

## Bibliotecas metagenômicas de DNA microbiano de solo de Cerrado

Denise O. Guimarães\* (PQ)<sup>1</sup>, Hala Iqbal (PG)<sup>2</sup>, Sean F. Brady (PQ)<sup>2</sup>, Sérgio A. Uyemura (PQ)<sup>1</sup>, Mônica T. Pupo (PQ)<sup>1</sup>. deol@fcrp.usp.br

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Ribeirão Preto – SP – Brasil.

2. The Rockefeller University. New York – NY – USA.

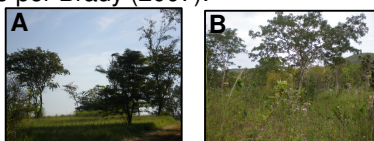
Palavras Chave: DNA ambiental, micro-organismos não cultiváveis, metagenômica, solo, Cerrado.

### Introdução

Metagenoma pode ser entendido como o conjunto de todos os genomas de um determinado ambiente. A metagenômica (técnica que estuda o metagenoma) tem contribuído para a exploração de micro-organismos não cultiváveis por métodos tradicionais em laboratório<sup>1</sup> e baseia-se na clonagem de DNA ambiental (eDNA) para o acesso do conjunto de genomas de uma determinada população microbiana. Essa abordagem envolve a construção de bibliotecas de clones que podem conter informações genéticas relacionadas com a produção de metabólitos secundários bioativos.<sup>2</sup> Neste trabalho é apresentada a construção de bibliotecas de eDNA de solo de cerrado que foram submetidas a dois tipos de *screening*: fenotípico e antibacteriano.

### Resultados e Discussão

Amostras de solos de cerrado (1 kg) foram coletadas em duas diferentes regiões: Ribeirão Preto – SP (solo A) e Pirenópolis – GO (solo B). O eDNA foi extraído e purificado seguindo protocolo descrito por Brady (2007).<sup>3</sup>



**Figura 1. A** – Cerrado de Ribeirão Preto – SP e **B** – Cerrado de Pirenópolis – GO.

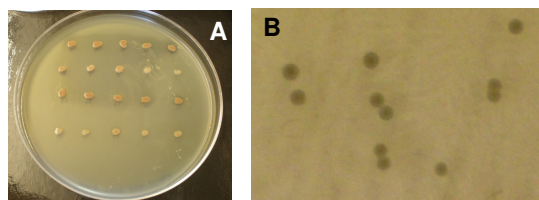
A partir do eDNA do solo A foi construída uma biblioteca de 250.000 clones em cosmídeo pJSS. Essa biblioteca foi submetida à *screening* fenotípico (busca por clones coloridos) e antibacteriano, frente *Bacillus subtilis* (busca por zonas de inibição), utilizando-se dois diferentes hospedeiros: *Escherichia coli* e *Ralstonia metallidurans*.

O eDNA do solo B também foi utilizado para a construção do mesmo tipo de biblioteca que para o solo A, porém o tamanho foi de 500.000 clones. Além dessa, ainda foi possível a construção de uma segunda biblioteca de 250.000 clones utilizando-se cosmídeo pWeb. Ambas as bibliotecas foram submetidas ao mesmo tipo de *screening* utilizando-se os mesmos hospedeiros que para a biblioteca com o solo A.

**Tabela 1.** Número de clones promissores obtidos nas bibliotecas metagenômicas.

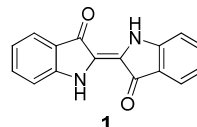
Biblioteca (cosmídeo/hospedeiro)	Clones coloridos	Clones com atividade antibacteriana	Clones bioativos no re-teste antibacteriano
Solo A (pJSS/EC100)	0	0	0
Solo A (pJSS/R. <i>metallidurans</i> )	20	7	7
Solo B (pJSS/EC300)	2	0	0
Solo B (pJSS/R. <i>metallidurans</i> )	12	10	8
Solo B (pWeb/EC300)	6	1	1

\*Frente *Bacillus subtilis*. EC = *Escherichia coli*



**Figura 2. A** – Exemplos de clones coloridos com zonas de inibição frente à *Bacillus subtilis*. **B** – Clone de cor azul proveniente da biblioteca do solo B utilizando pJSS e *Ralstonia metallidurans*.

Os clones que apresentaram coloração e/ou atividade antibacteriana foram cultivados em 50 mL de meio LB por 3 ou 4 dias, 225 rpm, 30 °C. Extratos brutos em acetato de etila foram obtidos após partição líquido-líquido do fluído da cultura em pH~9.0 e pH~3.0. Até o momento foi isolado o indigo (1) a partir do extrato em AcOEt do clone de cor azul (figura 2B) oriundo do solo B.



### Agradecimentos

FAPESP, CAPES, CNPq, The Rockefeller University.

<sup>1</sup> Rajendhran, J.; Gunasekaran, P. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 576.

<sup>2</sup> Banik, J. J.; Brady, S. F. *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, *13*, 603.

<sup>3</sup> Brady, S. F. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1297.