 ng de *Salmonella enterica* sorotipo *Rubislaw lysis*, e o controle negativo não continha template exógeno. Para visualização, 1 μL dos produtos de PCR foi aplicado à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x; em seguida, corou-se com brometo de etídeo, e visualizou-se em luz ultravioleta

Os produtos de PCR foram purificados com o *Concert Rapid PCR Purification Kit* (Life Technologies®) e clonados no vetor pTZ57R/T com o *Inst/Aclone "PCR Product cloning kit"* (Fermentas), seguindo informações do fabricante. Após a ligação realizou-se a transformação em estirpe TOP10 de *Escherichia coli*. Os transformantes foram obtidos em placas de LB ágar contendo ampicilina, X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo) e IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosídeo) nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 14-16 h. Os clones positivos foram coletados por seleção branco/azul e as colônias que obtiveram sucesso na clonagem (coloração branca) foram selecionadas e repicadas para novas placas com ampicilina, IPTG e X-Gal, para confirmação.

Os transformantes foram coletados com o auxílio de catadores de metal e organizados em placas de polietileno de 96 poços, contendo meio LB líquido e ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$), e incubados a 37 °C por 14h (*overnight*). No dia seguinte adicionou-se 70 μL de glicerol 16% às culturas. As placas foram seladas e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C. A biblioteca construída a partir da extração direta do DNA foi denominada de BD, e a construída a partir da extração indireta do DNA foi denominada de BI, cada biblioteca foi composta por 480 clones.

3.5. Extração de DNA plasmidial (Sambrook e Russell, 2001)

Para extração de DNA plasmidial foram utilizadas as seguintes soluções:

Solução 1	Solução 2	Solução 3
Glicose 20% - 23 mL	NaOH 10 N - 10 mL	5M KOAc - 300 mL
EDTA 0,5 M pH 8.0 - 10 mL	SDS 10% - 50 mL	Ácido acético glacial – 57,5 mL
Tris HCl 1 M pH 7.4 - 13 mL		
Volume final 500 mL	Volume final 500 mL (Preparada na hora do procedimento)	Volume final 500 mL

Antes de iniciar a extração foram realizados os seguintes procedimentos: 1) Ligou-se a estufa a 90 °C; 2) Adicionou-se 1 µL de RNase A (10 mg/mL) em cada poço das placas de fundo U; 3) Colocou-se a microplaca filtro sobre a microplaca de fundo V, e uniu-se com fita adesiva; 4) identificou-se todas as placas.

As placas contendo os clones a serem preparados para extração de DNA para sequenciamento foram retiradas do freezer –80 °C (5 placas de cada biblioteca) e deixou-se descongelar em temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos. Os clones, foram inoculados em poços de placa de crescimento com aproximadamente 2 µL de meio LB líquido e ampicilina (100 µg/mL). As placas foram seladas com um adesivo e furou-se o adesivo que cobre cada poço da placa com uma agulha esterilizada para permitir a aeração. As placas foram colocadas em um agitador horizontal ajustado a 260 rpm e 37 °C. As culturas foram incubadas por 14h. As placas foram retiradas do agitador e centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, para obter um *pellet* das células. Os adesivos das placas de crescimento foram removidos e o sobrenadante foi descartado em um recipiente com água sanitária. Escorreu-se o excesso de meio invertendo as placas sobre um papel toalha por 5 minutos. Adicionou-se 200 µL de solução 1 em cada poço das placas. As placas foram seladas e agitadas até ressuspender as células. As placas foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Os

adesivos das placas de crescimento foram removidos e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se novamente 50 µL de solução 1 em cada poço. As placas foram seladas com o mesmo adesivo e vortexadas para ressuspender as células. Transferiu-se 50 µL da suspensão de células para a placa fundo U contendo RNase. Adicionou-se 60 µL de solução 2 (preparada na hora) em cada poço. As placas foram seladas, misturadas por inversão por 10 vezes, e deixadas em repouso 5 minutos a 4 °C. As placas foram centrifugadas a 3.000 rpm por 1 minuto a 4 °C. Adicionou-se 60 µL de solução 3 (mantida a 4 °C) em cada poço das placas. As placas foram seladas e misturadas por inversão 20 vezes e deixadas em repouso por 10 minutos a 4°C. As placas foram centrifugadas a 3.000 rpm por 2 minutos a 4 °C. Os selos foram retirados e as placas foram incubadas a 90 °C por 30 minutos. As placas foram retiradas da estufa e colocadas em gelo por 10 minutos. As placas foram seladas e centrifugadas a 4.000 rpm por 4 minutos, 4 °C. Transferiu-se 70 µL do lisado das placas contendo DNA para as placas filtro. As placas foram centrifugadas por 10 minutos a 4.000 rpm, 4 °C. Removeu-se e descartou-se a placa filtro e adicionou-se 70 µL de isopropanol em cada poço da placa contendo o filtrado. As placas foram seladas, misturadas por inversão 20 vezes e centrifugadas por 45 minutos a 4.000 rpm, 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 150 µL de etanol 70% gelado (-20 °C). Centrifugou-se por 15 minutos a 4.000 rpm, 4 °C, e removeu-se o sobrenadante. Em seguida, as placas foram mantidas invertidas sobre papel toalha por 5 minutos, 10 minutos a 65 °C. Adicionou-se 50 µL de água ultra pura e deixou-se 1h a temperatura ambiente sob baixa agitação.

3.6. Seqüenciamento e análise de bioinformática

As seqüências nucleotídicas dos clones de genes 16S rDNA foram determinadas utilizando um seqüenciador de DNA automático (Megabace 1000™; Amersham Bioscience). A reação de seqüenciamento foi realizada com *primer*

M13 F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'). A amplificação foi feita em uma reação de 5 µL contendo: 2,0 µL de pré-mix (Fermentas), 0,3 µL *primer* M13 F e 2,7 µL de DNA. A PCR foi conduzida em termociclador MJC Research PTC200 (Eppendorf). Na reação foram utilizadas as seguintes condições de tempo e temperatura: 39 ciclos de 95 °C por 10 s, 50 °C por 15 s e 60 °C por 1 min e 20 s.

Antes de submeter as seqüências para análise filogenética, foi preciso remover as regiões das seqüências de baixa qualidade. Também foram eliminados os clones que não possuem nenhum 16S rDNA, assim como as regiões que não fazem parte de sua região informativa (região do vetor). Para o cálculo das distâncias filogenéticas utilizando alinhamento múltiplo, todas as seqüências foram editadas para representarem a mesma parte da região informativa do 16S rDNA.

Os clones seqüenciados foram analisados utilizando o classificador *Naive Bayesian rRNA classifier of the Ribosomal Database Project II* (<http://rdp.cme.msu.edu>). Este método trabalha com seqüências de aproximadamente 700 bases e tem uma eficiência maior que 99,2% no diagnóstico de filo, 98,4% na classe, 96,6% na ordem, 93% na família e 87,7% no gênero, usando um limiar de 80%. As informações geradas por este classificador foram tratadas com *scripts perl* para identificação dessas informações no estudo de distâncias filogenéticas. As seqüências com classificação possível foram então rotuladas com essas informações sobre sua taxonomia hierárquica.

3.7. Construção da biblioteca metagenômica

Para a construção da biblioteca metagenômica de DNA de alto peso molecular em fósforo, o DNA metagenômico foi extraído com *Mega Power SoilTM DNA Isolation Kit* (MOBIO) e clonado com *Copy ControlTM Fosmid Library Production Kit* (EPICENTRE). Os clones transformantes foram coletados com o auxílio de catadores de metal e organizados em placas de polietileno de 96 poços,

contendo 70 μL de meio LB líquido e cloranfenicol (12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e incubados a 37 °C por 14h (*overnight*). No dia seguinte adicionou-se 70 μL de glicerol estéril 16% às culturas. As placas foram seladas e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C.

Para confirmação do tamanho do inserto, 20 clones foram selecionados para extração de DNA do fosmídeo seguindo o protocolo do *California Institute of Technology* (<http://www.tree.caltech.edu>). Com o auxílio de ponteiros estéreis, cada colônia foi repicada em 1 tubo de fundo cônico contendo 2 mL de LB líquido e cloranfenicol (12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e incubada a 37 °C por 16h a 180 rpm. As culturas foram transferidas para tubos de 2 mL e centrifugadas a 3.000 rpm por 10min. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 300 μL de solução 1 (50 mM Tris, pH 8, 10 mM EDTA, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A). Adicionou-se 300 μL de solução 2 (0.2N NaOH, 1% SDS), e misturou-se por inversão. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 5 min. Adicionou-se 300 μL de solução 3 (3M KOAc, pH 5.5) a cada tubo e agitou-se gentilmente. Os tubos foram incubados em gelo por 5 min e centrifugados a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C. Transferiu-se o sobrenadante para tubos de 1,5 mL e adicionou-se 800 μL de isopropanol gelado. Os tubos foram misturados por inversão e colocados em gelo por 10 min, e centrifugados a 10.000 rpm por 15 min a 4 °C. Coletou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 μL de etanol 70% em cada tubo. Os tubos foram misturados por inversão e centrifugados a 10.000 rpm por 5 min a 4 °C. Removeu-se o sobrenadante dos tubos e os *pellets* foram secados a temperatura ambiente por 20 min. Adicionou-se 20 μL de água ultra pura a cada tubo.

Cerca de 20 clones foram utilizados para fazer a digestão utilizando *NotI*, uma enzima de restrição de corte raro. Utilizou-se cerca de 5 μL do DNA fosmidial e 0,1 U da enzima, 1,5 μL de tampão e 8,3 μL de água estéril. A reação foi incubada a 37 °C por 4h. Para visualização dos fragmentos, fez-se uma eletroforese em gel de agarose 1%, corou-se com brometo de etídeo, e visualizou-se em luz ultravioleta (UV).

3.8. Bioensaios

Em placas de Petri grandes, contendo ágar Mueller-Hinton e solução indutora (provida pelo Copy Control™ Fosmid Library Production Kit), os clones foram repicados, com auxílio de repicador de 96 poços, e incubados a 37 °C por 14 h. Para visualização do halo de degradação de amido, adicionou-se solução de iodo como revelador.

Para *screening* de antimicrobianos, em placas de Petri contendo LB ágar e solução indutora, inoculou-se 200 µL de suspensão (10^6 UFC/mL em solução salina a 0,9%) de *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 e aplicou-se a técnica “spread plate”. Em seguida, os clones foram inoculados por cima do revelador (*S. aureus*). A placa foi incubada por 16 h a 37 °C e observou-se quanto à formação de halo de inibição de crescimento em volta dos clones. Da mesma forma, foram realizados ensaios utilizando *Saccharomyces cerevisiae* Y1000 e W303, *Bacillus subtilis* ATCC-168, *Klebsiella pneumoniae* ATCC–10031, e *Salmonella* subsp. *enterica* serovar *Newport* como reveladores, conforme arranjo de 96 poços de placa de Elisa. Este procedimento foi aplicado aos 6.048 clones.

4. RESULTADOS

4.1. Análise de textura e fertilidade do sedimento

Os resultados da análise de textura e fertilidade da amostra composta do sedimento de mangue da baía de Camamu podem ser visualizados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Análise de fertilidade da amostra de sedimento da Baía de Camamu

pH	P	K	Ca	Mg	Ca+Mg	Al	Na	H+Al	S	CTC	V	MO
em H ₂ O	mg/dm ³					cmolc/ dm ³					%	g/Kg
4,1	15	1,05	16,3	5,1	21,4	0,7	20,87	7,59	43,32	50,91	85	62,22

Tabela 2. Composição granulométrica (g/Kg) da amostra de sedimento da Baía de Camamu, com dispersão com NaOH

Muito grossa	Grossa	Média	Fina	Muito fina	Areia Total	Silte	Argila	Classificação
10	35	59	330	291	725	154	121	Franco arenoso

4.2. Extração de DNA

O DNA metagenômico foi isolado da amostra composta do sedimento de Mangue da Baía de Camamu a partir de extração direta e indireta com concentração de 98 ng/μL e 65 ng/μL, respectivamente. A leitura em espectrofotômetro na razão 260/230 nm (que mostra contaminação por matéria orgânica) foi de 0,68 para extração direta e 1,4 para a extração indireta. A leitura

na razão 260/280 nm (que mostra contaminação por proteína) foi 1,2 para extração direta e 1,5 para extração indireta.

4.3. Amplificação e clonagem dos genes de RNA ribossômico 16S

As seqüências dos genes de rDNA 16S foram seletivamente amplificadas por PCR utilizando o DNA metagenômico extraído direta e indiretamente do solo de Mangue coletado na Baía de Camamu (Figura 2).

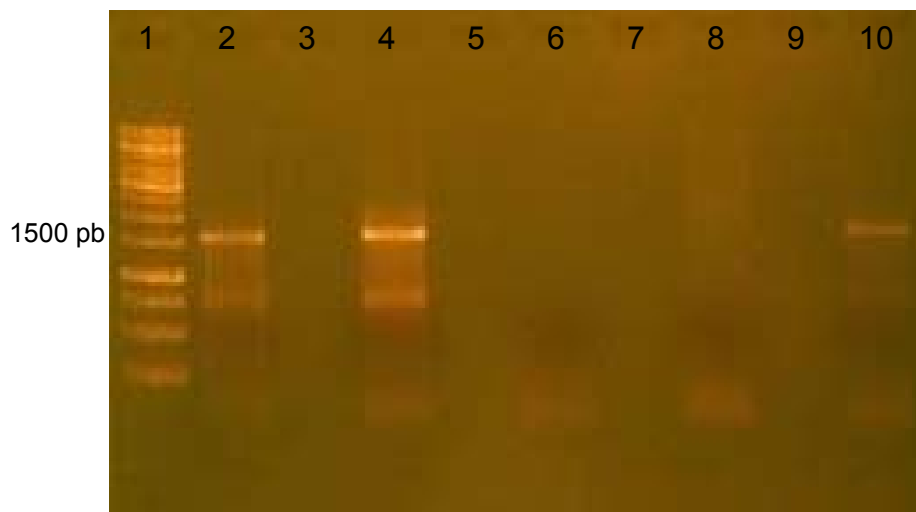


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE 1x dos fragmentos de rDNA 16S amplificados por PCR. Poços: 1. 1,5 μ L do marcador (250-10000pb); 2. PCR com 1 μ L do DNA extraído pelo método indireto; 3. vazio; 4. PCR com 1 μ L do DNA extraído pelo método direto; 5. vazio; 6. Controle negativo; 7. vazio; 8. PCR com 1 μ L do DNA extraído por fervura (dados não mostrados); 9. vazio; 10. Controle positivo (*Salmonella entérica* sorotipo *Rubislaw*).

4.4. Distribuição dos clones

Utilizando *primers* universais para construção das bibliotecas, foram obtidos clones pertencentes aos domínios *Bactéria* e *Archaea*. A Figura 3 mostra a distribuição dos clones entre os diferentes grupos filogenéticos.

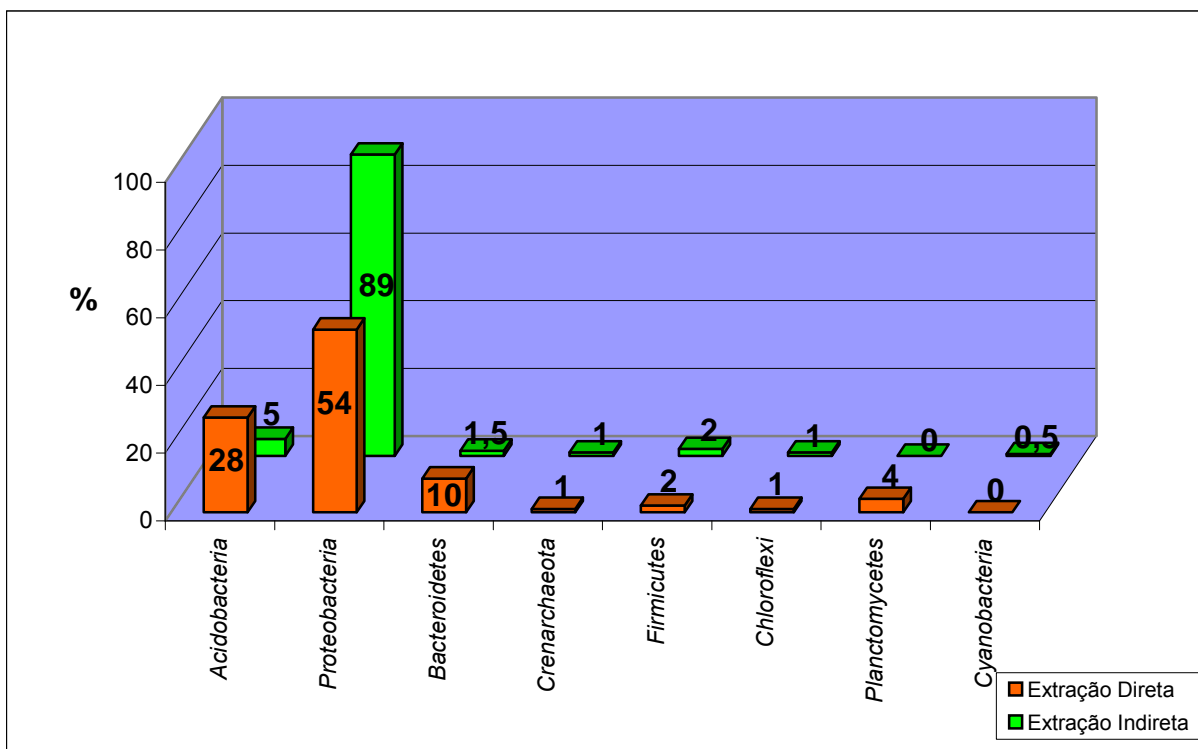


Figura 3. Distribuição dos clones de rDNA 16S obtidos de sedimento de Mangue da Baía de Camamu.

A análise filogenética mostrou 5 grupos do domínio bactéria comum a ambas bibliotecas: *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Chloroflexi*. Um exemplar de *Crenarchaeota* do domínio *Archaea* também foi comum a ambas. Além disso, 25% (aproximadamente) das seqüências não apresentaram similaridade com seqüências conhecidas e não foram classificadas.

Para ambas bibliotecas os filótipos de maior abundância foi de *Proteobacteria*, seguido de *Acidobacteria*.

Dentro das proteobactérias, para a biblioteca construída pelo método direto encontrou-se a seguinte distribuição: 14,3% alphaproteobactéria, 37,5% deltaproteobactéria, 42,9% gammaproteobactéria, 1,8% betaproteobactéria e 3,6% epsilonproteobactéria; para a biblioteca construída pelo método indireto

foram encontrados 0,5% alphaproteobacteria, 1,6% deltaproteobacteria, 94% gammaproteobacteria e 3,7% de betaproteobacteria (Figura 4).

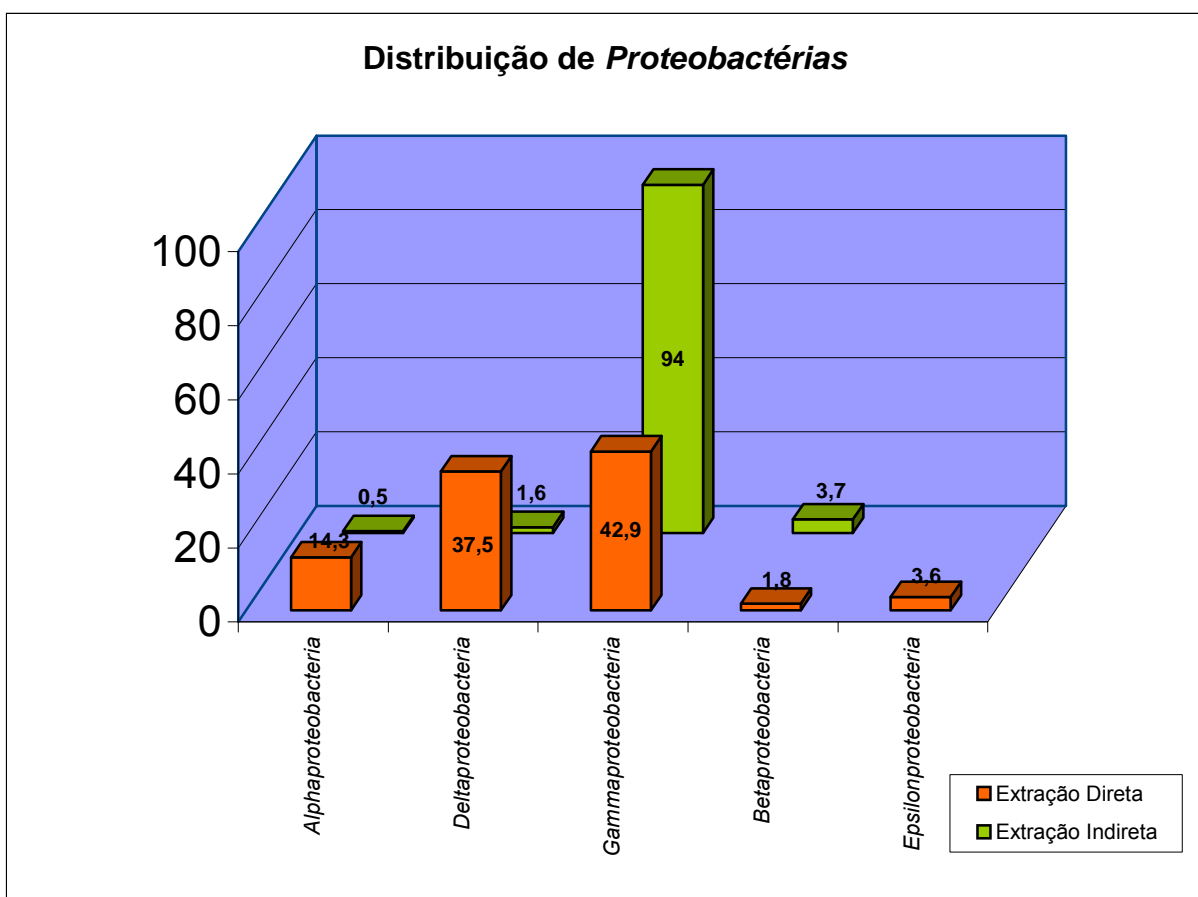


Figura 4. Distribuição dos clones de 16S rDNA obtidos de sedimento de Mangue da Baía de Camamu.

As Figuras 5, 6, 7 e 8 mostram a distribuição dos clones de 16S rDNA em classe, ordem, família e gênero, respectivamente.

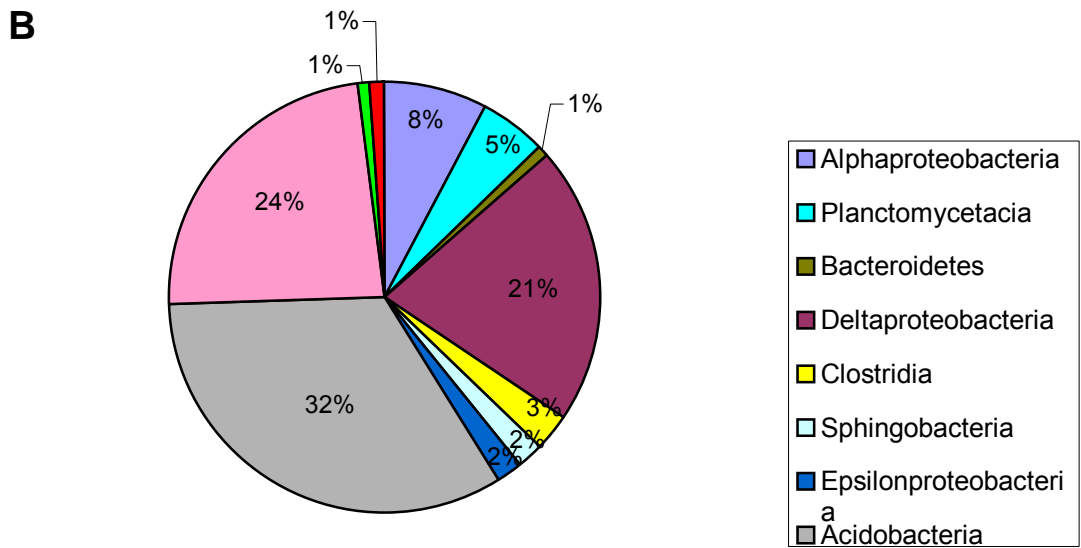
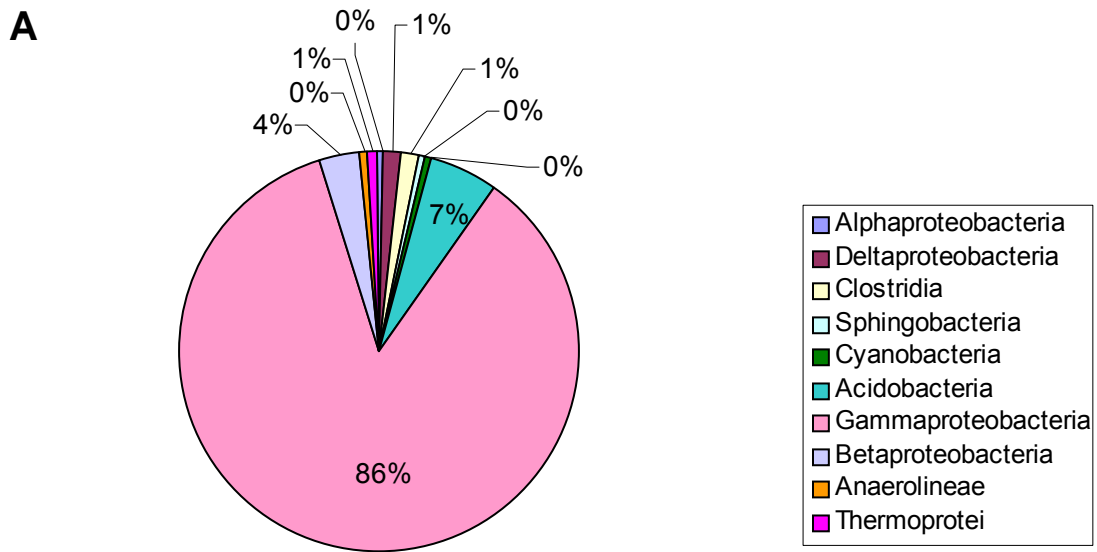
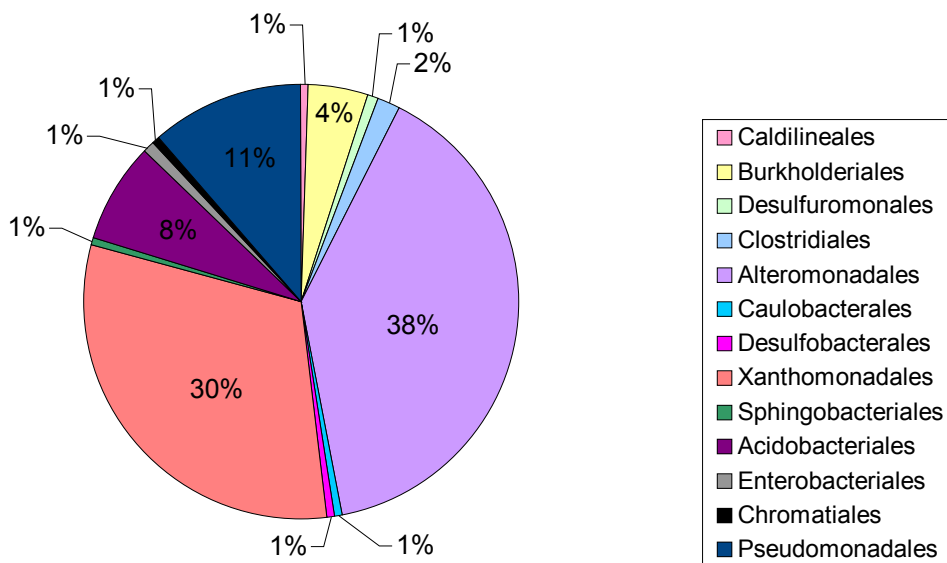


Figura 5. Distribuição em classes dos clones de 16S rDNA obtidos de sedimento de Mangue da Baía de Camamu. A) Extração Indireta; B) Extração Direta.

A



Ordem (Extração Direta)

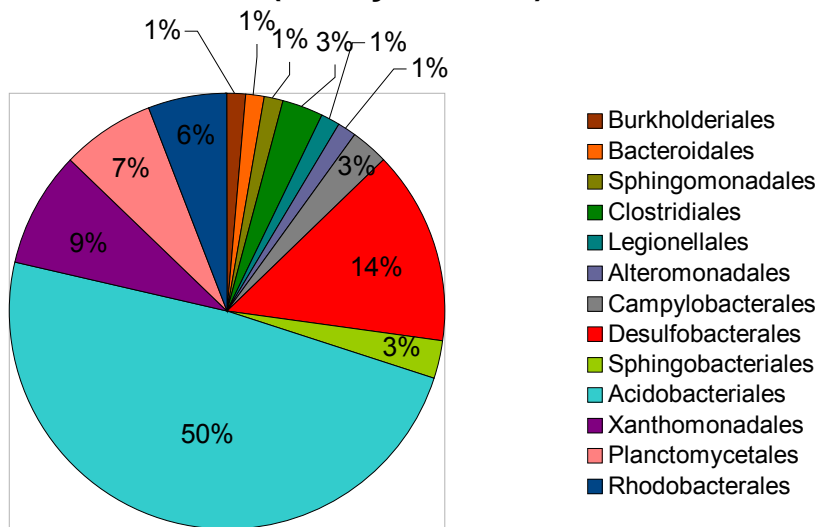


Figura 6. Distribuição em ordem dos clones de 16S rDNA obtidos de sedimento de Mangue da Baía de Camamu. A) Extração Indireta; B) Extração Direta.

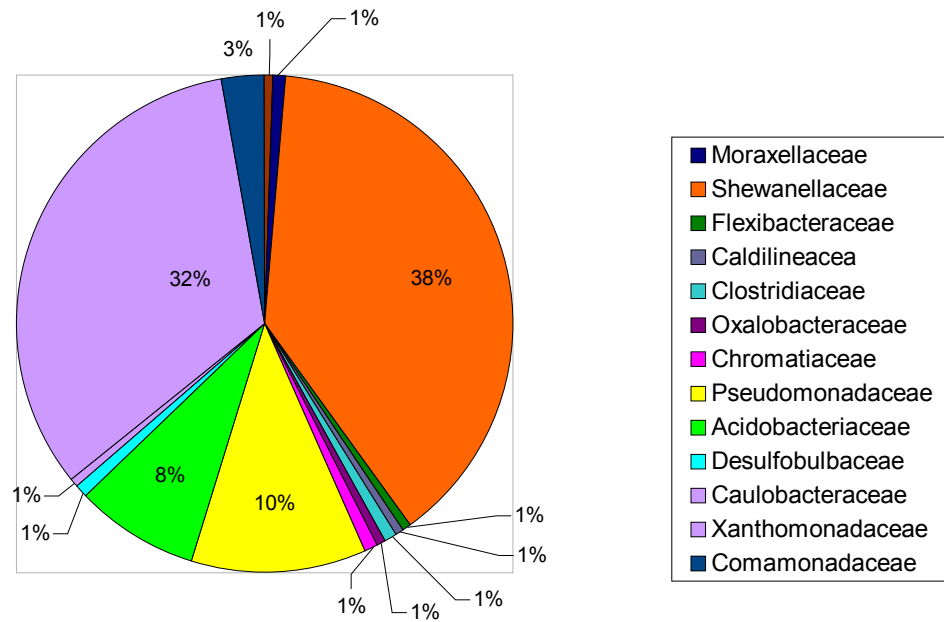
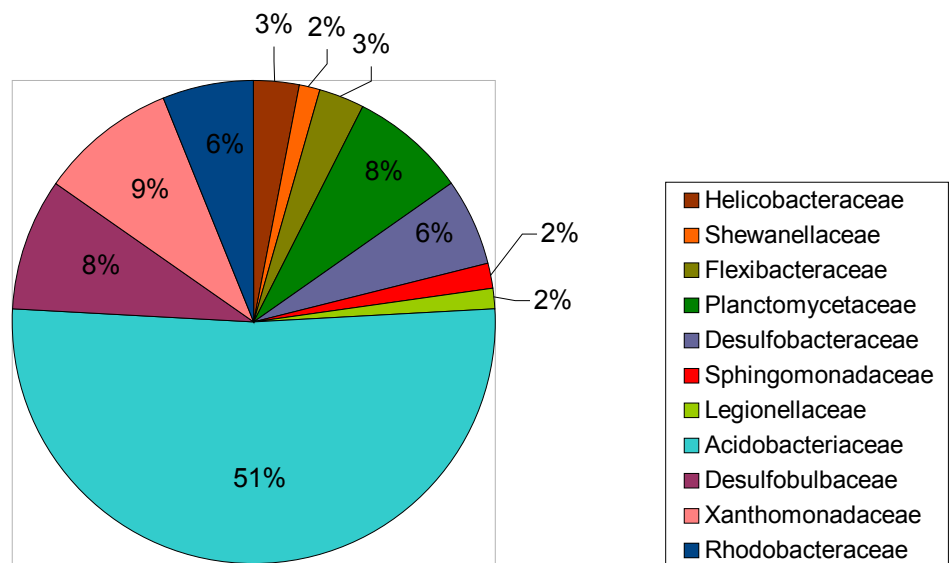
A**B**

Figura 7. Distribuição em família dos clones de 16S rDNA obtidos de sedimento de Mangue da Baía de Camamu. A) Extração Indireta; B) Extração Direta.

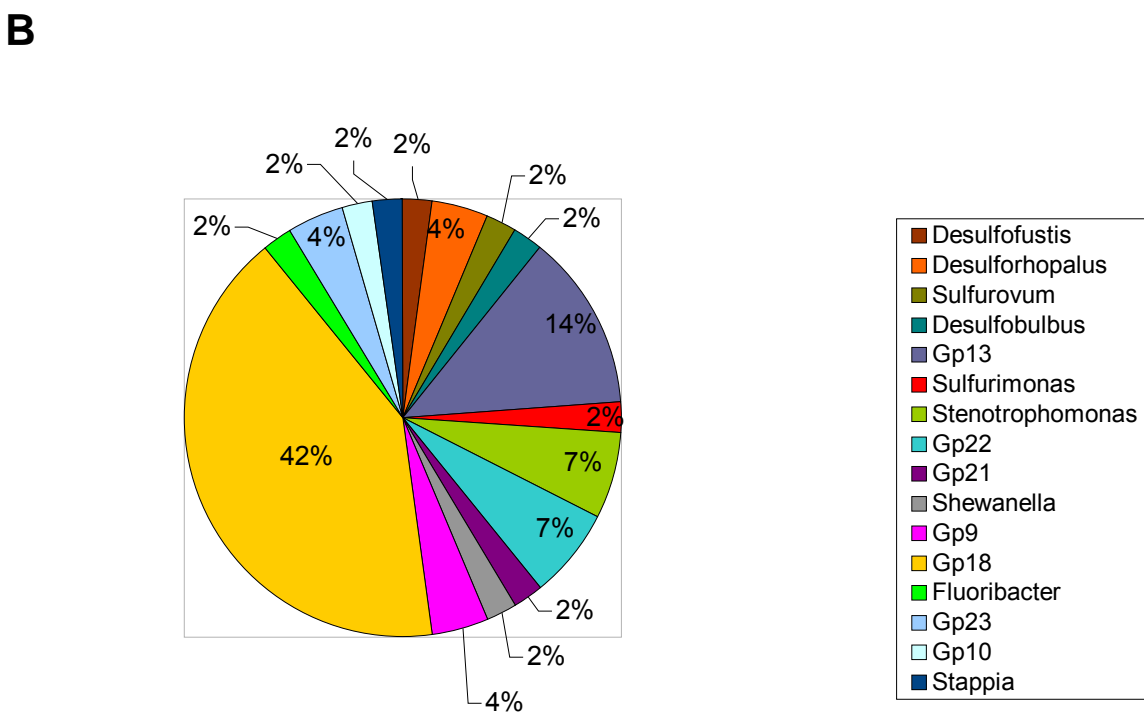
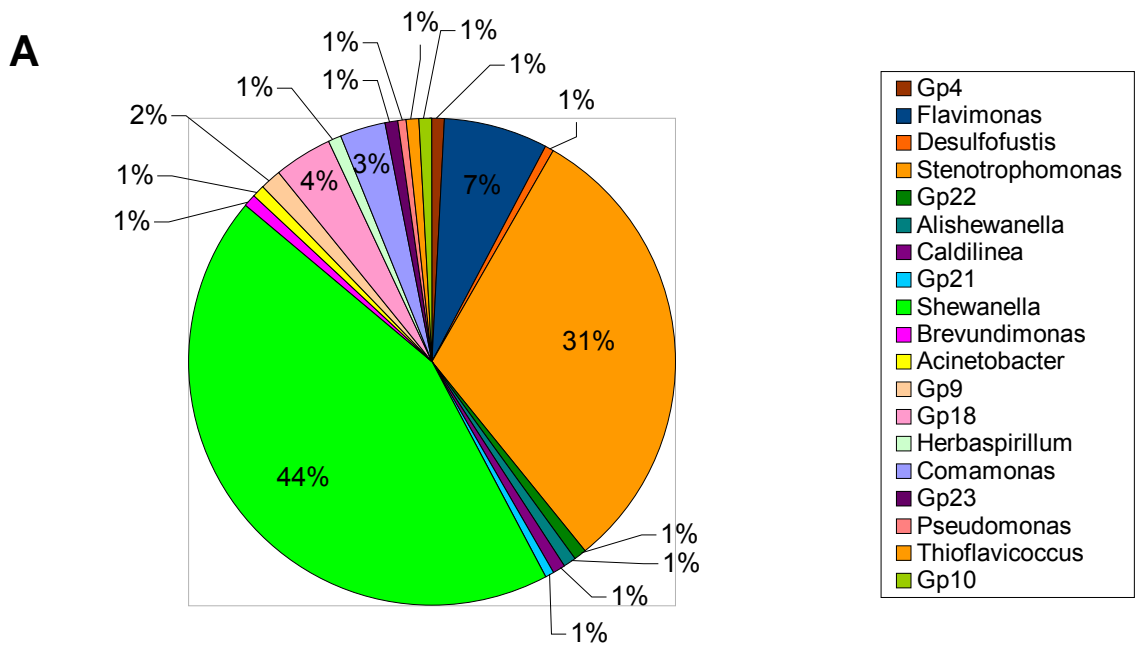
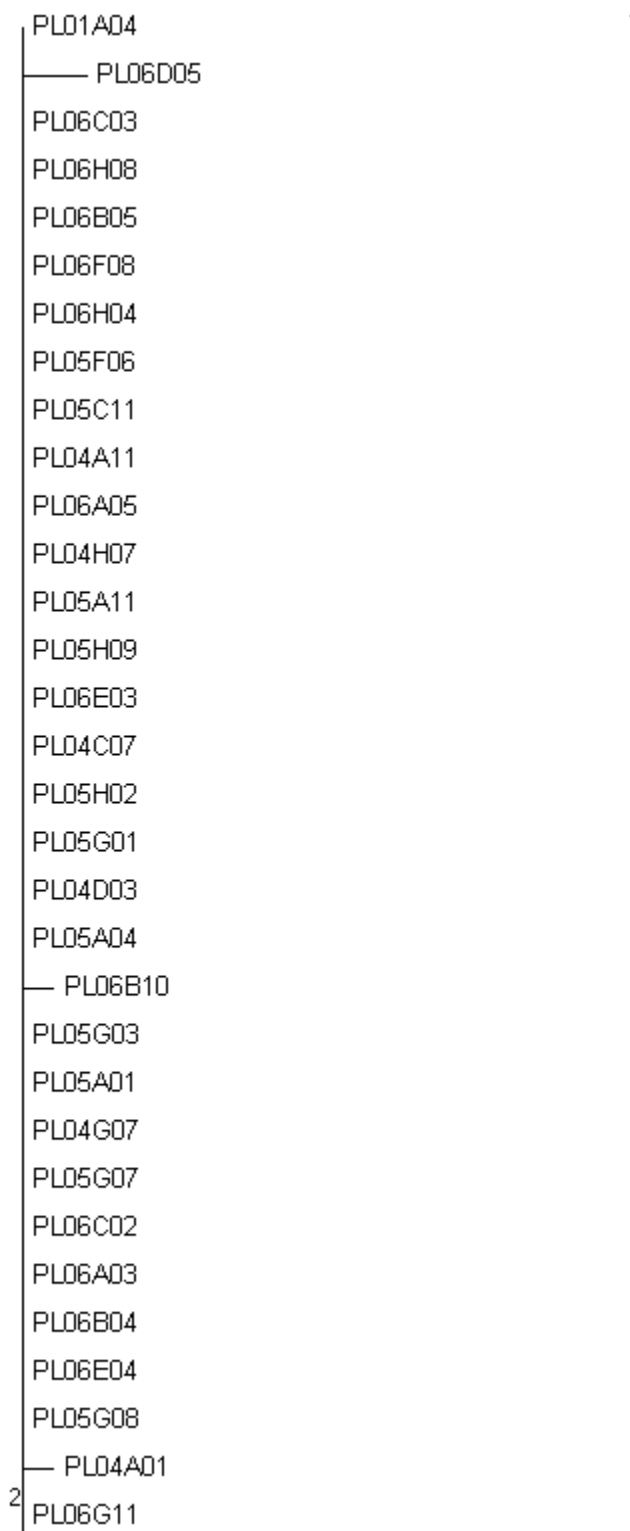
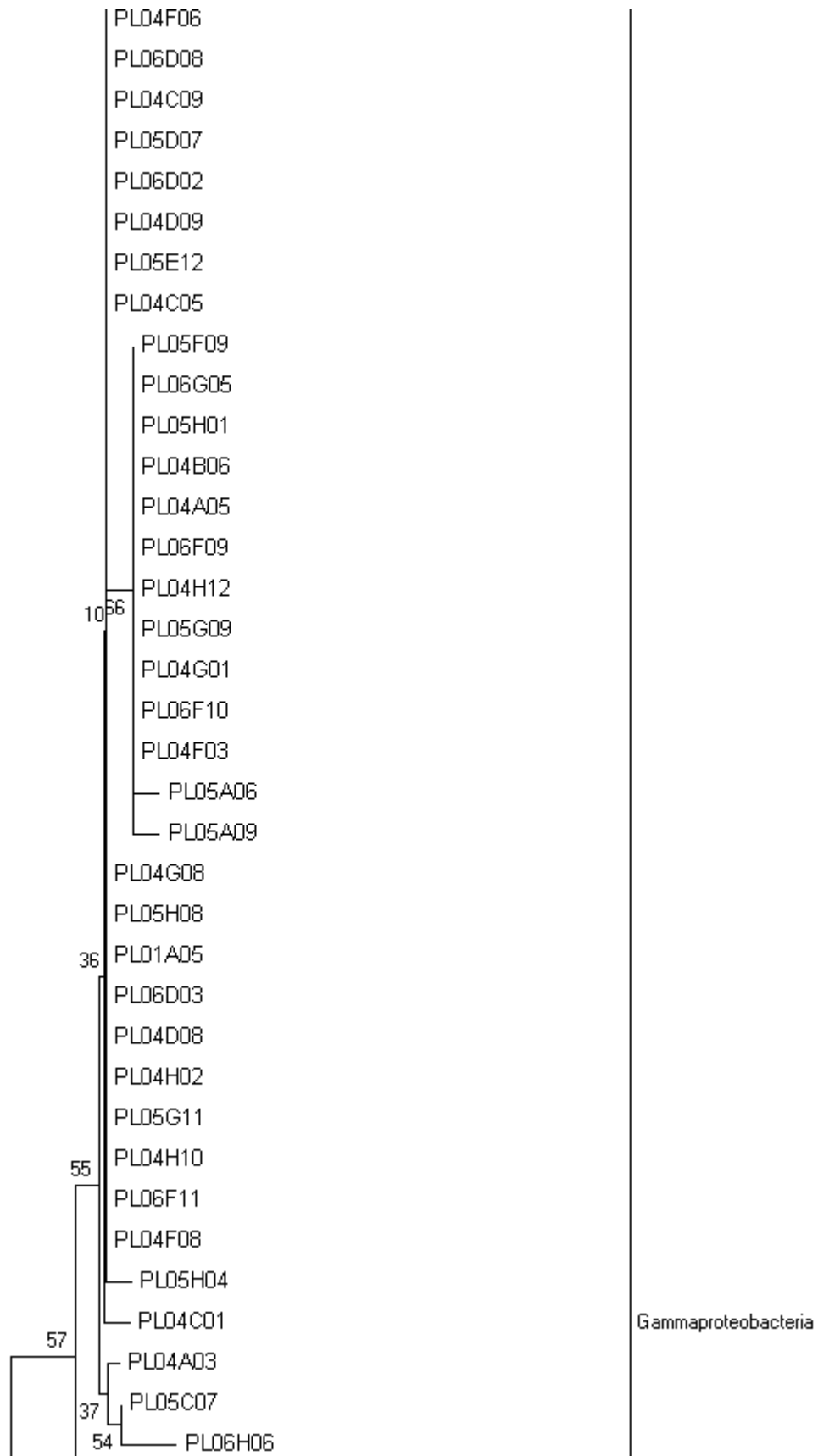
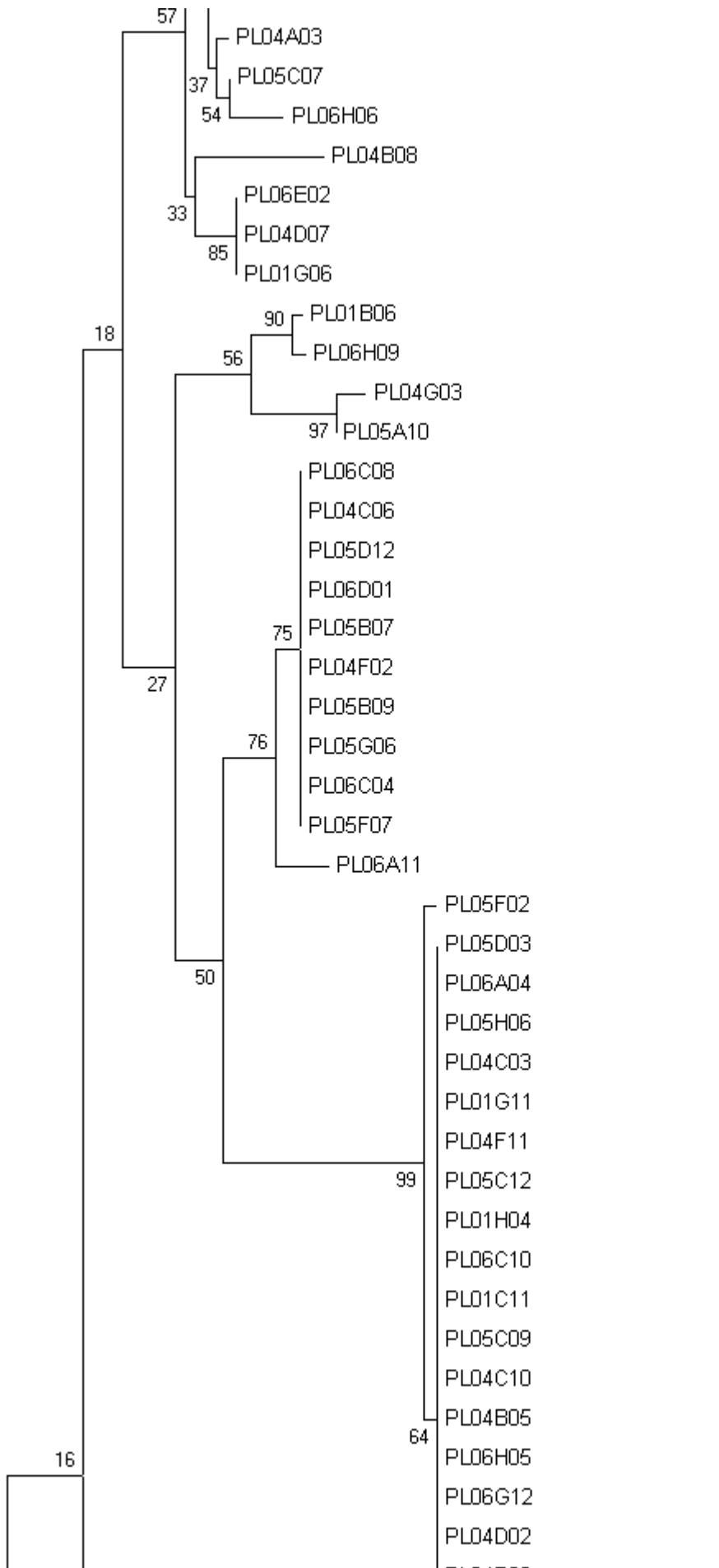


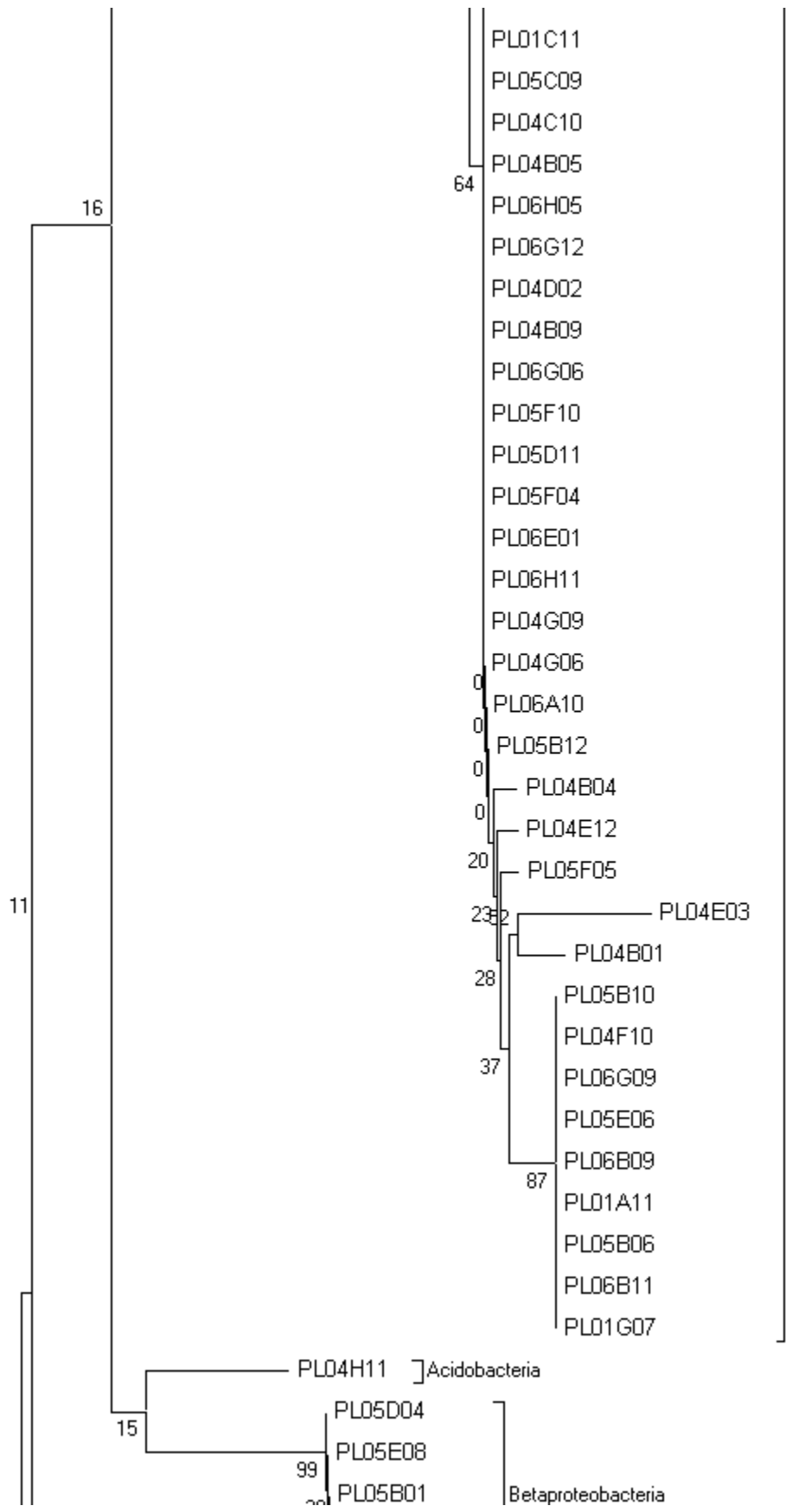
Figura 8. Distribuição em gênero dos clones de 16S rDNA obtidos de sedimento de Mangue da Baía de Camamu. A) Extração Indireta; B) Extração Direta.

As figuras 9 e 10 mostram a árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining das seqüências de RNA 16S de DNA metagenômico de sedimento de Mangue de Camamu.









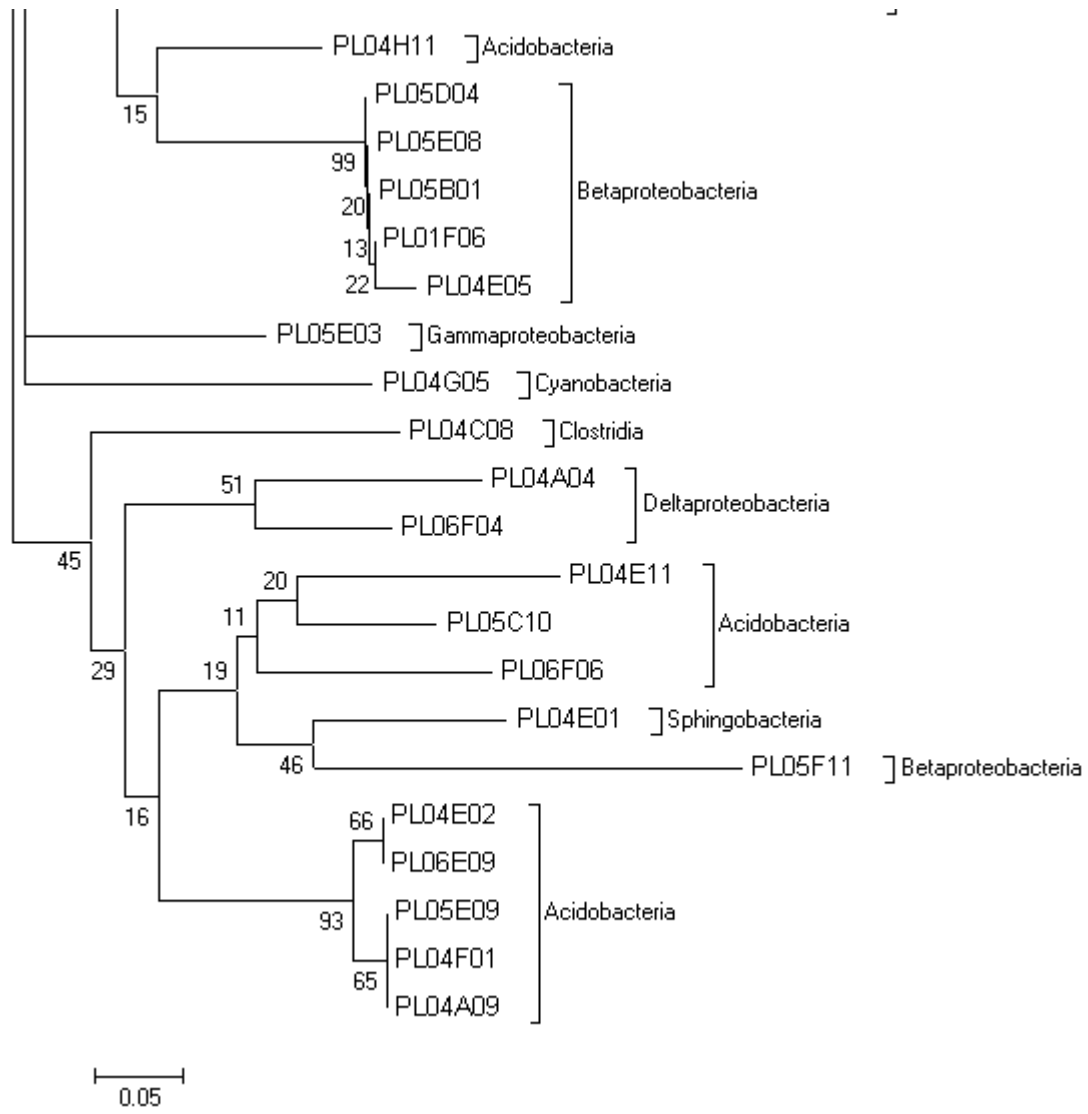
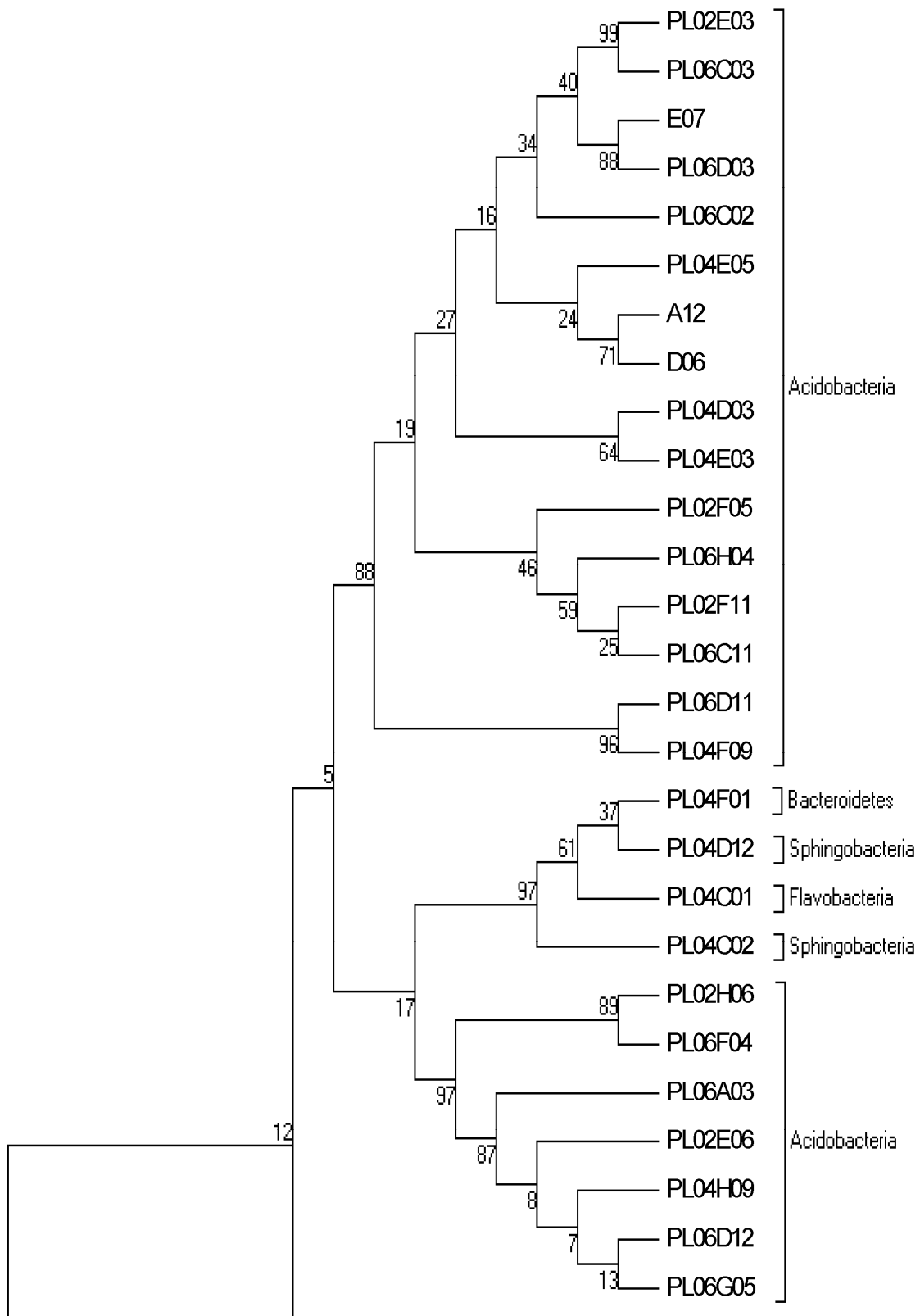
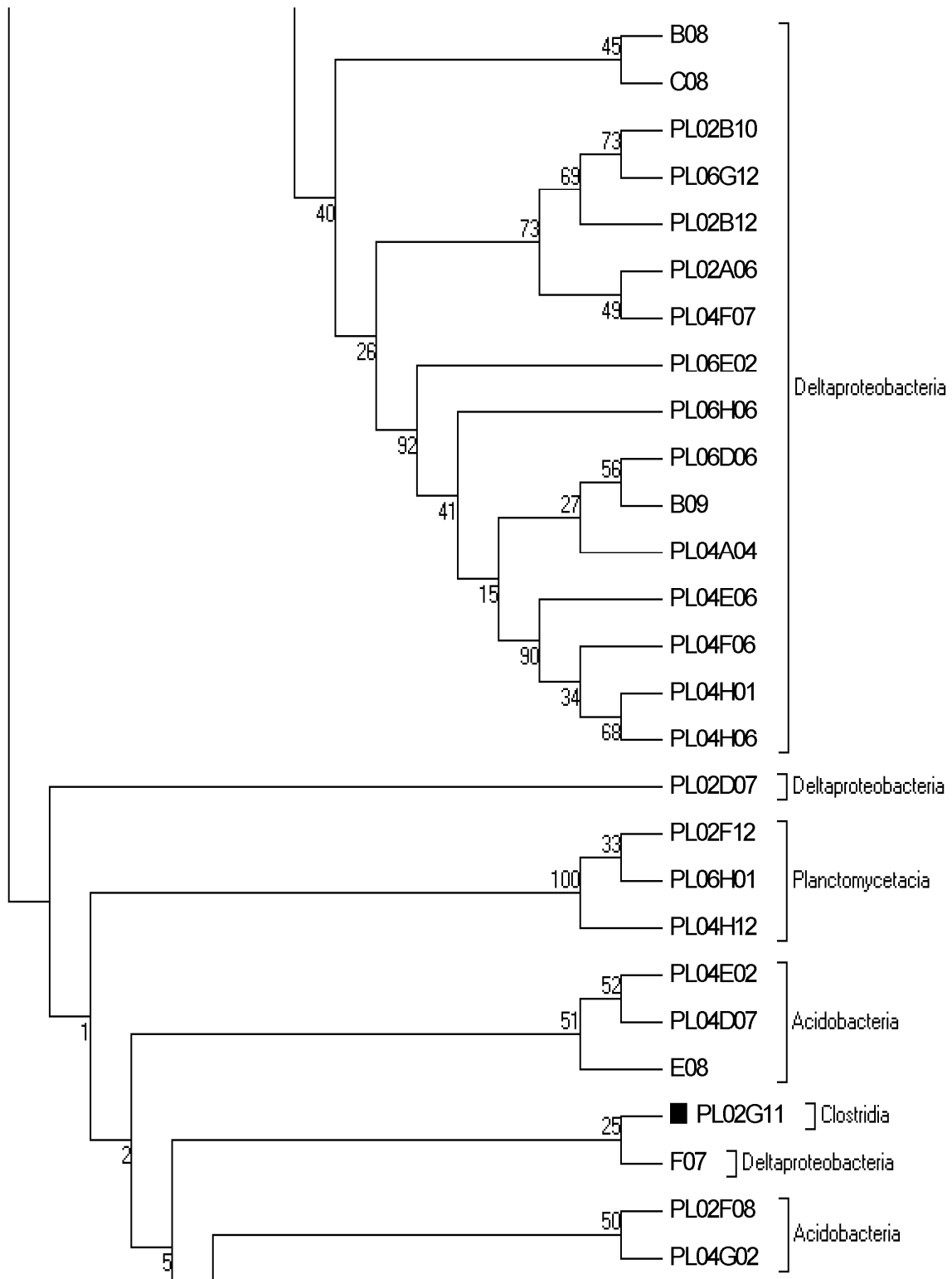


Figura 9. Dendrograma contendo os clones obtidos de DNA metagenômico extraído pelo método indireto.





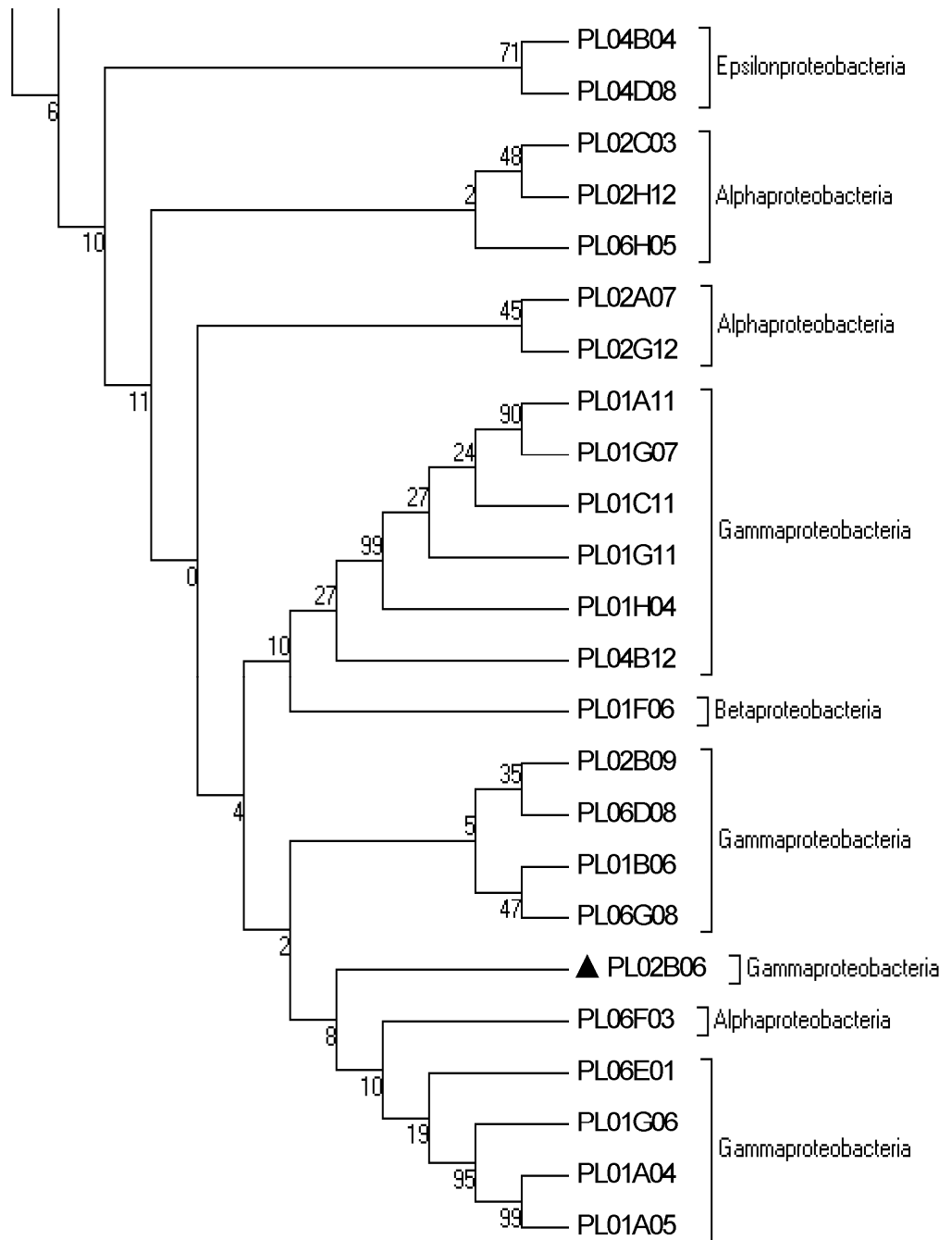


Figura 10. Dendrograma contendo os clones obtidos de DNA metagenômico extraído pelo método direto.

4.5. Construção da biblioteca metagenômica em fósideo

O DNA metagenômico foi isolado do *pool* das amostras de solo de Mangue da Baía de Camamu com *Mega Power Soil™ DNA Isolation Kit* (MOBIO) na concentração de 818 ng/μL (Figura 7). A leitura em espectrofotômetro na razão 260/230 nm foi de 1.265. A leitura na razão 260/280 nm foi de 1.29.

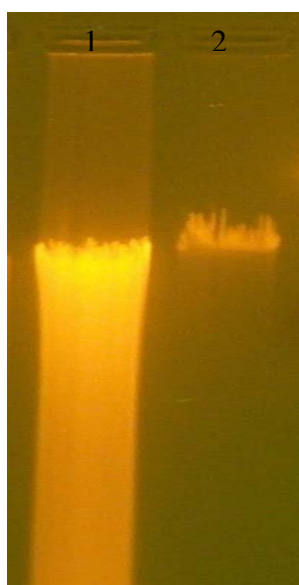


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 0,8% a 50 V/1h. 1. Extração de DNA de Mangue com Kit Mobio (C = 818 ng/μL); 2. Fosmid Copy Control 36 Kbp.

A biblioteca metagenômica construída com o *CopyControl™ Fosmid Library Production Kit* gerou 6.048 clones, dentre estes, alguns foram selecionados aleatoriamente para extração de DNA, e posterior digestão com *NotI*. Esta digestão mostrou que os fragmentos inseridos possuem entre 25-40 Kbp (Figura 8), o que confirma a restrição no empacotamento do fósideo vetor.

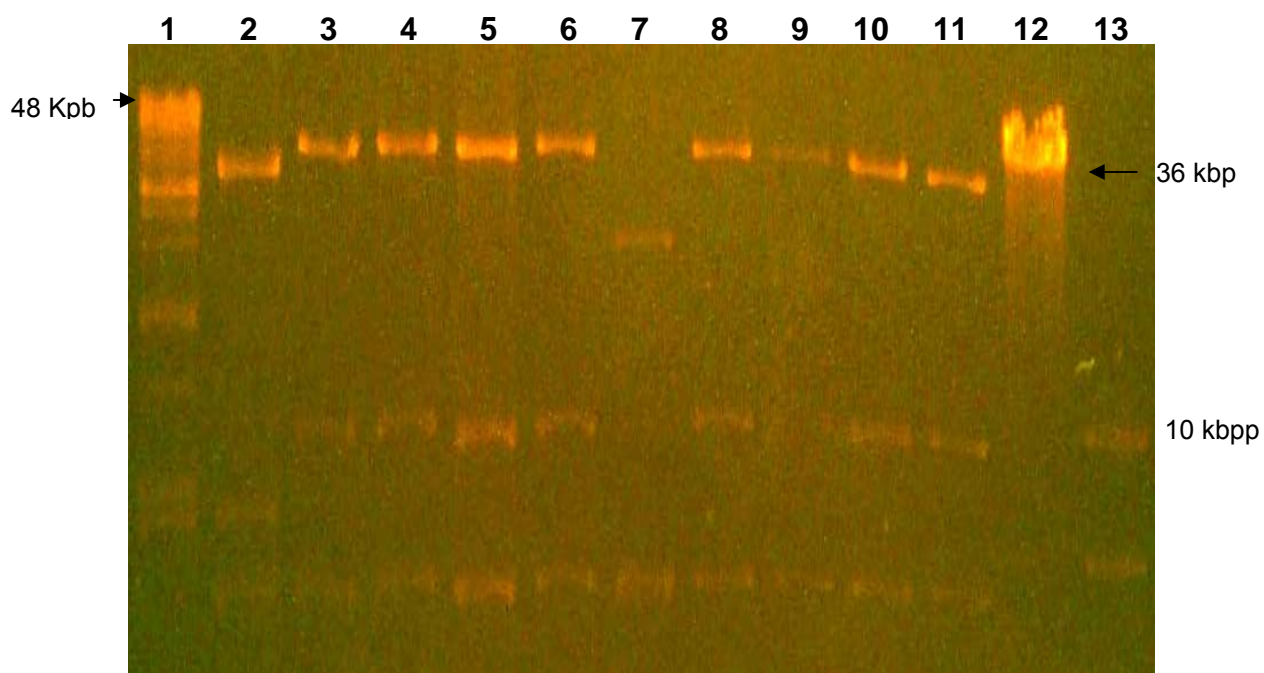


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 0,8% de DNA de fosmídeos da biblioteca de Manguê após restrição com *NotI*. Poços: 1. 0,8 μ L de marcador de alto peso (8-48 Kbp); 2 a 11. Clones digeridos com *NotI*; poço 12. 0,5 μ L Fosmid Control 36 Kbp; poço 13. 1 μ L marcador (250-10.000 pb).

5. DISCUSSÃO

5.1. Diversidade bacteriana de sedimento de mangue da Baía de Camamu

A análise da diversidade procariótica baseada em técnicas que utilizam o rDNA 16S fornece um melhor entendimento da complexidade da comunidade microbiana através da identificação das populações não cultiváveis. O objetivo deste estudo foi determinar a biodiversidade e a estrutura da comunidade microbiana em sedimento de mangue da Baía de Camamu, além de verificar se o método escolhido de extração de DNA interfere na representação da comunidade microbiana.

Um problema relacionado à extração de DNA, principalmente na extração direta, é que ácidos húmicos e outros contaminantes são extraídos junto com o DNA. Desde que estas substâncias podem afetar severamente as análises subsequentes, é crucial que a purificação seja eficiente (FROSTEGARD et al., 1999).

A interferência que muitos constituintes provoca nas moléculas de DNA, inviabiliza reações enzimáticas que são determinantes na construção de uma biblioteca metagenômica, tais como digestão, amplificação e ligação. O ácido húmico desnatura o DNA pela ligação de seus grupos fenólicos a amidas ou por serem oxidados e formarem quinonas que se ligam covalentemente ao DNA (ROBE et al., 2003). A Taq DNA polimerase é especialmente sensível ao ácido húmico e outros inibidores em potencial encontrados no solo. A inibição desta enzima pode inviabilizar amplificações via PCR (WHITEHOUSE; HOTTEL, 2007).

Um resultado igual ou maior que 2 na razão 260/230 nm indica que uma amostra de DNA está livre de contaminação por ácidos húmicos (ROH et al., 2006). O DNA extraído pelo método indireto (1,4) estava menos contaminado que o DNA extraído pelo método direto (0,68). O mesmo pôde ser verificado em relação à contaminação por proteínas, visto que, analisando-se a leitura na razão

260/280 nm, que nos mostra contaminação por proteína, quanto mais próximo ou maior estiver a razão de 1,8, menor será a contaminação (ROH et al., 2006).

Os resultados obtidos com todos os métodos de extração de ácido nucléico são influenciados pela natureza física das células bacterianas, que pode variar entre os grupos e sob diferentes condições, afetando a permeabilidade da sonda de oligonucleotídeo e o sucesso da extração (JANSSEN, 2006). Com relação à concentração e quantidade de DNA produzido, o método de extração direto mostrou um melhor rendimento, o que já era previsto como ROBE et al. (2003).

Resultados de alguns estudos de diversidade bacteriana em amostras ambientais por meio de métodos moleculares indicam que alguns grupos do domínio Bacteria apresentam distribuição cosmopolita, ao passo que outros parecem estar restritos a ambientes particulares (JANNASCH et al., 1992). Além disso, a composição e abundância na representação da comunidade bacteriana, são afetadas pelo método de extração escolhido (MARTIN-LAURENT et al., 2001).

Na análise filogenética, houve uma similaridade na representação dos filos das bibliotecas indireta e direta (*Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Cloroflexi*). Um exemplar de *Crenarcheota* do domínio *Archaea* também foi comum a ambas. Além disso, aproximadamente 25% das seqüências dos clones não apresentaram similaridade com as seqüências depositadas no banco de dados. Estas seqüências podem ser de microrganismos ainda não caracterizados e identificados.

Para ambas bibliotecas os filótipos de maior abundância foi de *Proteobacteria*, o que é comum para muitos ambientes como em solos congelados - *permafrost* - (STEVEN et al., 2007), águas costeiras (GENTILE et al., 2006) e estuários (LIAO et al., 2007). Dentre os papéis desempenhados pelas *proteobacterias* está à participação ativa no ciclo do nitrogênio, o que provavelmente justifica a presença do grande número desses indivíduos no solo de mangue.

Dentro das *proteobacterias*, para a biblioteca construída pelo método direto encontrou-se a seguinte distribuição: 14,3% *alphaproteobacteria*, 37,5%

deltaproteobacteria, 42,9% *gammaproteobacteria*, 1,8% *betaproteobacteria* e 3,6% *epsilonproteobacteria*; para a biblioteca construída pelo método indireto foram encontrados: 0,5% *alphaproteobacteria*, 1,6% *deltaproteobacteria*, 94% *gammaproteobacteria* e 3,7% de *betaproteobacteria*.

A co-dominância e coexistência de *alfa* e *betaproteobacterias* podem ser em decorrência do fluxo entre a água doce e o ambiente marinho, nos quais, as comunidades do bacterioplâncton são dominadas por *betaproteobacteria* e *alfaproteobacteria*, respectivamente (LIAO et al., 2007).

Duas famílias, Rhodobacteraceae e Comononadaceae, cada uma em diferentes classes, têm seus próprios mecanismos de adaptação, o que pode dar vantagens a diferentes nichos ecológicos, dentro de microbiambientes altamente heterogêneos em ecossistemas de mangue (BENT, 2003).

Através do uso de hibridização de genes de rDNA 16S amplificados por PCR, Courtois e colaboradores (2003) encontraram uma diferença significativa no espectro de diversidade da sub classe *gamma* de *Proteobacteria*, o que também ocorreu no presente trabalho.

A análise físico-química da amostra do solo indicou um pH de 4,1, o que classifica o solo como muito ácido ($\text{pH} \leq 4,3$ em CaCl_2). Essa característica justifica a presença de *acidobacterias*, segundo filo mais abundante nas duas bibliotecas analisadas. O filo *Acidobacteria* foi proposto por HIRAIISHI e colaboradores (1995) e possui apenas 3 representantes cultiváveis: *Acidobacterium capsulatum*, *Holophaga foetida* e *Geotrix fermentans*. *A. capsulatum* foi o primeiro representante desse filo e era classificado como uma α -*Proteobacteria* anteriormente. Ele é moderadamente acidofílico, aeróbico e heterotrófico. *H. foetida* e *G. fermentans* por outro lado são organismos estritamente anaeróbicos que fermentam compostos aromáticos e acetato. A maioria das seqüências dos organismos que compõe esse filo tem origem de amostras ambientais e são amplamente distribuídas pelo planeta. Seqüências do gene 16S rDNA desse grupo foram encontradas em várias localidades do mundo como por exemplo na Ásia (MITSUI et al., 1997), na Austrália (LIESACK;

STACKEBRANDT, 1992), nas Américas (BORNEMAN et al., 1996; BORNEMAN; TRIPLETT, 1997) e na Europa (FELSKE et al., 1998). A grande dispersão do filo sugere que ele é um constituinte importante de muitos ecossistemas, particularmente do solo.

Os membros do filo *Bacterioidetes* têm uma cobertura de (0 a 18%) na comunidade bacteriana do solo. Na biblioteca direta obteve-se 10% e na indireta 1,5%. Algumas evidências sugerem que os membros deste filo são sub-representados em bibliotecas de genes rDNA 16S amplificados por PCR (COTTRELL et al., 2000; EILERS et al., 2000).

Os diferentes grupos bacterianos aderem-se mais ou menos forte às partículas do solo (PRIEMÉ et al., 1996), o que pode levar a uma representação parcial da composição da comunidade microbiana da amostra. No presente trabalho não houve diferença significativa entre a representatividade dos microrganismos, isto pode ser devido ao fato da amostra de sedimento de mangue analisada ser francamente arenoso, o que ocasiona uma menor adesão dos microrganismos as partículas do solo.

Além disso, foram encontrados actinobacterias e deltabacterias que têm sido fonte de novas moléculas bioativas (JANSSEN, 2006), o que pode aumentar a chance de encontrar novos compostos na biblioteca construída com DNA de alto peso molecular, em fosmídeo.

5.2. Construção e análise da biblioteca metagenômica em fosmídeo

A clonagem com fragmentos grandes permite aumentar a chance de encontrar novos genes e óperons com aplicação biotecnológica (UCHIYAMA et al., 2005). A biblioteca metagenômica de solo de Mangue, construída com o CopyControl™ Fosmid Library Production Kit gerou 6.048 clones, cada um com um fragmento de DNA com aproximadamente 35 Kbp (Figura 6).

Recentes estudos, usando 32 genomas diferentes e analisando para a presença de sinal de expressão em E.coli. indicou que o nível de expressão metagenômica que pode ser encontrado usando este sistema foi de 40% (GABOR et al., 2004).

Os *screenings* realizados para antimicrobianos e enzimáticos, até o presente momento não identificaram nenhuma atividade em potencial. Esta técnica de *screening* por função é limitada, principalmente pelo fato da função nem sempre ser expressa na célula hospedeira, especialmente quando os genes requeridos para a função não estão agrupados (*clustered*) (RONDON et al., 2000).

6. CONCLUSÕES GERAIS

Foi possível extrair DNA com boa qualidade e concentração, através das duas metodologias (direta e indireta) utilizadas neste trabalho. Além disso, não houve diferença significativa, entre as metodologias aplicadas, na representação da diversidade bacteriana de sedimento de Mangue da Baía de Camamu.

Embora os dados filogenéticos e moleculares coletados neste estudo não possam identificar a função de cada microrganismo no ambiente em estudo, eles são de fundamental importância para o conhecimento da complexidade dos ecossistemas de mangue e pode fornecer subsídios para trabalhos posteriores.

Foi possível construir uma biblioteca metagenômica com DNA de alto peso molecular em fosmídeo e confirmar o tamanho dos fragmentos inseridos, permitindo a realização dos *screenings*, embora nenhuma substância ativa tenha sido encontrada, devido à dificuldade na expressão heteróloga. Como perspectivas futuras pretende-se realizar *screenings* por seqüência.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKKEN, L.R.; LINDAHL, V. Recovery of bacterial cells from soil. **Nucleic acids in the Environment: Methods and Applications**, v. 56, p. 9-27, 1995.

BENT, S.J.; GUCKER, C.L.; ODA, Y.; FORNEY, L.J. Spatial distribution of *Rhodopseudomonas polustris* ecotypes on a local scale. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5192-5197, 2003.

BERTRAND, H.; POLY, F.; VAN, V.T.; LOMBARD, N.; NALIN, R.; VOGEL, T.M.; SIMONET, P. High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 62, p. 1-11, 2005.

BORNEMAN, J.; SKROCH, P.W.; O'SULLIVAN, K.M.; PALUS, J.A.; RUMJANEK, N.G.; JANSEN, J.L.; NIENHUIS, J.; TRIPLET, E.W. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1935-1943, 1996.

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

BUCKLEY, D.H.; SCHMIDT, T. Exploring the diversity of soil - a microbial rain forest. In: Staley, J.T.; Reysenbach, A.L. **Biodiversity of Microbial Life**, p.183-208, 2002.

COTTRELL, M.T.; KIRCHMAN, D.L. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5116-5122, 2000.

COURTOIS, S.; CAPPELLANO, C.M.; BALL, M.; FRANCOU, F.X.; NORMAND, P.; HELYNCK, G.; MARTINEZ, A.; KOLVEK, S.J.; HOPKE, J.; OSBURNE, M.S.; AUGUST, P.R.; NALIN, R.; GUERINEAU, M.; JEANNIN, P.; SIMONET, P.; PERNODET, J.L. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 49-55, 2003.

DAMS, E.; HENDRIKS, L.; VAN DE PEER, Y.; NEEFS, J.M.; SMITS, G.; VANDENBEMPT, I.; WACHTER, R. COMPILATION OF SMALL RIBOSOMAL SUBUNIT RNA SEQUENCES. **Nucleic Acids Research**, V. 16, P. 87-173, 1988.

DANIEL, R. THE SOIL METAGENOME: A RICH RESOURCE FOR THE DISCOVERY OF NOVEL NATURAL PRODUCTS. **Current Opinion in Biotechnology**, V. 15, P.199-204, 2004.

DELONG, E.F.; PACE, N.A. Environmental diversity of bacteria and archaea. **Systematic Biology**, v. 50, n. 4, p. 470-478, 2001.

DOOLITTLE, W. Phylogenetic classification and the universal tree. **Science**, v. 284, p. 2124-2128, 1999.

DUKE, N.C.; MEYNECKE, J.O.; DITTMANN, S. A world without mangroves? **Science**, v. 317, p. 41-42, 2007.

EILERS, H.J.; PERNTHALER, F.O.; GLOCKNER, M.; AMANN, R. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from North Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3044-3051, 2000.

FELSKE, A.; WOLTERINK, A.; VAN LIS, R.; AKKERMANS, A.D.L. Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in a Drentse grassland soils (The Netherlands). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 871–879, 1998.

FROSTEGARD, A.; COURTOIS, S.; RAMISSE, V.; CLERC, S.; BERNILLON, D.; GALL, F.; JEANNIN, P.; NESME, X.; SIMONET, P. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5409-5420, 1999.

GABOR E.M.; ALKEMA, W.B.L.; JANSSEN, D.B. Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 879-886, 2004.

GENTILE, G.; GIULIANO, I.; D'AURIA, G.; SMEDILE, F.; AZZARO, M.; DOMENICO, M.; YAKIMOV, M. Study of bacterial communities in Antarctic coastal waters by a combination of 16S rRNA and 16S rDNA sequencing. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 2150-2161, 2006.

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

GOMES, N.C.M.; BORGES, L.R.; PARANHOS, R.; PINTO, F.N.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.S.; SMALLA, K. Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. **FEMS Microbiology and Ecology**, v. 66, p. 96-109, 2008.

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

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

HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbiology and Ecology**, v. 35, p. 1-21, 1998.

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

HIRAISHI, A.; KISHIMOTO, N.; KOSAKO, Y.; WAKAO, N.; TANO, T. Phylogenetic position of the menaquinone-containing acidophilic chemoorganotroph *Acidobacterium capsulatum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 132, p. 91-94, 1995.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 18, p. 4765-4774, 1998a.

HUGENHOLTZ, P.; PITULLE, C.; HERSHBERGER, K.L.; PACE, N.R. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 366-76, 1998b.

JANNASCH, H.W.; WIRSEN, C.O.; MOLYNEAUX, S.J.; LANGWORTHY, T.A. Comparative physiological studies on hyperthermophilic Archaea isolated from deep-sea hot vents with emphasis on *Pyrococcus* strain GB-D. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 11, p.3472-3481, 1992.

JANSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006.

KAUFFMANN, I.M.; SCHMITT, J.; SCHMID, R.D. DNA isolation from soil samples for cloning in different hosts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 665-670, 2004.

KELLENBERGER, E. Exploring the unknown. The silent revolution of microbiology. **EMBO Reports**, v. 2, p. 5-7, 2001.

KIM, Y. J.; CHOI, G.; KIM, S.B.; YOON, G.; KIM, Y. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. **Protein Expression and Purification**, v. 45, p. 315-323, 2006.

LIAO, P.C.; HUANG, B.H.; HUANG, S. Microbial community composition of the Danshui river estuary of northern Taiwan and the practicality of the phylogenetic method in microbial barcoding. **Microbial Ecology**, v. 54, p. 497-507, 2007.

LIESACK, W.; STACKEBRANDT, E. Occurrence of novel groups of the domain bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian

terrestrial environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 174, p. 5072–5078, 1992.

MACENA, T.N. Análise da biodiversidade metagenômica bacteriana de um solo de Mata Atlântica e isolamento de DNA de alto peso molecular visando aplicações biotecnológicas. (Dissertação de mestrado). **Universidade Estadual de Santa Cruz**, Ilhéus, BA, 2007.

MACIEL, B.M. Estudos prospectivos de microrganismos de solo de *landfarm* com potenciais aplicações em estratégias de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo. (Dissertação de mestrado). **Universidade Estadual de Santa Cruz**, Ilhéus, BA, 2004.

MARTIN-LAURENT, F.; PHILIPPOT, L.; HALLET, S.; CHAUSSOD, R.; GERMON, J. C.; SOULAS, G.; CATROUX, G. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2354-2359, 2001.

MITSUI, H.; GORLACH, K.; LEE, H. J.; HATTORI, R.; HATTORI, T. Incubation time and media requirements of culturable bacteria from different phylogenetic groups. **Journal of Microbiological Methods**, v. 30, p. 103-110, 1997.

MOREIRA, F.M.S; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Ed. UFLA, 729 p, 2006.

NEE, S. More than meets the eye. **Nature**, v. 429, p. 804-504. 2004.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J.G.; GROISMAN, E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v. 405, p. 299-304, 2000.

OLIVEIRA, M.C.O.; QUEIROZ, A.F.S.; ARGOLO, J.L.; ROESER, H.M.P.; ROCHA, S.R.S. Estudo mineralógico do sedimento de manguezal da baía de Camamu-BA. **Revista Escola de Minas**, v. 55, n. 2, p. 22-26, 2002.

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

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

PRIEMÉ, A.; SITAULA J.I.B.; KLEMEDTSSON A.K.; BAKKEN L.R. Extraction of methane-oxidizing bacteria from soil particles. **FEMS Microbiology and Ecology**, v. 21, p. 59-68, 1996.

QUAISER, A.; OCHSENREITER, T.; KLENK, H.P.; KLETZIN, A.; TREUSCH, A.H.; MEURER, G.; ECK, J.; SENSEN, C.W.; SCHLEPER, C. First insight into the genome of an uncultivated crenarchaeote from soil. **Environmental Microbiology**, v. 4, p. 203-611, 2002.

RAAIJMAKERS, J.M.; WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 881-887, 1997.

RAPPÉ, M.S.; GIOVANNONI, S.J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 369-394, 2003.

REISENFELD, C.S.; SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. **Annual Review of Genetics**, v. 28, p. 525-552, 2004.

ROBE, P.; NALIN, R.; CAPELLANO, C.; VOGEL, T.M.; SIMONET, P. Extraction of DNA from soil. **European Journal of Soil Biology**, v. 39, p. 183-190, 2003.

ROH, C.; VILLATTE, F.; KIM, B.G.; SCHMID, R.D. Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from soil and sludges samples. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 134, p. 199-204, 2006.

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

ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

ROSSI, M.; AGUIAR, MATTOS, I.F. Mangrove soils in São Paulo state: physical and chemical characterization. **Revista do Departamento de Geografia**, n. 15, p. 101-113, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 3v.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 303-310, 2003.

SCHMEISSER, C.; STEELE, H.; STREIT, W.R. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 955-962, 2007.

SKOKO, N.; VUJOVIC, J.; SAVIC, M.; PAPIC, N.; VASILJEVIC, B.; LJUBIJANKIC, G. Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strain FAV20 useful in detection of

immunosuppressants produced by soil actinomycetes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 61, p.137-140, 2005.

STEELE, H.; STREIT, W.R. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, p. 105-111, 2005.

STEVEN, B.; BRIGGS, B.; MCKAY, C.P.; POLLARD, W.H.; GREER, C.W.; WHYTE, L.G Characterization of the microbial diversity in a permafrost sample from the Canadian high Arctic using culture-dependent and culture-independent methods. **FEMS Microbiology and Ecology**, v. 59, p. 513–523, 2007.

TREUSCH, A.H.; KLETZIN, A.; RADDAT, G.; OCHSENREITER, T.; QUAISER, A.; MEURER, G.; SCHUSTER, S.C.; SCHLEPER, C. Characterization of large-insert DNA libraries from soil for environmental genomic studies of Archaea. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 970-980, 2004.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGATAD, T.F. Procaryotic diversity: magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v. 296, p.1064-1066, 2002.

UCHIYAMA, T.; ABE, T.; IKEMURA, T.; WATANABE, K. Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 88-92, 2005.

VALERA, F.R. Approaches to prokaryotic biodiversity: a population genetics perspective. **Environmental Microbiology**, v. 4, p. 628-633, 2002.

VAN DE PEER, Y.; CHAPELLE, S.; WACHTER, R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n 17, p. 3381-3391, 1996.

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

ZHANG, I.; BAO, Z.; CHENG, J.; LI, H.; HUANG, X.; WANG, S.; ZHANG, C.; HU, J. Fosmid library constructions and initial analysis of end sequences in Zhikong Scallop (*Chlamys farreri*). **Marine Biotechnology**, v. 9, p. 606-612, 2007.

WARD, D.M.; BATESON, M.M.; WELLER, R.; RUFF-ROBERTS, A.L. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. **Advances in Microbial Ecology**, v. 12, p. 219–286, 1992.

WHITEHOUSE, C.A.; HOTTEL, H.E. Comparison of five commercial DNA extraction kits for recovery of *Francisella tularensis* DNA from spiked soil samples. **Molecular and Cellular Probes**, v. 21, p. 92-96, 2007.

WHITTAKER, R.H. New concepts of kingdoms of organisms. **Science**, v. 163, p. 150-160, 1969.

WRIGHT, G.D. Antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature**, v. 5, p. 175-186, 2007.

WOESE, C.R.; GUTELL, R.; GUPTA, R.; NOLLER, H.F. Detailed Analysis of the Higher-Order Structure of 16S-Like Ribosomal Ribonucleic Acids. **Microbiological Reviews**, v. 47, n. 4, p. 621-669, 1983.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria e Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

YUN, J.; KANG, S.; PARK, S.; YOON, H.; KIM, M.; HEU, S.; RYU, S. Characterization of a novel amilolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 7229-7235, 2004.

YUN, J.; RYU, S. Screening for novel enzymes from metagenome and SIGEX, as a way to improve it. **Microbial Cell Factories**, v. 4, p. 1459-1465, 2005.