

Isabel de Souza da Cunha

Caracterização e análise funcional da comunidade bacteriana ruminal de caprinos da caatinga brasileira utilizando DNA metagenômico

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Ricardo Henrique Krüger

Co-Orientadora: Dra. Betania Ferraz Quirino

Brasília

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

C972c Cunha, Isabel de Souza da

Caracterização e análise funcional da comunidade bacteriana ruminal de caprinos da caatinga brasileira utilizando DNA metagenômico . / Isabel de Souza da Cunha. – 2010.

157f.; il. : 30 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Brasília, 2010.

Orientação: Ricardo Henrique Krüger

Co-Orientação: Betania Ferraz Quirino

Ficha elaborada pela Biblioteca Pós-Graduação da UCB

07/07/2010

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares e amigos, que sempre estiveram ao meu lado em todos os meus passos.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, fonte de inspiração e sabedoria... Meu Deus, obrigado por tudo e que meu caminho seja guiado por Ti... sempre!

Aos meus queridos pais Minervina Maria de Souza da Cunha e Davidçon Carvalho da Cunha e irmãos Davidson e João Aurélio por terem me dado muito amor, incentivo e coragem em todos os dias desses dois anos, nunca me deixando desistir dos meus objetivos, vocês são minha fonte inspiradora. É com grande satisfação que digo a vocês que concluí um curso de Mestrado. E essa vitória pertence a vocês. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Aos meus orientadores e amigos Dr. Ricardo Henrique Krüger, Dra. Betania Ferraz Quirino e Dra. Cristine Barreto pela oportunidade, dedicação e incentivo à pesquisa durante sua orientação, que me ensinaram a fazer ciência, mostrando caminhos ao invés de meras soluções. Sua perseverança e dedicação para comigo durante todos os momentos ficarão marcados, minhas estimadas considerações e desculpem pelas falhas. Espero que a distância não nos afaste e que possamos fazer vários trabalhos juntos!

Às minhas irmãs e amigas, Thais Lemos, Nídia, Betulia e Julia, que me ajudaram em cada segundo da minha formação tanto pessoal quanto moral. Vocês amigas são para mim anjos que apareceram na minha vida para guiar meus passos! Aprendi e aprendo com a força de vontade, inteligência, carisma e principalmente humildade que vocês sempre me mostraram. Tenho certeza que sempre estaremos juntas, independente da distância. Obrigada por tudo!

As pessoas que fizeram parte intimamente da minha formação, a quem devo muito carinho, Samuel, Jessica, Shelly, Lucas, Maíra, Abdala, João Mendanha, Aline Castro, Alessandra, Janaina, Rodrigo, Ohana e Ida. Eles que com muita paciência, compreensão, companheirismo indubitável durante todo o meu mestrado me ensinaram a ser eu mesma, a gostar mais ainda da Microbiologia e fizeram parte diretamente na minha formação, a vocês devo muito respeito e carinho. Sempre estiveram ao meu lado, me adotando nos momentos mais difíceis e nos mais alegres! Contarei nossas histórias sempre com muito carinho, amor e humor. Obrigada por tudo! Sentirei falta de todos, estão marcados na minha vida para todo sempre.

A todos os meus amigos do Laboratório de Ciências Genômicas e Biotecnologia, Matthias, Milena, Barbara, Felipe, Tainá, Virgilio, Ciro, Ricardo, Viviane e Raquel, obrigada pela amizade e pelo apoio que me deram para a realização desse trabalho! Á vocês amigos devo enorme gratidão. Tenho orgulho por ser amiga de vocês! Nossa amizade me fez crescer muito! Obrigada!

A todos meus amigos do Laboratório CAPB que me adotaram! Muito obrigada por tudo, pelo companheirismo e amizade. Adoro vocês!

A todos os professores da Universidade Católica de Brasília do curso de Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia. Ao coordenador do curso o Prof. Dr. Ruy Caldas, que sempre me incentivou a pesquisa, me encorajando e me parabenizando por cada passo dado. Não esquecerei jamais de todos seus ensinamentos.

Aos funcionários do campus da Universidade Católica de Brasília do campus II pelo apoio, principalmente meus grandes amigos do Laboratório de Informática Carlos Eduardo e Udson que me ajudaram e incentivaram na confecção desta dissertação. Muito obrigada por tudo.

Aos meus colegas de sala pelos conhecimentos compartilhados.

Á banca por suas considerações.

Enfim a todos que contribuíram direta, ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

“Não se pode fazer tudo em uma hora, em um dia. Precisamos de tempo e amor para superar os obstáculos.”
Emmanuel

RESUMO

Referência: Cunha, I.S. Título: Caracterização e análise funcional da comunidade bacteriana ruminal de caprinos da caatinga brasileira utilizando DNA metagenômico. 2010. pg. 170. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia)- Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2010.

Metagenoma refere-se à estrutura genética coletiva e funcional de uma comunidade microbiana. A riqueza e composição da comunidade microbiana do rúmen têm sido estudadas por técnicas de amplificação e sequenciamento dos genes que codificam o RNA ribossomal 16S/18S. Apesar dos inúmeros trabalhos sobre a microbiota de diferentes tipos de ruminantes, poucos estudos utilizaram técnicas moleculares independentes de cultivo para estudar o rúmen caprino. A clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA são considerados métodos eficientes para estudar a diversidade bacteriana em amostras naturais pois, permitem a determinação da riqueza bacteriana em diferentes ambientes e a identificação filogenética de organismos ainda não cultivados. A maior parte da digestão da dieta natural dos ruminantes é realizada no rúmen pela comunidade microbiana, por meio de enzimas hidrolíticas. Neste trabalho, a comunidade de bactérias presentes nas frações líquida e sólido-aderida do rúmen de caprinos da raça Moxotó foram caracterizadas através da construção e sequenciamento de clones de uma biblioteca 16S rDNA. Para a biblioteca 16S rDNA, aproximadamente 400 sequências não quiméricas e maiores que 400 pb foram obtidas para cada biblioteca. As curvas de rarefação para as bibliotecas 16S rDNA bacterianas atingiram um platô a nível de distância evolutiva de 15%, indicando que para este nível, o esforço amostral foi suficiente para cobrir a diversidade existente. Sequências de bactérias pertencentes aos filos Bacteroidetes, Firmicutes, TM7, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Lentisphaerae e Proteobacteria foram identificadas, sendo que as classes dominantes foram *Clostridia* e *Bacteroidia*. Com esses resultados, pôde-se concluir que a comunidade microbiana do rúmen da raça Moxotó é similar à encontrada em outros ruminantes. Porém, encontrou-se diferença na riqueza entre as duas frações, demonstrando que a comunidade bacteriana aderida ao material vegetal e a encontrada na fração líquida ruminal são distintas. Para explorar o potencial metabólico desta comunidade, foi construída uma biblioteca metagenômica de expressão de pequenos insertos da fração sólido-aderida (com média de inserto de 5kb) com aproximadamente

50.000 clones. Para a validação desta biblioteca metagenômica foi feita uma biblioteca 16S rDNA a partir da biblioteca metagenômica já construída. Com o estudo da riqueza bacteriana pôde-se comprovar a presença de filos já esperados para o rúmen, com a predominância dos filos Bacteroidetes e Firmicutes. Com o intuito de comprovar o potencial metabólico da comunidade bacteriana presente no rúmen caprino, foi realizada a bioprospecção da biblioteca metagenômica para atividade amilolítica. De um total de 2.670 colônias pesquisadas, 11 clones com atividade amilolítica e com padrões de restrição enzimática do DNA plasmidial distintos foram identificados. Um destes clones com inserto de cerca de 5 kb foi escolhido para sequenciamento (Ra33). O inserto deste clone foi subclonado e seus fragmentos sequenciados por *primer walking*. Até o presente momento 74% do clone foi sequenciado. Com os resultados obtidos da validação e do potencial metabólico pôde-se concluir que a biblioteca gerada possui a riqueza de filo esperada para uma amostra ruminal demonstrando que a metodologia de extração utilizada foi satisfatória. A biblioteca metagenômica de pequenos insertos construída neste trabalho poderá ser utilizada para bioprospecção de genes com outras atividades de interesse biotecnológico, incluindo genes codificadores de antimicrobianos e outras atividades hidrolíticas como lipases, proteases e celulases.

Palavras-chave: Rúmen, Caprinos, Metagenoma, Gene ribossomal 16S, Amilase.

ABSTRACT

Metagenome refers to the collective genetic structure and functional composition of a microbial community from a specific. The richness and composition of the rumen microbial community has been studied using amplification and sequencing of genes encoding the ribosomal rRNA 16S / 18S. Despite numerous studies on the microbiota of different types of ruminants, few studies have used culture-independent molecular techniques to study the goat rumen. Cloning and sequencing of 16S rRNA are considered effective methods to study bacterial diversity in environmental samples as it allows determination of the wealth of species in different environments and the phylogenetic identification of not yet cultured organisms. Most of the digestion of the natural diet of ruminants is carried out by the rumen microbial community, by hydrolytic enzymes. In this work, the bacterial community present in the liquid and solid-adhered fractions of the rumen of Moxotó goats were characterized by constructing and sequencing clones from a 16S rDNA library. For the 16S rDNA library, approximately 400 non-chimeric sequences and greater than 400 bp were obtained for each library. Rarefaction curves for the bacterial 16S rDNA libraries have reached a plateau level of evolutionary distance of 15%, indicating that for this level, the sampling effort was sufficient to cover the diversity. We identified sequences of bacteria belonging to the phyla Bacteroidetes, Firmicutes, TM7, Verrucomicrobia, Actinobacteria, and Proteobacteria Lentisphaerae, and the ruling classes were *Clostridia* and *Bacteroidia*. With these results, it was concluded that the rumen microbial community Moxotó is similar to that found in other ruminants. However, there was difference in bacterial diversity between the two fractions, demonstrating that the bacterial community attached to the plant material and that found in the rumen liquid fraction are different. To explore the metabolic potential of this community a small insert (approx. 5 kb) metagenomic expression library of about 50,000 clones was constructed. To validate this library, a metagenomic 16S rDNA gene library was constructed using the library DNA as template. Phyla already expected for the rumen were identified, with a predominance of Bacteroidetes and Firmicutes. In order to prove the metabolic potential of bacterial community present in goat rumen, the metagenomic expression library was screened for amylase activity. Of a total of 2,670 colonies surveyed, eleven clones with amylolytic activity that carried plasmids with distinct patterns when digested with restriction enzyme were identified. One of these clones with an insert of about 5 kb was chosen for sequencing (Ra33). The insert of this clone

was subcloned and its fragments sequenced by primer walking. To date, 74% of the clone was sequenced. The results of the library validation and metabolic potential library screening experiments led to the conclusion that the library generated contained the expected phyla associated with rumen showing that the extraction methodology used was satisfactory. The small insert metagenomic expression library constructed in this work can be used for screening other activities of biotechnological interest, including genes encoding antimicrobial activities and hydrolases such as lipases, proteases and cellulases.

Key words: Rumen, Goats, Metagenomic, 16S gene, Amylase.

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação dos ecossistemas brasileiros. Fonte: IBGE, 2010.	32
Figura 2 - Estrutura secundária da subunidade menor do RNA ribossômico.	39
Figura 3 - Projeto Conservação das raças de caprinos nativas do Nordeste do Brasil - Sobral, CE.....	43
Figura 4 - Fêmeas da Raça Moxotó pertencentes ao projeto Conservação das raças de caprinos nativas do Nordeste do Brasil.	44
Figura 5 - Mapa do vetor pGEM-T Easy Vector System I.....	46
Figura 6 - Análise em gel agarose 0,8% da amostra de DNA metagenômico da fração sólido-aderida.	49
Figura 7 - Análise em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR 16S rDNA obtidos de DNA das frações líquida e sólido-aderida.	50
Figura 8 - Placa contendo clones da biblioteca 16S rDNA de rúmen de caprinos.....	51
Figura 9 – Análise em gel de agarose 0,8% de miniprep de clones 16S aleatórios da fração líquida e fração sólido-aderida, para utilização no sequenciamento.	52
Figura 10 - Riqueza bacteriana da biblioteca 16S rDNA para a fração sólido-aderida. .54	
Figura 11 - Riqueza bacteriana da biblioteca 16S rDNA da fração líquida.	55
Figura 12 – Gráfico mostrando a riqueza bacteriana a nível de classe encontrada nas amostras ruminais.....	56
Figura 13 – Gráfico mostrando a riqueza bacteriana a nível de gênero encontrada nas amostras ruminais.....	56
Figura 14 - Árvore filogenética obtida a partir das sequências 16S rDNA obtidas da fração líquida e da fração sólido-aderida.....	58
Figura 15 - Árvore filogenética obtidas a partir das sequências 16S rDNA obtidas do rúmen de caprinos da fração líquida (RuLiq).....	61
Figura 16 - Árvore filogenética obtidas a partir das sequências 16S rDNA obtidas do rúmen de caprinos da fração sólido – aderida (Rusol).	64
Figura 17 - Curvas de rarefação geradas pelo programa DOTUR.	68

Figura 18 – Gráfico mostrando o resultado da comparação do J-Libshuff.....	69
Figura 19 - Fêmea da raça Moxotó pertencente ao projeto de conservação das raças de caprinos nativas do Nordeste do Brasil. EMBRAPA - Caprinos.	96
Figura 20 - Esquema da metodologia para a construção da biblioteca de pequenos insertos do DNA total do rúmen caprino.....	99
Figura 21 - Mapa do vetor de clonagem <i>pCF430</i>	100
Figura 22 - Mapa do vetor <i>pCF430</i> mostrando o promotor P _{BAD}	100
Figura 23 - Mapa do vetor de clonagem <i>pUC19</i>	104
Figura 24 – Análise em gel de agarose 0,8% de DNA extraído da fração sólido-aderida do rúmen.....	107
Figura 25 - Análise em gel de agarose 0,8% do DNA total purificado e digerido por <i>Pst</i> I.....	108
Figura 26 - Análise em gel de agarose 0,8% de DNA plasmidial de clones aleatórios da biblioteca de pequenos insertos de DNA ruminal da fração sólido-aderida.....	110
Figura 27 – Análise em gel de agarose 0,8% do padrão de digestão do DNA plasmidial de clones pertencentes a biblioteca de pequenos insertos.	111
Figura 28 - Grupos filogenéticos encontrados na biblioteca de pequenos insertos de rúmen de caprinos segundo análise de 16S rDNA.	113
Figura 29 - Comparação dos grupos filogenéticos através dos resultados gerados pela biblioteca 16S rDNA feita com a fração líquida e sólido – aderida (capítulo 1) e a validação da biblioteca de pequenos insertos.....	113
Figura 30 – Clones apresentando halo indicativo de atividade amilolítica em placa LB ágar com amido 0,5% corada com iodo.	115
Figura 31 – Análise em gel de agarose 0,8% do padrão de restrição enzimático com <i>Pst</i> I do DNA plasmidial dos clones com atividade amilolítica para confirmar a inserção dos fragmentos no plasmídeo.....	116
Figura 32 –Retransformação para confirmação da estabilidade do fenótipo amilolítica.	117

Figura 33 - Comparação da atividade clone Ra33. O controle positivo sendo <i>E. coli</i> EPI 300 + vetor <i>pCF430</i>	118
Figura 34 – Análise em gel de agarose 0,8% da digestão do clone Ra33 com a enzima <i>Pst</i> I.	118
Figura 35 – Análise em gel de agarose 0,8% da digestão dos vetores <i>pCF430</i> e <i>pUC 19</i> com a enzima <i>Pst</i> I a serem utilizados para clonagem de fragmentos.	119
Figura 36 – Análise em gel de agarose 0,8% da digestão dos subclones com a enzima <i>Pst</i> I par a confirmação da inserção dos fragmentos.	120
Figura 37 - Comparação da atividade entre o subclone Ra33P e Ra33 G.....	121
Figura 38 - Resultado da montagem das sequências para o subclone Ra33 P através da combinação das sucessivas rodadas de sequenciamento.....	122
Figura 39 - Resultado da busca por similaridade para o subclone Ra33 P para as sequências geradas utilizando os primer Forward e Reverse, através da ferramenta BLASTn..	124
Figura 40 - Resultado da montagem das sequências para o subclone Ra33 G através da combinação das sucessivas rodadas de sequenciamento.....	125
Figura 41 - Resultado da busca por similaridade para o subclone Ra33 G para as sequências geradas utilizando os primer Forward, através da ferramenta BLASTn....	126
Figura 42 - Resultado da busca por similaridade para o subclone Ra33 G para as sequências geradas utilizando os primer reverse, através da ferramenta BLASTn.....	127
Figura 43 – Esquema mostrando o alinhamento das sequências das pontas do <i>pCF430</i> Ra33 com as sequências já obtidas dos subclones.	128
Figura 44 - Esquematização do processo de sequenciamento do clone Ra33. O esquema está sendo ilustrado no vetor de origem <i>pCF430</i>	129

Índice de Tabelas

Tabela 1- Tabela de caracterização dos clusters de sequências para a fração Sólido-aderida e líquida.....	65
Tabela 2- Bactérias do rúmen fermentadoras de carboidratos estruturais.....	87
Tabela 3- Bactérias do rúmen fermentadoras de carboidratos não estruturais.....	88
Tabela 4 - Sequências dos primers utilizados no sequenciamento dos subclones com atividade amilolítica.	106

Lista de Abreviações

mL	Mililitro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
°C	Grau Celsius
μl	Microlitro
μg	Micrograma
ng	Nanograma
μM	Micromolar
dNTP	Deoxirribonucleosídeo Trifosfato
U	Unidade enzimática
%	Porcentagem
mM	Milimolar
Meio LB	Meio Luria-Bertani
miniprep	Mini extração de DNA plasmidial
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
SGal	5-bromo-4-cloro-3indolil-β-D-galactopiranosídeo
mm	Milimetro
μm	Micrômetro
μF	Microfaraday
Ω	Ohm

kV	Kilovolts
rpm	Rotações por minuto
g ou RCF	Força centrífuga relativa
pb	Pares de bases
kb	Kilo bases
rDNA	DNA ribossomal
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano
pH	Potencial de hidrogênio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
GITC	2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-arabinopiranosil isotiocianato
M	Molar
T ₁ E ₁₀	Tris-EDTA
TAE	Tris-Acetato-EDTA
F	Forward
R	Reverse
μ mol	Micromol
L	Litro
XGal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
ATP	Adenosina trifosfato

SUMÁRIO

Índice de Figuras	17
Índice de Tabelas	20
Lista de Abreviações	21
CAPÍTULO 1	26
Resumo	27
Abstract.....	30
1. Introdução.....	29
2. Revisão Bibliográfica	31
2.1 Bioma Caatinga.....	31
2.2 Caprinos	33
2.3 Microrganismos no Rúmen.....	34
2.4 Bactérias no Rúmen	36
2.5 Gene 16S rDNA.....	38
3. Justificativa.....	41
4. Objetivos.....	42
4.1 Objetivo Geral.....	42
4.2 Objetivos Específicos	42
5. Material e Métodos	43
5.1 Amostra.....	43
5.2 Extração Direta de DNA	44
5.3 Amplificação doGene 16S rDNA	44
5.4 Clonagens dos Produtos de PCR	45
5.5 Análise das Sequências	47
6. Resultados.....	49
6.1 Extração de DNA.....	49

6.2	Construção da Biblioteca 16S rDNA.....	50
6.3	Extração do DNA plasmidial.....	51
6.4	Análise da Diversidade das Comunidades Bacterianas	52
6.5	Análise Filogenética	57
6.6	Análise do número de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs).....	67
7.	Discussão.....	70
8.	Conclusão.....	77
9.	Perspectivas Futuras	78
CAPÍTULO 2.....		81
Resumo.....		80
Abstract.....		82
1.	Introdução.....	84
2.	Revisão Bibliográfica	85
2.1	Rúmen como sistema	85
2.2	Enzimas Bacterianas no Rúmen.....	86
2.3	Metagenoma	89
2.4	Exploração Biotecnológica	91
3.	Justificativa.....	94
4.	Objetivos.....	95
4.1	Objetivo Geral.....	95
4.2	Objetivos Específicos	95
5.	Material e Métodos.....	96
5.1	Animais e Dieta	96
5.2	Extração das bactérias sólido-aderidas e Extração de DNA.....	97
5.3	Construção da Biblioteca Metagenômica de Pequenos Insertos	98

5.4	Validação da riqueza da Biblioteca Metagenômica: gene ribossomal 16S rDNA.....	101
5.5	Triagem da biblioteca metagenômica de expressão de rúmen de caprinos para atividade amilolítica.....	102
6.	Resultados.....	107
6.1	Extração de DNA.....	107
6.2	Digestão e clonagem.....	107
6.3	Validação da Biblioteca Metagenômica: Diversidade bacteriana na biblioteca de pequenos insertos.....	112
6.4	Validação da Biblioteca metagenômica utilizando a bioprospecção: bioensaio para atividade amilolítica.....	114
6.5	Sequenciamento dos Subclones	121
6.6	Ra33 P.....	121
6.7	Ra33G	124
6.8	Disposição dos fragmentos no vetor PCF 430.....	128
7.	Discussão.....	130
8.	Conclusão	137
9.	Perspectivas Futuras	138
10.	Referências	139

CAPÍTULO I

DIVERSIDADE DA COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE NO RÚMEN DE CAPRINOS DA CAATINGA BRASILEIRA

RESUMO

O rúmen é um complexo ecossistema que abrange uma rica comunidade microbiana. O ambiente anaeróbico do rúmen de caprinos (*Capra hircus*) abriga uma comunidade microbiana capaz de degradar material vegetal gerando nutrientes que são absorvidos pelo animal. A clonagem e o sequenciamento do gene ribossomal 16S rDNA é o método mais eficiente para estudo da diversidade microbiana em amostras ambientais. No entanto, essa abordagem ainda não foi aplicada para uma avaliação detalhada da diversidade da comunidade bacteriana no rúmen de caprinos brasileiros. Neste trabalho, a comunidade de bactérias presentes nas frações líquida e sólido-aderida do rúmen de caprinos da raça Moxotó foi caracterizada por técnica independente de cultivo. O DNA total foi extraído das amostras ruminais e PCR foi utilizada para amplificar o gene ribossomal 16S de *Bacteria* usando os primers universais 27F e 1492R. As sequências quiméricas de cada biblioteca foram encontradas e retiradas. Aproximadamente 400 sequências não quiméricas e maiores que 400 pb foram obtidas para cada biblioteca. As curvas de rarefação atingiram um platô a um nível de distância evolutiva de 15%, indicando que neste nível o esforço de amostragem foi suficiente para saturar a diversidade existente ao nível de filo. Foram identificadas sequências de *Bacteria* pertencentes aos filos Bacteroidetes, Firmicutes, TM7, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Lentisphaerae e Proteobacteria. As classes dominantes no rúmen foram *Clostridia* e *Bacteroidia* que são conhecidas por desempenhar um papel na degradação da fibra vegetal em outros ruminantes. A diferença mais evidente está ao nível mais fino onde foram encontrados gêneros presentes unicamente em uma das frações. Bactérias não classificadas representaram 4,8% das sequências da fração líquida e 18,4% das sequências da fração sólido-aderida. Este é o primeiro estudo sobre a comunidade bacteriana de rúmen de caprinos utilizando bibliotecas do gene ribossomal 16S rDNA. Em conclusão, como foi observado no rúmen de outros animais, uma porcentagem relativamente elevada de bactérias não classificadas foram encontradas. Porém, pode-se encontrar diferença na riqueza entre as duas frações, demonstrando que a comunidade bacteriana aderida ao material vegetal e a encontrada no fluido ruminal são diferentes.

Palavras-chave: Rúmen, Gene ribossomal 16S, *Bacteria*.

ABSTRACT

The rumen is a complex ecosystem that includes a rich microbial community. The anaerobic environment of the goat (*Capra hircus*) rumen harbors a microbial community that degrades plant material generating nutrients that are absorbed by the animal. Cloning and sequencing of the ribosomal 16S gene is the most efficient method for studying microbial diversity in environmental samples. However, this approach has not yet been applied to make a detailed assessment of the bacterial community diversity present in the rumen of Brazilian goats. In this work, the bacterial community in the liquid and solid-associated fractions of the rumen of Moxotó goats was characterized by a culture-independent technique. Total DNA was extracted from rumen samples and PCR was used to amplify the ribosomal 16S gene of *Bacteria* using the universal primers 27F and 1492R. The chimaeric sequences from each library were identified and removed. Approximately 400 non-chimaeric sequences greater than 400 bp were obtained from each library. Rarefaction curves reached a plateau at an evolutionary distance level of 15%, indicating that the sampling effort saturated the existing diversity at the level of phyla. Sequences for the following *Bacteria* phyla were identified: Bacteroidetes, Firmicutes, TM7, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Proteobacteria and Lentisphaerae. Dominant classes in the rumen were *Clostridia* and *Bacteroidia*, which are known to play a role in the degradation of plant fiber in other ruminants. The most apparent difference found was that certain genera were found only in one of fraction. Unclassified bacteria represented 4.8% of the sequences in the liquid fraction and 18.4% of the sequences in the solid-associated fraction. This is the first study about the goat rumen bacterial community using 16S rDNA gene libraries. In conclusion, as observed in the rumen of other animals, a relatively high percentage of unclassified bacteria was found. However, differences in the richness of the bacterial communities found in the two fractions studied showed that the communities found associated with the plant material and liquid are different.

Keywords: Rumen, Ribosomal 16S rDNA gene, *Bacteria*

1. Introdução

Os caprinos nativos ou naturalizados brasileiros caracterizam-se como animais adaptados devido ao processo de seleção natural a que foram submetidos ao longo dos séculos. Apesar da sua grande importância, encontram-se sob forte ameaça, devido aos cruzamentos desordenados com raças exóticas, introduzidas com o objetivo de melhorar os índices produtivos dos rebanhos locais. Esta medida tem causado grandes modificações no padrão desses animais. A caatinga é um bioma exclusivo do Brasil, possuindo característica de sazonalidade peculiar devido à predominância da estação seca que dura em média oito meses do ano (Pimentel *et al.*, 1992). Os caprinos do semi-árido nordestino alimentam-se da caatinga, vegetação nativa do nordeste brasileiro.

Sobre esse ponto de vista, o material vegetal ingerido pelos caprinos é fermentado pelo microorganismos inseridos no rúmen, uma das quatro partes do estômago dos bovinos. A eficiente utilização do alimento por este órgão é dependente de uma complexa relação entre a fermentação e interações microbianas. A digestão dos alimentos é concretizada pela fermentação microbiana, a qual depende da manutenção de um ambiente razoavelmente constante em relação à temperatura, pH, pressão osmótica, suplemento de nutriente, contínua remoção de digesta e dos produtos de fermentação entre outros (Lana, 2005). O principal interesse produtivo do ruminante está na capacidade de aproveitar os nutrientes na digestão microbiana. No rúmen a presença da comunidade microbiana permite o aproveitamento eficiente de vários nutrientes, principalmente para a produção de energia (Arcuri *et al.*, 2006).

Nessa perspectiva, o rúmen é um ecossistema compreendendo microrganismos que interagem para a quebra do material vegetal. Baseado em alguns estudos, a comunidade microbiana pode variar de acordo com a espécie de ruminante e podem se alterar com o tempo. Os fatores que promovem mudanças na população microbiana incluem a idade do animal, a estação do ano, o uso de terapêutica e antibióticos promotores de crescimento, e, mais importante do ponto de vista agrícola, a dieta do animal (Whitford *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2009). Estes fatores tornam o rúmen de caprinos, que vivem no semi-árido nordestino e se alimentam de uma vegetação nativa brasileira, um ambiente propício de se encontrar uma comunidade bacteriana singular.

Sendo assim, o conhecimento sobre a diversidade e ecologia de comunidades bacterianas tem aumentado significativamente com o estudo das variações dentro do gene ribossomal 16S rDNA (Hugenholtz *et al.*, 1996). Estudos anteriores sobre diversidade de bactérias no rúmen estimaram que existem cerca de 22 espécies de bactérias predominantes (Krause *et al.*, 1996). No entanto, esses estudos basearam em técnicas tradicionais e podem ter sido prejudicados pelas exigências de crescimento de muitas bactérias do rúmen, por isso sequências específicas do gene ribossomal 16S rDNA têm sido usadas para identificar, quantificar e visualizar a população bacteriana ruminal (Stahl *et al.*, 1988; Amann *et al.*, 1995).

Este é o primeiro trabalho sobre a diversidade microbiana do rúmen de caprinos da raça Moxotó com técnicas independentes de cultivo através da amplificação do DNA total das frações líquida e sólido-aderida. Nos últimos anos, a diversidade genética das bactérias do rúmen tem sido revelada pela análise da sequência do gene RNA ribossomal 16S. Através do processo de análise da comunidade bacteriana no rúmen, a presença de bactérias não cultivadas tem sido conhecida. No entanto, os papéis dessas bactérias ainda não descritas para a digestão de fibras vegetais são controversos (Whitford *et al.*, 1998; Tajima, Aminov *et al.*, 2001).

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Bioma Caatinga

O domínio do bioma caatinga abrange cerca de 900 mil km², correspondendo aproximadamente a 54% da região Nordeste e 11% do território brasileiro (Figura 1). Está compreendido entre os paralelos de 2° 54'S a 17° 21'S e envolve as áreas dos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, o sudoeste do Piauí, partes do interior da Bahia e do norte de Minas Gerais (Andrade *et al.*, 2005).

A caatinga da região semi-árida é constituída por plantas adaptadas fisiologicamente às condições de deficiência hídrica. Como as outras vegetações, a caatinga também passa por um extenso processo de devastação ambiental provocado pelo uso insustentável dos seus recursos naturais (Leal *et al.*, 2003), ainda de forma mais grave por ser um ecossistema menos valorizado. Até recentemente, era considerada pobre em biodiversidade, somente na última década passou a ser estudada mais detalhadamente e, até hoje, pouco se conhece das suas potencialidades. (Andrade, 2005).

Além disso, existem espécies de plantas nesta área que sequer foram caracterizadas. A vegetação xerófila da caatinga é essencialmente heterogênea no que se diz respeito à fitofisionomia e à estrutura, tornando difícil a elaboração de planos classificatórios capazes de considerar de maneira satisfatória as inúmeras tipologias ali ocorrentes (Andrade-Lima, 1981).

De acordo com Fernandes (2000), é mais prático e acertado considerar basicamente duas fitofisionomias: caatinga arbórea e caatinga arbustiva. Segundo este autor, as descrições pormenorizadas e cuidadosas devem ficar a critério de cada pesquisador, quando as peculiaridades dos locais estudados assim o exigirem. Ultimamente, a caatinga tem sido classificada como savana-estépica, hierarquizada em diversas tipologias (Ibge, 1992).

Nesse bioma são realizadas algumas atividades econômicas, como a criação de caprinos e ovinos. Nessa questão Pfister (1983) observou que a composição botânica da dieta dos caprinos e ovinos que pastejavam em área de caatinga no município de Sobral (CE), no período chuvoso (janeiro – fevereiro), incluía gramíneas (33 a 52%), plantas

arbustivas (45 a 55%) e arbóreas (2 a 10%). No entanto, Nascimento (1988) concluiu que os ovinos que pastejavam em área de caatinga no sertão central cearense selecionaram mais gramíneas no período seco e mais dicotiledôneas herbáceas no período úmido, com o maior percentual de gramíneas ocorrendo no mês de outubro (68,51%) e o menor em agosto (17,45%). A partir desses estudos, podemos inferir que o rúmen de caprinos e ovinos dessa região é capaz de degradar a pastagem típica da Caatinga. A digestão de materiais lignocelulósicos, oriundos de biomassa vegetal é de extrema importância para a biotecnologia. A prospecção de novas enzimas que desempenham esse papel pode levar, por exemplo, à produção de etanol de segunda geração economicamente viável. Neste capítulo, focamos na biodiversidade que pode ser encontrada em rúmen de caprinos com o objetivo desta bioprospecção.

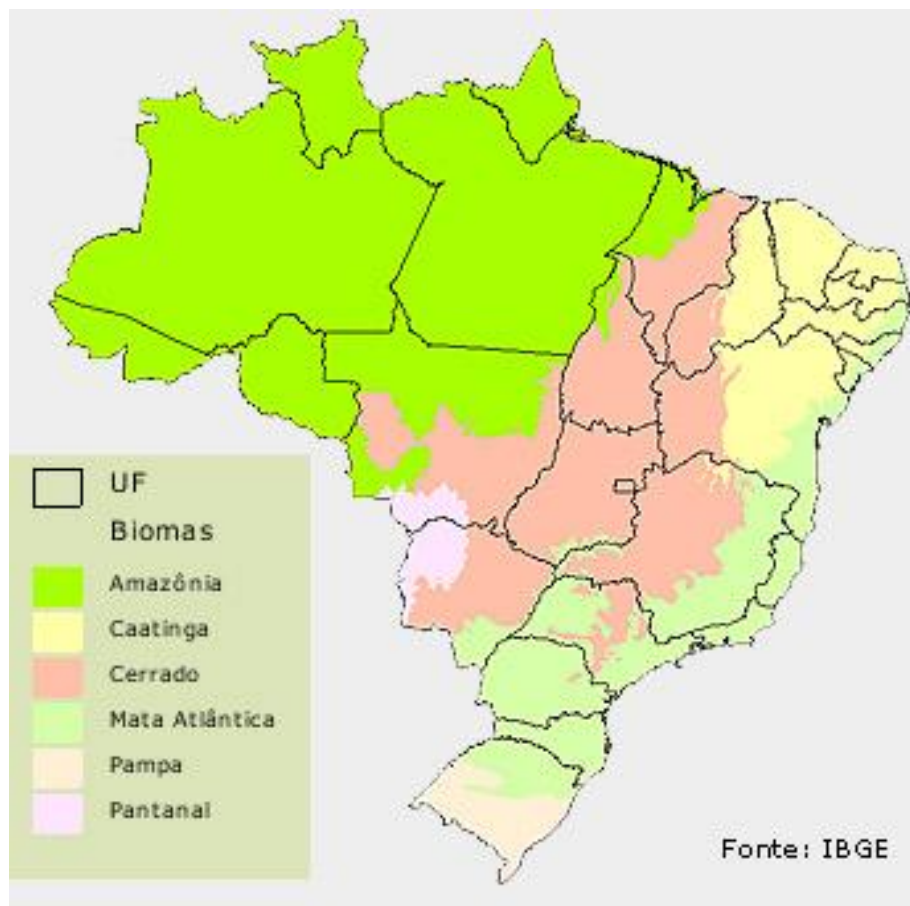


Figura 1 – Representação dos ecossistemas brasileiros. Fonte: IBGE, 2010.

2.2 Caprinos

Os caprinos pertencem, à ordem dos Artiodactyla, subordem Ruminantia (cabra mocha, ovelha, gado, cervo, alce, caribu, alce americano, girafa, ocapí, antílope), família Bovidae, e gênero *Capra*, existindo seis espécies correspondentes a este gênero, que são distinguidas pela sua forma de chifres. A cabra doméstica denominada *Capra hircus* evoluiu principalmente da *Capra aegagrus*, que tem os chifres em forma de cimitarra (espada turca) com um tipo de quilha anterior e algumas saliências arredondadas interrompendo-a, exceto para as raças Angora, "Cashmere" e Damasco, as quais descendem da *Capra falconeri*, que têm enormes chifres torcidos e chatos (Ribeiro, 2006).

As cabras domésticas (*Capra hircus*), considerado pelo homem, mais importantes e de fácil adaptação (Machugh *et al.*, 2001). Elas fornecem uma grande quantidade de produtos úteis, principalmente leite, carne e couro. Evidências arqueológicas mostraram que, provavelmente, elas foram domesticadas primeiro no Crescente Fértil, região do Oriente próximo, há cerca de 10.000 anos (Zeder *et al.*, 2000). Mannen *et al.* (2001) sugeriram que pelo menos duas espécies selvagens do gênero *Capra* contribuíram para o patrimônio genético das cabras domésticas, enquanto que um segundo e independente evento de domesticação pode ter originado as raças "Cashmere-like" no Paquistão (Meadow, 1993). Segundo Joshi, *et al.* (2004) os caprinos têm desempenhado um papel importante na agricultura, economia, cultura e até mesmo na religião desde o início da civilização humana.

Caprinos são encontrados em quase todas as regiões do Brasil, por terem grande capacidade de adaptação e flexibilidade para viver nos diversos ambientes, sendo que algumas raças demonstram melhor desenvolvimento em localidades específicas (Ribeiro, 2006). Estes animais em regiões tropicais semi-áridas têm potencial para contribuir significativamente o aumento da disponibilidade de produtos (carne, leite, pele, etc.) que geram renda, desde que seja explorada racionalmente (Simplício, 2004).

O rebanho caprino da região nordeste do Brasil, que compreende 91,4% do rebanho nacional (Ibge, 2008), é constituído por raças exóticas, animais sem padrão racial definido (SRD), e as raças tidas como nativas. As raças nativas, como Moxotó e Canindé, caracterizam-se pela rusticidade e adaptação à zona semi-árida. Esses animais possuem potencial genético e produtivo compatíveis com o ambiente semi-árido próprio

da região nordeste do Brasil, entretanto, somente nos últimos anos têm sido avaliados adequadamente nos aspectos genéticos e nutricionais (Santos *et al.*, 2005). Os animais das raças Moxotó e Canindé caracterizam-se por possuir pequeno porte, atingindo altura média de 62 e 55 cm, respectivamente, e apresentam boa prolificidade. Ambas as raças são produtoras de carne, sendo que a Canindé possui habilidade leiteira acima da média nacional (Jardim, 1986).

A raça Moxotó, rústica e adaptada à região semi-árida, foi introduzida no país pelos colonizadores, sendo também denominada “Lombo preto”. Segundo Ribeiro *et al.* (2004), a origem do nome “Moxotó” provém do vale do rio Moxotó, em Ibimirim-Inajá, no Estado de Pernambuco, onde se formou a raça. Na atualidade, é criada principalmente nos Estados da Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Piauí (Ribeiro, 2004).

A caprinocultura no estado do Ceará, como em quase toda a região semi-árida do nordeste brasileiro, tem como base alimentar a vegetação nativa, que é para a maioria dos rebanhos a única fonte de alimento durante o ano (Pimentel *et al.*, 1992). A caprinocultura vem ganhando grande impulso nos últimos anos pelo potencial que representa, podendo ser considerada um instrumento eficaz de promoção do desenvolvimento da zona semi-árida, no nordeste brasileiro (Lima, 2000). Um dos fatores que apresentam maior dificuldade para a criação é a alimentação, devido aos altos custos e a estacionalidade das forragens, sendo o comportamento ingestivo um dos meios utilizados para se avaliar as respostas desses animais a determinados alimentos e que garanta o seu desempenho (Ribeiro, 2006).

2.3 Microrganismos no Rúmen

As adaptações anatômicas e fisiológicas dos ruminantes para acomodar a grande quantidade de plantas consumidas e para manter a população concentrada de microrganismos necessária ao processamento deste material vegetal são altamente especializadas. Rúmen, também conhecida como “pança”, forma a grande parte do retículo-rúmen, que é a primeira câmara no canal alimentar dos ruminantes. Ele serve como o principal local de fermentação microbiana dos alimentos ingeridos (Hobson *et al.*, 1997).

A microbiota ruminal é representada por um conjunto de organismos que inclui bactérias, arqueias, fungos e protozoários. Tais organismos apresentam diferenças fundamentais em nível celular que permitem classificá-los em procariotos e eucariotos. O conceito de espécies para o estudo de diversidade de procariotos ainda não foi completamente estabelecido, aumentando a dificuldade de estudar tais organismos (Rosseló-Mora *et al.*, 2001; Gevers *et al.*, 2005). A transferência horizontal que ocorre entre os genes bacterianos permite aumentar a troca genética entre esses organismos, trazendo profundas mudanças evolutivas e dificultando a denominação pela ciência de características específicas necessárias para a classificação de espécies em procariotos (Lammel, 2007).

O ecossistema do rúmen consiste, principalmente, de bactérias (10^{10} - 10^{11} células/mL), arqueias (10^7 - 10^9 células/mL), protozoários (10^4 - 10^6 /mL), fungos anaeróbios (10^3 - 10^5 zoospóros/mL) e bacteriófagos (10^8 - 10^9 /mL) (Kamra, 2005). O sinergismo e antagonismo de diferentes grupos de microrganismos e também de gêneros de um mesmo grupo são diversos e complexos. Os resultados destas interações no rúmen é que são responsáveis pela bioconversão dos alimentos na forma que é utilizada pelo animal. A qualidade e quantidade dos produtos da fermentação são dependentes do tipo e das atividades dos microrganismos no rúmen (Towne *et al.*, 1990; Russel *et al.*, 1992).

O rúmen fornece um ambiente que favorece o desenvolvimento de uma específica comunidade microbiana. Esta característica ocorre pelos seguintes fatores: 1) temperatura entre 38 a 42°C (média de 39°C); 2) anaerobiose; 3) pH tampão variando entre 5.5 a 7.0 (média de 6.8); 4) suplemento de nutriente e contínua remoção de digesta e dos produtos de fermentação; 5) matéria seca entre 10 a 15% 6) pressão osmótica constante entre outros (Lana, 2005).

Diante do exposto, os microrganismos no rúmen desempenham um papel importante na produção animal por meio de suas atividades sobre os componentes da dieta dos animais ruminantes. A microbiota transforma as substâncias como celulose, lignina e outros compostos, em ácidos orgânicos, aminoácidos e vitaminas bem como, substâncias que estimulam o crescimento e a produção de carne, leite e lã (Oliveira *et al.*, 2007).

2.4 Bactérias no Rúmen

Durante muitos anos, considerou-se que a maior diversidade na terra era devido aos eucariotos, particularmente devido às suas formas multicelulares, enquanto os procariotos eram considerados simples, primitivos e relativamente uniformes em suas características (Hugenholtz *et al.*, 1996). Este conceito começou a ser modificado há cerca de 20 anos, quando Carl Woese e seus colaboradores, baseados na análise do RNA da subunidade menor do ribossomo, sugeriram que os organismos vivos fossem classificados em três grupos: *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*. Tais grupos, denominados domínios, surgiram através de vias evolutivas distintas a partir de um ancestral comum (Terceti, 2009).

O domínio *Bacteria*, inicialmente proposto por Woese (1987), era formado por 11 filos compostos por indivíduos cultivados e caracterizados, sendo posteriormente verificada, por meio de técnicas independentes de cultivo, a presença de um número maior de filos, muitos desses com representantes não cultiváveis (DeLong, 1996). Diante dessa situação, Hugenholtz *et al* (1998) propuseram uma nova classificação baseada na inclusão de sequências do gene ribossomal 16S rDNA de organismos retirados diretamente do ambiente. Esta nova classificação aumentou o número de filos bacterianos para 36. Em contrapartida, Rappe e Giovannoni (2003), baseados no estudo de sequências do gene ribossomal 16S rDNA amplificados a partir do DNA total de amostras ambientais de diversos locais, sugeriram 52 filos bacterianos. Porém, apenas 24 são conhecidos pelo manual de Bergey (Krieg, 1984), sendo que, o rúmen aparenta ser dominado por um pequeno número destes filos.

Considerando a complexidade de populações bacterianas, diversas interações acontecem no rúmen, envolvendo diferentes grupos de microrganismos. As interações entre bactérias incluem transferência interespecífica de hidrogênio, alimentação cruzada de produtos da fermentação de oligômeros (*crossfeeding*, onde uma espécie pode utilizar o produto final da outra para suas vias metabólicas), de monômeros derivados da degradação dos polímeros e a produção de bacteriocinas por espécies bacterianas predominantes no rúmen (Flint, 1997). Estudos das vias metabólicas de algumas bactérias do rúmen, isoladas em laboratório, demonstraram que várias espécies produzem produtos finais, que não podem ser detectados no líquido ruminal (Atlas *et al.*, 1998).

A comunidade bacteriana desempenha um papel fundamental na fermentação, podendo atingir densidades acima de 10^{10} células por mL ou por grama de digesta (Russell *et al.*, 2001). A comunidade bacteriana do rúmen inclui microrganismos degradadores de celulose, de amido, de hemicelulose, fermentadores de açúcar, utilizadores de ácidos orgânicos, bactérias proteolíticas e lipolíticas. O rúmen apresenta grande diversidade de espécies bacterianas, sendo que os gêneros bacterianos predominantes são *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Succinomonas*, *Butyvirbio*, *Selenomonas*, *Succinivibrio*, *Streptococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, entre outros (Atlas *et al.*, 1998).

Nesta mesma abordagem, Cunningham (2004), que o número total de bactérias nos pré-estômagos e intestino grosso varia, normalmente, de 10^{10} a 10^{11} células por grama de ingesta. Barbosa *et al.* (2003) avaliando o fluido ruminal de bovinos e bubalinos encontrou a predominância de bactérias gram-positivas, fato este que pode ser explicado pela dieta rica em carboidratos estruturais. Kumar *et al.* (2002), avaliando a concentração de bactérias viáveis de búfalos e zebuínos também encontraram maior população de bactérias gram-negativas em búfalos do que em bovinos ($37,5 \times 10^8$ /mL; $26,5 \times 10^8$ /mL respectivamente).

No que se refere à disposição das bactérias no rúmen, estas são classificadas em quatro grupos de acordo com o ambiente: (1) bactérias de vida livre associados à fase líquida do rúmen (2); bactérias associadas com partículas de alimentos; (3) bactérias associadas com o epitélio do rúmen, e (4) as bactérias associadas à superfície de protozoários (Czerkowski *et al.*, 1988; Mcallister *et al.*, 1994). Bactérias associadas com partículas de alimentos são consideradas o grupo mais importante para a degradação devido à sua predominância em termos de massa bacteriana e atividade de endoglicanase (Minato, 1966; 1993).

Além dessa questão, uma grande variedade de fatores ecológicos está envolvida na determinação da presença ou não de espécies bacterianas que podem existir e crescer dentro do rúmen. Embora o número e tipos destes fatores ecológicos não sejam totalmente conhecidos e possam variar de espécie para espécie, os estudos com culturas puras de bactérias do rúmen têm sugerido alguns fatores importantes que interferem na comunidade microbiana (Smith *et al.*, 1981; Smith *et al.*, 1982; Stack *et al.*, 1984; Patterson *et al.*, 1985). Estas incluem: (a) a capacidade de anexar às partículas alimentares ou de associar com a população de células aderentes, ou ambos; (b)

tolerância a níveis elevados de ácidos graxos voláteis (cerca de 100-150 mM) e altas concentrações de sal (cerca de 50-60 g/L de cloreto de sódio); (c) altas afinidades com os hidratos de carbono e aminoácidos; (d) gastos baixo de energia para as funções de manutenção durante crescimento. Estima-se que estes traços da microbiota ruminal, juntamente com os fatores ambientais são importantes para o não crescimento de anaeróbios facultativos, bactérias do solo e outros microrganismos para estabelecer qualquer população numericamente significativa no rúmen (Hespell, 1987).

Além dos fatores acima citados, Tajima *et al.* (2000) descrevem que a estrutura da comunidade bacteriana do rúmen varia de acordo com as mudanças na dieta do animal. Plantas ingeridas podem conter grandes quantidades de celulose, hemicelulose ou amido. De acordo com a composição da dieta ingerida pelo animal, a eficiência da fermentação é alterada. Os agropecuaristas têm buscado manipular a estrutura da comunidade bacteriana do rúmen, por meio da composição da dieta e pela administração de promotores de crescimentos (antibióticos), visando maior rendimento na produção (Costa, 2006).

2.5 Gene 16S rDNA

O ribossomo bacteriano é composto de RNA ribossomal e várias proteínas. Ele é constituído de duas subunidades principais, a 40S (denominada subunidade maior) e a 30S (subunidade menor). Na subunidade maior estão as moléculas de rRNA 23S, 5S e mais 31 proteínas e a subunidade menor estão o 16S rRNA e mais 21 proteínas (Woodson *et al.*, 1998).

Os genes de RNA ribossomal são universalmente distribuídos nos diferentes grupos de seres vivos, sendo a molécula que apresenta o maior grau de conservação existente. Sua variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão em diferentes regiões da molécula (Lane *et al.*, 1985). O gene ribossomal 16S rDNA, é um fragmento de aproximadamente 1.500 nucleotídeos, está presente em todos os procariotos e gera grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas (Amann *et al.*, 1995).

As seqüências de rRNA contêm domínios conservados, intercalados com regiões variáveis (Figura 2). Devido aos domínios conservados, a comparação de seqüências de rDNA é uma ferramenta importante para a determinação de relações filogenéticas e evolutivas entre os organismos, na avaliação da diversidade em amostras ambientais e na detecção e quantificação de populações específicas (Head *et al.*, 1998).

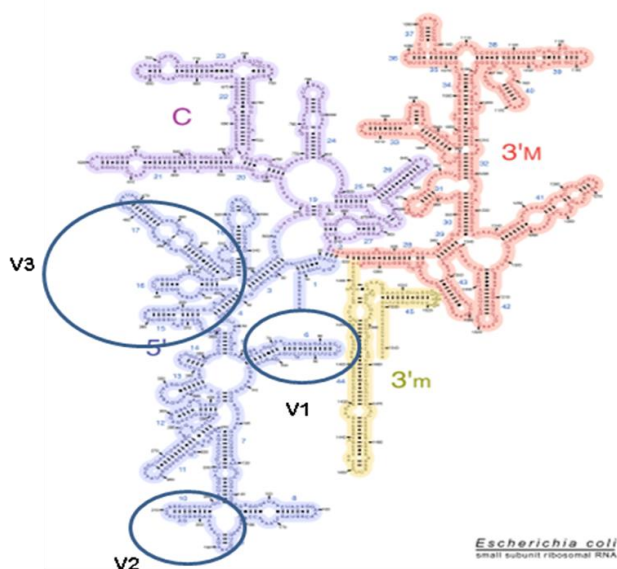


Figura 2 - Estrutura secundária da subunidade menor do RNA ribossômico. As regiões circuladas identificam algumas regiões variáveis encontradas nessa subunidade.

Pesquisas a cerca da biodiversidade procariótica tem sido dificultado por muitos anos devido à dificuldade de caracterizar microrganismos antes de seu isolamento em cultura pura. Esta limitação metodológica tem levado a uma limitação na análise real da diversidade microbiana. A dificuldade de cultivo de microrganismos complexos tem impedido a compreensão da estrutura da comunidade microbiana em termos de espécie na maioria dos ecossistemas. No entanto, a situação mudou nos últimos 20 anos, a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) tem permitido o estudo dos genes microbianos diretamente amplificados a partir de amostras, sem qualquer necessidade de cultivo (Garcia-Martinez *et al.*, 1999). Os genes rDNA são utilizados para esse tipo de análise, uma vez que estes se apresentam em grande número na maioria das células e aparentemente, o gene ribossomal 16S rDNA não possui a característica de transferência lateral.

O gene ribossomal 16S rDNA é o mais utilizado, primeiramente, porque a natureza desta sequência com um mosaico de regiões altamente conservadas intercaladas com trechos variáveis e hipervariáveis, torna conveniente para o desenho de primers para PCR (Stackebrandt, 1996). Além disso, a vasta base de dados de sequências disponíveis para este gene faz encontrar possíveis parentes próximos cultiváveis. Caso não seja aplicada esta similaridade, a sequência pode ser colocada em um quadro de relações com outros microrganismos que muitas vezes são relacionados por implicações filogenéticas ou comportamento fisiológico provável (Amann *et al.*, 1995).

Sobre este ponto de vista, as diferenças na sequências do gene que codifica para 16S rRNA, desde a descoberta da PCR e do sequenciamento do DNA, têm sido utilizadas para a identificação, classificação filogenética e inferências evolutivas de espécies, gêneros e famílias desses organismos (Amann *et al.*, 1995). Nesta perspectiva, a clonagem e sequenciamento do gene do 16S rDNA é considerado o método mais eficiente para descrição da diversidade microbiana em amostras naturais (Muyzer, 1999). O estudo de fragmentos amplificados do gene ribossomal 16S rDNA, permite realizar uma estimativa da riqueza microbiana associada a diferentes ambientes e a identificação filogenética de organismos ainda não cultivados (Makkar *et al.*, 2002). Altas proporções de gene ribossomal 16S rDNA para um determinado grupo em uma comunidade pode indicar que ou esse grupo é numericamente dominante ou esse grupo tem a capacidade de crescer mais rapidamente em comparação aos demais presentes nessa comunidade (Daniel *et al.*, 2003).

A diversidade genética e a composição da comunidade microbiana do rúmen de caprinos e bovinos tem sido estudada por técnicas de amplificação e sequenciamento do gene ribossomal 16S rDNA, eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), Hibridação Substrativa Supressiva (SSH) e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism) (Edwads *et al.*, 2004; Wright, 2004). Por isso, neste trabalho pretende-se aplicar técnicas reportadas na literatura, como comparações do 16S rDNA, para caracterizar a diversidade microbiana no rúmen de caprino da raça moxotó do semi-árido brasileiro.

3. Justificativa

A maioria dos estudos para ruminantes estão concentrados nas espécies de bovinos, o que se torna extremamente necessário o estabelecimento de parâmetros de riqueza da microbiota ruminal de outras espécies, uma vez que estes animais apresentam comportamento alimentar e manejo diferentes do encontrado em bovinos.

Sobre este ponto de vista, compreensão da composição da população de microrganismos ruminal é fundamental para o fornecimento de condições necessárias ao melhor aproveitamento do processo de digestão. Assim, sistemas mais eficientes de nutrição unindo produtividade e diminuição de custos poderão ser gerados. O presente trabalho é o primeiro que visa à caracterização da microbiota bacteriana do rúmen de caprinos nativos da raça brasileira Moxotó, utilizando técnicas independentes de cultivo

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Este trabalho visa o emprego de método independente de cultivo para estimar a riqueza das bactérias presente no rúmen de caprinos do semi-árido nordestino da raça brasileira Moxotó.

4.2 Objetivos Específicos

- Construir bibliotecas 16S rDNA de bactérias da fração líquida e sólido-aderidas presentes no rúmen de caprinos.
- Sequenciar a biblioteca 16S rDNA de bactéria das duas frações para obter conhecimento sobre a comunidade bacteriana dentro do rúmen de caprinos.
- Analisar filogeneticamente sequências de 16S rDNA das duas amostras.
- Comparar os resultados da análise da riqueza encontrada na fração líquida e sólido-aderida.

5. Material e Métodos

5.1 Amostra

O conteúdo total do rúmen de três fêmeas adultas da raça Moxotó foi fornecido pelo projeto: “Conservação de raças nativas de caprinos do Nordeste do Brasil”, localizado na Embrapa-Caprinos, localizada em Sobral – CE (Figura 3). Comumente os animais (Figura4) desta região se alimentam de plantas nativas que ficam disponíveis durante a estação chuvosa como, jitibirana (*Ipomoea spp.*), paco-paco (*Wissadula spp.*), catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*), pau branco (*Auxemma oncocalyx*) e marmeleiro (*Croton hemiagyreus*), sem necessidade de suplemento alimentar. Os exemplares foram sacrificados sob a supervisão de médicos veterinários e técnicos pertencentes à Embrapa Caprinos. Dois tipos de amostras de rúmen foram coletadas: uma fração sólido-aderida e uma fração líquida. A fração líquida foi considerada o líquido do rúmen enquanto que a fração sólido-aderida foi considerada o filtrado resultante da passagem do material vegetal parcialmente digerido através da gaze. As amostras da fração líquida e fração sólido-aderida foram posteriormente colocadas em tubos de 50 mL e congelados em nitrogênio líquido.



Figura 3 - Projeto Conservação das raças de caprinos nativas do Nordeste do Brasil -Sobral, CE, local de coleta das amostras ruminal.

Essas amostras foram transportadas em gelo seco e armazenados a -80°C até seu processamento no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília.



Figura 4 - Fêmeas da Raça Moxotó pertencentes ao projeto Conservação das raças de caprinos nativas do Nordeste do Brasil.

5.2 Extração Direta de DNA

A extração do DNA da amostra foi realizada utilizando 500 μl de ambas as frações (líquida e sólida-aderida) utilizando o Kit de extração de *DNA Kit Fast DNA SPIN Kit for soil* (MP Biomedical, LLC). A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e seu tamanho estimado por comparação com marcador 1kb *plus DNA ladder* (Invitrogen). O DNA total extraído da fração líquida e sólida-aderida foi purificado através do protocolo *ULTRA CLEAN DNA purification Kit* (MoBio, EUA).

5.3 Amplificação do Gene 16S rDNA

O DNA metagenômico foi extraído da porção líquida e sólida-aderida e do rúmen. O DNA total foi utilizado para a amplificação do gene ribossomal 16S rDNA

bacteriano por meio da técnica de PCR, utilizando os ¹primers universais 1492R (5' GGY¹ TAC CTT GTT ACG ACT T 3') e 27F (5' AGA GTT TGA TCM¹ TGG CTC AG 3') , específicos para o domínio *Bacteria* (Reysenbach *et al.*, 1992). O PCR foi realizado em um termociclador (Applied Biosystems) com os seguintes parâmetros: 3 minutos para desnaturação inicial à 95 ° C, seguido por 25 ciclos de 94 ° C durante 30 segundos, 52 ° C por 30 segundos e 72 ° C por 1 min e 40 segundos e um ciclo final de 72 ° C por 7 minutos. Cada 20 µl de reação de PCR continha 10 ng de DNA total do rúmen (fluido e sólido-aderido), 0,25µM de cada primer, 250 µM de dNTP, e 2U da enzima Taq DNA polimerase (Phonotria, BR), no tampão do fabricante (que continha 1,5 mM de MgCl₂).

5.4 Clonagens dos Produtos de PCR

Os fragmentos de DNA amplificados e purificados das frações líquida e sólida-aderida foram clonados no vetor pGEM-T Easy (pGEM-T *Easy Vector System I* Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 10 ng de DNA amplificados na PCR foram ligados ao vetor pGEM-T Easy (Figura-5).

Este vetor oferece uma rápida e fácil detecção dos clones positivos, pois ele contém um sítio múltiplo de clonagem e apresenta um gene de resistência ao antibiótico ampicilina, que juntamente com gene *lac Z* são compatíveis para a seleção de colônias brancas e pretas.

A ligação foi dialisada em membrana de nitrocelulose 0,025 µm (Milipore) por 20 minutos. Para a transformação com as ligações, foram realizadas eletroporações em cubeta Gene Pulse[®] Cuvette de 0,2 mm (Biorad) previamente resfriada em gelo, utilizando as células competentes *Escherichia coli* EPI 300 (Epicentre, EUA). O eletroporador *Gene Pulsed*[®] (Biorad) foi ajustado às seguintes condições: capacitância 25 µF; resistência 200 Ω e 700 Ω; voltagem 2,5 kV. Após o procedimento de eletroporação foi adicionado 1 mL de meio SOC na cubeta e misturados gentilmente com a pipeta até a solução célula/meio SOC estivesse homogênea, essa mistura foi

¹ Y e M são nucleotídeos degenerados onde pode se adicionar, C ou T e A ou C respectivamente.

transferida para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e incubada durante aproximadamente 1 hora a 37°C.

A seleção dos clones transformados foi feita por meio do método de escolha entre colônias brancas e pretas. Diluições seriadas foram feitas e plaqueadas em meio LB ágar, IPTG, SgalTM (SIGMA) e ampicilina (150µg/mL), as placas passaram por um período de incubação de 16 horas à 37°C. Cinco colônias brancas representantes de cada amostra de estudo foram selecionadas para a detecção da presença de inserto, sendo incubadas em tubo de polipropileno (Falcon), contendo 5 mL de meio LB acrescido de ampicilina (150 µg/mL) durante 16 horas à 37°C e 240 rpm. Nessas amostras foram realizadas mini extração de DNA plasmidial (miniprep) com o Kit QIAprep[®] (Qiagen), com o intuito de isolar o vetor da célula hospedeira *E. coli* EPI 300 (Epicentre, EUA). Para confirmação da presença de insertos nos clones foram realizadas reações de PCR desses clones aleatórios, utilizando os *primers* 27F e 1492R, com os parâmetros já descritos.

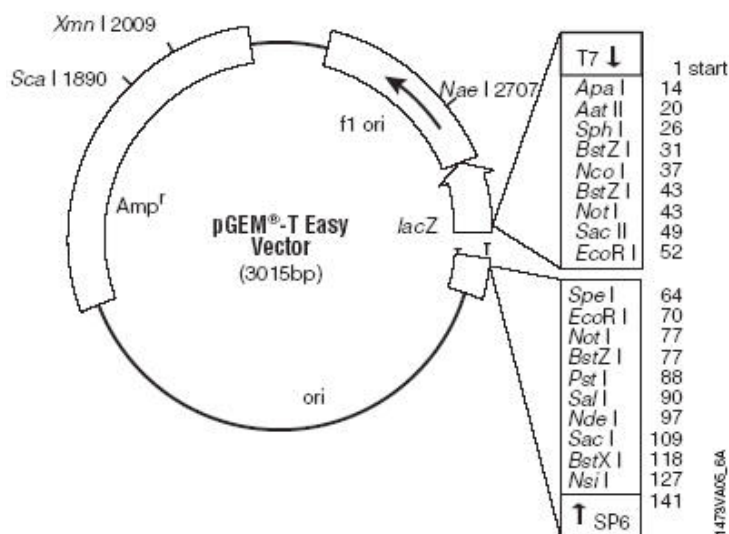


Figura 5 - Mapa do vetor pGEM-T Easy Vector System I. Utilizado para a clonagem dos fragmentos de PCR obtidos da amplificação do gene 16S rDNA.

Após a verificação, aproximadamente 1.000 clones de cada amostra (fração líquida e sólido-aderida) foram selecionados, cultivados em LB e congelados em freezer -80°C com glicerol 15%. As colônias foram coletadas com auxílio de palitos estéreis e

transferidas para microplaca “Deep – Well” com 96 poços contendo 1 mL de meio LB e ampicilina (150 µg/mL), incubados durante 16 horas à 37°C e 240 rpm, visando à extração plasmidial por lise alcalina (Sambrode) e em seguida o sequenciamento dos mesmos.

5.5 Análise das Sequências

Para cada uma das amostras, foram enviados 400 clones para o sequenciamento. A reação de sequenciamento dos clones selecionados foi processada utilizando o sequenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) utilizando o primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'), 100 ng de DNA plasmidial, 2 µl de *Sequencing reagent dynamic premix* (GE Healthcare, EUA) em 10 µl de volume final da reação. Os parâmetros para execução dos ciclos foram: 95°C por 3 minutos, seguidos de 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 40 segundos e após terminar os 25 ciclos 72°C por 7 minutos.

Para a avaliação da qualidade das sequências utilizamos três ferramentas. A primeira ferramenta é o “*Trimmed sequence*” (Chou *et al.*, 2001) que é utilizada para cortar as partes das sequências com baixa qualidade e remove sequências do vetor, esta ferramenta está disponível no site desenvolvido pelo Departamento de Bioinformática da Universidade Católica de Brasília, disponível no site <http://www.bioinformatica.ucb.br/eletro.html>. As sequências foram alinhadas com a ferramenta *NAST* (Nearest Nearest Alignment Space Termination) para o alinhamento de sequência múltipla, esta ferramenta está disponível no site *Greengenes* (Desantis *et al.*, 2006). A segunda avaliação é feita com o programa *Bellerophon* - versão 3 (Huber *et al.*, 2004) que detecta sequências quiméricas em um conjunto de sequências múltiplas por meio de análise comparativa. *Bellerophon* foi especificamente desenvolvido para detectar quimeras em clones de biblioteca do gene ribossomal 16S rDNA, mas pode ser aplicada a outros conjuntos de genes. O último processo de avaliação de qualidade foi realizada pelo o software *Pintail* (Ashelford *et al.*, 2005) um programa que detecta e analisa quimeras e outras anomalias em sequências 16S rDNA. Sequências de aproximadamente 400 pb foram submetidos à *Ribosomal Database Project II Release*

10 (Cole *et al.*, 2009) por meio da ferramenta *CLASSIFIER* o qual atribui sequências de rDNA 16S à sua hierarquia taxonômica. O Limite de confiança utilizado foi de 80%.

As sequências escolhidas foram agrupadas em um só arquivo utilizando o programa *BioEdit*, disponível gratuitamente no site: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. Incluído neste programa existem vários subprogramas. O alinhamento foi realizado pelo programa *Clustal W*, disponível no programa *Bioedit*. Esse arquivo foi convertido para o formato “.dist” utilizando o programa DNADIST, disponível no programa *Bioedit*, o qual fornece uma matriz de dados. A matriz é gerada como arquivo de saída (outfile). O programa utilizado para atribuir as unidades taxonômicas operacionais (OTU) foi o *DOTUR* (Distance-Base OTU and Richness) (Schloss *et al.*, 2005). O DOTUR é um programa que usa uma matriz de distância e atribui sequências às unidades taxonômicas operacionais (OTU). Esse programa está disponível gratuitamente no site: <Http://www.planpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html>. Uma vez que as sequências são atribuídas a OTUs, os dados da frequência para cada nível da distância foram usados para construir curvas de rarefação e o número das espécies observadas. Dos arquivos gerados por esse programa, aqueles com extensão “.r_rarefaction” foi utilizado para construção de curvas de rarefação, “.list” para a listagem das OTUs e “.chao.ltt” para ter os dados da riqueza das bibliotecas.

Por fim foi utilizado o programa β -Libshuff (Schloss *et al.*, 2004). Este programa faz análise par a par bibliotecas, respondendo se uma população é diferente uma da outra. Ele encontra-se disponível gratuitamente no site: www.planpath.wisc.edu/fac/joh/S-libshuff.html. Para a análise filogenética utilizamos o programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), para a inferência das árvores filogenéticas. Para a construção das mesmas foi utilizado o método Neighbor-joining e para testar a confiança das árvores filogenéticas geradas, foi utilizado *bootstrap* com 1.000 repetições.

6. Resultados

6.1 Extração de DNA

Quando o DNA do ambiente é isolado para construção de bibliotecas existem três considerações relacionadas à técnica: (1) O DNA pode ser extraído de vários microrganismos, então representa uma população original microbiana; (2) O DNA não pode ser degradado durante a extração porque é necessário um DNA de alto peso molecular (DNA muito fragmentado pode causar produtos quiméricos); (3) O DNA tem que estar livre de substâncias contaminantes (partículas vegetais e polissacarídeos) que interfere no processo de digestão e inserção dos fragmentos no vetor de clonagem (Purdy, 2005).

O protocolo utilizado para extração de DNA metagenômico de rúmen de caprinos, tanto da fração sólido-aderida quanto da líquida, foi considerado adequado, pois obteve-se DNA em quantidade e qualidade satisfatórias (Figura 6). Uma parte da amostra foi purificada em gel agarose 0,8% *Low melting*, com o intuito de uma maior limpeza do material, devido à contaminação por polissacarídeos.

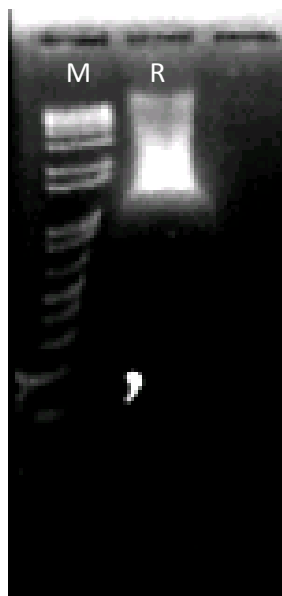


Figura 6 - Análise em gel agarose 0,8% da amostra de DNA metagenômico da fração sólido-aderida. M- Marcador 1kb *plus DNA ladder*; R- DNA metagenômico da fração sólido-aderida.

6.2 Construção da Biblioteca 16S rDNA

O DNA total foi submetido a uma PCR para amplificação do gene que codifica para o 16S rRNA. Os produtos obtidos da PCR tinham 1,4 kb (Figura 7) conforme esperado. Com os produtos de PCR foram construídas duas bibliotecas, utilizando o vetor de clonagem *pGEM-T easy*, sendo uma biblioteca da fração líquida (RuLiq) e uma da fração sólido-aderida (RuSol). As bibliotecas RuLiq e RuSol foram compostas por 1.000 clones cada uma. Os produtos de PCR foram clonados imediatamente no vetor *pGEM-T easy* para ocorrer a preservação dos resíduos finais de nucleotídeos de adenina, construída pela *Taq* polimerase que apresenta ausência de atividade exonuclease 3'-5' para otimizar a hibridização e clonagem no vetor escolhido.

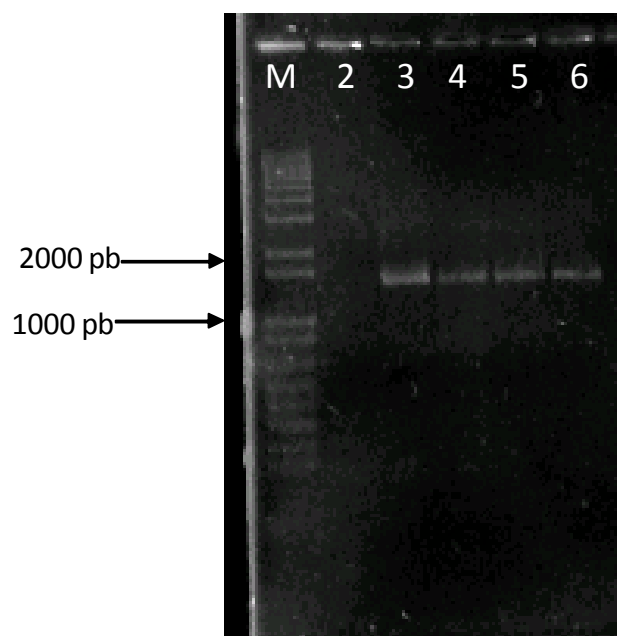


Figura 7 - Análise em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR 16S rDNA obtidos de DNA das frações líquida e sólido-aderida. M- Marcador 1kb plus DNA ladder; 2- Controle negativo da PCR; 3 e 4 – Amplificação da fração líquida; 5 e 6 – Amplificação da amostra sólido-aderida

Após a clonagem em *pGEM-T Easy Vector System I*, segundo instruções dos fabricantes (Promega) os clones positivos para a transformação foram selecionados pela diferenciação entre colônias brancas e pretas, as colônias brancas, as quais devem conter inserto, foram selecionadas (Figura 8). Foram selecionadas 12 colônias brancas representantes de cada amostra de estudo para a detecção da presença de inserto.



Figura 8 - Placa contendo clones da biblioteca 16S rDNA de rúmen de caprinos. Seta indicando colônias brancas que detectam a presença de inserto.

6.3 Extração do DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi realizada pelo método de lise alcalina. Foi confirmada por meio desta miniprep a presença visível do vetor em todas as colônias aleatórias escolhidas da fração sólido-aderida e em apenas oito colônias aleatórias da fração líquida (Figura 9).

A extração de DNA plasmidial foi realizada para confirmar a clonagem dos amplicons gerados no PCR do 16S rDNA. As minipreps de colônias aleatórias da fração sólido-aderida e da fração líquida foram analisadas em gel de agarose 0,8% (Figura 9).

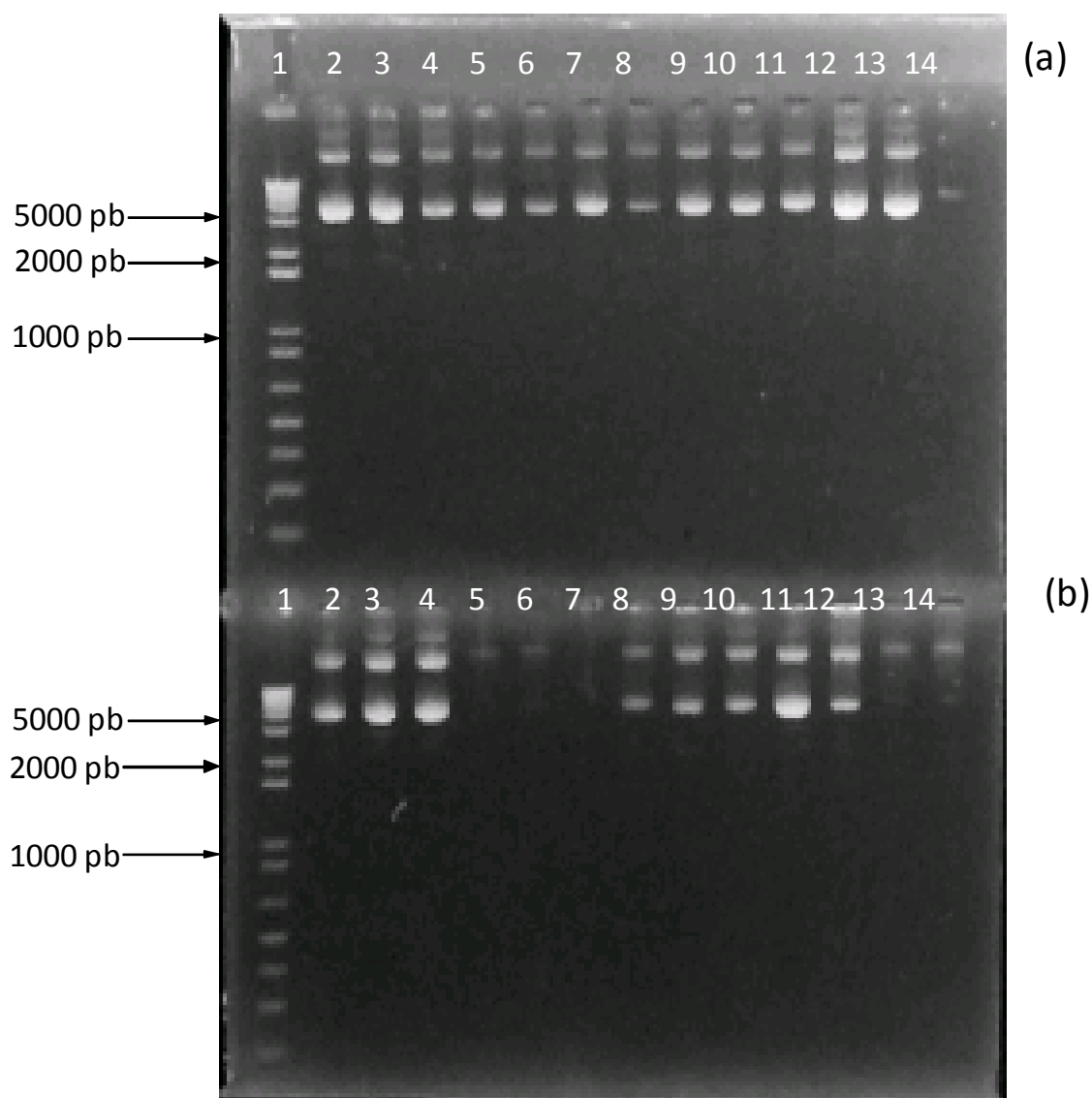


Figura 9 – Análise em gel de agarose 0,8% de miniprep de clones 16S aleatórios da fração líquida (A) e fração sólido-aderida (B), para utilização no sequenciamento. 1- Marcador 1kb *plus* DNA *ladder*; 2 a 14- clones aleatórios pertencentes a biblioteca 16S rDNA.

6.4 Análise da Diversidade das Comunidades Bacterianas

A reação de sequenciamento foi feita para um total de 400 clones de cada amostra. Os clones foram sequenciados utilizando o primer 27F. O sequenciamento

parcial é justificado uma vez que o objetivo foi avaliar a diversidade bacteriana presente nas amostras e não a realização de um estudo evolutivo detalhado. Para se caracterizar a biodiversidade microbiana associada com rúmen de caprino foi realizado o sequenciamento do banco de sequências para o gene ribossomal 16S rDNA.

Para a avaliação da qualidade das sequências utilizamos três ferramentas *Trimmed sequence*, *Bellerophon* e *Pintail*. Ao final do primeiro critério de seleção obtivemos 219 sequências da fração líquida e 258 sequências da fração sólido-aderida que apresentaram qualidade suficiente no eletroferograma disponibilizado no site da Bioinformática da Universidade Católica de Brasília (Pappas *et al.*, 2005). Através do programa *Bellerophon*, foram removidas 11 quimeras da fração líquida e três quimeras da fração sólido-aderida, os quais são gerados de dois parentes filogeneticamente distintos (Huber *et al.*, 2004). Além disso, o programa descartou uma sequência menor que 300 pb na fração líquida e 17 na fração sólido-aderida e cinco sequências menores que 400 pb para a fração líquida e 26 na fração sólido-aderida.

Mais uma ferramenta de análise para um refinamento das nossas sequências foi utilizada, o programa *Pintail*. Este programa nos mostrou mais 11 possíveis sequências quiméricas na fração líquida e 10 na fração sólido-aderida. Mesmo após a utilização dessas duas ferramentas, ao final da nossa análise encontramos mais uma possível quimera na fração líquida e uma para fração sólido-aderida, que foram retiradas da análise.

Ao final da avaliação da qualidade das sequências foram obtidas 190 sequências da amostra rúmen líquido e 201 sequências do rúmen sólido-aderida, maiores que 400 pares de bases sequenciados. As sequências 16S rDNA foram analisadas e comparadas a outras sequências disponíveis no banco de dados público *Ribosomal Database Project* para conhecimento ecológico da diversidade associada, que mostram que as sequências bacterianas da biblioteca ruminal da amostra sólido-aderida estão distribuídas em sete grupos: Bacteroidetes, Firmicutes, TM7, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Lentisphaerae e Bactérias não classificadas (Figura 10). Nesta amostra os filos mais predominantes, com 79 e 78 clones, foram Bacteroidetes e Firmicutes respectivamente, filo já conhecido por apresentar um papel importante na degradação de fibras (Shi *et al.*, 2008)

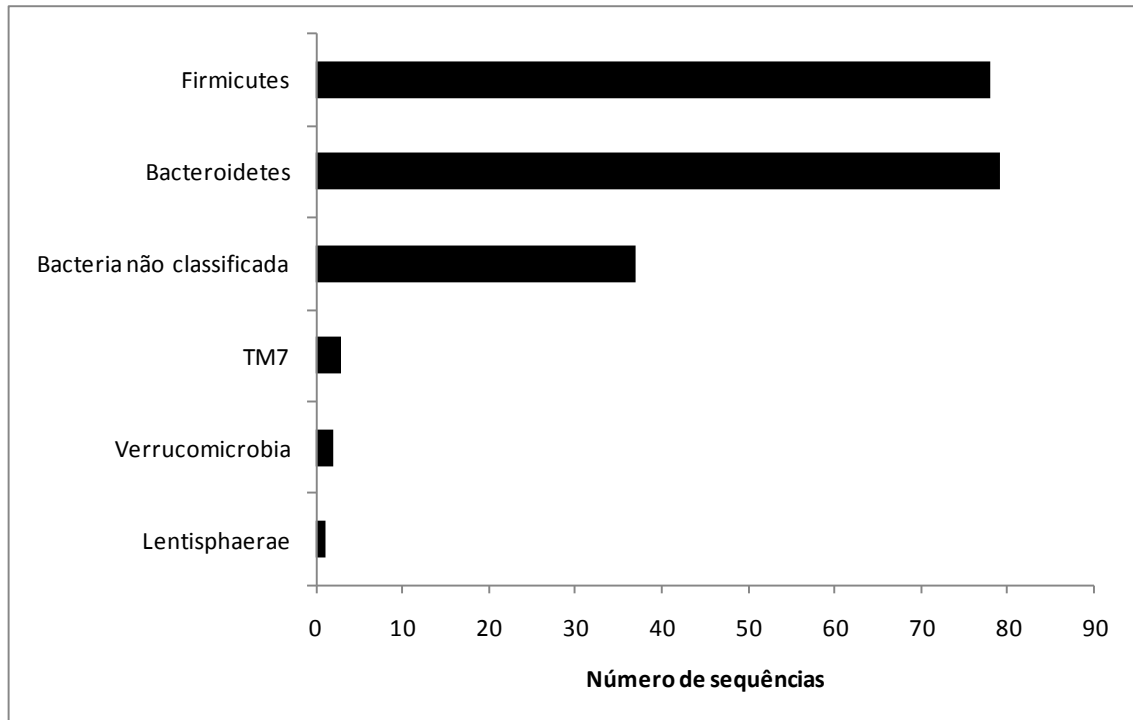


Figura 10 - Riqueza bacteriana da biblioteca 16S rDNA para a fração sólido-aderida. Dados gerados pelo RDP com confiança maior ou igual a 80% para sequências depositadas.

Na amostra de fluido ruminal foi observado outro padrão de distribuição dos filos. As sequências bacterianas estão distribuídas em cinco grupos filogenéticos: Firmicutes, Bacteroidetes, TM7, Proteobacteria e Bactérias não classificadas (Figura 11). Para esta amostra o filo com mais representativo foi o Firmicutes com 106 clones. A composição de ambas as bibliotecas são similares com predominância de sequências relacionadas ao filo Firmicutes seguido de sequências relacionadas ao filo Bacteroidetes. Os Firmicutes foram mais predominantes na fração fluída representando 56,1% de todas as sequências. Sequências pertencentes ao Filo TM7 foram observados em ambas as frações, no entanto, eles foram mais abundantes na fração sólido-aderida (1,5%). Verrucomicrobia (1%), Lentisphaerae (0,5%) e Actinobacteria (0,5%) foram observados apenas na fração sólido-aderida. Sequências não relacionadas com qualquer filo foram predominantes na fração sólido-aderida correspondente a 18,4% das sequências e na fração fluída correspondente a 4,8% das sequências. Essas sequências apresentam similaridade no intervalo de 80 – 100% para sequências depositadas no RDP de bactérias não classificadas.

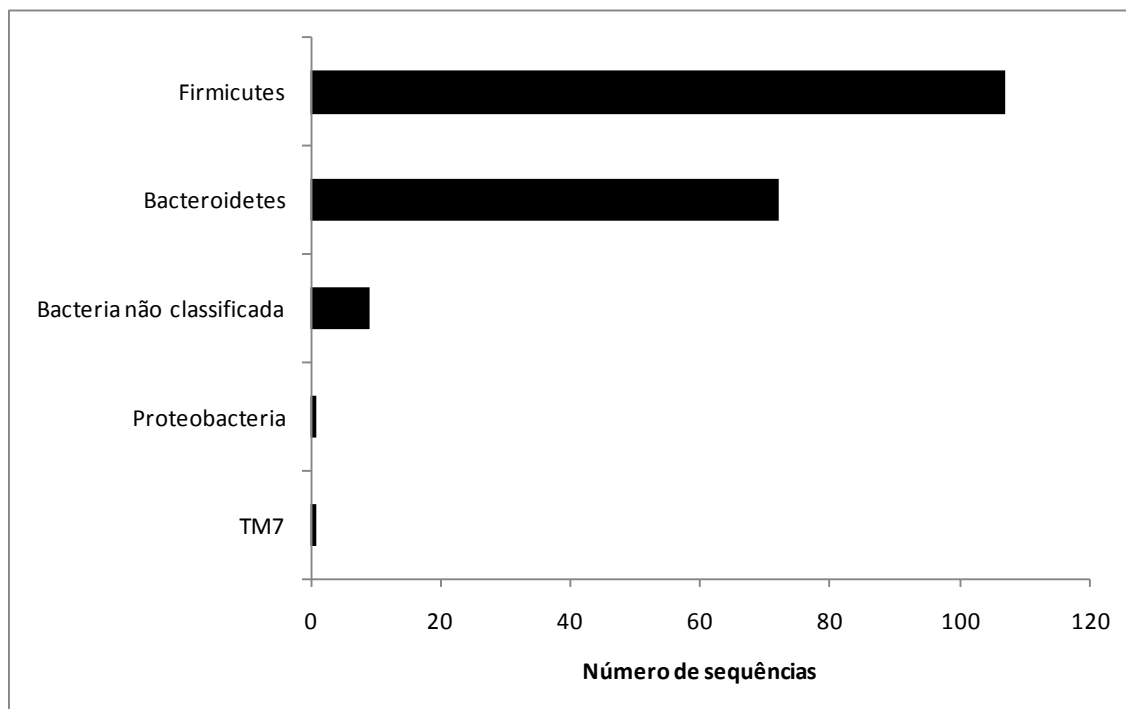


Figura 11 - Riqueza bacteriana da biblioteca 16S rDNA da fração líquida. Dados gerados pelo RDP com confiança maior ou igual a 80% para sequências depositadas.

Com relação à classe houve diferença na distribuição encontrada nas duas amostras (Figura 12). As classes predominantes foi Clostridia, com 106 e 76 clones, na amostra rúmen fluída e sólido-aderida, respectivamente. A diferença mais evidente é com relação à ocorrência de gêneros exclusivos para cada fração. Os gêneros *Mogibacterium*, *Butyrivibrio*, *Oribacterium*, *Syntrophococcus*, *Erysipelotrichi* não classificado, e *Succiniclasticum* e as classes *Proteobacteria/ Deltaproteobacteria* só apareceu na fração líquida, mas o gênero que apresentou uma distribuição similar nas duas frações foi *Prevotella* com 25 clones na fração líquida e 15 clones na fração sólido-aderida. Mesmo ao nível da predominância de gênero das sequências pertencentes a “*Clostridia* não classificado” estavam em ambas as frações, 71 sequências da fração líquida e 45 na fração sólida associada (Figura 13)

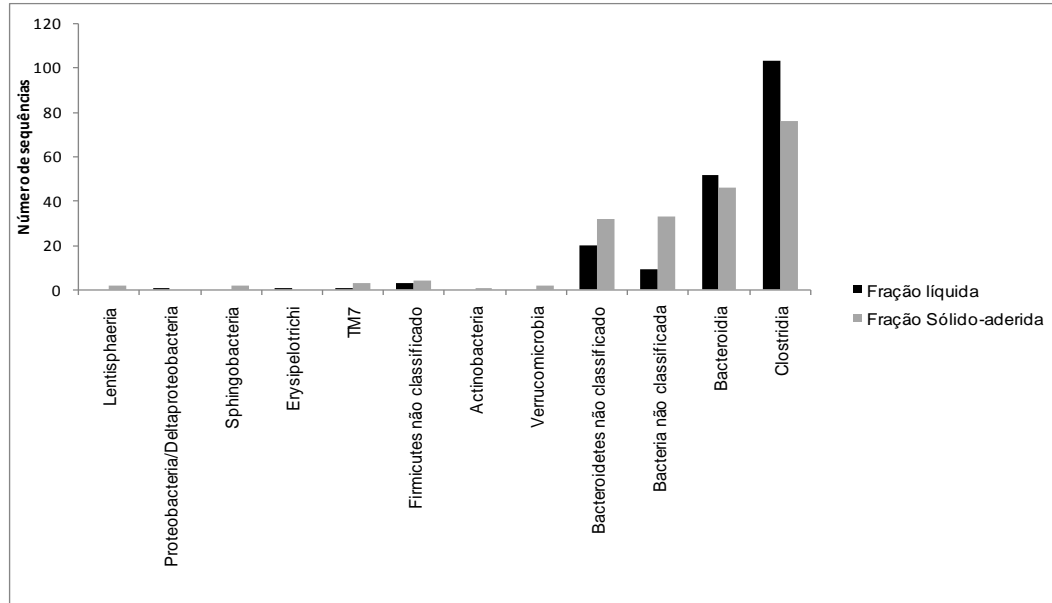


Figura 12 – Gráfico mostrando a riqueza bacteriana a nível de classe encontrada nas amostras ruminais. Dados gerados pelo RDP com confiança maior ou igual a 80% para sequências depositadas.

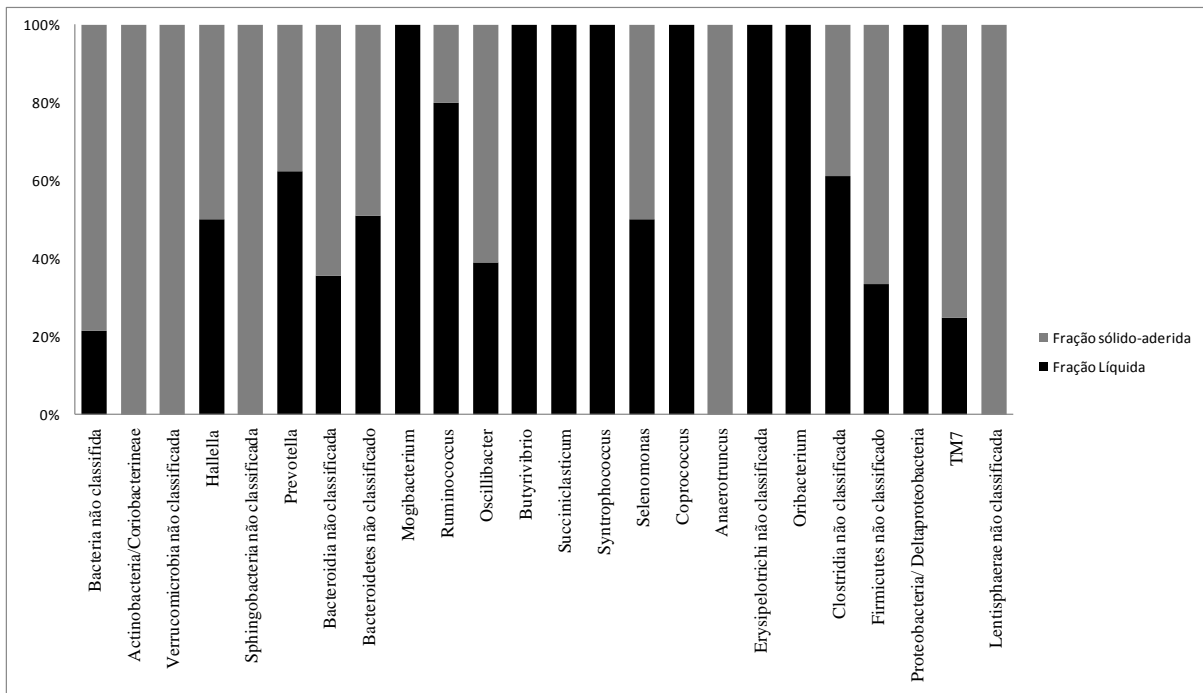


Figura 13 – Gráfico mostrando a riqueza bacteriana a nível de gênero encontrada nas amostras ruminais. Dados gerados pelo RDP com confiança maior ou igual a 80% para sequências depositadas.

6.5 Análise Filogenética

Representantes das sequências encontradas nas duas bibliotecas foram comparadas com outras sequências obtidas no GenBank (estirpes tipo e outras sequências do ambiente). Usando os mesmos parâmetros já mencionados, uma árvore foi gerada (Figura 14, 15 e 16), utilizando *Methanocaldococcus jannaschii* como grupo externo. Uma pequena parte das sequências da fração líquida e da fração sólido-aderida formou grupos que foram definidos como pelo menos quatro grupos com mais de 97% de similaridade (Tabela 1). O maior cluster na fração líquida foi *Clostridium orbiscindens* (L1), que representaram 7,85% das sequências (N = 15) possuindo 98% de similaridade a uma sequência de bactéria não cultivada (EU475525.1) (Tabela 1). Uma grande parte das sequências de fração líquida (75,4%) e da fração sólida - aderida (64,35%) não se encontravam em clusters (Figura 15). O cluster dominante na fração de sólido - aderida foi o S1, que representou 12,3% das sequências (N = 25) e tinha 89% de similaridade de sequência para uma sequência *Clostridium orbiscindens* (Tabela 1). O segundo maior cluster (S7) teve sete sequências sendo *Kaistella koreensis* a estirpe similar (82% de similaridade de sequência) (Figura 16). Estes dados sugerem que a maioria das sequências encontradas tanto na fração sólido-aderida quanto na fração líquida são de espécies ainda não descritas, sugerindo este ser um ambiente com um grande potencial exploratório.

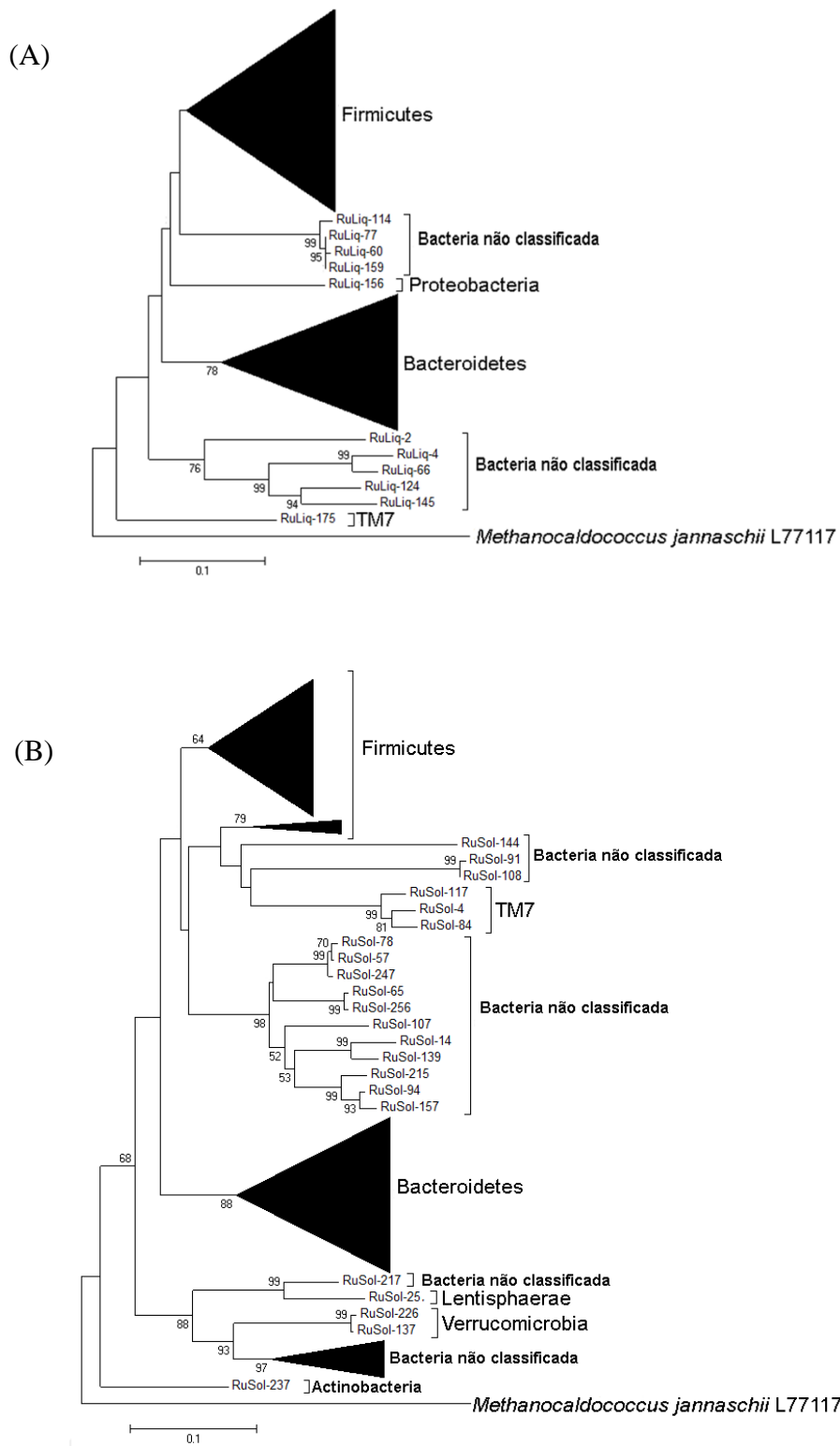
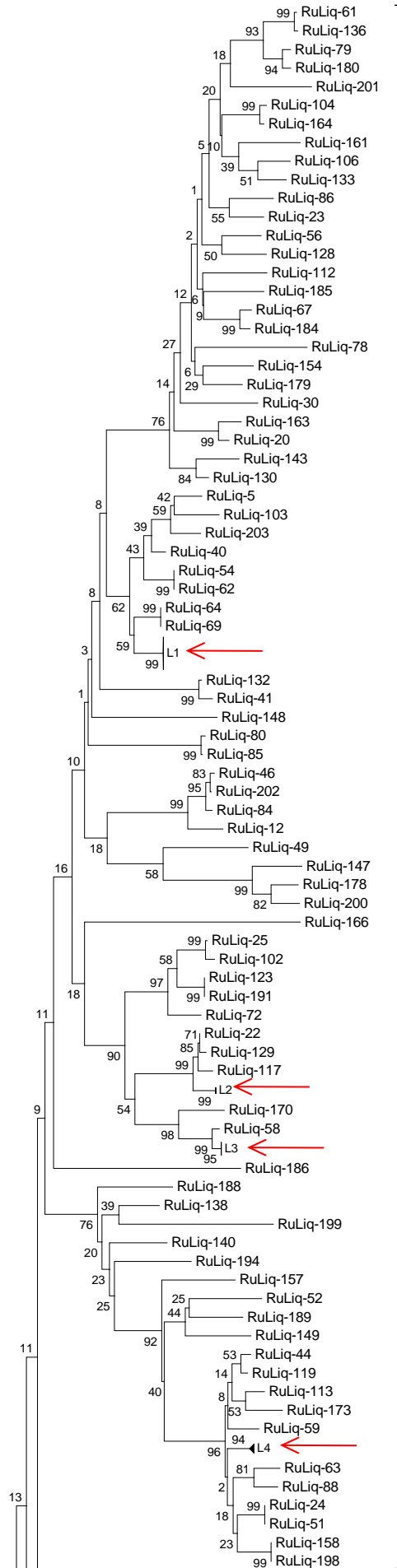
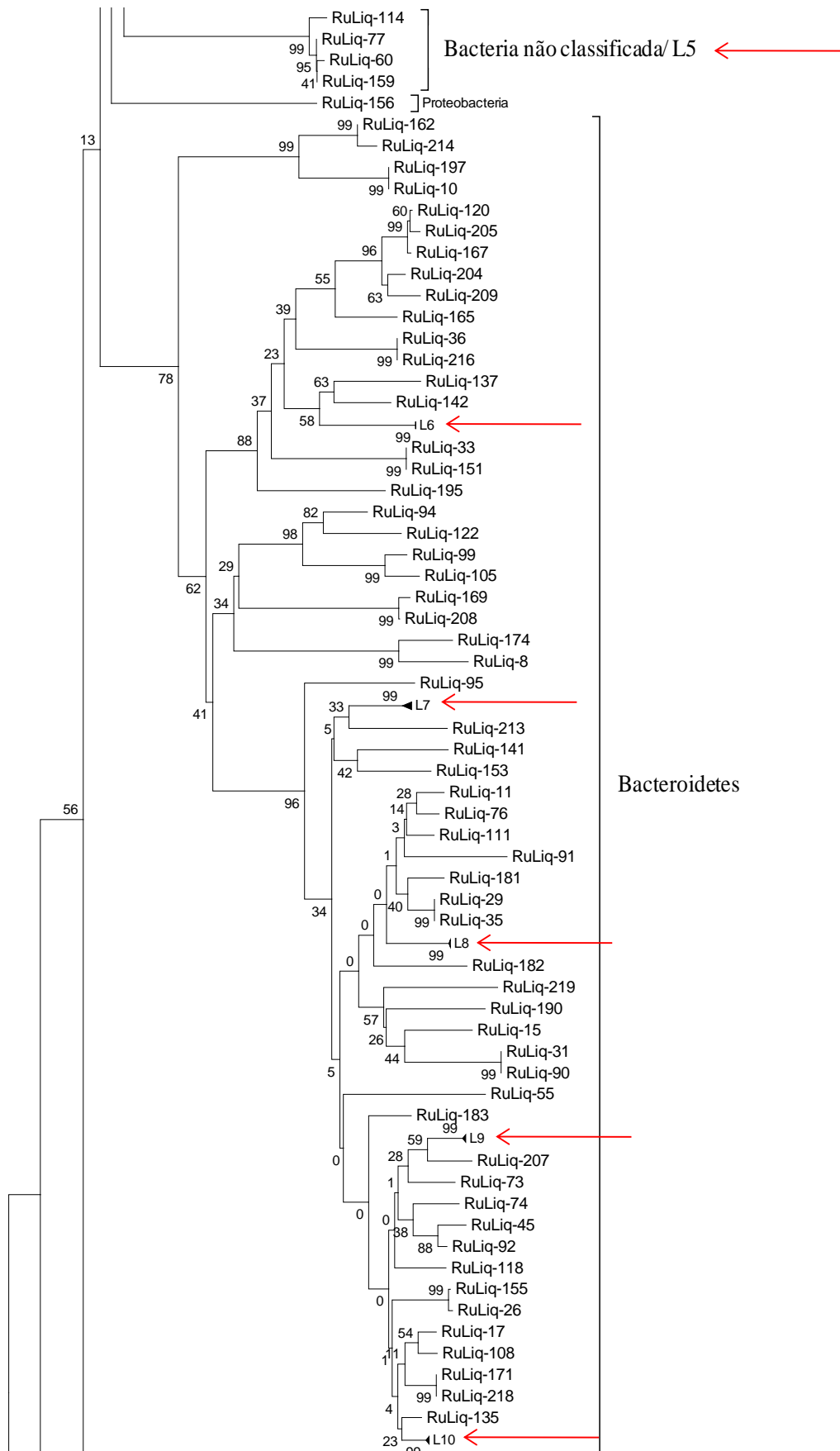


Figura 14 - Árvore filogenética obtida a partir das sequências 16S rDNA obtidas da fração líquida (A) e da fração sólido-aderida (B). As sequências estão representadas pelo número dos clones e seguida da sua classificação por filo determinada pelo RDP. A análise de bootstrap foi realizada com 1000 replicatas utilizando o programa MEGA 4.0.



Firmicutes



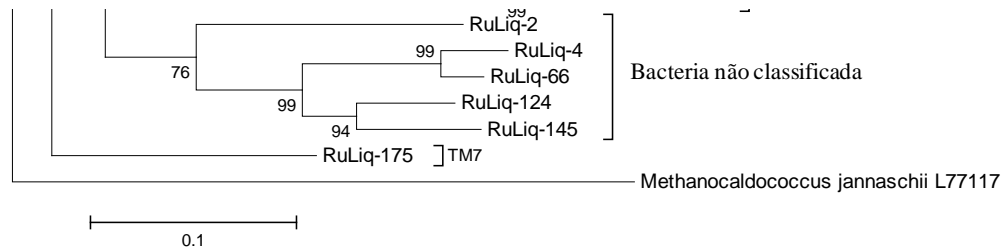
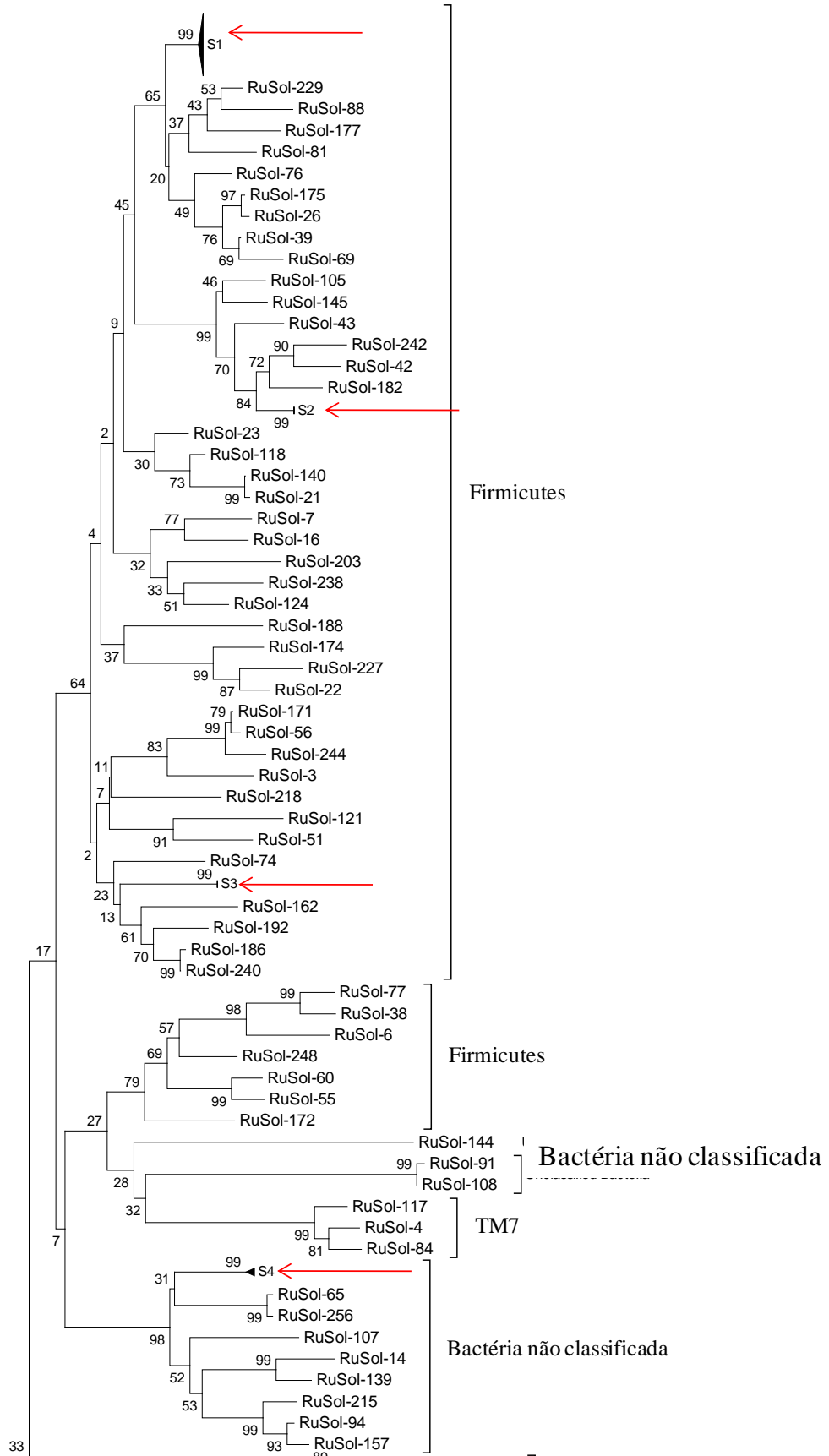
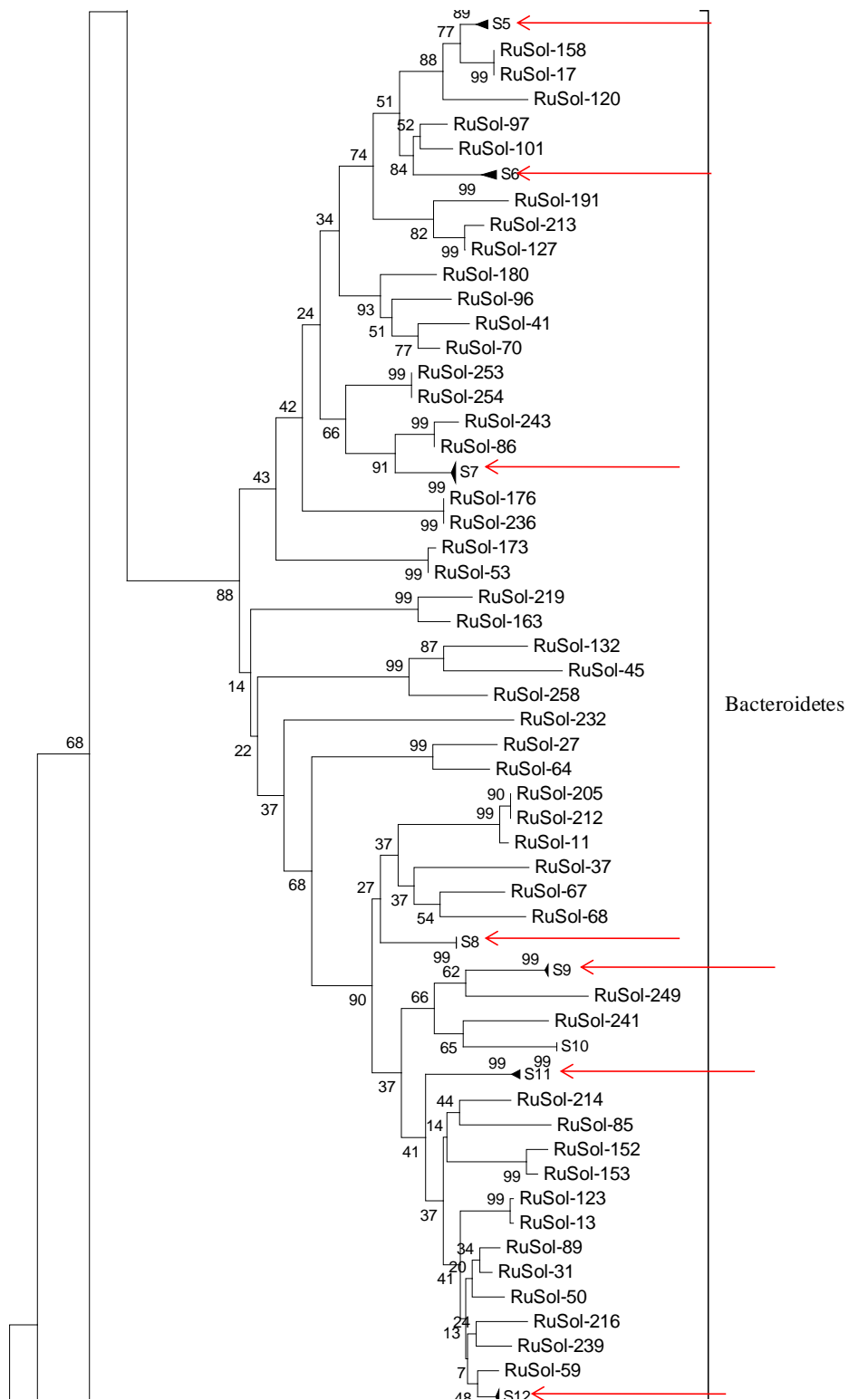


Figura 15 - Árvore filogenética obtidas a partir das sequências 16S rDNA obtidas do rúmen de caprinos da fração líquida (RuLiq). As sequências dos clones estão representadas pelo número dos clones e seguida da sua classificação por filo determinada pelo RDP. A análise de bootstrap foi realizada com 1.000 replicatas utilizando o programa MEGA 4.0. Os valores de Bootstrap são mostrados apenas maiores que 50%. As setas estão indicando os clusters de sequências dentro de cada filo.





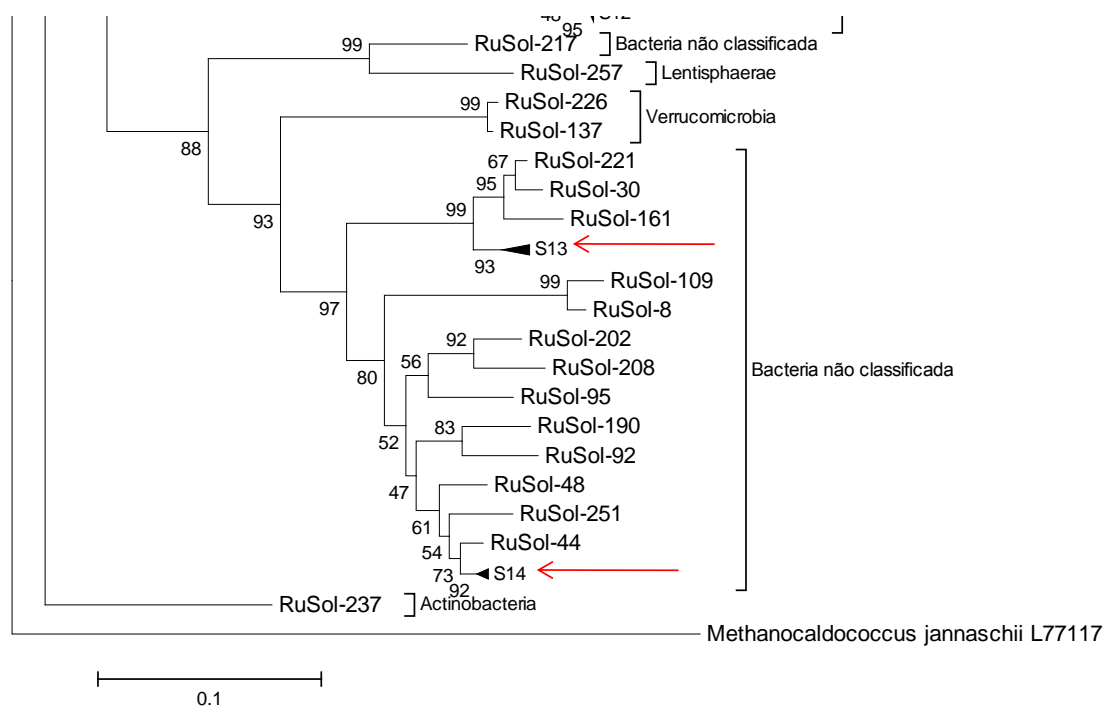


Figura 16 - Árvore filogenética obtidas a partir das seqüências 16S rDNA obtidas do rúmen de caprinos da fração sólido – aderida (Rusol). As seqüências dos clones estão representadas pelo número dos clones e seguida da sua classificação por filo determinada pelo RDP. A análise de bootstrap foi realizada com 1.000 replicatas utilizando o programa MEGA 4.0. Os valores de Bootstrap são mostrados apenas maiores que 50%. As setas estão indicando os clusters de seqüências dentro de cada filo.

Tabela 1- Tabela de caracterização dos clusters de sequências para a fração Sólido-aderida e líquida.

Rúmen Sólido-aderido	Número de Clones 72	Representante	Sequências mais Próxima (%similaridade)	N° de acesso Sequência mais próxima	Sequência de Cultivados mais Próximo (%similaridade)	N° de acesso
S1	25	RuSol-234	Uncultured bacterium clone SBSD (96)	EU475525.1	<i>Clostridium orbiscindens</i> (T);(89)	Y18187
S2	3	RuSol-52	Uncultured bacterium clone TU1 (95)	EU470004.1	<i>Eubacterium ramulus</i> (T); (90)	L34623
S3	3	RuSol-103	Uncultured bacterium clone 1103200831344 (95)	EU843612.1	<i>Anaerotruncus colihominis</i> (T); (88)	AJ315980
S4	3	RuSol-78	Uncultured bacterium clone RB-3C9 (93)	FJ172803.1	<i>Acholeplasma axanthum</i> (T); (89)	AF412968
S5	3	RuSol-159	Uncultured bacterium clone SBSD_aaa01d11 (96)	EU475525.1	<i>Bacteroides capillosus</i> (T); (88)	AY136666
S6	3	RuSol-111	Uncultured bacterium clone P5_D12 (95)	EU382048.1	<i>Xylanibacter oryzae</i> (T); (91)	AB078826
S7	7	RuSol-34	Uncultured bacterium clone GRC67 (92)	DQ673532.1	<i>Kaistella koreensis</i> (T); (82)	AF344179
S8	4	RuSol-36	Uncultured bacterium clone GOR_aag72e04 (97)	EU469848.1	<i>Prevotella oris</i> (T); (96)	L16474
S9	3	RuSol-82	Uncultured bacterium clone 814334 (94)	EU719233.1	<i>Prevotella shahii</i> (T); (94)	AB108825
S10	4	RuSol-187	Uncultured bacterium clone molerat_aai72f05 (88)	EU463271.1	<i>Prevotella albensis</i> (T); (92)	AJ011683
S11	3	RuSol-90	Uncultured bacterium clone TWBRB96 (92)	FJ028808.1	<i>Prevotella shahii</i> (T); (89)	AB108825
S12	5	RuSol-224	Uncultured bacterium clone BF375 (94)	EU850565.1	<i>Prevotella oris</i> (T); (87)	L16474
S13	3	RuSol-125	Uncultured bacterium clone horsej_f08_ (88)	EU468266.1	<i>Rhodothermus marinus</i> (T); R-10 (DSM 4252); (Not significant similarity found)	X80994
S14	3	RuSol-178	Uncultured bacterium clone TWBRB28 (93)	FJ028752.1	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> (T); (Not significant similarity found)	U75647

Rúmen Líquido	Número de Clones 47	Representante	Sequências mais Próxima (%similaridade)	N° de acesso Sequência mais próxima	Sequência de Cultivados mais Próximo (%similaridade)	N° de acesso
L1	15	RuLiq-196	Uncultured bacterium clone SBSD_aaa01d11. (98)	EU475525.1	<i>Clostridium orbiscindens</i> (T); (86)	Y18187
L2	3	RuLiq-125	Uncultured bacterium clone KO2_aai19b09 (93)	EU776330.1	<i>Alkaliphilus crotonatoxidans</i> (T); B11-2; (87)	AF467248
L3	6	RuLiq-70	Uncultured bacterium clone CAP_aah99f09 (94)	EU459549.1	<i>Garciella nitratireducens</i> (T);(87)	AY176772
L4	4	RuLiq-159	Uncultured bacterium clone CAP_aah98h12 (94)	EU459516.1	<i>Ferrimonas balearica</i> (T); PAT; (97)	X93021
L5	4	RuLiq-98	Uncultured bacterium rumen clone GRC24 (94)	DQ673489.1	<i>Selenomonas ruminantium</i> (T); GA192; (94)	M62702
L6	3	RuLiq-21	Uncultured bacterium rumen clone GRC67 (100)	DQ673532.1	<i>Kaistella koreensis</i> (T);(97)	AF344179
L7	3	RuLiq-146	Uncultured bacterium clone p1c05ct-1 (100)	AY578375.1	<i>Prevotella oulorum</i> (T); (100)	L16472
L8	3	RuLiq-160	Uncultured bacterium rumen clone TWBRB96 (100)	FJ028808.1	<i>Prevotella shahii</i> (T); JCM 12083; EHS11; (100)	AB108825
L9	3	RuLiq-39	Uncultured bacterium rumen clone YRC33 (100)	EU259409.1	<i>Prevotella albensis</i> (T); (100)	AJ011683
L10	3	RuLiq-206	Uncultured bacterium clone DL_2aaa04f05 (100)	EU473820.1	<i>Prevotella oris</i> (T)); (98)	L16474

6.6 Análise do número de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs)

O programa DOTUR foi utilizado para calcular estimadores de riqueza e para a construção de curvas de rarefação. Um total de 131 e 129 operacionais distintos Taxonomic Units (OTU's) foram identificados para a fração de líquido e sólido-aderida, respectivamente, utilizando o critério de 97% de similaridade (Figura 17). A análise das sequências derivadas de bibliotecas da fração líquida e sólida-aderida mostrou homogeneidade entre os filos. As curvas de rarefação usando uma distância evolutiva de 0,01 ou 0,03 das bibliotecas de bactérias revelou elevada riqueza em nível de gênero (97%), mas a riqueza a este nível não foi suficientemente cobertos.

Para avaliar se diferenças observadas na composição da comunidade bacteriana são estatisticamente significantes o programa β -Libshuff (Schloss, 2004) foi usado com 10.000 randomizações. Esta análise ilustra o poder do β -Libshuff de detectar diferenças entre as comunidades, fornecendo a base para inferências ecológicas sobre a associação da composição da comunidade microbiana ruminal. Os valores obtidos P significativa ($P < 0.0002$) mostram que as bibliotecas são diferentes (Figura 18). A riqueza de espécies foi estimado usando o Chao 1, um estimador de riqueza de espécies não-paramétrico para estimar o tamanho das populações de animais que é adequado para uso com as comunidades microbianas (Hughes *et al.*, 2001). Esta análise mostra que a riqueza esperada para a fração de sólido-aderido é maior do que para a fração líquida estimando 333 espécies para a fração líquida e 355 para a fração sólido-aderida.

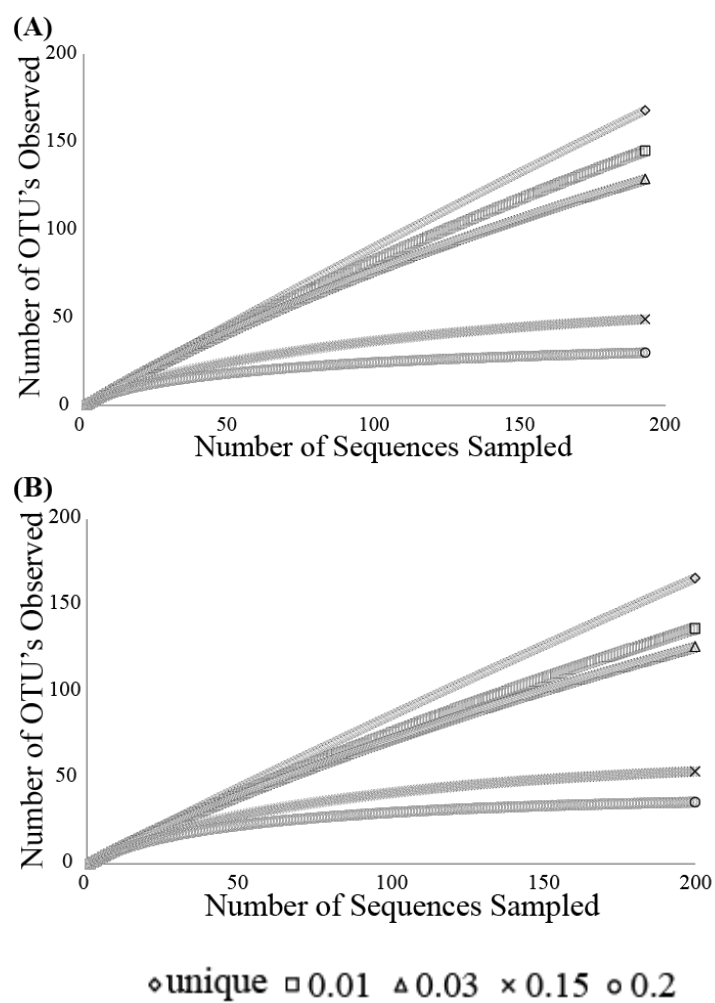


Figura 17 - Curvas de rarefação geradas pelo programa DOTUR. (A) Rúmen fração líquida; (B) Rúmen fração sólido-aderida.

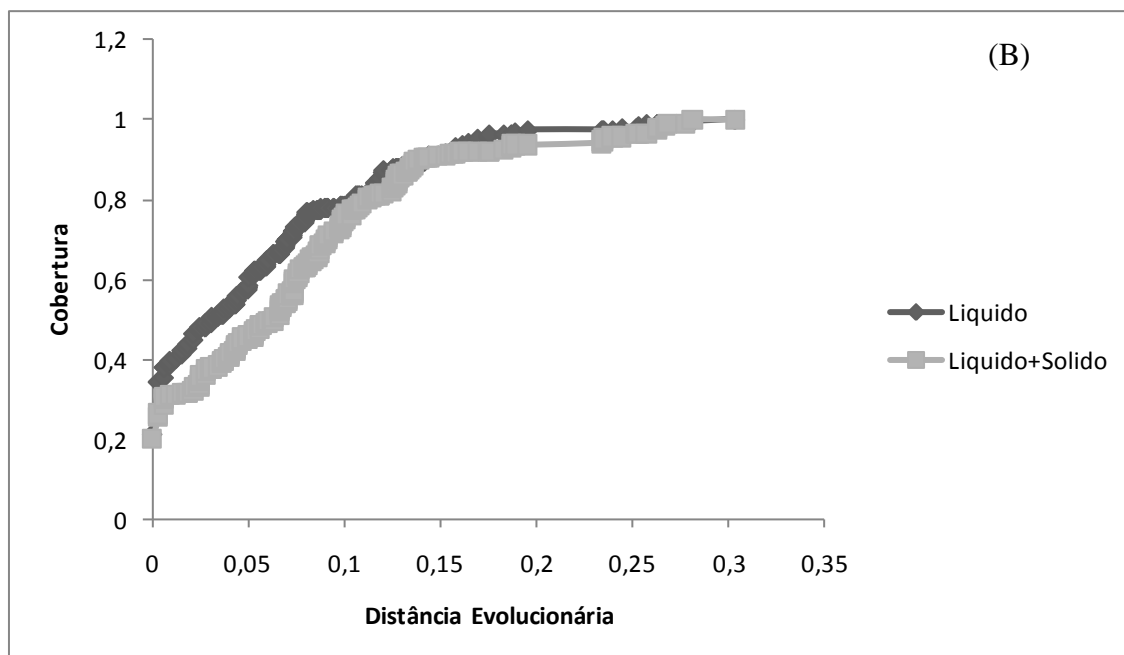
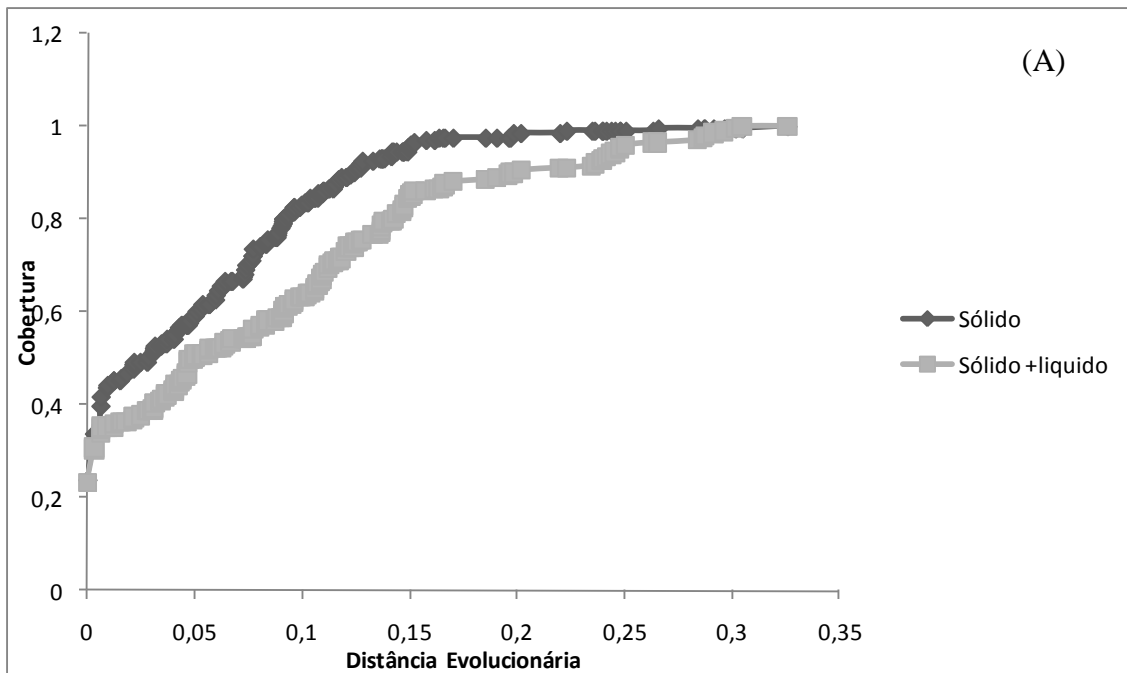


Figura 18 – Gráfico mostrando o resultado da comparação do β -Libshuff. (A) Sólido, Sólido + líquido; (B) Líquido, Líquido + Sólido.

7. Discussão

A análise dos amplicons gerados por PCR do gene ribossomais 16S rDNA é o método mais eficiente utilizado para estudos de diversidade e riqueza devido à distribuição universal desses genes entre procariotos, a presença de domínios conservados e variável no gene e sua confiabilidade para inferir relações filogenéticas (Woese, 1987; Pace, 1997). Estudos da comunidade microbiana no rúmen de caprino utilizando técnicas de cultura independente são escassos (Shi *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2009). Este é o primeiro estudo sobre a diversidade das comunidades de *Bacteria* na microbiota do rúmen de caprinos com gene ribossomal 16S rDNA. Nossa análise do gene 16S rDNA de espécies de bactérias presentes no conteúdo ruminal de uma raça de cabras nativas do Nordeste do Brasil revela um grupo muito diversificado de microrganismos, a maioria dos quais não foram previamente identificados por meio da cultura tradicional ou técnicas moleculares .

Estudos recentes mostram que a diversidade microbiana de rúmen de caprinos é extremamente subestimada por pesquisas que utilizam o método de cultura direta. Isto se deve ao fato de que a maioria dos microrganismos na natureza normalmente não pode ser cultivada por técnicas padrão (Amann *et al.*, 1995). O advento do estudo do gene ribossomal 16S rDNA baseado em métodos moleculares independentes de cultura tem gerado maior compreensão da extensão da diversidade bacteriana (Pace, 1997). Sobre tal perspectiva de análise, mais de 40 divisões bacterianas são agora reconhecidas, apenas metade dos que têm representantes obtidos em cultura pura (Holt *et al.*, 1989). Conseqüentemente, as sequências de clones ambientais compõem uma parcela significativa das sequências de 16S rDNA presente em bases de dados públicas.

No entanto, como a maioria dos métodos de estudo do gene rDNA são aplicados aos microrganismos que ocorrem naturalmente no ambiente, a detecção de quimeras não é um trabalho simples, uma vez que ambientes naturais possuem novas sequências de rDNA (Maidak *et al.*, 1999). Sendo assim, o processo de detecção de quimeras dos genes ribossomais rDNA é importante na hora de analisar os dados pois, estas sequências podem fornecer conclusões errôneas de uma nova linhagem evolucionária, levando a uma falsa impressão de biodiversidades dentro da comunidade bacteriana (Liesack *et al.*, 1992).

As sequências bacterianas 16S rDNA pertencentes a biblioteca 16S rDNA da amostra ruminal sólido-aderida estão distribuídas em sete grupos: Bacteroidetes, Firmicutes, TM7, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Lentisphaerae e Bactérias não classificadas (Figura 10). Nesta amostra os filos mais predominantes, com 79 e 78 clones, foram Bacteroidetes e Firmicutes respectivamente. Na amostra fluído ruminal foi observado outro padrão de distribuição dos filos. As sequências bacterianas estão distribuídas em cinco grupos filogenéticos: Firmicutes, Bacteroidetes, TM7, Proteobacteria e Bactérias não classificadas (Figura 11). Essa diferença na riqueza encontrada nestas duas amostras pode ter ocorrido devido diversos fatores que promovem mudanças na população microbiana como a idade do animal, a estação do ano, o uso de terapêuticos e acima de tudo a dieta do animal hospedeiro (Edwards *et al.*, 2004).

Ao analisar a árvore filogenética (Figura 14) é evidente que existe uma diferença na distribuição dos filos ao longo da árvore gerada para as duas bibliotecas. Bacteroidetes e Firmicutes encontrados na biblioteca são bem distribuídas ao longo da árvore, no entanto, os clones associados à fração sólido-aderida formam um grupo separado de bactérias não-classificadas que são intercaladas entre TM7 e filos Bacteroidetes e um grande grupo de bactérias classificadas são separadas dos outros grupos.

Como foi observado em um estudo sobre a microbiota de rúmen de bovino, realizado por Brulc *et al.* (2009), utilizando a tecnologia de pirosequenciamento, a composição de filos de bactérias encontradas no rúmen caprino foi semelhante ao encontrado no rúmen de bovinos com a filo Firmicutes e Bacteroidetes sendo os representantes mais prevalentes, tanto nas frações líquidas, quanto nas sólidas associadas. Diferentemente do rúmen de bovinos, representantes de Proteobacteria não foram identificadas entre as sequências de rúmen de caprino sólido-aderida. No entanto, é possível que Proteobacteria esteja presente em níveis baixos, pois pôde-se observar sequências de Proteobacteria ao validar a biblioteca metagenoma de pequenos insertos de rúmen de caprino². Como no rúmen de bovinos, Verrucomicrobia só foi encontrado na fração sólida-aderida. No entanto, Actinobacteria que só foi encontrado na fração

² Este resultado será abordado especificadamente no capítulo 2 desta dissertação.

sólido-aderida no rúmen de cabra também foi detectado na fração líquida no rúmen de bovinos, embora em níveis baixos (Brulc 2009).

Estudos anteriores com abordagens moleculares descreveram parcialmente a comunidade microbiana no rúmen (Whitford *et al.*, 1998; Tajima *et al.*, 1999). Em Nelson *et al.* (Nelson *et al.*, 2003) com base nas análises filogenéticas de materiais provenientes de rúmen de zebra e gazelas, representantes de apenas quatro filos bacterianos foram identificados: Verrucomicrobia, Proteobacterias (a ordem deltaproteobacteria e a classe Gammaproteobacteria), Bacteroidetes e Firmicutes. Este resultado é similar ao encontrado em nosso estudo com a exceção do aparecimento da classe Gammaproteobacteria pertencente ao filo Proteobacteria.

Três filos bacterianos, Firmicutes (Gram-positivos), Bacteroidetes (gram-negativas) e Actinobacteria (gram-positivos) também dominam a microbiota do intestino de humanos adultos. Firmicutes, quando comparado a outros filos, é o maior filo de bactérias e contém mais de 200 gêneros, incluindo *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Bacillus* e *Clostridium*. Os Bacteroidetes (incluindo cerca de 20 gêneros) e Actinobacterias também pertencem à microbiota intestinal dominante, mas estes são frequentemente perdidos por sequenciamento do gene ribossomal 16S RNA e na maioria das vezes só pode ser detectada por fluorescência de hibridização in situ (FISH) (Zoetendal *et al.*, 2001). No entanto mesmo com as limitações da técnica e da dificuldade de encontrar representantes do filo Actinobacteria, em nossa biblioteca encontramos um exemplar na fração sólido-aderida.

As Actinobacterias são representados por bactérias gram-positivas e com alto teor de G+C (Arcuri *et al.*, 2006), este filo está distribuído em ecossistemas aquáticos e terrestres possuem importante função na decomposição de matéria orgânica e formação de húmus (Rappe *et al.*, 1999), portanto possuem um papel importante no rúmen de caprinos.

O filo Proteobacteria constitui o maior e mais diverso grupo de bactérias cultivadas, apresentando grande diversidade de morfologia e metabolismo. Possui cinco divisões: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria e Gammaproteobacteria. Um dos papéis desempenhados por esse grupo está na participação ativa do ciclo de nitrogênio (Nusslein *et al.*, 1999).

Os Firmicutes são caracterizados como bactérias gram-positivas aeróbicas e anaeróbicas, com baixo teor de G+C. Organismos pertencentes a este filo como os gêneros *Bacillus* e *Clostridium* são bactérias formadoras de esporos e utilizam como estratégia de sobrevivência um crescimento rápido quando há nutrientes abundantes em áreas com baixa competição, geralmente são encontrados em ambientes instáveis que estejam passando por transições (Atlas *et al.*, 1998). Bacteroidetes é uma das principais linhagens de bactérias e se destacou cedo durante o processo evolutivo (Salyers *et al.*, 1993). Recentes avanços da genômica e proteômica facilitaram a compreensão da natureza adaptativa das espécies de Bacteroides. O gênero *Bacteroides* sofreu grandes revisões nos últimos 15 anos. A inclusão ou exclusão de espécies dentro do gênero *Bacteroides* ocorreu frequentemente, no entanto, estas mudanças são de grande importância, uma vez que o posicionamento taxonômico é uma útil ferramenta que pode ser usada como indicador do potencial de virulência e resistência antimicrobiana (Wexler, 2007).

A divisão TM7 é uma das várias recém-descritas divisões exclusivamente bacteriana caracterizada por dados de sequência provindas do meio ambiente (Hugenholtz *et al.*, 1998). TM7 foi originalmente proposto, baseado no 16S DNA ribossomal (rDNA) sequências parciais obtidas de estudos de PCR clonal de uma turfeira (uma sequência, depois disso a divisão foi nomeado) (Rheims *et al.*, 1996), um solo da floresta madura (duas sequências) (Borneman *et al.*, 1997), e de dois sequenciamentos de lamas de reator (sete sequências) (Bond *et al.*, 1995).

Com uma análise mais detalhada das sequências pertencentes às bactérias não classificadas em ambas as frações, utilizando um critério de valor acima de 0.8 (score do seqmatch), observou-se que quase 100% das sequências não se relacionam com nenhuma sequência encontrada em ruminantes. Na fração sólido-aderida, 89,2% do grupo pertencem a bactérias não cultivadas não relacionadas às bactérias do rúmen. Isto mostra que a maioria das bactérias não classificadas em ambas as frações estão relacionadas com bactérias conhecidas de outros habitat com fezes e rúmen de bovinos.

Em relação à classe houve diferença na distribuição encontrada nas duas amostras (Figura 12). As classes predominantes foi Clostridia, na amostra rúmen líquida e sólido-aderida. Este resultado pode indicar que a comunidade bacteriana sólido-aderida não consiste somente em espécies fibrolíticas, mas também de espécies não-

fibrolíticas e que a degradação das fibras podem ser aceleradas pela interação “cross feeding” com o produto da hidrólise de outras espécies (Wolin *et al.*, 1997).

Dois estudos recentes têm apresentado uma análise preliminar da biodiversidade genética de bactérias utilizando o gene 16S rDNA, presentes no rúmen de *Bos taurus* da região de clima temperado, alimentados com dietas definidas contendo feno e seus concentrados (Tajima, Aminov *et al.*, 2001; Tajima, Nagamine *et al.*, 2001). Nestes estudos, a maioria das sequências de 16S rDNA obtidas de gado doméstico, eram de novas espécies ou gêneros dentro de dois filos principais: o Firmicutes (baixo G+ C, bactérias Gram-positivas) relacionados com *Clostridium*, e Bacteroidales (*Prevotella* grupo Bacteroides). Além disso, *Prevotella spp.* tem sido encontrada como as espécies predominantes entre os microrganismos isolados do rúmen usando métodos baseados em cultura, e têm mostrado representar até 60% das bactérias do rúmen rDNA amplificadas por métodos moleculares (Wood *et al.*, 1998).

Segundo Jaladiun *et al.* (1992), bactérias isoladas do rúmen de bovinos e búfalos indianos foram representados por *Ruminococcus albus* e *R. flavefaciens* (59,8%), *Bacteroides succinogenes* (*Fibrobacter succinogenes*) (19,2%), *Butyrivibrio fibrisolvens* (11,1%), *Clostridium lochheadii* (3,8%) e *C. longisporum* (1,3%), que são bactérias capazes de degradar celulose.

Do mesmo modo, Cheng e McAllister (1997) caracterizam a população microbiana ruminal em três tipos, aquela livre no fluído, a aderida em partículas do alimento e aquela associada a parede do intestino. Oitenta por cento do total de enzimas endoglicanase são sintetizadas por microrganismos aderidos as partículas de alimentos. *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus* são consideradas bactérias celulolíticas representantes no rúmen (Forsberg *et al.*, 1997).

Estudos da informação da sequência 16S rDNA demonstraram que as comunidades microbianas gastrintestinais em bovinos (Whitford *et al.*, 1998; Tajima *et al.*, 1999), suínos (Leser *et al.*, 2002) e humanos (Suau *et al.*, 1999) parecem ser dominado por Firmicutes, particularmente aqueles relacionados ao gênero *Clostridium*. Essa predominância aparente pode, em parte, estar relacionada ao viés da técnica de PCR de amplificação de DNA total da comunidade (Von Wintzingerode, 1997). Os fatores específicos que poderiam influir os dados incluem a possibilidade de que a

sequência de rDNA de espécies microbianas com elevado conteúdo G + C genômica pode ser menos facilmente amplificadas (Reysenbach *et al.*, 1992), e que alguns *Clostridium spp.* em geral parecem ter entre os maiores números de rDNA genes por genoma até agora descrito em procariontes (Farrelly *et al.*, 1995). Sobre este ponto de vista, Shi *et al.* (2008) ao estudarem rúmen de caprinos chineses sugeriram que a comunidade bacteriana é influenciado diferencialmente pelas diferentes espécies de cabra. Tais diferenças podem refletir a influência individual de cabras na comunidade bacteriana do rúmen.

A análise das sequências derivadas de bibliotecas da fração líquida e sólida-aderida em nossas amostras mostrou homogeneidade entre os filos. As curvas de rarefação (Figura 17) usando uma distância evolutiva de 0,01 ou 0,03 das bibliotecas de bactérias revelaram elevada riqueza em nível de gênero (97%), mas a riqueza a este nível não foi suficientemente cobertos, atingindo um platô em nível de filo.

Encontramos também um total de 131 e 127 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU's) para as frações líquida e sólido-aderida, respectivamente, utilizando o critério de 97% de similaridade. Edwards *et al.* (2004) analisaram as sequências de três bibliotecas genômicas depositadas no GenBank, construídas a partir da amplificação, por PCR do rDNA 16S, de amostras do conteúdo ruminal de bovinos. Neste estudo comparativo, os autores estimaram que apenas 11% das unidades taxonômicas operacionais (OTU), detectadas por técnicas moleculares, representam microrganismos cultiváveis em laboratório. Deste total, a maioria das espécies bacterianas foram isoladas do rúmen, embora algumas sequências representam microrganismos que foram isolados de cavidade oral humana ou do intestino de suíno e que, não foram descritas no ambiente ruminal. As sequências disponíveis neste trabalho também indicaram que os dois maiores grupos presentes no rúmen são: Bacteroidetes e Firmicutes. Edwards *et al.* (2004) estimaram que o rúmen de bovinos contém 341 OTUs e que a espécie *Prevotella ruminicola* é mais abundante (5% da população). Foi constatado também, que várias sequências representam novos grupos taxonômicos, embora apenas a informação do rDNA 16S seja insuficiente para determinar a posição dessas novas unidades taxonômicas operacionais. Diferentemente do encontrado por Koike *et al.* (2003) que ao estudar a comunidade ruminal bacteriana sólido-aderida em cabras japonesas encontrou bactérias fibrolíticas e não-fibrolíticas, e sequências

relacionadas a *Prevotella* e *B. fibrisolvens*, que formavam um grande cluster filogenético.

Para avaliar se diferenças observadas na composição da comunidade bacteriana são estatisticamente significantes o programa β -Libshuff (Schloss *et al.*, 2004) foi usado com 10.000 randomizações. Esta análise ilustra o poder do β -Libshuff de detectar diferenças entre as comunidades, fornecendo a base para inferências ecológicas sobre a associação da composição da comunidade microbiana ruminal. Os valores obtidos P significativa ($P < 0.0002$) mostram que as bibliotecas são diferentes (Figura 18). Porém segundo Schloss *et al.* (2004) é possível que haja diferenças mais significantes que o programa não possa calcular por causa do tamanho das sequência e de sua qualidade.

8. Conclusão

Como em outros ruminantes os conjuntos de dados microbianos aqui apresentados representam uma avaliação da diversidade da comunidade bacteriana do rúmen de caprinos brasileiros, quanto ao conteúdo genético ecológico. Como tal, eles representam uma linha de base para futuros estudos e será de grande utilidade para a compreensão da comunidade microbiana ampla, complexa e dinâmica do rúmen de caprinos, cuja composição, em última análise reflete a co-evolução/seleção de microrganismos com seu hospedeiro e dieta. Nas bibliotecas de rúmen de caprinos, as sequências de 16S rDNA mais comumente detectadas nos clones foram pertencentes ao filo Firmicutes e Bacteroidetes na fração líquida e sólida-aderida, respectivamente.

Já é conhecido que a composição e função da microbiota podem ser afetadas por diversos fatores, tais como ingredientes alimentares, níveis de nutrientes, meio ambiente, probiótico e tratamentos com antibiótico. As informações das sequências geradas por este estudo foram importantes para o conhecimento das espécies encontradas no rúmen, onde nos permitem vincular este resultado ao potencial metabólico para a identificação de microrganismos ruminais em seu habitat natural. Além disso, nos proporcionou um maior conhecimento da comunidade bacteriana fazendo com que o manejo dos animais possa ser melhorado através de diretrizes específicas para a comunidade em questão.

9. Perspectivas Futuras

- Para concluir esse trabalho está sendo redigido um artigo científico com previsão para submissão até Julho de 2010.
- Caracterização das *Archaeas* presentes nas frações líquida e sólido-aderida nesta mesma amostra.
- Sequenciamento das duas frações da biblioteca 16S rDNA utilizando pirosequenciamento.
- Comparação com a composição da comunidade bacteriana de espécies de caprino da raça Moxotó que se alimentaram na estação seca no semi-árido nordestino.
- O estudo de diversidade de um habitat é importante para que possamos conhecer os tipos de organismos e metabolismos utilizados por estes. Podendo assim servir de guia para uma melhor escolha do enfoque da bioprospecção de enzimas de interesse biotecnológico.

CAPÍTULO II

CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DE UMA BIBLIOTECA METAGENÔMICA DE EXPRESSÃO DA MICROBIOTA DE RÚMEN DE CAPRINOS

Metodologia publicada em Comunicado Técnico na revista interna da EMBRAPA.

RESUMO

Metagenoma refere-se à genoma coletivo de uma comunidade microbiana. Estudos moleculares que são baseados em metagenômica permitem o estudo da comunidade, sem a necessidade de cultivo. A utilização da abordagem metagenômica para estudar comunidades microbianas revelou uma riqueza de espécies muito maior do que conhecido pelas técnicas tradicionais de cultivo de microrganismos em meio *in vitro*. A amplificação do gene 16S rDNA e sequenciamento do mesmo a partir de DNA metagenômico tem sido utilizada para estudar a riqueza e composição da comunidade microbiana do rúmen de diversas espécies animais. Esta abordagem tem sido utilizada para estudar a riqueza e a composição da comunidade microbiana do rúmen de diversas espécies animais. Estes estudos revelaram uma riqueza de espécies capazes de degradar o material vegetal ingerido, que inclui celulose e amido. Portanto, existe um grande potencial metabólico nestas comunidades microbianas que pode ser usado em aplicações biotecnológicas. O objetivo deste trabalho foi a prospectar enzimas produzidas por bactérias do rúmen de caprinos da raça Moxotó brasileira típica da região semi-árida. Para isso, foi construída uma biblioteca metagenômica de expressão de pequenos insertos de DNA a partir de bactérias sólido-aderida do rúmen. Protocolos foram adaptados para extração de DNA total dos microrganismos no rúmen. O DNA extraído foi obtido em qualidade e em quantidade suficientes para a manipulação por técnicas de biologia molecular. Preparações de DNA foram parcialmente digeridas com a enzima de restrição *Pst* I e resultando em fragmentos de 100 bp a 15 kb aproximadamente. Fragmentos de DNA entre 2 e 8 kb foram retirados do gel e ligados ao plasmídeo *pCF430* linearizado com *Pst* I. Para esta biblioteca foi possível obter cerca de 50.000 clones. Foram extraídos DNA plasmidial de clones aleatórios e seus tamanhos e perfis de bandas, após digestão com enzimas de restrição, foram analisados em gel de agarose para validar a biblioteca. Para demonstrar a diversidade da biblioteca metagenômica obtivemos uma biblioteca de 16S rDNA amplificada a partir do conjunto de DNA de todos os clones metagenômicos. Este estudo da riqueza bacteriana confirmou a presença de filos que já eram esperados para o rúmen, com o predomínio do filo Firmicutes e Bacteroidetes, um resultado semelhante ao apresentado no Capítulo 1 desta dissertação. Com o mesmo objetivo, vários clones metagenômicos aleatórios tiveram suas extremidades sequenciadas. Com o objetivo de demonstrar o potencial biotecnológico da biblioteca metagenômica do rúmen de caprinos foi realizada uma bioprospecção para a atividade amilase. Foram encontrados 11 clones positivos com atividade amilolítica com

diferentes padrões de digestão, de um total de 2.670 clones analisados, e um clone de cerca de 5 kb foi escolhido para o sequenciamento (Ra33). Para sequenciar o clone Ra33 foi realizada uma subclonagem de fragmentos menores e sequenciamento por *primer walking*. Até agora, 74% do clone Ra33 foi sequenciado. Com os resultados obtidos da validação e do potencial metabólico pôde-se concluir que a biblioteca gerada possui a riqueza de filos esperada para uma amostra ruminal demonstrando que a metodologia de extração de DNA utilizada foi satisfatória. A biblioteca metagenômica de pequenos insertos construída neste trabalho poderá ser utilizada para bioprospecção de genes com outras atividades de interesse biotecnológico, incluindo genes codificadores de antimicrobianos e outras atividades hidrolíticas como lipases, proteases e celulases.

Palavras chaves: Metagenoma, Rúmen, Amilase, Bioprospecção.

ABSTRACT

Metagenome refers to the collective genome of a microbial community. Molecular studies based on metagenomics allow the study of the community without the need for cultivation. The use of the metagenomic approach for studying microbial communities has revealed a greater species richness than that previously known by the traditional techniques of cultivation of microorganisms in the laboratory. 16S rDNA gene amplification and sequencing using metagenomic DNA as a template has been used to study the richness and composition of the rumen microbial community in several animal species. This approach has been used to study the richness and composition of the microbial community of the rumen in several animal species. These studies revealed a number of species capable of degrading plant material, which includes cellulose and starch. Therefore, there is great metabolic potential in these microbial communities that can be explored for biotechnological applications. The aim of this work was to prospect enzymes produced by bacteria in the rumen of goats of the Brazilian race Moxoto commonly found in the semi-arid region. For this a small insert metagenomic expression library was constructed from bacteria adhered to the solid content of the rumen. Protocols were adapted to extract total DNA from rumen microorganisms. The extracted DNA was obtained in quality and quantity sufficient for manipulation by molecular biology techniques. Preparations of DNA were partially digested with the restriction enzyme *Pst* I and yielded fragments between 100 bp and 15 kb approximately. DNA fragments between 2 and 8 kb were excised from gels and ligated into the plasmid *pCF430* linearized with *Pst* I. For this library we were able to obtain approximately 50,000 clones. To validate this library, plasmid DNA from a random sample of clones was obtained and their size and profile of bands after digestion with restriction enzymes was analyzed on agarose gel. To demonstrate the diversity of the metagenomic library, a 16S rDNA library was constructed using the pool of all metagenomic clones as a template. This study of bacterial richness confirmed the presence of phyla already expected for the rumen, with the predominance of Firmicutes and Bacteroidetes phyla, a result similar to that presented in Chapter 1 of this dissertation. To the same end, several random metagenomic clones were end sequenced. To demonstrate the biotechnological potential of the goat rumen metagenomic library, screening for amylase activity was performed. This screening for amylase activity identified 11 positive clones analyzed, from a total 2,670 clones, with amyolytic activity with different restriction

patterns. One of these clones with an insert of about 5 kb was chosen for complete sequencing (Ra33). To sequence this clone a strategy of subcloning smaller fragments and sequencing them by primer walking was chosen. To date, 74% of the Ra33 clone has been sequenced. The results of validation and metabolic potential experiments allow us to conclude that the library generated has the expected phylum composition for a rumen sample showing that the DNA extraction methodology used was satisfactory. The small insert metagenomic library constructed can be further used for bioprospecting other activities of biotechnological interest, including genes encoding antimicrobial activities and other hydrolytic activities such as lipases, proteases and cellulases.

Keyword: Metagenome, Rumen, Amylase, Bioprospection.

1. Introdução

O rúmen é um potente sistema de fermentação de fibras devido à presença de microrganismos anaeróbios obrigatórios (fungos, protozoários, bactérias e arqueias). Este órgão foi identificado como fonte valiosa de enzimas fibrolíticas que podem ser exploradas na indústria de alimentos, na indústria têxtil, no processamento de papel e celulose e atualmente na indústria de bioenergia.

O conteúdo da digesta presente no rúmen é uma mistura heterogênea de material vegetal parcialmente digerido suspenso em uma fase líquida, sendo que, muitos microrganismos ruminais estão associados estreitamente com as partículas vegetais (Cheng *et al.*, 1997). A população microbiana no rúmen representa uma subutilizada fonte de enzimas com grande potencial para aplicação industrial. As atividades enzimáticas presentes no rúmen são diversas e incluem enzimas que degradam polímeros de parede celular de plantas (por exemplo, celulase, xilanase e pectinase), amilase, protease, fitase e enzimas específicas de degradação de toxinas de plantas (Daims *et al.*, 2001).

No que diz respeito ao ecossistema ruminal, técnicas independentes de cultivo para o estudo de microrganismos têm levado a grandes avanços na sua compreensão (Singh *et al.*, 2008). Um das aplicações mais importantes dessas técnicas para o rúmen deve ser direcionada para identificar os microrganismos e mecanismos microbianos de digestão de fibras para aprimorar a absorção de nutrientes de forragem com baixa qualidade e estudar as interações dos nutrientes com os tecidos do hospedeiro (Singh, 2008).

Atualmente, mesmo havendo dificuldade de cultivo de determinados microrganismos, o seu genoma e riqueza metabólica podem ser acessados através da construção de biblioteca metagenômica. Do ponto de vista metodológico, neste trabalho utilizaremos o metagenoma, o genoma de todos os microrganismos em um determinado meio ambiente em oposição ao genoma de um organismo isolado do ambiente e cultivadas *in vitro* (Handelsman *et al.*, 1998). A diversidade microbiana constitui uma riqueza de novas enzimas que podem ser aproveitadas nos processos biocatalíticos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Rúmen como sistema

O papel essencial dos microrganismos no trato digestivo de mamíferos tem sido estudado desde Sprengel (1832) que mostrou a produção de ácido acético e butírico durante a quebra do material vegetal no rúmen. Dentre os grupos de microrganismos encontrados no rúmen, as bactérias possuem a população mais diversa, o que pode ser explicado por sua elevada atividade metabólica, diversidade da dieta ingerida pelo hospedeiro e facilidade na adaptação ao ambiente ruminal (fator essencial às espécies predominantes) (Arcuri *et al.*, 2006). Como visto no Capítulo 1, as sequências de DNA mais comumente detectadas na biblioteca do gene ribossomal 16S são pertencentes aos filos Firmicutes e Bacteroidetes na fração líquida e na fração sólido-aderida, respectivamente. Uma diferença entre as duas bibliotecas quando comparadas por meio de uma árvore filogenética são as sequências de bactérias não classificadas presentes unicamente na fração sólido-aderida. Porém, a diferença mais visível foi encontrada em nível de gênero, onde foram observadas particularidades em cada fração.

Esses diferentes microrganismos formam uma complexa comunidade, onde ocorre forte interação. Esta comunidade desempenha um papel importante na digestão dos alimentos e no fornecimento de energia para o hospedeiro (Wright, 2004). A fermentação ruminal é um processo resultante de atividades físicas e microbiológicas, que transformam os substratos da dieta em produtos úteis ao hospedeiro (ácidos graxos de cadeia curta, proteínas microbianas, vitaminas do complexo B); produtos não utilizados pelo hospedeiro (metano e gás carbônico); e também nocivos (amônia), quando em excesso (Otero, 2008). A população microbiana é mantida no rúmen através da ingestão contínua de alimentos, da adição de tampões produzidos pelo animal, da eliminação dos ácidos produzidos e dos resíduos alimentícios não digeríveis, bem como da manutenção das condições ambientais deste órgão (pH, temperatura e umidade) apropriadas para o crescimento da comunidade microbiana específica (Owens *et al.*, 1998).]

O ambiente do rúmen é singular, com alta capacidade de alguns microrganismos produzirem fatores antimicrobianos, que são fatores limitantes ao desenvolvimento de outros microrganismos oportunistas. As condições anaeróbicas são mantidas no rúmen pelos gases gerados nos processos fermentativos, como o dióxido de carbono, metano e

hidrogênio. O oxigênio aprisionado na dieta consumida é utilizado por algumas bactérias anaeróbicas facultativas, mantendo assim o ambiente anaeróbio (Kamra, 2005).

A fermentação ruminal é resultado do equilíbrio de interações entre as diferentes espécies de microrganismos existentes no rúmen (Yokoyama *et al.*, 1993). A composição da microbiota no rúmen pode variar por inúmeros fatores, como por exemplo, o tempo entre a ingestão de alimentos e o tipo de dieta. Existem muitas interações entre diferentes espécies de bactérias, onde uma espécie pode utilizar o produto final da outra para seu metabolismo. Além disso, também ocorre interação entre diferentes espécies dentro desse ecossistema, como é o caso dos protozoários que digerem bactérias e as bactérias parasitam os protozoários, controlando assim, a taxa de colonização nas partículas de alimento (Londoño *et al.*, 1997)

Quando o ambiente ruminal apresenta condições ótimas para a população microbiana nela inserida, o alimento sofrerá alterações físicas e metabólicas até ser finalmente absorvido pelo hospedeiro. Ou seja, através de uma dinâmica interativa com o alimento e as condições orgânicas mantidas pelo hospedeiro os microrganismos ruminais mantêm seu crescimento e permitem o aporte dos nutrientes necessários para suprir as exigências do ruminante (Coelho, 2002).

2.2 Enzimas Bacterianas no Rúmen

O rúmen contém uma associação de microrganismos que abriga o complexo de degradação lignocelulósico para que ocorra a digestão da biomassa ingerida. No entanto, o complexo processo químico necessário para degradar a parede celular vegetal raramente é realizado por uma única espécie. As evidências também sugerem que os organismos e conjuntos de genes mais envolvidos na hidrólise da parede vegetal estão associados com a porção sólido-aderida do rúmen (Brulc, 2009).

As bactérias ruminais geralmente são classificadas em grupos nutricionais de acordo com o substrato principal sobre o qual atuam, mesmo que existem bactérias que estão adaptadas para sobreviver em uma grande variedade de substratos (Orskov, 1988). A classificação destas bactérias é feita levando em conta o tipo de substrato utilizado e os produtos oriundos de sua fermentação, sendo classificadas em bactérias

fermentadoras de carboidratos estruturais (celulose e hemicelulose), fermentadoras de carboidratos não estruturais, amilolíticas, pectinolíticas, lipolíticas, proteolíticas, metanogênicas e as lácticas (Beloqui *et al.*, 2006).

As bactérias degradadoras de carboidratos estruturais (Tabela 2) degradam a celulose e hemicelulose da parede celular dos vegetais, apresentam uma taxa de crescimento relativamente mais lenta e depende de amônia e de ácidos graxos de cadeia ramificada para síntese de proteínas (Arcuri *et al.*, 2006).

Tabela 2- Bactérias do rúmen fermentadoras de carboidratos estruturais.

Fermentadores de carboidratos estruturais	
CELULOSE	HEMICELULOSE
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
<i>Bacteroides succinogenes</i>	<i>Prevotella ruminicola</i>
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>Bacteroides ruminicola</i>
<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Eubacterium xylanophilum</i>
<i>Clostridium cellobioparum</i>	<i>E. uniformis</i>
<i>Clostridium longisporum</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
<i>Clostridium lochheadii</i>	<i>Prevotella ruminicola</i>
<i>Eubacterium cellulosolvens</i>	<i>Bacteroides ruminicola</i>
<i>Cillobacterium cellulosolvens</i>	

Adaptado de Kamra, 2005

As bactérias fermentadoras de carboidratos não-estruturais (Tabela 3) degradam os carboidratos como amido, dextrinas, frutanas e glicoses. Estas bactérias apresentam uma taxa de crescimento alta e podem utilizar amônia, aminoácidos e peptídeos para a síntese de suas proteínas (Arcuri *et al.*, 2006).

Tabela 3- Bactérias do rúmen fermentadoras de carboidratos não estruturais.

Fermentadores de carboidratos não-estruturais	
AMIDO	LIPOLÍTICAS
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>
<i>Ruminobacte ramylophilus</i>	UREOLÍTICAS
<i>Bacteroides amylophilu</i>	<i>Megasphaera elsdenii</i>
<i>Prevotella ruminicola</i>	UTILIZADORAS DE ÁCIDO
AÇUCAR/DEXTRINA	<i>Megasphaera elsdenii</i>
<i>Bacteroides ruminicola</i>	<i>Peptostreptococcus elsdenii</i>
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	<i>Wollinella succinogenes</i>
<i>Succinivibrio amylolytica</i>	<i>Vibrio succinogenes</i>
<i>Selenomonas ruminantium</i>	<i>Veillonella gazogenes</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Veillonella alcalescens</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>Micrococcus lactolytica</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>Oxalobacter formigenes</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>Succiniclasticum ruminis</i>
<i>Bifidobacterium globosum</i>	ACETOGÊNICAS
<i>B. thermophilum</i>	<i>Eubacterium limosum</i>
<i>B. ruminale</i>	<i>Acetitomaculum ruminis</i>
<i>B. ruminantium</i>	DEGRADADORAS DE TANINO
PROTEOLÍTICA	<i>Streptococcus caprinus</i>

<i>Prevotella ruminicola</i>	<i>Eubacterium oxidoreducens</i>
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	DEGRADADORAS DE MIMOSINA
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Synergistes jonesii</i>
METANOGENICA	EUBACTERIUM
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	<i>E. uiforms</i>
<i>Methanobacterium formicicum</i>	<i>E. xylanophilum</i>
<i>Methanosarcina barkeri</i>	BIFIDOBACTERIUM
<i>Methanomicrobium mobile</i>	<i>B. globosum</i>
PECTINOLÍTICA	<i>B. longum</i>
<i>Treponema saccharophilum</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>Lachnospira multiparus</i>	

Adaptado de Kamra, 2005

Diante do exposto, a enorme diversidade de microrganismos encontrados em variados habitats, como no rúmen, propicia uma grande riqueza de enzimas microbianas que podem ser utilizadas em indústrias. A grande maioria das enzimas aplicadas industrialmente, cerca de 75%, são hidrolíticas, capazes de atuar em polímeros naturais. Microrganismos que vivem em condições extremas, por exemplo, de pH ou temperatura, sintetizam enzimas que possibilitam sua sobrevivência nestas condições. No entanto, vários fatores interferem na aplicação de uma enzima em um processo industrial. A escolha é dependente de estudos de especificidade, temperatura, pH, inibidores, ativadores, métodos de análise e custos (Said *et al.*, 2004).

2.3 Metagenoma

Métodos baseados na caracterização fenotípica de espécies encontradas no rúmen comprovam que técnicas de cultura tradicional têm subestimado a diversidade de bactérias no rúmen. Isso se deve à dificuldade em cultivar bactérias facultativas e

obrigatoriamente anaeróbios (Nelson *et al.*, 2003). A técnica de hibridação DNA-DNA tem sido utilizada como protocolo padrão para a identificação bacteriana, empregando métodos baseados em PCR para sequências de genes 16S rDNA. Todavia, os avanços tecnológicos permitiram, nos últimos anos, estudos mais aplicados aos ecossistemas microbianos, utilizando a bioinformática na identificação de novos genes com potencial farmacêutico, além de outras aplicações biotecnológicas (Singh *et al.*, 2008).

Nesse sentido, o cultivo direto pode ser usado para explorar a diversidade microbiana. No entanto, as técnicas tradicionais de cultivo e isolamento de microrganismos, e os estudos da diversidade da microbiota ficam prejudicados, pois somente entre 0.1% a 1% das bactérias podem ser cultiváveis em laboratório. Desta forma a diversidade das comunidades microbianas não são eficientemente exploradas. Em contrapartida, técnicas utilizando métodos moleculares baseadas no isolamento e análise de ácidos nucleicos (principalmente DNA) de amostras ambientais têm sido desenvolvidas. Através destas técnicas é possível descobrir novos microrganismos, até então desconhecidos, alcançando os 99% da diversidade que não é conseguida através de técnicas tradicionais de cultivo. (O'donnell *et al.*, 1994; Torsvik *et al.*, 1998; Rolf, 2005).

O termo “metagenoma” foi cunhado por Handelsman *et al.* (1998), no contexto de um estudo do genoma de todos os microrganismos em um ambiente particular, contrapondo estudos de um único genoma de organismos cultiváveis. Considerando assim, trata-se de uma abordagem que permite a investigação da grande diversidade de genes e dos seus produtos, bem como análise de todos os operons que codificam vias biosintéticas ou degradativas. Nesta perspectiva, muitos trabalhos têm demonstrado a eficiência e as vantagens em construir bibliotecas metagenômicas para a descoberta de novos compostos bioativos (Daniel, 2004).

Com efeito, a criação de bibliotecas metagenômicas oferece oportunidade para a bioprospecção de genes de interesse biotecnológico, sem a necessidade de cultivar organismos *in vitro*. Sua construção envolve métodos idênticos aos de clonagem do DNA genômico de microrganismos individuais. Em outras palavras, ocorre a fragmentação do DNA do ambiente por digestão utilizando enzimas de restrição ou fragmentação mecânica, seguidas da inserção dos fragmentos de DNA em um vetor apropriado, por exemplo, plasmídeos para fragmentos menores que 10 kb, cosmídeos ou

fosmídeos para fragmentos de até 40 kb ou BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*), para fragmentos acima de 100 kb (Wild *et al.*, 2002).

Estudos metagenômicos se encaixam em três categorias principais em termo de seleção de ambientes. O primeiro grupo seleciona ambientes naturalmente enriquecidos para enzimas alvo, tais como a busca de xilanases no intestino do inseto (Brennan *et al.*, 2004). O segundo grupo seleciona ambientes com alta diversidade genômica. Deste ambiente faz-se a extração direta de DNA e clonagem ou a amostra é sujeita primeiro a um enriquecimento da comunidade e só assim os procedimentos de extração e clonagem são realizados. O terceiro grupo alvo foca em ambientes extremos e busca biocatalisadores que são estáveis nas condições vivenciadas pelos microrganismos neste ambiente (Ferre *et al.*, 2005).

Sendo assim, o campo da metagenômica é desenvolvido a partir de avanços realizados na extração de DNA e clonagem a partir de amostras ambientais (Tsai *et al.*, 1992). As aplicações de técnicas moleculares revelam que a diversidade procariótica tem sido grandemente subestimada e torna-se evidente a presença de um grande potencial biocatalítico na maioria dos procariotos não cultiváveis (Amann *et al.*, 1995; Handelsman *et al.*, 1998; Streit *et al.*, 2004).

2.4 Exploração Biotecnológica

As condições particulares nos herbívoros, usando microrganismos para fermentar fibras de plantas, variam de animal para animal (Moir, 1968), principalmente ao que se refere à seleção da população microbiana, que pode ser única para cada animal (Hungate, 1985). Os procariotos são capazes de crescer em uma vasta gama de ambientes, de lagos alcalinos a fontes hidrotermais, indicando que eles carregam enzimas que são estáveis e ativas sob estas condições extremas (Purcarea *et al.*, 2001; Rothschild *et al.*, 2001; Grant *et al.*, 2004). Estas enzimas são de interesse porque têm potenciais aplicações em processos industriais, mas a maioria dos microrganismos de tais ambientes, apesar de ativos, geralmente são recalcitrantes à cultura (Amann *et al.*, 1995; Ouverney, 2000). O fato de que tradicionalmente biocatalisadores só poderiam ser obtidos de bactérias isoladas foi uma das principais limitações para a aplicação generalizada de biocatalisadores na indústria (Leresche *et al.*, 2006).

Sobre este ponto de vista, o rúmen é um potente sistema de fermentação de fibras, devido à presença de anaeróbios obrigatórios (fungos, protozoários, bactérias e archaea) e estes microrganismos foram identificados como fonte valiosa de enzimas fibrolíticas que poderiam ser explorados pela indústria de alimentação (sacarificação de biomassa vegetal, fornecendo nutrientes essenciais para os animais de forragem de baixa qualidade na ração), têxtil, processamento de polpa e papel e etanol de segunda geração (Selinger *et al.*, 1996; Palackal *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2007). O progresso da exploração do ecossistema do rúmen é lento, principalmente devido às peculiaridades deste ambiente, que dificultam os estudos que usam a cultura tradicional dependente de técnicas microbiológicas (Singh *et al.*, 2008). O uso do metagenoma já vem revolucionando a ecologia microbiana do rúmen e pode nos fornecer, não simplesmente uma maior compreensão, mas uma descrição completa do sistema ainda não aprofundado.

Em tal perspectiva, bibliotecas metagenômicas podem ser triadadas para diferentes tipos de biocatalisadores (Streit *et al.*, 2004). Seu nível de caracterização depende fortemente da aplicação final do biocatalisador. Por exemplo, ao analisar genes metagenômicos envolvidos na síntese de biotina, o nível de atividade da enzima é importante, e quando se analisa esterases metagenômicas ou celulases, a sua estabilidade em uma ampla gama de condições é tão importante como o seu nível de atividade e faixa de substrato (Steele *et al.*, 2009).

Tais abordagens têm sido particularmente bem sucedidas em ambientes terrestres, onde genes envolvidos na produção de antibióticos, de resistência a antibióticos e enzimas de degradação foram identificados (Handelsman, 2004; Lammler *et al.*, 2007; Suenaga *et al.*, 2007). Estudos que utilizam as bibliotecas metagenômicas para triagem e outras abordagens inovadoras, tem facilitado a descoberta de operons catabólicos potencialmente envolvidas na degradação de benzoato, catecol, entre outros (Uchiyama *et al.*, 2005). As técnicas baseadas em análise funcional tiveram acréscimo de informação através do uso de sequenciadores, pois, estes visam novos genes com sequências similares aos genes conhecidos. A junção da triagem de bibliotecas metagenômicas e o sequenciamento de clones resultou na descoberta de genes, como sintases de poliquetídeos ou ‘*polyketide synthases*’ (Seow *et al.*, 1997), alcanando

hidroxilases (Xu *et al.*, 2008), ciclomaltodextrinases (Tang *et al.*, 2006), xilanases (Hayashi *et al.*, 2005) e beta-xilanases (Sunna *et al.*, 2003).

Pelos resultados obtidos até agora, o rúmen de caprino da raça moxotó revelou ter uma comunidade bacteriana diversa e pode ser um ambiente adequado para exploração biotecnológica de enzimas hidrolíticas importantes para indústria. Por isso, neste trabalho, além de caracterizar a diversidade da microbiota, uma biblioteca metagenômica de expressão de pequenos insertos foi construída. Além disso, uma triagem inicial para amilases foi realizada para demonstrar o potencial biotecnológico da biblioteca.

3. Justificativa

O rúmen apresenta um ecossistema microbiano equilibrado e ao mesmo tempo dinâmico. O ecossistema é estável porque o ruminante saudável não sofre a contaminação do ecossistema, apesar de entrada de milhões de microrganismos no rúmen diariamente, através dos alimentos, água e ar. É dinâmico por que a população muda consideravelmente por mudanças na dieta do animal. Estas características ocorrem devido a adaptação de certos microrganismos ao ambiente ruminal, enquanto os microrganismos contaminantes não sobrevivem a este ambiente.

Os ruminantes diferem de outros mamíferos por sua maneira de degradar os alimentos, que são submetidos à fermentação microbiana no rúmen, antes de passar para o estômago verdadeiro e trato intestinal. Processos que ocorrem no rúmen, devido à atividade microbiana, incluem a degradação de carboidratos como a celulose, que não pode ser utilizada a não ser que seja digerida por microrganismos. O rúmen é um potente sistema de fermentação de fibras, devido à presença de exclusivo anaeróbios obrigatórios. A microbiota do rúmen foi identificada como fonte valiosa de enzimas fibrolíticas como as hemicelulases, xilanases, celulasas e endoglucanases, entre outras.

Diante do exposto, a importância desse estudo deve-se a necessidade de se explorar os potenciais da diversidade bacteriana existente nessa amostra, por meio da bioprospecção de enzimas com interesse biotecnológico.

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Esse trabalho tem como objetivo a identificação de genes que codifiquem para atividades hidrolíticas com um potencial uso na indústria como a amilolítica, por meio da construção e triagem de bibliotecas metagenômicas de expressão de pequenos insertos de rúmen de caprinos.

4.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver protocolo para extração de DNA de bactérias sólido-aderidas de uma amostra de rúmen de caprinos.
- Criar bibliotecas metagenômicas: clonagem de fragmentos de DNA metagenômicos em vetor de expressão *pCF430* por estratégias já estabelecidas na literatura.
- Validação da biblioteca por meio da construção de uma biblioteca 16S rDNA a partir da biblioteca de pequenos insertos.
- Biopropecção de genes com atividade amilolítica para interesse biotecnológico utilizando a biblioteca de pequenos insertos.
- Sequenciar um clone com atividade amilolítica positiva e compara-lo com as sequências disponíveis em bancos de dados

5. Material e Métodos³

5.1 Animais e Dieta

Foram escolhidas aleatoriamente para esse estudo, três fêmeas da raça Moxotó (Figura 19) pertencentes ao Projeto de Conservação das raças de caprinos nativas do Nordeste do Brasil, localizado na EMBRAPA - Caprinos (Sobral, CE). A coleta foi realizada durante a estação chuvosa no mês de Março de 2008. Durante a estação chuvosa há uma grande quantidade de material vegetal disponível, sendo assim, os animais não necessitam de suplementação alimentar, bastando a pastagem na área de caatinga.

Após escolha dos animais, o sacrifício foi realizado com anestesia pelos veterinários e técnicos da EMBRAPA - Caprinos, no período vespertino pós-prandial. A porção sólida do rúmen foi coletada manualmente. Foi considerado material sólido-aderido aquele resultante da filtração do esmagamento o material vegetal com gaze. Esta amostra foi congelada em nitrogênio líquido e posteriormente armazenada em freezer -80°C até a sua utilização.



Figura 19 - Fêmea da raça Moxotó pertencente ao projeto de conservação das raças de caprinos nativas do Nordeste do Brasil. EMBRAPA - Caprinos.

³ Metodologia publicada em Comunicado Técnico na revista interna da EMBRAPA.

5.2 Extração das bactérias sólido-aderidas e Extração de DNA

A extração do DNA da microbiota sólido-aderida foi feita por modificações dos protocolos descritos por Martin (Martin *et al.*, 1994) e Handelsman et al. (Handelsman *et al.*, 1998). A amostra contendo a parte sólido aderida do rúmen de caprino (50 mL) foi inicialmente diluída com igual volume de solução de NaCl 0,9% (p/v), pré-aquecida a 39°C e centrifugadas a 1.000 x g, por 10 minutos à 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e reservado no gelo. O pellet resultante foi ressuspensionado em 50 mL de solução de NaCl 0,9% gelada, e colocado no liquidificador em velocidade máxima por 1 minuto e centrifugadas a 1.000 x g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e reservado no gelo. O pellet foi ressuspensionado, liquidificado e centrifugado conforme descrito anteriormente por mais duas vezes. O conteúdo dos 8 tubos reservados no gel foram centrifugados a 27.000 x g por 30 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 75 mL de Tampão Z autoclavado (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100mM Solução de Fosfato de Sódio; 100mM EDTA, pH 8,0; 1,5M NaCl; 1% (v/v) CTAB, hexadeciltrimetil brometo de amônia). Os tubos foram colocados em um banho de gelo seco com isopropanol, por 1 hora e logo após transferidos para banho à 65°C por mais 1 hora.

Este processo foi repetido por mais uma vez. Em seguida, a cada tubo foram adicionados 9 mL de SDS 20% (p/v) e 4,5 mL de GITC 5M. Os tubos foram, em seguida, incubados à 65°C por 2 horas, sendo gentilmente agitados periodicamente. Os tubos foram então centrifugados por 20 minutos a 15.000 x g à 10°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo (foi utilizado gaze para filtragem), e foram adicionados 25 mL de solução clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) homogeneizando gentilmente por 1 minuto. Os tubos foram então centrifugados a 15.000 x g por 2 minutos à 10°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Foi adicionado 70% do volume da amostra de isopropanol e novamente foi feita homogeneização por 5 minutos. Após uma precipitação inicial do DNA por 20 minutos a temperatura ambiente, os tubos foram colocados *overnight* à 4°C.

Após o período de incubação a 4°C, os tubos foram centrifugados por 40 minutos a 15.000 x g à 10°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de DNA foi seco à temperatura ambiente. Em seguida foi realizada uma lavagem do DNA com etanol

70% e foi feita uma nova centrifugação por 40 minutos a 15.000 x g à 10°C. O pellet de cada tubo foi ressuspensionado em 5 mL de T₁E₁₀ (10mM EDTA e 100mM Tris-HCl) pH 8,0. Os carboidratos foram precipitados adicionando acetato de potássio em concentração final 0,5 M, incubando-se por 5 minutos no gelo e centrifugando-se por 20 minutos a 13.400 x g em microcentrífuga de bancada à 20°C.

Os sobrenadantes foram transferidos para tubos falcons de 15 mL (no máximo 6mL para cada tubo) e o DNA foi extraído com um volume de fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (25:24:1), para misturar o tubo foi invertido algumas vezes e centrifugado por 5 minutos a 600 x g a temperatura ambiente (20°C), por duas vezes. Após centrifugação foi removida a camada aquosa de DNA e extraído uma vez com um volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), invertendo algumas vezes para misturar e centrifugar por 5 minutos a 600 x g à temperatura ambiente (20°C). O sobrenadante de DNA foi transferido para um novo tubo onde ocorreu acréscimo de um volume de isopropanol (misturado gentilmente), e incubado por 1 hora à temperatura ambiente (20°C) e centrifugado por 20 minutos a 15.000x g a 20°C.

O sobrenadante foi retirado e deixado secar na bancada, o pellet foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 13.400 x g. O pellet foi ressuspensionado com T₁E₁₀ (10mM EDTA e 100mM Tris-Cl) em 750 µl lavando bem as paredes (volume final para os dois tubos). Logo após da extração foi feito gel preparativo TAE 1x (agarose *low melting* 1%), sem brometo para limpar o DNA, colocando o máximo de material possível nos poços (material + tampão de carregamento 10x) e posteriormente eluí-lo, por meio do protocolo *ULTRA CLEAN DNA purification Kit* (MoBio, EUA). O gel foi corrido na câmara fria, por 20 horas a 65 volts.

5.3 Construção da Biblioteca Metagenômica de Pequenos Insertos

O DNA metagenômico total foi digerido utilizando a enzima de restrição *Pst* I (Promega, EUA) que é caracterizada por deixar as extremidades coesivas. Para essa enzima foi utilizado o tampão H 1x para melhor sua eficiência. A digestão foi realizada a 37°C *overnight* e verificada em gel agarose 0,8% com brometo de etídio (2µg/ml).

Para clonagem, o DNA digerido foi submetido a uma seleção de tamanho de fragmento por corrida em gel de agarose *low melting* 1% (TAE 1x), por 4 horas a 45

volts em temperatura ambiente (20°C) seguida de excisão e purificação dos fragmentos com tamanho entre 2 e 8 kb por meio do protocolo *ULTRA CLEAN DNA purification Kit* (MoBio, EUA). O DNA metagenômico purificado foi ligado ao plasmídeo linearizado *pCF430* (Newman, 1999) usando a enzima T4 Ligase (Promega, EUA) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. O vetor de expressão *pCF430* (Figura 20) é caracterizado por possuir baixo número de cópias na célula hospedeira, apresenta no mapa o gene de indução *araC* (indução por arabinose) (Figura 21 e 22), permitindo maior controle sobre o promotor do plasmídeo, seu tamanho é de 12 kb e possui tetraciclina como marca de seleção.

A transformação dos plasmídeos com inserto ocorreu por eletroporação utilizando células *E. coli* EPI 300 (Epicentre, EUA) segundo instruções do fabricante (Biorad). A seleção dos clones transformados foi feita por meio do plaqueamento em meio LB contendo tetraciclina (20 µg/mL), por um período de incubação de 16 horas a 37°C. A biblioteca metagenômica foi conservada pela adição de glicerol 50%, para uma concentração final 20% e armazenada as placas em freezer -80°C (Figura 20).

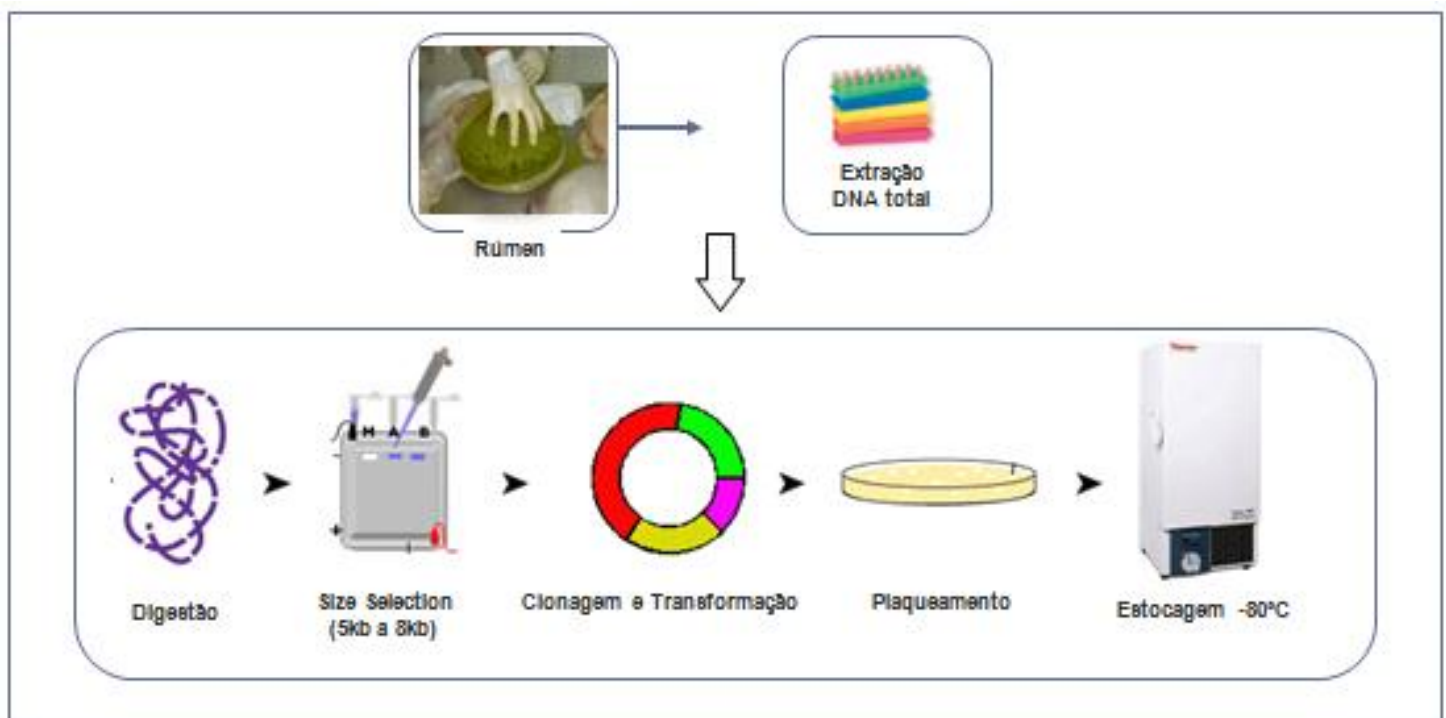


Figura 20 - Esquema da metodologia para a construção da biblioteca de pequenos insertos do DNA total do rúmen caprino.

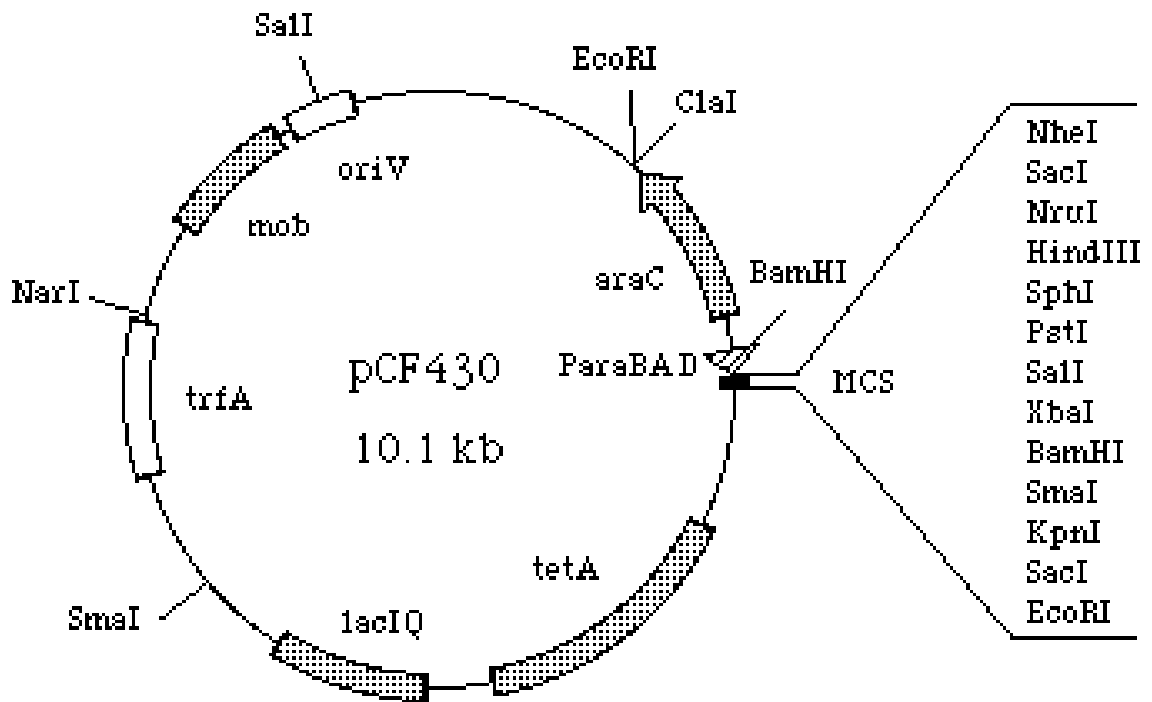


Figura 21 - Mapa do vetor de clonagem *pCF430*. Utilizado para clonagem dos fragmentos resultante da digestão do DNA metagenômico total com *Pst* I.

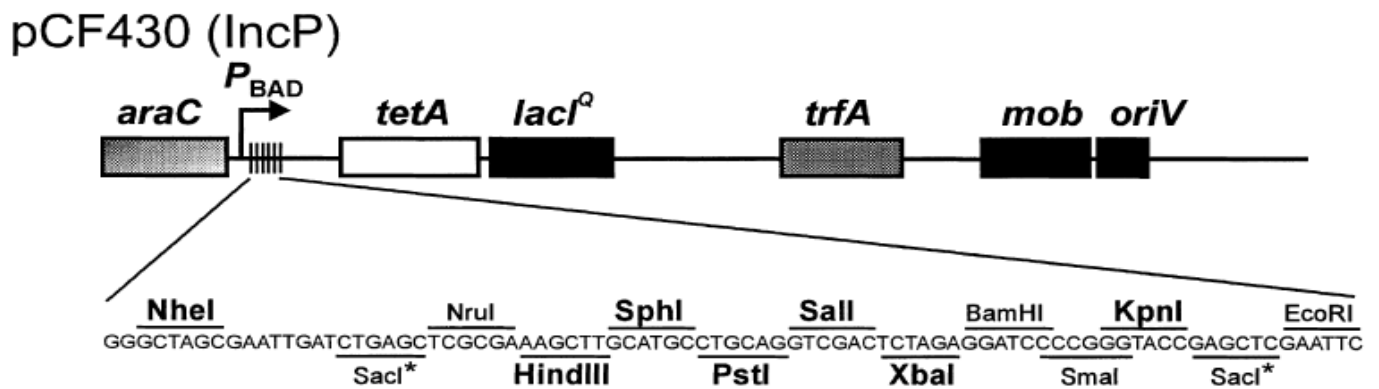


Figura 22 - Mapa do vetor *pCF430* mostrando o promotor P_{BAD} .

5.4 Validação da riqueza da Biblioteca Metagenômica: gene ribossomal 16S rDNA.

Para validação da riqueza da biblioteca metagenômica de pequenos insertos foi feita uma caracterização das bactérias nela representadas através da amplificação e sequenciamento do gene ribossomal 16S rDNA a partir de DNA metagenômico da biblioteca. Primeiramente foi feito inóculo de clones aleatórios da biblioteca metagenômica (diretamente do estoque), em LB com tetraciclina (20 µg/mL), por um período de incubação de 16 horas a 37°C. Para extração de DNA plasmidial foi utilizado o kit QIAprep® (Qiagen, EUA). Para construir uma “Biblioteca” 16S rDNA a partir da Biblioteca metagenômica o DNA cromossomal da célula hospedeira foi eliminado com a enzima *Plasmid-Safe*TM *ATP-Dependent DNase* (Epicentre) conforme as instruções do fabricante. O sistema de restrição foi incubado durante 3 horas a 37°C e em seguida a enzima foi inativada por 30 minutos a 70°C.

A amplificação do gene 16S rDNA bacteriano foi realizada através de PCR, utilizando os *primers* universais 1492R 5' GGY⁴ TAC CTT GTT ACG ACT T 3' e o *primer* 27F 5' AGA GTT TGA TCM⁴ TGG CTC AG 3', específicos para o domínio *Bacteria* (Reysenbach *et al.*, 1992). A reação foi montada com 1x do tampão de *Taq* 10x, 0,25µmol L⁻¹ de cada primer, 250 µmol L⁻¹ de dNTP, 2U de enzima *Taq* DNA polimerase (Phoneutria, Brasil) e aproximadamente 10 ng de DNA plasmidial, em uma reação com 20µl de volume final. Os parâmetros para execução dos ciclos de amplificação foram: 95°C por 3 minutos, seguidos de 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 40 segundos e após terminar os 25 ciclos 72°C por 7 minutos. Para purificar os fragmentos amplificados, foi utilizado o protocolo *ULTRA CLEAN DNA purification Kit* (MoBio, EUA).

Os fragmentos específicos amplificados foram clonados no vetor *pGEM-T easy* (Promega, EUA), conforme as instruções do fabricante. Essa ligação foi dialisada em membrana de nitrocelulose 0,025 µm (MiLipore) por 20 minutos. A transformação foi realizada por eletroporação. A seleção dos clones transformados foi feita através do plaqueamento em meio LB Agar, IPTG e SgalTM (SIGMA) contendo ampicilina (100 µg/mL), por um período de incubação de 16 horas a 37°C e da observação de colônias

⁴ Y e M são nucleotídeos degenerados onde pode se adicionado, C ou T e A ou C respectivamente.

brancas e pretas. As 96 colônias brancas foram incubadas em placas de Elisa (fundo U), com 130µL de LB com ampicilina (100µg/ml) e incubadas a 37°C por 17 horas. Clones individuais foram guardados em glicerol em freezer -80°C. Cada clone foi crescido em placa contendo LB e ampicilina (100µg/ml), *overnight* e foi realizada miniprep para extração plasmidial por lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989)

O sequenciamento de 96 clones foi realizado em sequenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). As reações para sequenciamento utilizaram o primer 27F, 100 ng de DNA plasmidial e 2 µl de *Sequencing reagent premix* (GE Healthcare, EUA) em 10 µl de volume final da reação. Os parâmetros para execução dos ciclos foram: 95°C por 3 minutos, seguidos de 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 40 segundos e um ciclo final a 72°C por 7 minutos. As sequências obtidas foram analisadas para a determinação de qualidade de eletroferograma utilizando um programa desenvolvido pelo Departamento de Bioinformática da Universidade Católica de Brasília, disponível no site <http://www.bioinformatica.ucb.br/eletro.html>. Através da ferramenta “Trimmed sequence” as sequências que não alcançaram qualidade baseado no programa Lucy (Chou *et al.*, 2001) foram descartadas e as sequências escolhidas foram comparadas por meio do programa CLASSIFIER do banco de dados público *Ribosomal Database Project* (Cole *et al.*, 2008) disponível no site: <http://rdp.cme.msu.edu/>, por meio do *classifier*, o qual atribui sequências de rDNA 16S à sua hierarquia taxonômica. O limite de confiança utilizado foi de 80%.

5.5 Triagem da biblioteca metagenômica de expressão de rúmen de caprinos para atividade amilolítica.

A estratégia de seleção de clones utilizada para detecção da atividade enzimática de amilase na biblioteca metagenômica de pequenos insertos rúmen sólido de caprinos, foi feita através de plaqueamento em LB com ágar, 0,5% (p/v) de amido (Vetec), 20 µg/mL de tetraciclina e arabinose 0,02% (indutor), sendo o controle positivo *Paenibacillus ourofinesis*, onde este foi utilizado para otimizar o protocolo de bioensaio para amilase, pois é uma espécie conhecida para atividade amilolítica. Os clones mantidos congelados em glicerol a 20% foram diluídos a 1:10⁵ com auxílio de alça de platina em LB líquido com tetraciclina (20 µg/mL). Inicialmente 5 e 10 µl da diluição da biblioteca, foram plaqueadas (placas médias) e os clones crescidos *overnight* a 37°C

na estufa, após esse crescimento as placas foram deixadas a temperatura ambiente por 5 dias e reveladas com iodo para a visualização do halo de degradação de amido. Os clones com atividade amilolítica positiva foram repicados para novas placas com LB com ágar, 0,5% (p/v) de amido (Vetec), 20 µg/mL de tetraciclina e arabinose 0,02% (indutor) e reveladas para a confirmação da atividade e posterior estocagem em duplicata a -80°C, dos clones individuais em glicerol 15%.

Os clones positivos foram plaqueados em LB ágar com tetraciclina (20 µg/mL), de acordo com a técnica *single colony*. Para confirmação da atividade enzimática foi feito o retransformação, utilizando o DNA plasmidial extraído pela miniprep, que consiste numa transformação em *E. coli* EPI 300 (Epicentre, EUA) e posterior plaqueamento em LB agar, 0,5% amido (Vetec), 20 µg/mL de tetraciclina e arabinose 0,02% (indutor). As placas foram reveladas através da sublimação do iodo.

A partir das colônias isoladas e com atividade comprovada foi realizada miniprep para extração do DNA plasmidial em pequena escala. Para obter o perfil de digestão enzimática do inserto, o DNA plasmidial foi digerido utilizando a enzima de restrição *Pst* I (Promega – EUA). Para essa enzima foi utilizado o tampão H 10x (Promega) e a digestão foi realizada a 37°C por 2 horas. As amostras foram corridas em um gel de agarose 0,8% com brometo de etídio para visualização das bandas.

Após a obtenção dos padrões de restrição enzimática dos fragmentos e tamanho aproximado dos insertos foi escolhido um clone para ser subclonado em pUC19, o clone Ra 33 A. A escolha desse clone foi baseada no tamanho de insertos liberado após a digestão para uma melhor clonagem no vetor. O pUC19 (Figura 23) é um vetor utilizado para clonagem em *E. coli* de origem com alto número de cópias dentro da célula. Seu antibiótico de seleção é a ampicilina na concentração de 150 µg/mL. Este vetor permite a diferenciação de colônias azuis sem o inserto e brancas com inserto, pois possui o gene *lac Z α* (Sambrook *et al.*, 2001). O vetor foi digerido com a enzima *Pst* I (Promega – EUA) para ser possível a inserção dos fragmentos.

Para que a subclonagem ocorresse, foi realizada miniprep com o *Kit QIAprep*[®] (Qiagen), com o clone escolhido, para a remoção do vetor da célula hospedeira *E. coli* EPI 300 (Epicentre, EUA). O DNA plasmidial foi digerido com a enzima de restrição *Pst* I (Promega – EUA) a 37°C por 2 horas. Subsequentemente a amostra digerida foi corrida em gel preparativo TAE 1x (agarose *low melting* 1%), sem brometo para excisão

de fragmento de DNA do gel e posterior eluição com o kit. O gel foi corrido na câmara fria, por 20 horas a 65 volts. Para eluição dos fragmentos, foi utilizado o *Kit Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, EUA).

Os fragmentos do clone escolhido foram subclonados no vetor pUC19 com a proporção de 1:1 (vetor/inserto), através de reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Promega, EUA) à 16°C em incubação por 16 horas. A ligação foi dialisada em membrana de nitrocelulose 0,025 µm (Milipore) por 20 minutos. A transformação foi realizada por eletroporação na célula competente *E. coli* EPI 300 (Epicentre, EUA). A seleção dos clones transformados foi feita através do plaqueamento em meio LB ágar, IPTG (100 mg/mL) e Xgal (20 mg/mL) contendo ampicilina (150 µg/mL), por um período de incubação de 16 horas a 37°C e da observação de colônias brancas e pretas. Para confirmar a presença do inserto foi realizada miniprep com as colônias positivas, posterior digestão dos subclones com a enzima *Pst* I e determinação do perfil de bandas de DNA por eletroforese em gel de agarose 0,8% com brometo de etídio.

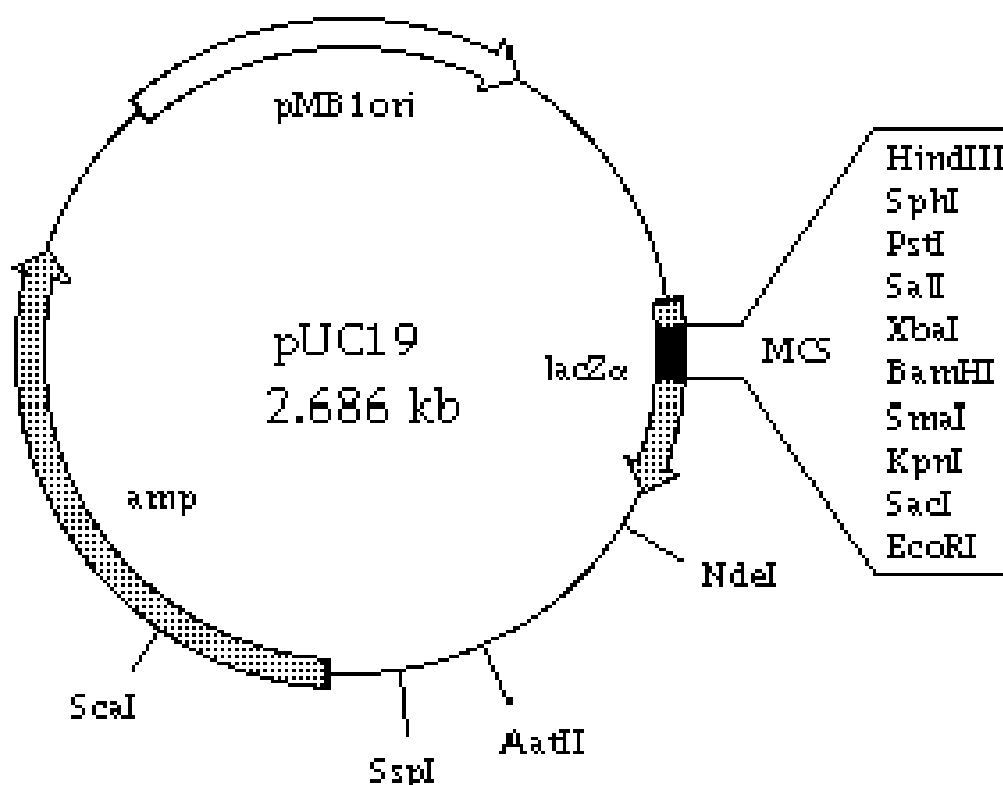


Figura 23 - Mapa do vetor de clonagem pUC19. Utilizado para subclonagem dos fragmentos oriundos do clone com atividade amilolítica positiva.

Após a confirmação da subclonagem, os subclones foram plaqueados separadamente em meio LB ágar contendo ampicilina (150 µg/mL) e amido (0,5%), para conferir a conservação da atividade amilolítica, por um período de incubação de 16 horas a 37°C.

Em paralelo, os subclones foram sequenciados no sequenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). A primeira reação de sequenciamento foi feita através de oligonucleotídeos desenhados a partir das sequências localizadas na porção final do vetor de clonagem (*M13 Forward* e *M13 Reverse*) (Tabela 4), ou seja, sequenciando as pontas do inserto. Logo em seguida a estratégia utilizada para o total sequenciamento do inserto foi por “*Primer walking*” (Tabela 4).

As sequências obtidas foram analisadas para a determinação de qualidade de eletroferograma, desenvolvido pelo departamento de Bioinformática da Universidade Católica de Brasília, disponível no site <http://www.bioinformatica.ucb.br/electro.html>. Sequências as quais não alcançaram essa qualidade no eletroferograma foram descartadas. As sequências escolhidas foram agrupadas em um só arquivo utilizando o programa *BioEdit*, disponível gratuitamente no site: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. O alinhamento foi realizado pelo programa *CLUSTAL W* disponível no *Bioedit* e o arquivo gerado foi editado. Para uma visualização mais eficiente da montagem das sequências em “contigs” foi utilizado o programa Geneious (Drummond *et al.*, 2009). Geneious é um sistema integrado, uma multi-plataforma de software para manipulação de bioinformática, encontrar, compartilhar e explorar os dados biológicos, como sequências de DNA ou proteínas, filogenias, as informações da estrutura 3D, publicações, entre outros. Possui capacidade de alinhamento de sequências e análise filogenética, montagem de contigs, desenho de primers, acesso ao NCBI e UniProt, visualizando a estrutura da proteína, PubMed automatizada, dentre outras ferramentas. Este programa está disponível no endereço eletrônico http://www.geneious.com/default,387_home.sm. Utilizando a ferramenta BLAST n (Altschul *et al.*, 1990) do banco de sequências do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), disponível no endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, as sequências foram comparadas àquelas disponíveis nos bancos de dados de sequências nucleotídicas na busca por similaridade com sequências já descritas.

Tabela 4 - Sequências dos primers utilizados no sequenciamento dos subclones com atividade amilolítica.

Primer	Sequência
Ra33 P fwd 1/M13 (-21)forward	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'
Ra33 P fwd 2	5' AAT GAG GTC GTT GTC 3'
Ra33 P fwd 3	5' GAA TCC ACA TCC GCA G 3'
Ra 33 P Rev 1/M13 reverse	5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3'
Ra33 P Rev 2	5' TGA CAA GAAGGT GCT 3'
Ra33 P Rev 3	5' ACA AAC GCT GTC TC 3'
Ra33 G fwd1/M13 (-21)forward	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'
Ra33 G Rev 2	5' GTT CAG GGC AAC TAC 3'
Ra 33 G Rev 1/M13 reverse	5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3'
Ra33 G Rev 2	5' TGA TGC AGG TAG TAA G 3'
Ra33 PCF fwd	5' ATC TGT GGC ACC AAT G 3'
Ra33 PCF Rev	5' AGT CGT GGC AAT ATC G 3'

6. Resultados

6.1 Extração de DNA

O rúmen contém em média, uma capacidade de armazenagem de alimentos, de 20,3 kg de amostra vegetal (Costa *et al.*, 2003). Ao pensar nessa problemática montamos uma metodologia onde poderíamos extrair as bactérias sólido-aderidas e não o material genético das plantas. Por esse motivo, a extração do DNA da microbiota sólido-aderida foi feita por modificações dos protocolos descritos por Martin *et al.* (1994) e Handelsman *et al.* (1998). Onde a primeira metodologia visa à dissociação das bactérias da partícula vegetal e a segunda metodologia a extração do DNA bacteriano. A extração de DNA forneceu material suficiente em quantidade e qualidade, comprovando a eficiência da junção das metodologias (Figura 24).

6.2 Digestão e clonagem

Por meio da extração total direta do DNA dos microrganismos do rúmen foi possível quantificar o material disponível para fazer digestão com a enzima de restrição *Pst* I. As preparações do DNA com digestão parcial resultaram em fragmentos desde menores 100 pb a maiores 15 kb (Figura 25). A faixa de tamanho 5 a 8 kb foi excisado do gel e purificado.

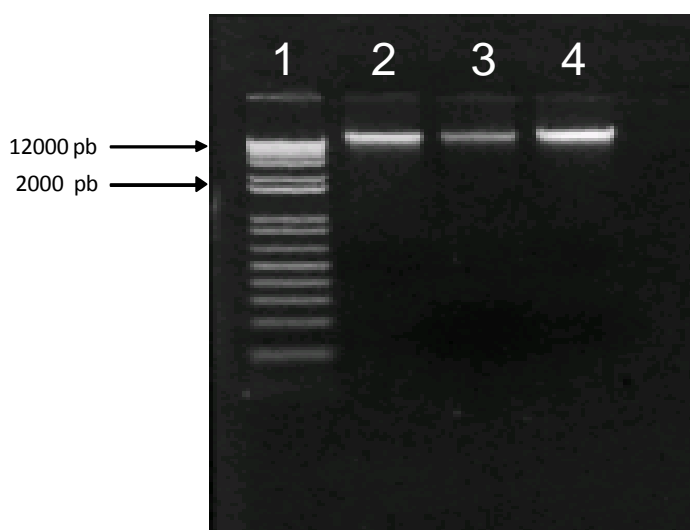


Figura 24 – Análise em gel de agarose 0,8% de DNA extraído da fração sólido-aderida do rúmen. 1- Marcador 1kb plus DNA ladder; 2 a 4- DNA ruminal.

O processo de precipitação é geralmente realizado através do uso de etanol, isopropanol e polietilenoglicol (Tsai *et al.*, 1992). Na maioria dos protocolos esse processo é realizado através do uso de isopropanol devido a suas propriedades de cargas que permite que seja usado apenas 0,6 volume de isopropanol para precipitar um volume de DNA extraído, enquanto são necessários dois volumes de etanol para cada volume de DNA extraído (Zhou *et al.*, 1996). Após a precipitação, o DNA deve ser ressuspenso em tampão, geralmente TE (1 mM de Tris, 1 mM de EDTA pH 8,0) ou em água ultra pura. Essa opção do uso do isopropanol para a precipitação é devido a uma melhor obtenção da qualidade de DNA do rúmen depois a eluição do gel.

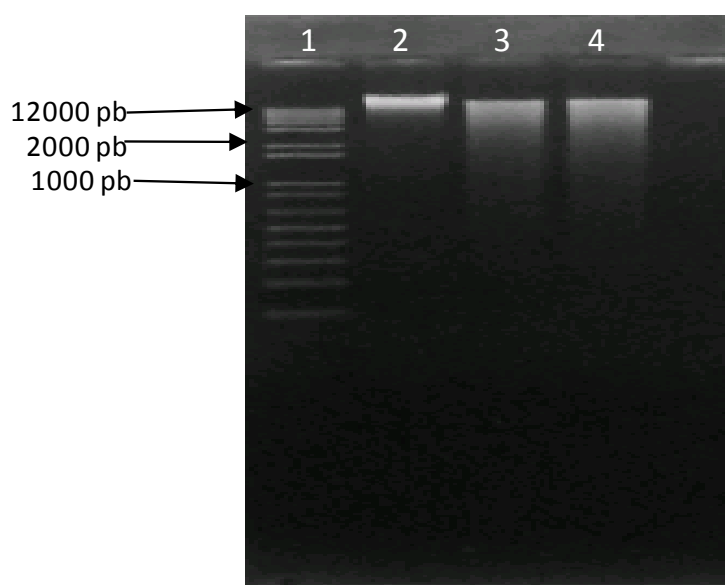


Figura 25 - Análise em gel de agarose 0,8% do DNA total purificado e digerido por *Pst* I. 1- Marcador 1kb plus DNA ladder; 2- DNA ruminal intacto; 3 e 4- DNA ruminal digerido com *Pst* I.

Após toda a preparação do DNA do rúmen foi necessário ter as condições da reação para a clonagem. Se a concentração do vetor é alta na reação, a re-circulação é favorecida, geralmente a taxa molar de vetor : inserto utilizada é 1:1, pois assim maximiza o número de plasmídeos recombinantes.

O DNA metagenômico purificado foi ligado ao plasmídeo linearizado *pCF430* e o sistema de ligação foi transformado em *E.coli* utilizando eletroporação. Conseguiu-se aproximadamente 50.000 clones, sendo este resultado obtido em duas séries de

extração, digestão e clonagem. Com a primeira série conseguimos aproximadamente 15.000 clones e com a segunda conseguimos aproximadamente 35.000 clones, a única diferença entre as duas séries de trabalho foi o volume de amostra submetido à metodologia de extração.

Para verificar a eficiência da clonagem, foram realizadas extrações do DNA plasmidial de uma amostragem de clones aleatórios e seu tamanho foi analisado em gel de agarose 1%. Obteve-se DNA plasmidial de tamanho maiores do que o plasmídeo originalmente utilizado (Figura 26).

Para comprovação da inserção dos fragmentos no plasmídeo foi realizada digestão de 10 clones aleatórios com a enzima *Pst* I (Figura 27). A análise dos fragmentos liberados tornou possível calcular o tamanho médio dos insertos, sendo de 5 kb. Tendo o plasmídeo original como referência, após digestão com enzima, os clones recombinantes se diferenciam do mesmo, pois possuem um maior número de bandas (Figura 27).

Com essa comprovação os clones foram guardados em placas Deep Well (fundo U) em glicerol para uma concentração final de 20% e armazenados em tubos apropriados e congelados em freezer a -80°C devidamente etiquetados. Desta forma foram mantidos individualmente para possíveis testes de seleção.

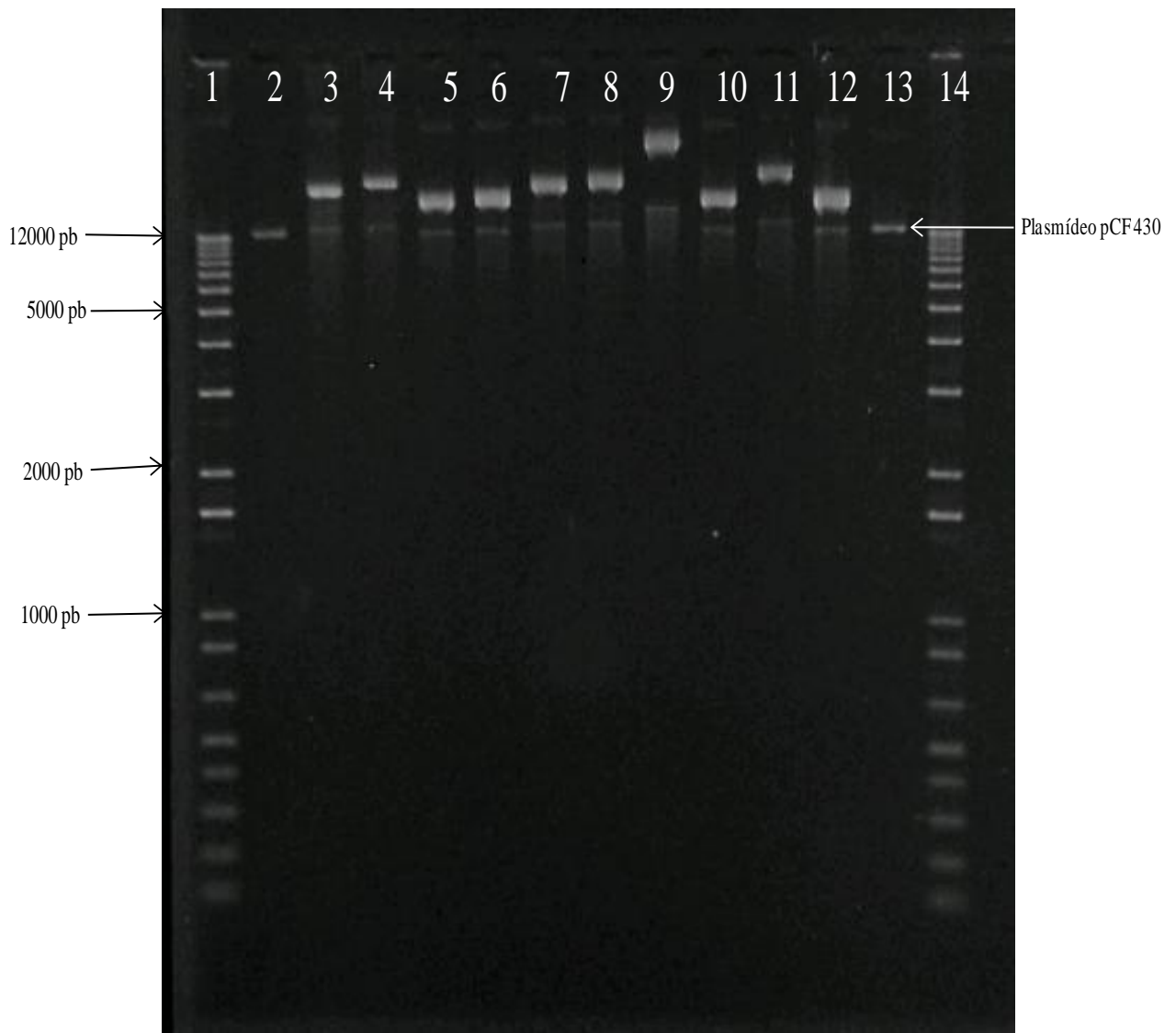


Figura 26 - Análise em gel de agarose 0,8% de DNA plasmidial de clones aleatórios da biblioteca de pequenos insertos de DNA ruminal da fração sólido-aderida. 1 e 14 Marcador 1kb *plus* DNA ladder; 2 e 13- DNA plasmidial *pCF430* digerido com *Pst* I ; 3 a 12- Clones aleatórios pertencentes a Biblioteca de pequenos insertos.

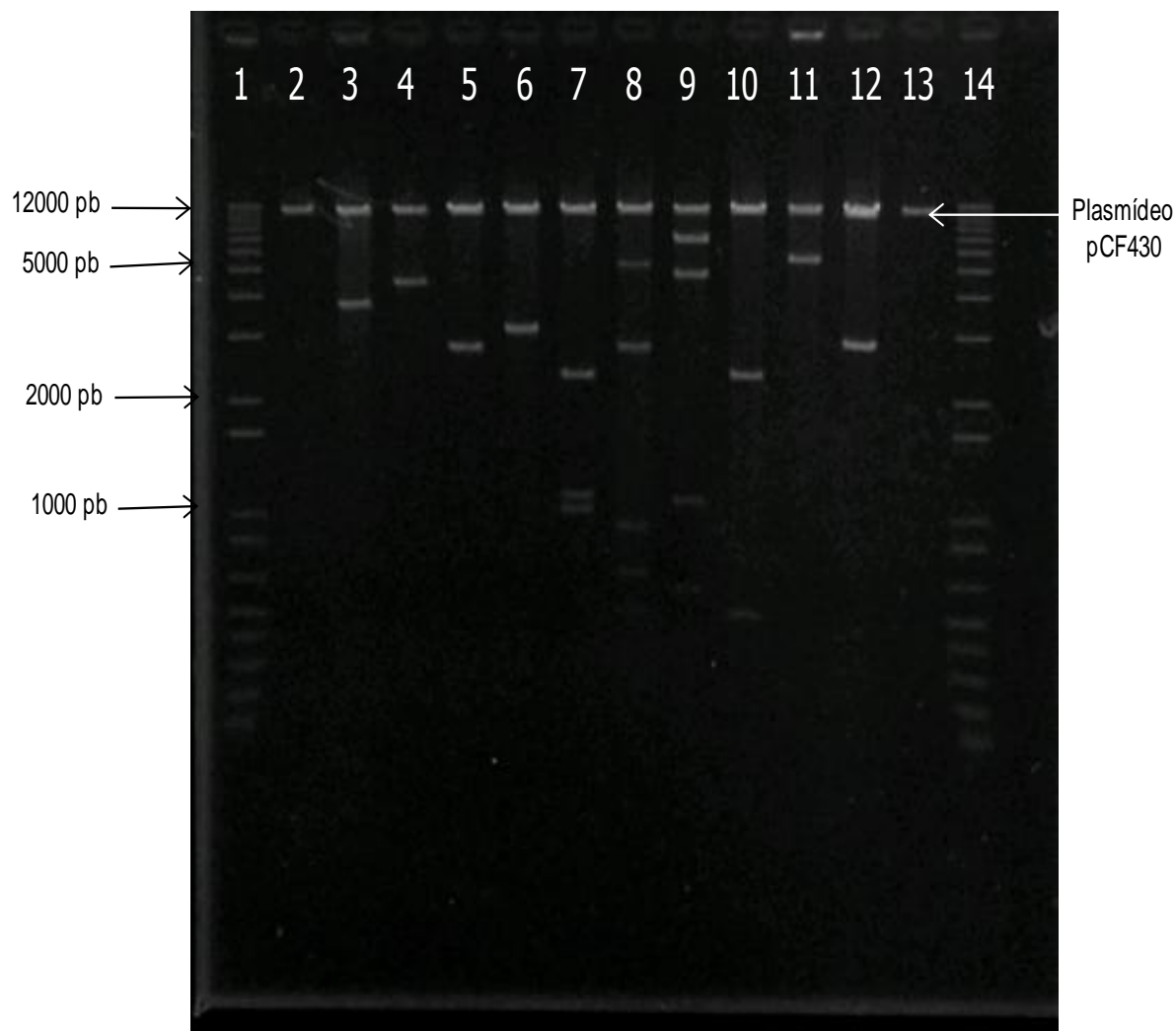


Figura 27 – Análise em gel de agarose 0,8% do padrão de digestão do DNA plasmidial de clones pertencentes a biblioteca de pequenos insertos. 1 e 14 Marcador 1Kb *plus* DNA ladder; 2 e 13- DNA plasmidial *pCF430*; 3 a 12- Clones pertencentes a biblioteca de pequenos insertos.

Para a validação da biblioteca metagenômica foi utilizada a técnica baseada na riqueza desta biblioteca através da construção de uma biblioteca 16S rDNA a partir da biblioteca metagenômica já construída. Com o objetivo de comprovar o potencial biotecnológico desta biblioteca metagenômica de rúmen de caprinos, foi realizada uma bioprospecção para atividade amilolítica.

6.3 Validação da Biblioteca Metagenômica: Diversidade bacteriana na biblioteca de pequenos insertos

A riqueza bacteriana representada na biblioteca foi amostrada através do sequenciamento de gene ribossomal 16S rDNA amplificados utilizando o DNA plasmidial da biblioteca como molde na reação de PCR. A validação da biblioteca é algo essencial, pois podemos ter certeza de que em nossa biblioteca existe material genético bacteriano. Como já se sabe o rúmen de caprinos é constituída basicamente de material vegetal em digestão, então esta validação é para afirmar que a biblioteca de pequenos insertos da fração sólida do rúmen é constituída de bactérias. Porém, não pode ser descartada a existência de material genético vegetal utilizando somente este tipo de validação. Sendo assim, para uma melhor comprovação seria necessário o sequenciamento das pontas dos clones pertencentes a esta biblioteca.

No total, 96 clones foram aleatoriamente selecionados da biblioteca de pequenos insertos para a amplificação com o primer 27F (5' AGA GTT TGA TCM⁵ TGG CTC AG 3') e posterior sequenciamento para ser analisados filogeneticamente. Após análise de qualidade, 88 clones foram comparados a outras sequências disponíveis no banco de dados público *Ribosomal Database Project* para conhecimento ecológico da biodiversidade associada. A análise destas sequências demonstrou a presença de três grupos filogenéticos, a saber, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, além da presença de bactérias não classificadas (Figura 28). Este resultado corrobora os resultados apresentados no Capítulo 1. Pode-se verificar a semelhança entre os resultados e até o aparecimento de um filo nas duas bibliotecas 16S rDNA que não aparece na biblioteca 16S rDNA da validação (Figura 29). Nesta amostra a classe predominante, com 45 clones, foi Bacteroidia, bactérias já conhecidas por apresentar um papel importante na degradação de fibras (Edwads *et al.*, 2004). Esta diversidade de filios bacterianos demonstra que os clones da biblioteca metagenômica capturaram a diversidade presente na microbiota bacteriana ruminal.

⁵ Y e M são nucleotídeos degenerados onde pode se adicionado, C ou T e A ou C respectivamente.

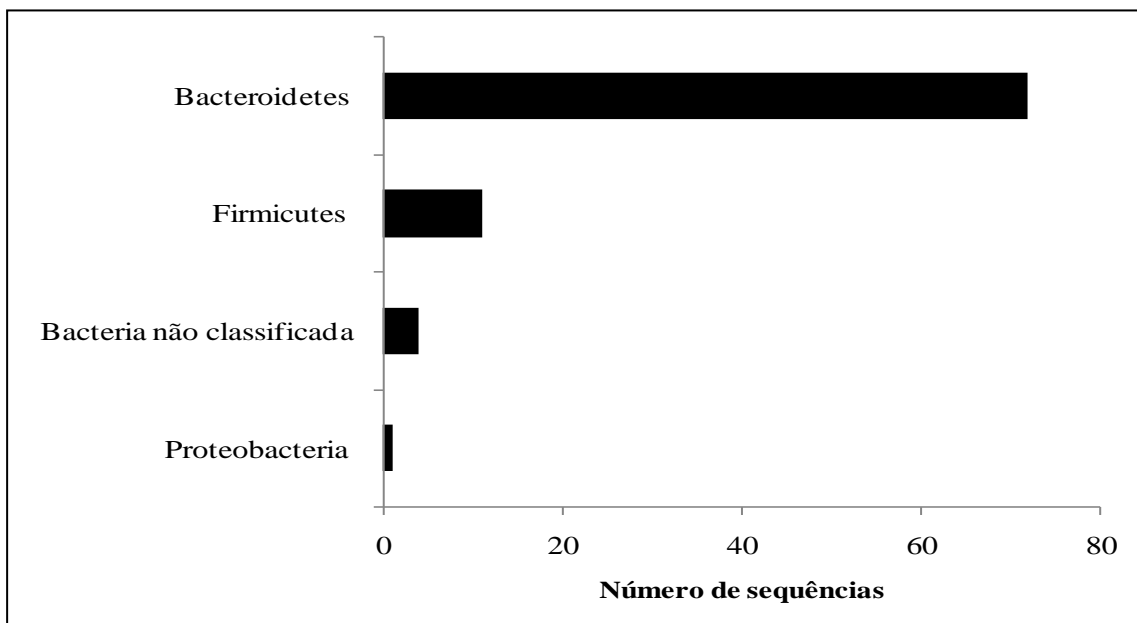


Figura 28 - Grupos filogenéticos encontrados na biblioteca de pequenos insertos de rúmen de caprinos segundo análise de 16S rDNA. Dados gerados pelo RDP com confiança maior ou igual a 80% para sequências depositadas.

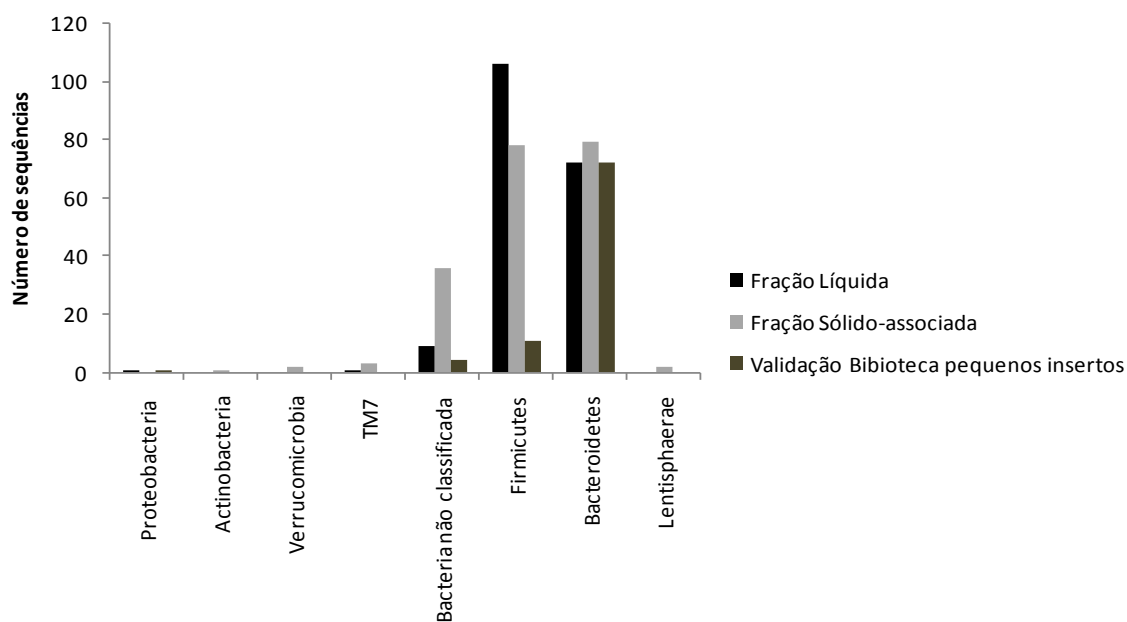


Figura 29 - Comparação dos grupos filogenéticos através dos resultados gerados pela biblioteca 16S rDNA feita com a fração líquida e sólida – aderida (capítulo 1) e a validação da biblioteca de pequenos insertos. Dados gerados pelo RDP com confiança maior ou igual a 80% para sequências depositadas.

6.4 Triagem da biblioteca metagenômica de expressão de rúmen de caprinos para atividade amilolíticas.

Com o intuito de bioprospectar clones com atividade amilolítica, plaqueamos a biblioteca de pequenos insertos em LB ágar, 0,5% amido. Após o período de incubação de cinco dias à temperatura ambiente, obteve-se ao total 2.670 colônias e destes, 41 clones apresentaram atividade amilolítica (Figura 30). Estas foram repicadas para novas placas para confirmação da atividade, no entanto, após cinco dias 13 das colônias repicadas não cresceram. Das outras 28 colônias, foram confirmadas como amilolíticas 22 colônias, que foram nomeadas com a sigla “Ra” que significa “Rúmen Amilase”.

Ao repicar os clones para fazer *single colony* assegurando-se a pureza do material, dois clones não cresceram diminuindo o conjunto de clones positivos para 20. Com a miniprep e digestão dos clones positivos o padrão de fragmentos dos insertos foi obtido, mostrando que das 20 amostras (Ra 1, Ra 2, Ra 3, Ra 4, Ra 5, Ra 8, Ra 9, Ra10, Ra 11, Ra12, Ra 13, Ra 17, Ra 19, Ra 20, Ra 22, Ra 24, Ra 31, Ra 32, Ra 33 e Ra 34) tem-se 11 clones (Ra 1, Ra 2, Ra 4, Ra 5, Ra 8, Ra 9, Ra 11, Ra12, Ra 13, Ra 19 e Ra 33) com padrões de digestão diferentes (Figura 31).

Para confirmar a estabilidade do fenótipo, foi feita uma retransformação em *E. coli* EPI300 com o DNA plasmidial extraído e as células foram plaqueadas em LB ágar, 0,5% amido (Vetec), 20 µg/ml de tetraciclina (20 µg/mL) e arabinose 0,02% (indutor). O mesmo foi feito com o vetor *pCF430* para controle negativo. Mesmo aparentemente havendo 11 clones com padrões de digestão diferentes foram incubados *overnight* a 37°C, 15 clones (Ra 1, Ra 2, Ra 3, Ra 4,, Ra 11, Ra12, Ra 13, Ra 19, Ra 20, Ra 22, Ra 24, Ra 31, Ra 32 e Ra 33) e depois colocados a temperatura ambiente por cinco dias para comprovar novamente a atividade amilolítica. No sexto dia, a placa foi exposta a vapor de iodo e notou-se a formação de halos translúcidos em volta das seis colônias (Ra 4, Ra12, Ra 13, Ra 24, Ra 33 e Ra 34) provenientes da transformação com o plasmídeo do clone, mas nenhum halo se formou ao redor da colônia do controle negativo (*E. coli* + *pCF430*) (Figura 32). Em muitos estudos tem sido utilizada a estratégia de triagem de bibliotecas metagenômicas baseadas em função e tem sido possível várias proteínas biocatalíticas como lipases, amilases e proteases em bibliotecas (Desantis *et al.*, 2002; Yun *et al.*, 2004).

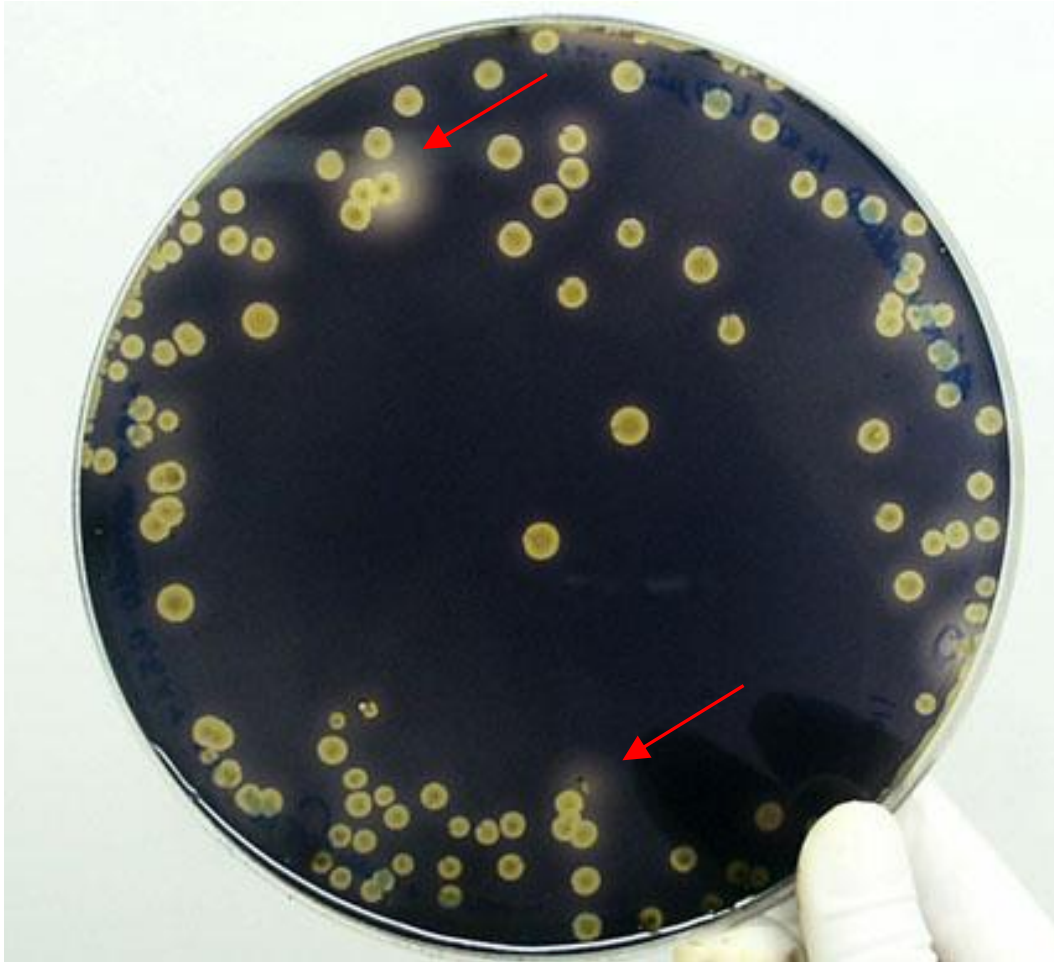


Figura 30 – Clones apresentando halo indicativo de atividade amilolítica em placa LB ágar com amido 0,5% corada com iodo. Setas indicam clones com halo indicativos de atividade amilolítica.

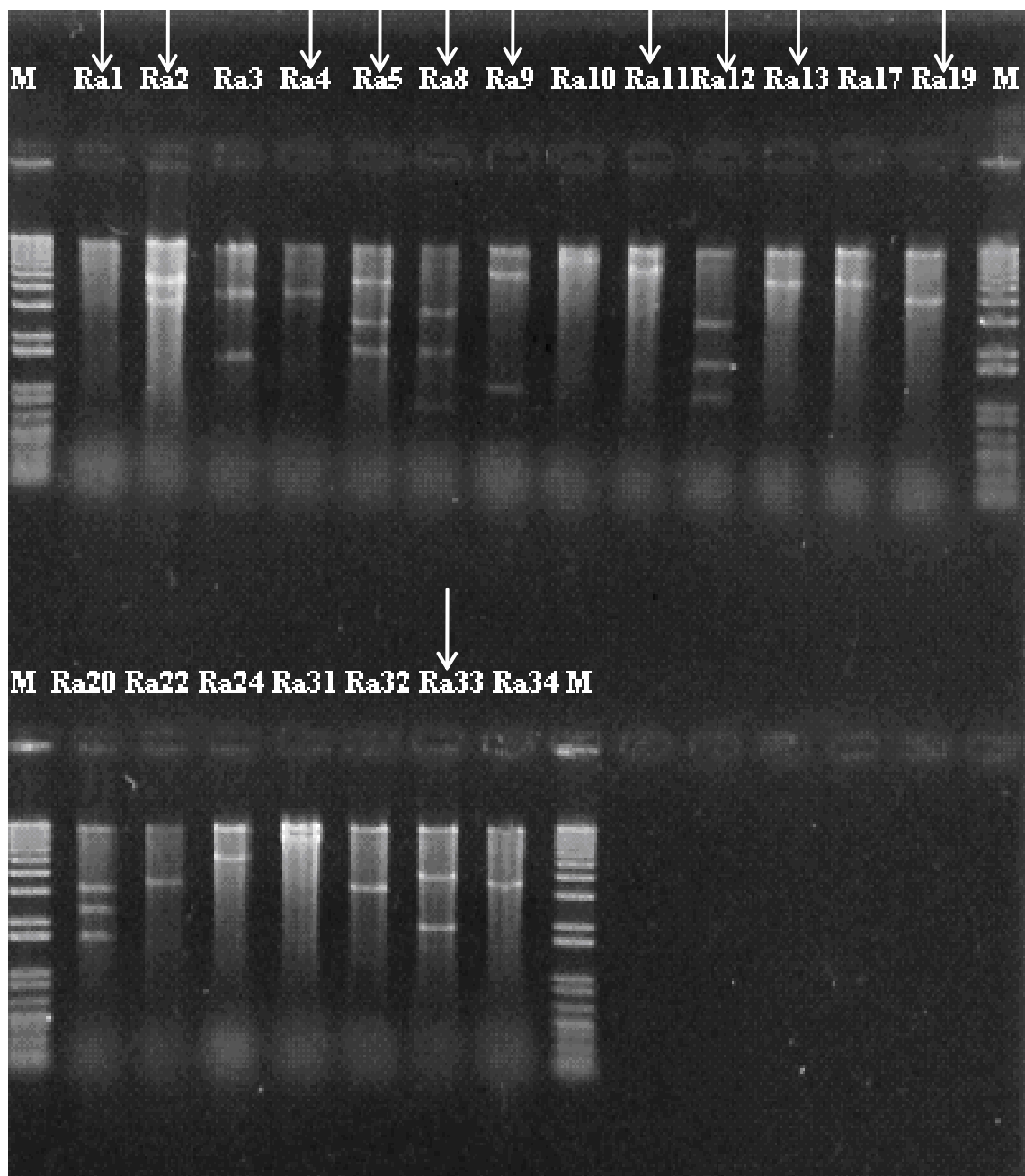


Figura 31 – Análise em gel de agarose 0,8% do padrão de restrição enzimático com *Pst* I do DNA plasmidial dos clones com atividade amilolítica para confirmar a inserção dos fragmentos no plasmídeo. M - Marcador 1kb *plus DNA ladder*; Ra- Clones positivos para atividade amilolítica.

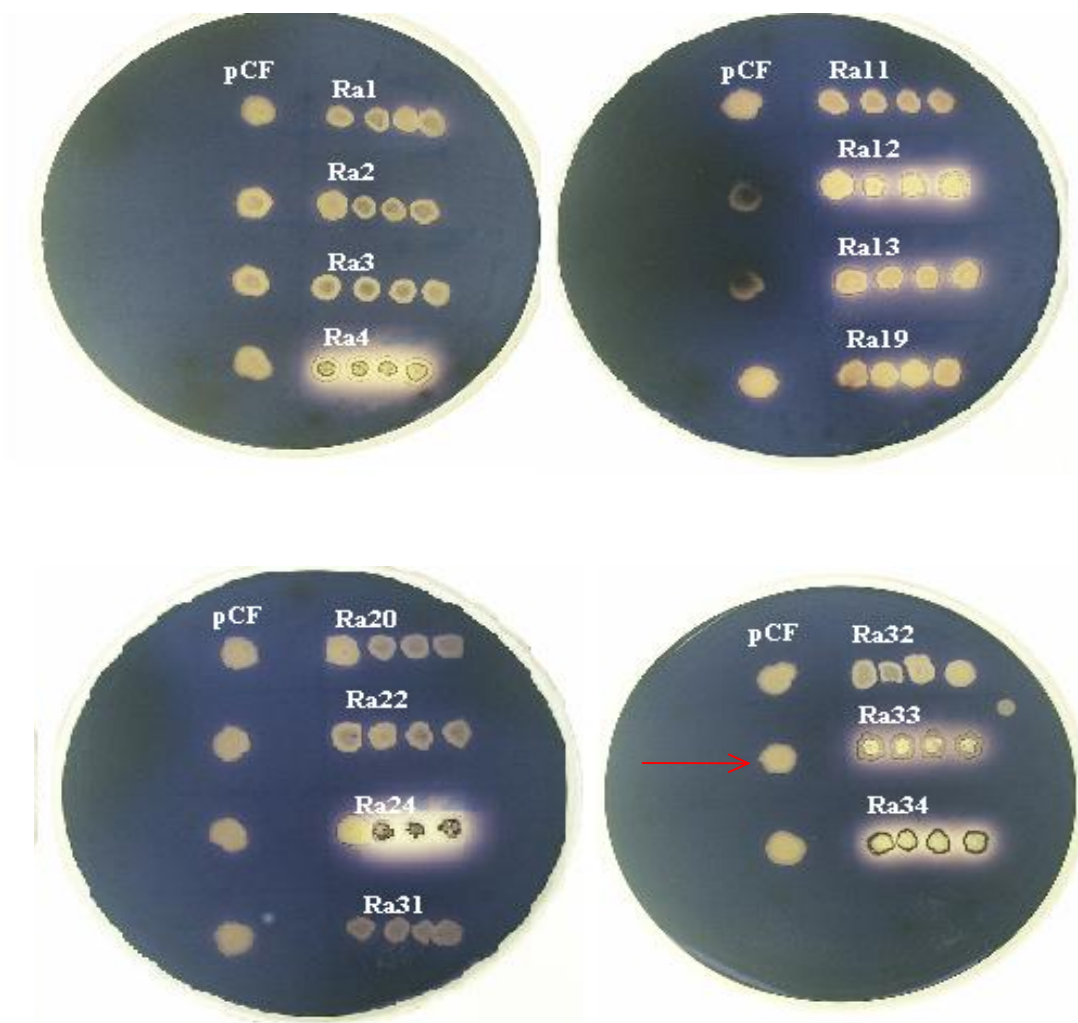


Figura 32 –Retransformação para confirmação da estabilidade do fenótipo amilolítica. Plasmídeos de clones com atividade positiva inicialmente para amilase foram retransformados em células competentes *E. coli* EPI 300 e plaquadas em placas de LB agar e amido 0,5%. O complexo iodo com o amido revela halo ao redor das colônias capazes de hidrolisar o amido.

Após o retransformação foi escolhido um clone para ser subclonado e sequenciado. O clone escolhido foi o Ra33 (Figura 33). A escolha desse clone foi baseada no tamanho dos fragmentos gerados após a digestão do clone com a enzima *Pst*I. Este clone ao ser digerido libera dois fragmentos um com aproximadamente 1,7 kb e outro com aproximadamente 3,5 kb (Figura 34).

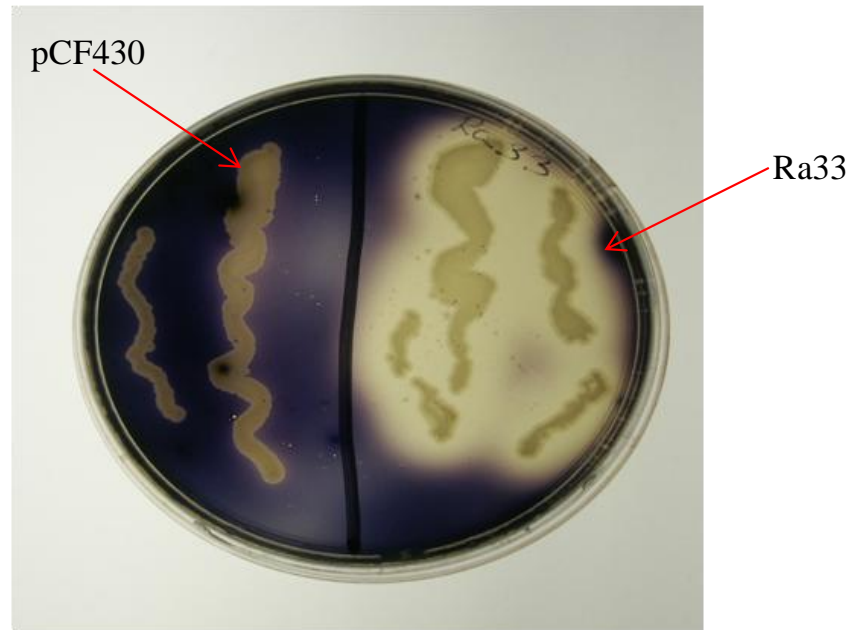


Figura 33 - Comparação da atividade clone Ra33. O controle positivo sendo *E. coli* EPI 300 + vetor *pCF430*. Plaqueado em LB contendo tetraciclina (20µg/mL) e amido 0,5%.

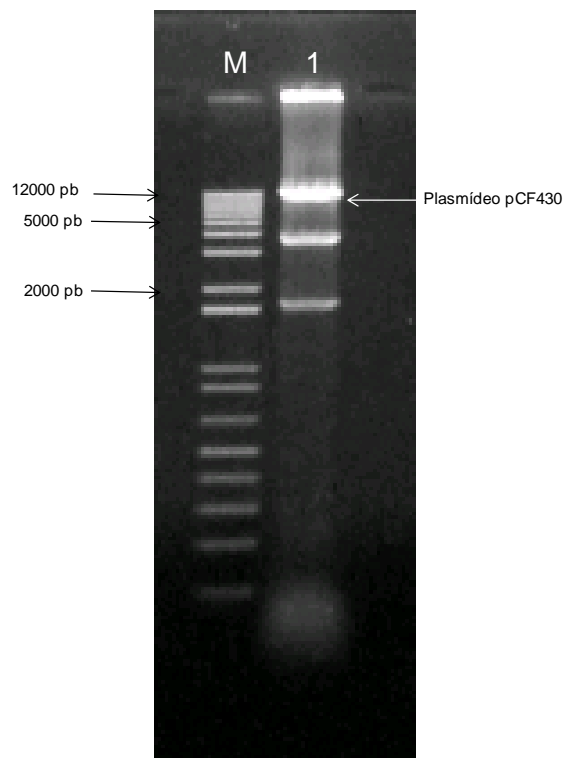


Figura 34 – Análise em gel de agarose 0,8% da digestão do clone Ra33 com a enzima *Pst* I. M- Marcador 1kb plus DNA ladder; 1- Clone Ra33 digerido com *Pst* I.

Para que ocorresse a subclonagem foram feitas minipreps do clone Ra33 e sua posterior digestão com a enzima *Pst* I (Figura 35). Os fragmentos originados da digestão foram clonados no vetor pUC 19 que também foi digerido com *Pst* I (Figura 35). A ligação no vetor foi de acordo com o descrito na metodologia e assim foram gerados dois subclones o Ra33 P, com o fragmento de 1,7 kb, e o Ra33 G, como o fragmento de 3,5 kb. A seleção dos subclones transformados foi feita através plaqueamento por um período de incubação de 16 horas a 37°C. Através da observação de colônias brancas e azuis, as colônias brancas, as quais devem conter o inserto, foram selecionadas para realização de uma nova miniprep para confirmação da inserção do fragmento no vetor. Para essa confirmação foi feita uma digestão com a enzima *Pst* I para a verificação da inserção do fragmento (Figura 36).

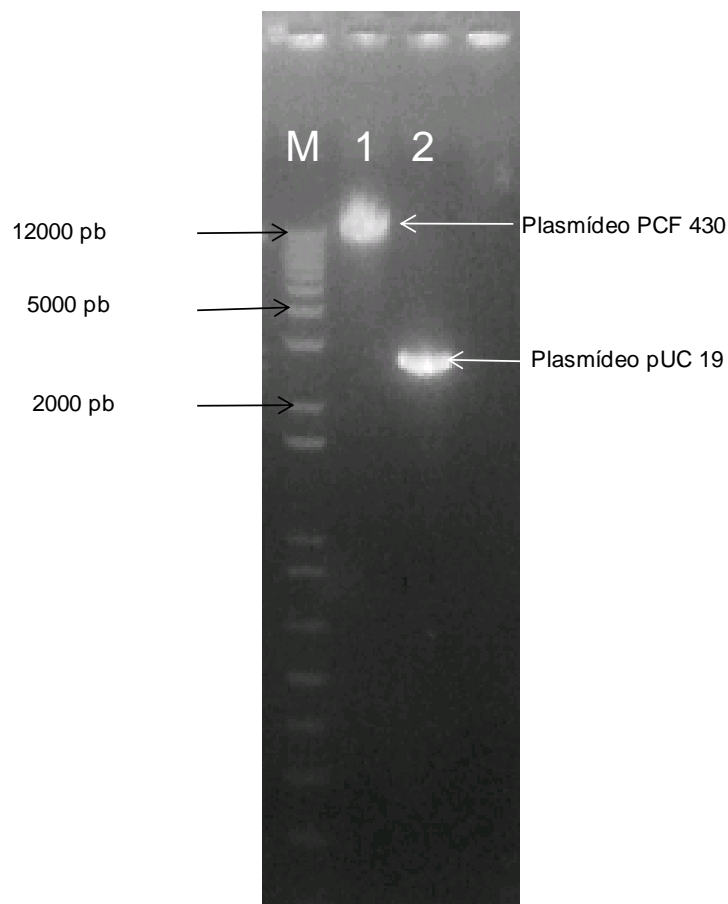


Figura 35 – Análise em gel de agarose 0,8% da digestão dos vetores *pCF430* e *pUC 19* com a enzima *Pst* I a serem utilizados para clonagem de fragmentos. M- Marcador 1kb *plus DNA ladder*; 1- Plasmídeo *pCF 430* digerido com *Pst* I; 2- Plasmídeo *pUC 19* digerido com *Pst* I.

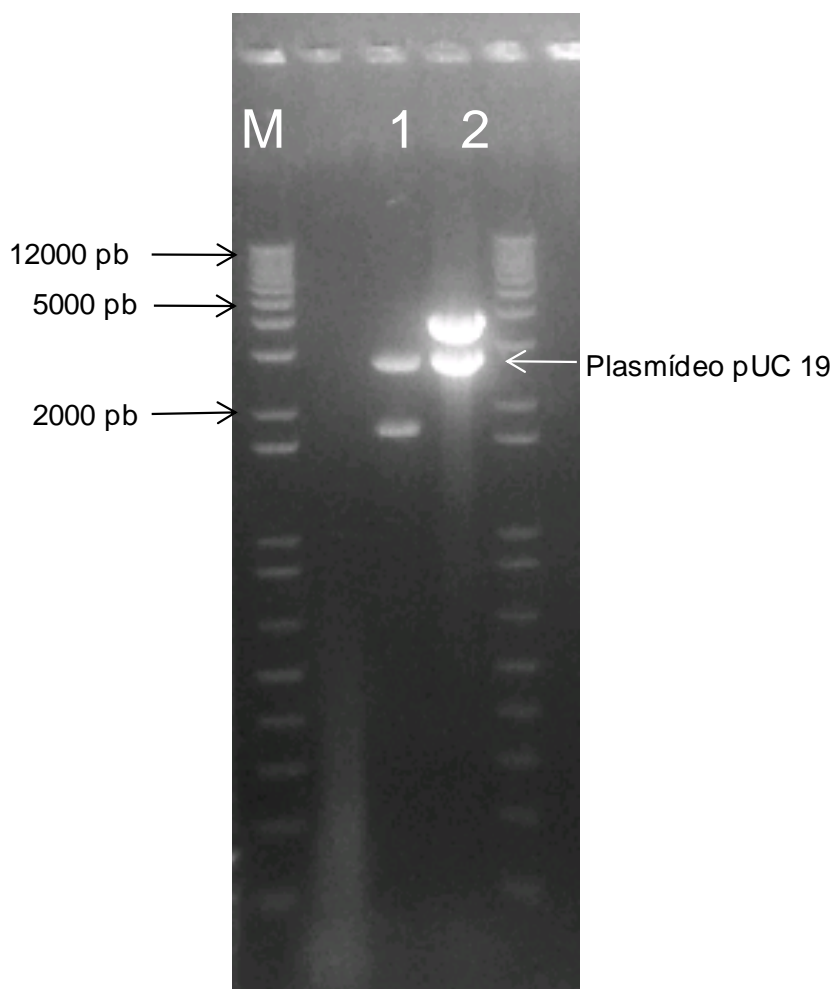


Figura 36 – Análise em gel de agarose 0,8% da digestão dos subclones com a enzima *Pst* I par a confirmação da inserção dos fragmentos. M- Marcador 1kb *plus DNA ladder* ; 1- Subclone Ra33 P; 2- Subclone Ra33 G.

Com o sucesso da inserção dos fragmentos, os suclones foram testados separadamente para a atividade amilolítica. Para isso os subclones foram plaqueados LB Agar contendo ampicilina (150 µg/mL) e amido (0,5%) por um período de incubação de 16 horas a 37°C em e cinco dias em temperatura ambiente. Após os seis dias de incubação ao revelar a placa observou-se que o subclone Ra33 G apresentou halo comprovando atividade amilolítica e enquanto que o subclone Ra33 P não apresentou halo (Figura 37). O aparecimento de halo para um subclone é um resultado muito importante, pois como o vetor pUC 19 utilizado para subclonagem não possui um promotor (Figura 23) e mesmo assim a atividade enzimática continua a aparecer isso indica que o fragmento do subclone Ra 33 G carrega o seu próprio promotor. Com o

intuito de encontrar o gene responsável pelo aparecimento da atividade amilolítica e de conhecer os clones Ra33 G e Ra33 P por inteiro foi realizado o sequenciamento de ambos os subclones.

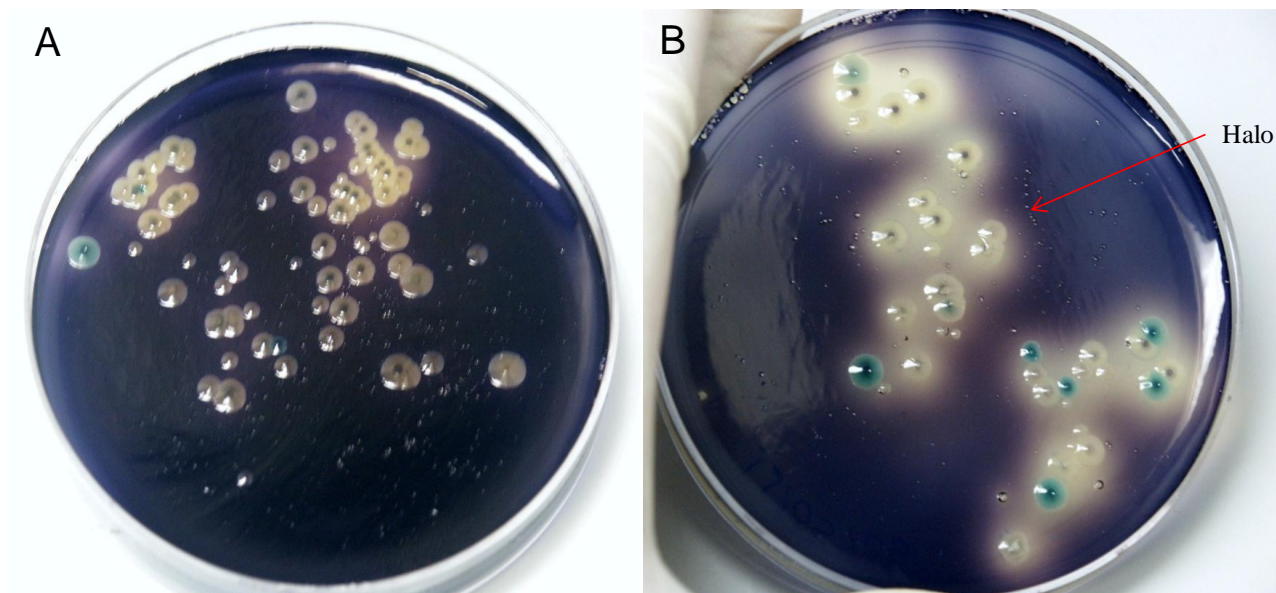


Figura 37 - Comparação da atividade entre o subclone Ra33P e Ra33 G. Plaqueado em LB contendo ampicilina (150µg/mL) e amido 0,5%. A- Ra33P; B- Ra33 G.

6.5 Sequenciamento dos Subclones

Os dois subclones foram mandados para o sequenciamento, a primeira reação de sequenciamento foi feita através de oligonucleotídeos desenhados a partir das sequências localizadas na porção final do vetor de clonagem (*M13 Forward* e *M13 Reverse*) (Tabela 4), ou seja, sequenciando as pontas do inserto. Logo em seguida a estratégia utilizada para o total sequenciamento do inserto foi por “*Primer walking*”. Como os subclones são de tamanhos diferentes, um de 1,7kb e outro de 3,5 kb, a quantidade de rodadas (desenho de primers e sequenciamento) para o

btermos os fragmentos por completo foram diferentes.

6.6 Ra33 P

Para o subclone Ra33 P foram feitos três rodadas de sequenciamento para ter o contig completo de 1,7 kb (Figura 38). Os sequenciamentos foram nomeados com Ra33 P Fwd para os primer forward e Ra33 P Rev para os primer reverse, com seus respectivos números. À medida que as leituras das sequências foram obtidas, as

sequências consensos da subclonagem com os primer *M13 Forward* (Ra33 P fwd 1) e *M13 Reverse* (Ra33 P Rev 1) (Tabela4) foram submetidas à construção de primers internos, Ra33 P fwd 2, Ra33 P fwd 3, Ra33 P Rev 2, Ra33 P Rev 3 (Tabela 4). Para verificar com qual sequências este subclone se assemelha utilizou-se a ferramenta BLASTn. Com esta ferramenta não encontramos similaridade com nenhuma sequência depositada no banco de dados (Figura 39). Após a análise das sequências, comprovou-se que os valores “score” são muito altos para este fragmento, variando de 667 a 70 (Figura 38). Contudo, mesmo considerando um alto score entre duas sequências, nem sempre podemos inferir um alto grau de homologia entre elas, devido à aleatoriedade no processo de alinhamento feito pelo BLAST. Dada a variabilidade entre as sequências comparadas e as estratégias do BLAST, utiliza-se assim o e-value, que procura fornecer aos usuários a segurança de que a pontuação dada para um determinado hit não ocorreu aleatoriamente.

O valor e-value de um hit para um dado score correspondem à probabilidade de se obter, com outra sequência aleatória de mesmo tamanho e composição de nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos, outro alinhamento com score igual ou superior. Desta forma, quanto mais próximo de zero for o e-value, mais confiável será a consulta (Sousa *et al.*, 2007). Por exemplo, para um hit com e-value = 1, significa que para a mesma sequência de consulta, comparada com outra sequência aleatória de mesmo tamanho e composição, vai gerar um alinhamento com score igual ou maior ao obtido. Neste trabalho o e-value sempre apareceu com altos valores indicando que as sequências obtidas provavelmente são provenientes de organismos ainda não cultivados e/ou sequenciados anteriormente.

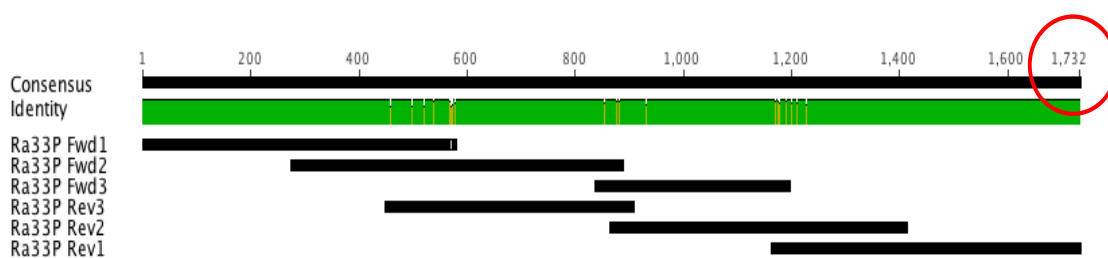
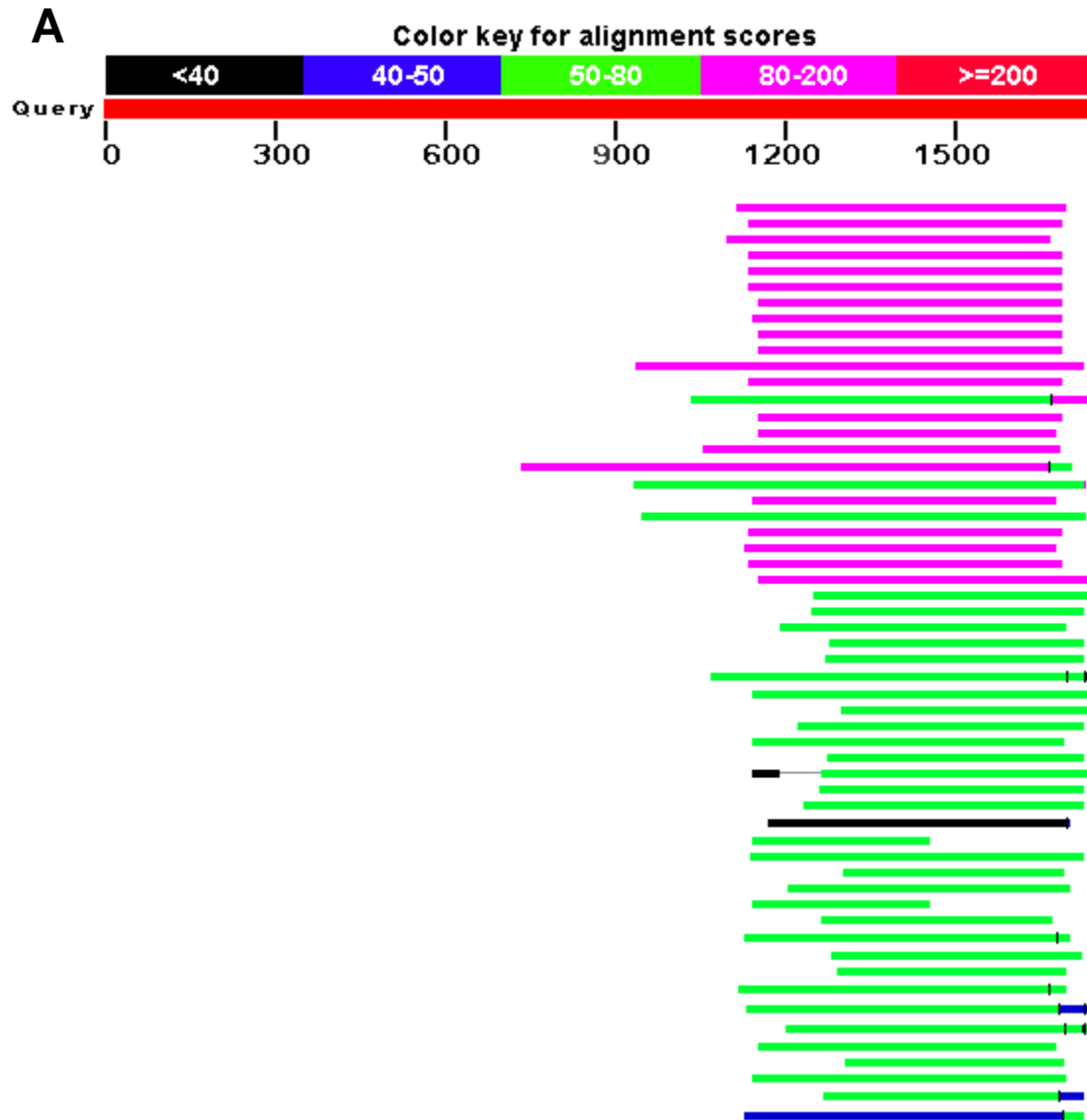


Figura 38 - Resultado da montagem das sequências para o subclone Ra33 P através da combinação das sucessivas rodadas de sequenciamento. Esta Figura foi gerada pelo programa Geneious utilizando a ferramenta "Assembly". “Consensus” é a sequência gerada pela junção dos fragmentos sequenciados; “Identity” é a qualidade de semelhança entre as sequências.



B

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CBL17006.1	hypothetical protein [Ruminococcus sp. 18P13]	100	160	33%	4e-19	36%
ZP_06616708.1	putative lipoprotein [Bacteroides ovatus SD CMC 3f] >qb EFF53301	99.4	99.4	31%	1e-18	35%
ZP_05981478.2	ubiquitin family protein [Subdoligranulum variabile DSM 15176] >qt	99.4	99.4	32%	1e-18	36%
ZP_02071951.1	hypothetical protein BACUNI_03393 [Bacteroides uniformis ATCC 8	99.4	99.4	31%	1e-18	35%
ZP_04548583.1	conserved hypothetical protein [Bacteroides sp. 2_2_4] >qb EEO58	98.6	98.6	31%	2e-18	34%
ZP_04848355.1	conserved hypothetical protein [Bacteroides sp. 1_1_6] >qb EES67	97.8	97.8	31%	4e-18	34%
ZP_04543432.1	conserved hypothetical protein [Bacteroides sp. D1] >ref ZP_06086	95.9	95.9	30%	1e-17	36%
ZP_05548116.1	conserved hypothetical protein [Parabacteroides sp. D13] >qb EEU	95.5	95.5	31%	2e-17	35%
ZP_04848356.1	conserved hypothetical protein [Bacteroides sp. 1_1_6] >qb EES67	94.7	94.7	30%	3e-17	35%
ZP_02068418.1	hypothetical protein BACOVA_05434 [Bacteroides ovatus ATCC 846	94.7	94.7	30%	3e-17	35%
ZP_02205380.1	hypothetical protein COPEUT_00139 [Coprococcus eutactus ATCC 2	93.2	133	45%	9e-17	29%
ZP_06725541.1	putative lipoprotein [Bacteroides ovatus SD CC 2a] >ref ZP_06768	92.4	92.4	31%	2e-16	33%
CBL17493.1	hypothetical protein [Ruminococcus sp. 18P13]	91.7	452	40%	3e-16	33%
ZP_04548584.1	conserved hypothetical protein [Bacteroides sp. 2_2_4] >qb EEO58	91.3	91.3	30%	3e-16	35%
ZP_05414086.1	The GLUG motif protein family protein [Bacteroides finegoldii DSM 1	91.3	91.3	30%	3e-16	34%
ZP_05347020.1	The GLUG motif protein family protein [Bryantella formatexiqens DS	91.3	91.3	36%	3e-16	34%
ZP_02418024.1	hypothetical protein ANACAC_00591 [Anaerostipes caccae DSM 146	90.9	151	55%	5e-16	27%
CBL17726.1	The GLUG motif. [Ruminococcus sp. 18P13]	89.7	221	45%	1e-15	33%
ZP_02070378.1	hypothetical protein BACUNI_01798 [Bacteroides uniformis ATCC 8	89.4	89.4	30%	1e-15	32%
CBL17134.1	hypothetical protein [Ruminococcus sp. 18P13]	89.0	220	45%	2e-15	33%
ZP_02068419.1	hypothetical protein BACOVA_05435 [Bacteroides ovatus ATCC 846	89.0	89.0	31%	2e-15	34%
ZP_06725540.1	putative lipoprotein [Bacteroides ovatus SD CC 2a] >ref ZP_06768	86.3	86.3	31%	1e-14	33%

ZP_05414087.1	The GLUG motif protein family protein [Bacteroides finegoldii DSM 1	82.8	82.8	31%	1e-13	35%
YP_001996445.1	GLUG domain protein [Chloroherpeton thalassium ATCC 35110] >q	80.1	80.1	33%	8e-13	31%
YP_003250214.1	GLUG domain protein [Fibrobacter succinoqenes subsp. succinoqene	79.3	266	27%	1e-12	39%
EES53456.1	putative filamentous hemaagglutinin family protein [Leptospirillum f	79.0	122	27%	2e-12	30%
YP_753757.1	Iq-like domain-containing protein [Svntrophomonas wolfei subsp. w	77.8	238	28%	4e-12	34%
YP_003452955.1	filamentous haemaagglutinin outer membrane protein [Azospirillum s	75.9	235	25%	2e-11	35%
YP_220401.1	hypothetical protein p49879 1p24 [Leptospirillum ferrooxidans] >qt	74.3	168	26%	4e-11	33%
YP_003130980.1	GLUG domain protein [Halorhabdus utahensis DSM 12940] >qb AC	73.6	513	38%	7e-11	32%
ZP_06344633.1	putative halomucin [Clostridium sp. M62/1] >qb EFE14509.1] putati	73.2	73.2	34%	1e-10	27%
ZP_03645249.1	hypothetical protein BACCOPRO_03642 [Bacteroides coprophilus D:	72.8	72.8	24%	1e-10	35%
YP_001100131.1	hypothetical protein HEAR1853 [Hermiimonas arsenicoxydans] >e	72.8	130	28%	1e-10	31%
ZP_04853573.1	conserved hypothetical protein [Paenibacillus sp. oral taxon 786 str.	72.0	72.0	31%	2e-10	24%
EES53455.1	putative filamentous hemaagglutinin family protein [Leptospirillum f	72.0	117	25%	2e-10	31%
YP_002297183.1	the GLUG motif domain protein, putative [Rhodospirillum centenum	72.0	375	29%	2e-10	50%
YP_001678767.1	multidomain protein with s-layer homology region, qluq motif, iq mc	71.6	71.6	26%	3e-10	34%
YP_001772507.1	filamentous haemaagglutinin outer membrane protein [Methylobacte	71.2	667	28%	4e-10	35%
YP_001339353.1	filamentous haemaagglutinin outer membrane protein [Marinomonas	70.9	209	30%	5e-10	35%
ZP_06615817.1	putative lipoprotein [Bacteroides ovatus SD CMC 3f] >qb EFF54190	70.5	70.5	17%	6e-10	36%
YP_393521.1	GLUG [Sulfurimonas denitrificans DSM 1251] >qb ABB44286.1] GLL	70.5	122	33%	6e-10	32%
NP_901141.1	adhesin [Chromobacterium violaceum ATCC 12472] >qb AAQ5914f	70.5	70.5	22%	6e-10	31%
ZP_06690114.1	conserved hypothetical protein [Achromobacter piechaudii ATCC 43	70.1	70.1	28%	8e-10	32%
ZP_06615821.1	glycosyl hydrolase family 32 [Bacteroides ovatus SD CMC 3f] >qb	70.1	70.1	17%	8e-10	36%
ZP_06468741.1	filamentous hemaagglutinin outer membrane protein [Burkholderia s	69.7	69.7	23%	1e-09	35%
YP_001621105.1	hypothetical protein ACL_1119 [Acholeplasma laidlawii PG-8A] >qb	68.6	433	32%	2e-09	36%
YP_001353305.1	heme utilization/adhesion protein [Janthinobacterium sp. Marseille]	68.6	170	25%	2e-09	37%
YP_001353306.1	large exoproteins involved in heme utilization or adhesion [Janthino	68.2	68.2	23%	3e-09	36%
YP_001996769.1	filamentous haemaagglutinin family outer membrane protein [Chloro	67.4	249	33%	5e-09	30%

Figura 39 - Resultado da busca por similaridade para o subclone Ra33 P para as sequências geradas utilizando os primer Forward e Reverse, através da ferramenta BLASTn. A- Cor da sequência de acordo com a nota dada para o alinhamento; B- Sequências que produziram alinhamentos significantes.

6.7 Ra33G

Com o subclone Ra33 G foram realizadas duas rodadas de sequenciamento até o momento (Figura 39). Os sequenciamentos foram nomeados com Ra33 G Fwd para os primer forward e Ra33 G Rev para os primer reverse, com seus respectivos números. À medida que as leituras das sequências foram obtidas, as sequências consenso da subclonagem com os primer *M13 Forward* (Ra33 G fwd 1) e *M13 Reverse* (Ra33 G Rev1) foram utilizadas para a construção de primers internos, Ra33 G fwd 2, Ra33 G Rev 2 (Tabela4).

Os resultados provenientes do sequenciamento dos primers forward do subclone gerou um fragmento de 976 pb (Figura 40A). Ao colocar esse contig no NCBI utilizando a Ferramenta BLASTn verificou-se que o menor e-value (0,15) encontrado foi para a “RNA polymerase Rpb1 C-terminal repeat domain-containing protein” com um máximo de identidade de 27%. Apesar de que de ter encontrado um e-value com um

valor considerável, a maioria dos outros valores de e-value são muito altos para algumas das sequências similares. Esta discrepância nos valores indica que as sequências obtidas provavelmente são provenientes de organismos ainda não cultivados e/ou não sequenciados anteriormente (Figura 41).

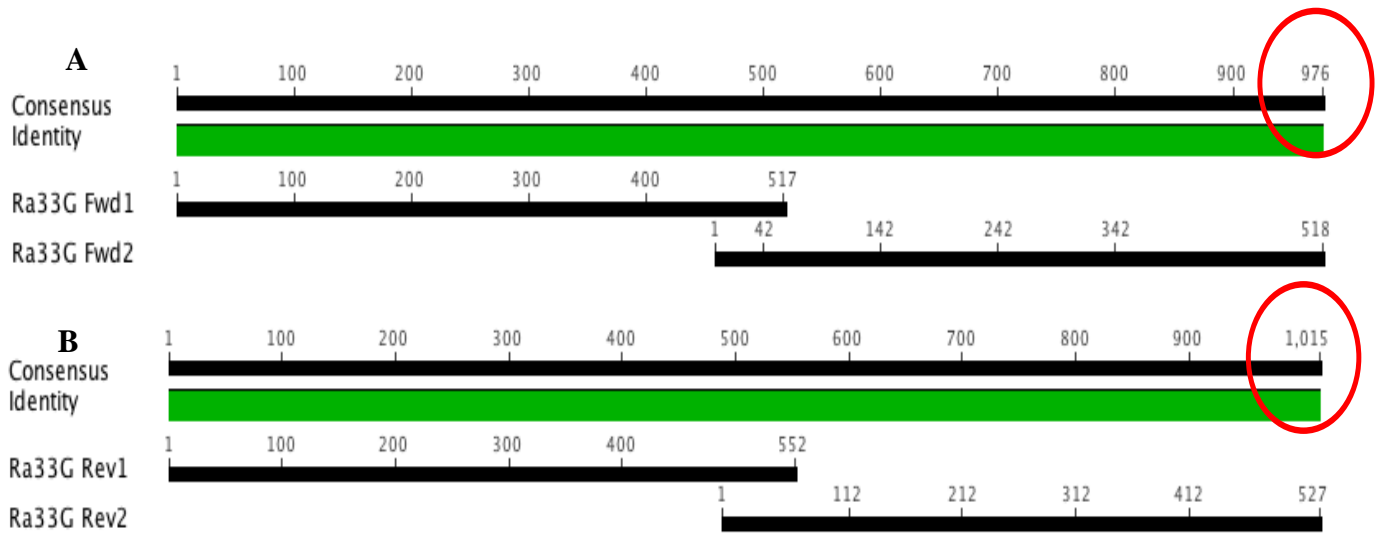
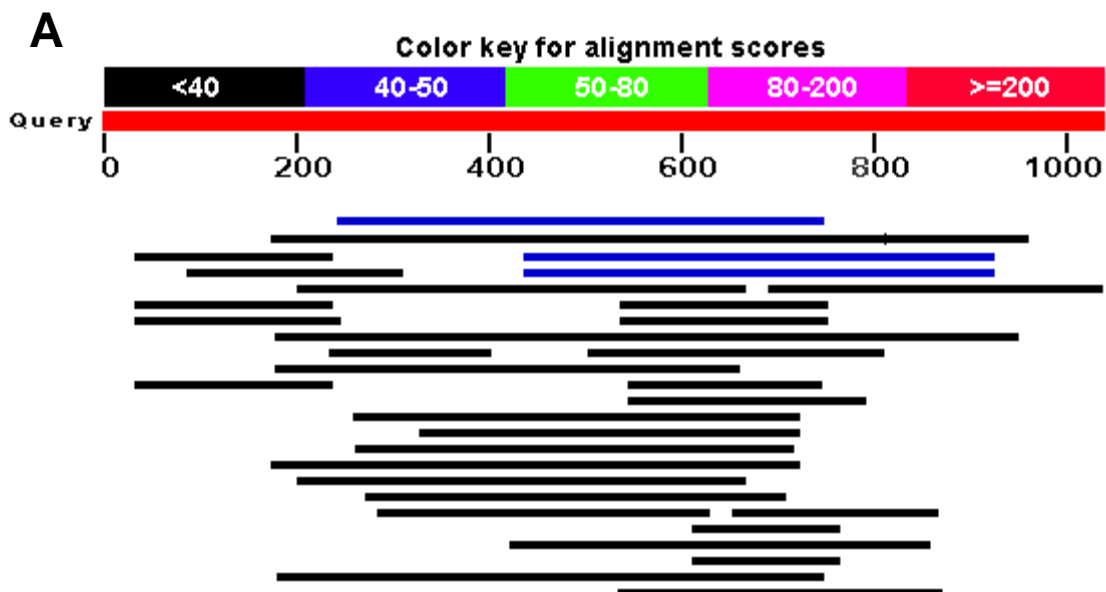


Figura 40 - Resultado da montagem das sequências para o subclone Ra33 G através da combinação das sucessivas rodadas de sequenciamento. Esta Figura foi gerada pelo programa Geneious utilizando a ferramenta "Assembly". "Consensus" é a sequência gerada pela junção dos fragmentos sequenciados; "Identity" é a qualidade de semelhança entre as sequências.

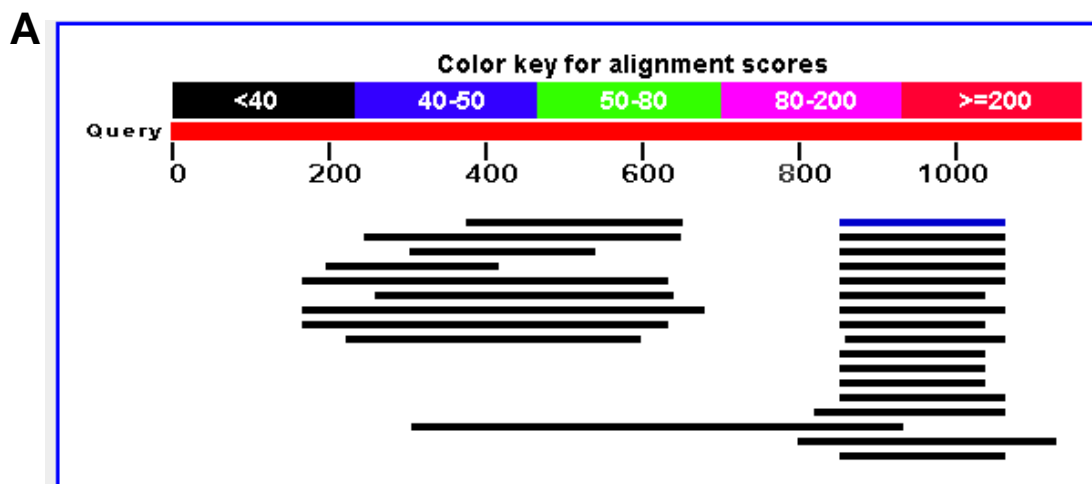


Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EEE26844.1	RNA polymerase Rpb1 C-terminal repeat domain-containing protein	41.6	41.6	48%	0.15	27%
NP_001018272.1	sequence orphan [Schizosaccharomyces pombe] >sp Q8TFG4.1 YU	35.0	59.3	75%	0.37	26%
FAW62535.1	zinc finger, A20 domain containing 2, isoform CRA c [Homo sapiens]	40.0	40.0	47%	0.45	29%
FAW62537.1	zinc finger, A20 domain containing 2, isoform CRA d [Homo sapiens]	40.0	40.0	47%	0.45	29%
EEE31096.1	chloride channel protein k, putative [Toxoplasma gondii VEG]	38.5	38.5	44%	1.3	25%
ZP_02146683.1	hypothetical protein RGBS107_04451 [Phaeobacter gallaeciensis BS]	38.5	38.5	20%	1.3	34%
ZP_02149421.1	hypothetical protein RG210_05662 [Phaeobacter gallaeciensis 2.10]	38.5	38.5	20%	1.3	34%
NP_523475.3	salivary gland secretion 1 [Drosophila melanogaster] >qb AAF5095	38.5	38.5	74%	1.3	23%
NP_827663.1	hypothetical protein SAV_6487 [Streptomyces avermitilis MA-4680]	38.1	38.1	29%	1.7	26%
YP_161136.1	hypothetical protein ebA7253 [Aromatoleum aromaticum EbN1] >er	38.1	38.1	46%	1.7	29%
ZP_03266168.1	methyl-accepting chemotaxis sensory transducer [Burkholderia sp.]	37.4	37.4	19%	2.9	32%
YP_583843.1	methyl-accepting chemotaxis sensory transducer [Cupriavidus meti]	37.4	37.4	23%	2.9	23%
XP_002369229.1	hypothetical protein TGM49_085910 [Toxoplasma gondii ME49] >q	37.0	37.0	44%	3.8	27%
BAE91904.1	hypothetical protein [Pichia minuta]	37.0	37.0	38%	3.8	26%
CB158047.1	unnamed protein product [Sordaria macrospora]	36.2	36.2	43%	6.4	30%
XP_002315162.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >qb EEF01333.1 predicted	36.2	36.2	52%	6.4	28%
XP_002369229.1	voltage gated chloride channel domain-containing protein [Toxoplasma]	36.2	36.2	44%	6.4	26%
ABA91707.2	expressed protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] >dbj BA	36.2	36.2	42%	6.4	24%
AA101235.1	NADH dehydrogenase subunit 2 [Telophorus sulfureopectus]	36.2	36.2	19%	6.4	28%
YP_447405.1	tyrosyl-tRNA synthetase [Methanospaera stadtmanae DSM 3091] :	36.2	36.2	33%	6.4	24%
CAA36550.1	precursor TRG1 protein [Saccharomyces cerevisiae] >qb AAA35169	36.2	36.2	33%	6.4	26%
XP_957236.1	hypothetical protein NCU00112 [Neurospora crassa OR74A] >qb EA	36.2	36.2	21%	6.4	30%
ADC92479.1	NADH dehydrogenase subunit 2 [Pachycephala soror]	35.8	35.8	19%	8.4	30%
ADC92474.1	NADH dehydrogenase subunit 2 [Pachycephala inornata]	35.8	35.8	20%	8.4	30%
ZP_06182931.1	hypothetical protein HMPREF0578_1567 [Mobiluncus mulieris 28-1] :	35.8	35.8	14%	8.4	33%
ZP_04706109.1	L-carnitine dehydratase/bile acid-inducible protein F [Streptomyces]	35.8	35.8	42%	8.4	25%
ZP_03994474.1	conserved hypothetical protein [Mobiluncus mulieris ATCC 35243] >	35.8	35.8	14%	8.4	33%
YP_002774235.1	putative ADP-ribose pyrophosphatase [Brevibacillus brevis NBRC 11	35.8	35.8	16%	8.4	30%
XP_002297570.1	predicted protein [Thalassiosira pseudonana CCMP1335] >qb EED8	35.8	35.8	54%	8.4	27%
ACA35119.1	NADH dehydrogenase subunit 2 [Pachycephala sp. CEM22]	35.8	35.8	19%	8.4	30%
XP_001607788.1	PREDICTED: similar to LOC524155 protein [Nasonia vitripennis]	35.8	35.8	20%	8.4	29%
YP_711161.1	hypothetical protein FRAAL0898 [Frankia alni ACN14a] >emb CAJ59	35.8	35.8	32%	8.4	31%

Figura 41 - Resultado da busca por similaridade para o subclone Ra33 G para as sequências geradas utilizando os primer Forward, através da ferramenta BLASTn. A- Cor da sequência de acordo com a nota dada para o alinhamento; B- Sequências que produziram alinhamentos significantes.

Para as sequências resultantes da utilização dos primers reverse foi gerado um fragmento de 1,015 pb (Figura 40 B). Ao colocar esse contig no BLASTn obtivemos um resultado já esperado, pois apresentou um e-valeu de 0,24 porém, tendo um similaridade de 30% para “keratin associated protein 1-4” (Figura 42). Este resultado já é esperado pelo fato de que, como visto no Capítulo 1, uma grande parte das bactérias encontradas no rúmen de caprinos são ainda não conhecidas, pois pouco se sabe da microbiota encontrado em rúmen de caprinos que se alimentação de uma vegetação nativa da caatinga brasileira. Recentemente a diversidade microbiana de ruminantes estão sendo estimadas por meio de abordagens de cultura independente (Rondon *et al.*, 1999). Abordagens de estudo utilizando o metagenoma têm sido feitas para diferentes

habitats e aos poucos tem sido revelado como uma forma potente de identificar genes para serem usados em processos biotecnológicos (Roh, 2008).



B

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NP_001034591.1	keratin associated protein 1-4 [Mus musculus] >dbj BAE20862.1 ui	41.2	41.2	18%	0.24	30%
XP_002724592.1	PREDICTED: keratin associated protein 1-3-like [Rattus norvegicus]	38.9	38.9	18%	1.2	29%
XP_850026.1	PREDICTED: similar to keratin associated protein 1-3 [Canis familia	38.9	38.9	18%	1.2	30%
XP_850039.1	PREDICTED: similar to keratin associated protein 1-3 [Canis familia	38.9	38.9	18%	1.2	30%
BAA25573.1	high sulfur protein B2E [Rattus norvegicus]	38.9	38.9	18%	1.2	29%
AAI19473.1	OTTMUSG00000002180 protein [Mus musculus]	38.5	38.5	15%	1.5	34%
XP_001917992.1	PREDICTED: similar to keratin-associated protein 4-6 [Equus caball	38.1	38.1	18%	2.0	28%
YP_002940513.1	ABC transporter related [Kosmotoqa olearia TBF 19.5.1] >qb ACR7	37.7	37.7	23%	2.6	29%
XP_002719195.1	PREDICTED: keratin associated protein 4-7-like [Oryctolagus cunicu	37.4	74.3	15%	3.4	36%
YP_003307759.1	outer membrane autotransporter barrel domain protein [Sebaldella	37.0	37.0	34%	4.5	28%
YP_743915.1	short chain dehydrogenase [Granulibacter thesedensis CGDNIH1]	37.0	37.0	20%	4.5	27%
XP_001497223.2	PREDICTED: similar to keratin associated protein 9.3 isoform 1 [Equ	36.6	36.6	17%	5.9	27%
NP_001092782.1	keratin associated protein 4 family member [Mus musculus] >emb	36.6	36.6	15%	5.9	32%
AAI04359.1	OTTMUSG00000002180 protein [Mus musculus] >qb AAI04360.1 O	36.6	36.6	15%	5.9	32%
NP_001094084.1	hypothetical protein LOC670496 [Mus musculus] >emb CAM17659.:	36.6	36.6	15%	5.9	31%
NP_001078995.1	keratin associated protein 1-3 [Mus musculus] >emb CAM19188.1]	36.6	36.6	18%	5.9	29%
NP_613924.1	hypothetical protein MK0639 [Methanopyrus kandleri AV19] >qb AA	36.6	36.6	18%	5.9	29%
XP_001056463.2	PREDICTED: hypothetical protein [Rattus norvegicus]	36.2	36.2	21%	7.7	29%
ZP_05441351.1	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase [Fusobacterium sp. D11]	36.2	36.2	40%	7.7	26%
XP_001555914.1	hypothetical protein BC1G_05589 [Botryotinia fuckeliana B05.10] >	36.2	36.2	54%	7.7	23%
XP_726654.1	hypothetical protein [Plasmodium yoelii yoelii str. 17XNL] >qb EAA1	36.2	36.2	32%	7.7	25%
ZP_06750151.1	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase [Fusobacterium sp. 3 1	35.8	35.8	44%	10.0	22%
ZP_04574354.1	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase [Fusobacterium sp. 7 1] >	35.8	35.8	40%	10.0	25%
XP_002613363.1	hypothetical protein BRAFLDRAFT_68348 [Branchiostoma floridae] >	35.8	35.8	28%	10.0	25%
NP_001119794.1	hypothetical protein LOC100040276 [Mus musculus] >ref XP_00147	35.8	35.8	18%	10.0	30%
XP_420625.2	PREDICTED: similar to fragile site-associated protein [Gallus gallus]	35.8	35.8	32%	10.0	27%

Figura 42 - Resultado da busca por similaridade para o subclone Ra33 G para as seqüências geradas utilizando os primer reverse, através da ferramenta BLASTn. A- Cor da seqüência de acordo com a nota dada para o alinhamento; B- Seqüências que produziram alinhamentos significantes.

6.8 Disposição dos fragmentos no vetor pCF430

Para montar a sequência completa do Ra33 é necessário saber a disposição do fragmento Ra33 P e Ra33 G no vetor de expressão *pCF430*, que é o seu vetor de origem. Para isto, sequenciamos as pontas do clone Ra33 com os primers PCF forward e PCF reverse (Tabela 4) e comparamos com as sequências já obtidas nas subclonagens.

Comparando as sequências obtidas no sequenciamento das pontas do *pCF430* Ra33 com as sequências já obtidas dos subclones, foi possível mostrar que o Ra33G está posicionado a frente do Ra33 P e após o promotor do *pCF430* (Figura 43). Observou-se também que o subclone Ra33 P está clonado de forma reversa no pUC 19, o que não interfere na montagem da sequência completa.

Ao todo foram sequenciados aproximadamente 2kb para o subclone Ra33 G iremos continuar o sequenciamento, o fragmento menor (1,7kb) já foi totalmente sequenciado, então será continuado o sequenciando do subclone Ra33 G para concluir a descrição deste fragmento (Figura 43) e posteriormente começar a caracterização deste gene com atividade amilolítica.

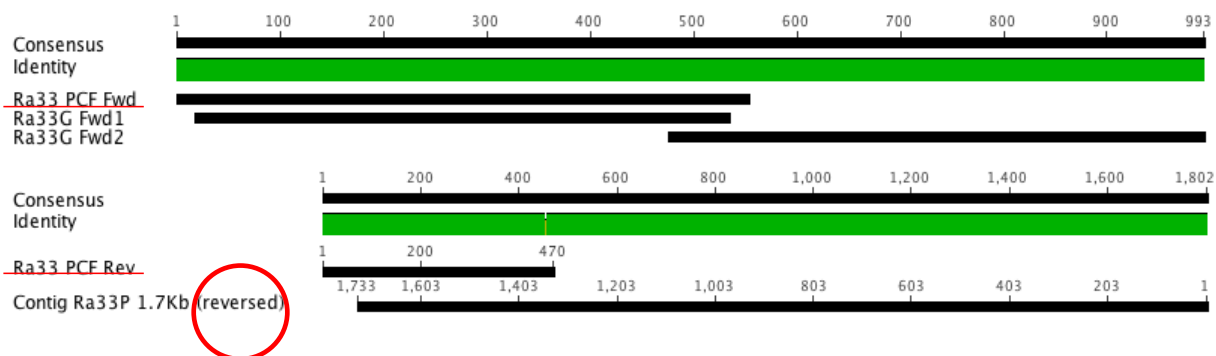


Figura 43 – Esquema mostrando o alinhamento das sequências das pontas do *pCF430* Ra33 com as sequências já obtidas dos subclones. Resultado obtido do programa Geneious utilizando a ferramenta "Assembly". Consensus é a sequência gerada pela junção dos fragmentos sequenciados; "Identity" é a qualidade de semelhança entre as sequências. A- Ra33 PCF Forward alinhado com as sequências do Ra33 G Forward; B- Ra33 PCF 430 Reverse alinhado com a sequência completa do Ra33 P.

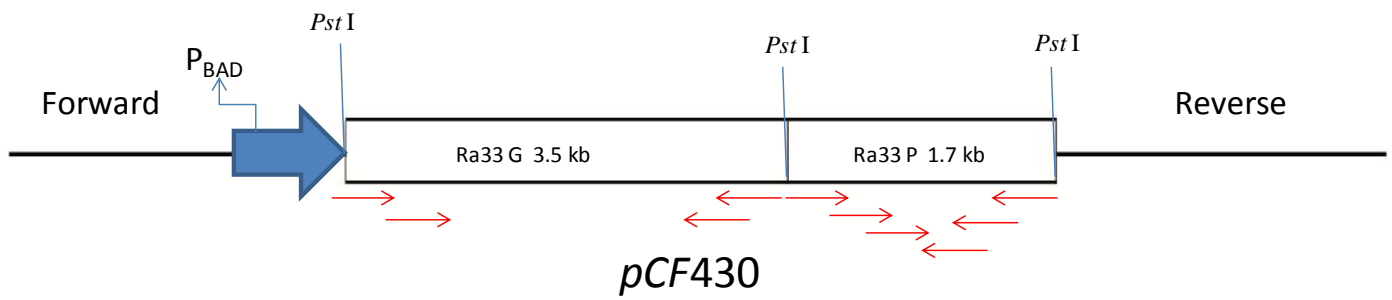


Figura 44 - Esquematização do processo de sequenciamento do clone Ra33. O esquema está sendo ilustrado no vetor de origem *pCF430*. As setas vermelhas representam as rodadas de sequenciamento e a seta azul o promotor do vetor P_{BAD} .

7. Discussão

A aplicação de técnicas moleculares revolucionou o campo da microbiologia (Pace, 1997), por melhorar a capacidade de analisar e investigar comunidades microbianas naturais. Apesar de quase 20 anos de pesquisa nesta área, ainda não há consenso sobre o método mais eficaz de extração de ácidos nucleicos a partir de amostras ambientais (Forney *et al.*, 2004). Nenhum dos métodos disponíveis são perfeitos, todos são métodos empiricamente desenvolvidos que são aceitáveis porque eles atuam satisfatoriamente nas amostras de interesse. No entanto, é possível determinar os melhores métodos disponíveis para cada amostra, considerando que o ácido nucleico é necessário, que tipos de ácidos nucleicos precisam ser extraídos, a qualidade exigida e o número de amostras a ser processado (Purdy, 2005).

Cada tipo de amostra traz seus próprios problemas, que em certa medida explica a variedade de métodos que podem ser encontrados na literatura. A maioria das amostras são problemáticas para trabalhar como as que contêm altas concentrações de produtos de degradação orgânica, como ácidos fúlvicos e húmicos, que são facilmente co-extraídos (Tebbe *et al.*, 1993). Sendo assim, o tipo de amostra, a biomassa dentro da amostra e todos os potenciais contaminantes devem ser considerados quando iniciar uma extração (Purdy, 2005). Levando em consideração todas essas problemáticas a metodologia gerada para esta biblioteca, de acordo com os resultados obtidos, foi eficiente para a confecção de uma biblioteca metagenômica de pequenos insertos para amostras ruminais.

O processo de construção de bibliotecas metagenômicas envolve as seguintes etapas: 1) fragmentação do DNA extraído 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 (Daniel, 2004). Bibliotecas podem ser classificadas em dois grupos de acordo com o tamanho médio de seus insertos. Bibliotecas contendo grandes insertos de DNA (acima de 20 Kpb) são construídas em vetores como cosmídeo, fosmídeo, cromossomo bacteriano artificial (BAC) e cromossomo de levedura artificial. Bibliotecas com pequenos insertos podem ser construídas em plasmídeos (menos que 10 Kb) (Handelsman, 2004). As estratégias para construção da biblioteca variam de acordo com o alvo de estudo, 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 (Handelsman, 2004).

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, 2004) e *Rhizobium* (Li, 2006) também são usados. Diferentes hospedeiros apresentam diferentes capacidades e sistemas para expressar genes heterólogos. Gabor *et al.* (Gabor *et al.*, 2004) estimam 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. Duas abordagens gerais, análise funcional e análise baseada na sequência, tem emergido para extrair informação biológica de bibliotecas metagenômicas (Schloss *et al.*, 2004).

Para a biblioteca de rúmen de caprinos utilizamos como hospedeiro *E. coli* e como plasmídeo o vetor *pCF430* e obtivemos 50.000 clones. A análise dos fragmentos liberados tornou possível calcular o tamanho médio dos insertos como sendo de 5 kb. Antes da utilização dessa biblioteca para fins de bioprospecção de enzimas com finalidade biotecnológicos, utilizamos dois tipos de técnicas para a comprovação da eficiência da biblioteca. Para a validação da riqueza da comunidade bacteriana pertencente à biblioteca pôde ser confirmado os filos comumente encontrados em rúmen: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, além da presença de bactérias não classificadas (Figura 28). Este resultado corrobora os resultados apresentados no Capítulo 1 (Figura 29). Pode-se verificar a semelhança entre os resultados e até o aparecimento de um filo nas duas bibliotecas 16S rDNA que não aparece biblioteca 16S rDNA da validação. Nesta amostra a classe predominante foi *Bacteroidia*, porém para o resultado da fração sólido-aderida da biblioteca 16S rDNA os *Bacteroidia* foram segunda segunda classes mais representante. Esta diversidade de filos bacterianos demonstra que os clones da biblioteca metagenômica capturaram a diversidade presente na microbiota bacteriana ruminal.

Com o objetivo de comprovar o potencial biotecnológico desta biblioteca metagenômica de rúmen de caprinos, foi realizada uma bioprospecção para atividade amilolítica. Obteve-se ao total 2.670 colônias e destes, 41 clones apresentaram atividade amilolítica (Figura 30), porém somente 11 tinham diferença em relação ao padrão de restrição. Um clone de cerca de 5kb foi escolhido para ser subclonado e sequenciado

por *primer walking*, o Ra33 (Figura 33). Até agora, 74% do clone Ra33 foi sequenciado (Figura 44). Com os resultados obtidos da validação e do potencial metabólico pôde-se concluir que a biblioteca gerada possui a riqueza de filo esperado para uma amostra ruminal demonstrando que a metodologia de extração utilizada foi satisfatória.

No que se refere à biopospecção, as espécies de herbívoros selvagens demonstram uma habilidade superior para processar alimentos que tem baixos teores de proteínas e toxinas e rico em fibras, quando comparados com os seus parentes domesticados (Nelson *et al.*, 2003). Sendo o rúmen considerado um potente sistema de fermentação de fibras, esse foi identificado como fonte valiosa de enzimas fibrolíticas (hemicelulases, xilanases, celulases, endoglucanases e acetil-xilana esterases, amilase, etc.) que podem ser utilizadas na fabricação de alimentos para animais (sacarificação da biomassa vegetal, fornecendo nutrientes críticos para os animais com baixa qualidade nutricional), indústria têxtil e transformação de celulose em papel. O progresso na exploração do ecossistema rúmen é lento, principalmente pela impossibilidade de se abranger todo o ecossistema ruminal utilizando técnicas tradicionais de cultura microbiológicas (Palackal *et al.*, 2007).

Nessa abordagem, a biotecnologia moderna tem uma constante procura de novos biocatalizadores, que levou ao desenvolvimento de novas abordagens experimentais para encontrar e identificar novos genes que codificam biocatalíticos. Só recentemente foram iniciados estudos para investigar o metagenoma (Rondon *et al.*, 2000), como uma fonte rica para o isolamento de muitos novos genes (Voget *et al.*, 2003). O amido é um composto de açúcares no estado polimerizadas que contém relativamente pouca água. Este composto pode ser hidrolisado em açúcares solúveis. O amido serve para armazenar carboidratos para uso na alimentação, a formação e a digestão ocorrem facilmente e rapidamente em conformidade com as necessidades nutricionais (Hungate, 1985). O amido é o principal polissacarídeo de reserva dos vegetais, sendo um polímero formado por monômeros de glicose. Está presente em diferentes partes da planta: no caule, na raiz ou nos frutos. Seu local de origem na planta reflete as necessidades de armazenamento deste açúcar, ou então, faz parte da estratégia de dispersão de sementes do vegetal por uso do fruto (Qian *et al.*, 2005). Sua constituição molecular, seu grau de polimerização e sua solubilidade variam de acordo com os locais da planta onde há o

seu armazenamento, assim como variam entre diferentes estirpes de uma mesma cultura e entre diferentes culturas (Oates, 1997).

Diante do exposto, as amilases têm sido relacionadas entre as mais importantes enzimas industriais em muitos campos, principalmente na indústria alimentar, como na panificação, na indústria de cerveja, no processo de fabricação dos cereais para alimentação infantil, tais como farinha láctea (à base de trigo), mingau de milho, arroz e misturas de cereais (Spier, 2005; Queji, 2006). A aplicação de amilases industriais em reações depende das suas características únicas, tais como sua ação padrão, especificidade com o substrato, temperatura ótima e pH. Encontrar novas amilases é importante tanto no que diz respeito à economia quanto para a ciência (Yun *et al.*, 2004).

Conforme conceituadas por Reed (1975), as enzimas responsáveis pela degradação de amido estão amplamente distribuídas na natureza. Entre elas estão as amilases, que atuam sobre o amido, glicogênio e polissacarídeos para hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4. As amilases podem ser divididas em três grupos: as α -amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases); as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases); e as glucoamilases (amiloglicosidasas), as quais liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato.

Outro conceito dado por Gupta *et al* (2003) mostra que as amilases são divididas em duas categorias, endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam as hidrólises de forma aleatória no interior da molécula de amido. Esta ação causa a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos. As exoamilases hidrolisam a partir das extremidades não-redutoras da cadeia resultando em produtos finais pequenos.

As enzimas amilolíticas são o foco de uma série de estudos metagenômicos. Pelo menos cinco artigos publicados relatam a detecção e caracterização de novas enzimas amilolítica através de bibliotecas metagenômicas de solo e rúmen (Richardson, 2002; Voget *et al.*, 2003; Yun *et al.*, 2004; Ferre *et al.*, 2005). Destes, 14 clones amilolítica foram encontrados e apenas 4 foram purificadas e caracterizadas (Richardson, 2002; Yun *et al.*, 2004). Para esta abordagem é necessário a criação de bibliotecas metagenômicas grandes para obter de 1 a 5 clones positivos por *screening* enzimático

(Ferre *et al.*, 2005), por exemplo, foram analisados 5 Gb para obter cinco enzimas degradantes 4-hidroxibutirato (Henne *et al.*, 1999); cerca de 6 Gb foram rastreados obter quatro enzimas lipolítica (Henne *et al.*, 2000), e 150 Mb foram triados para obter uma amilase (Yun *et al.*, 2004).

Bactérias amilolíticas são as responsáveis pela degradação do amido (que se dá pela enzima amilase), que é fermentado por espécies do gênero *Bacteroides*, dentre estas, *Bacteroides amylophilus* utiliza amido, mas é incapaz de utilizar glicose ou outros monossacarídeos. Já *Streptococcus bovis* e *Selenomonas ruminantium* fermentam amido e açúcares solúveis produzindo acetato (Russell *et al.*, 1986).

Pelo menos 100 genes diferentes, a maioria codifica enzimas envolvidas na degradação de fibras, foram clonados a partir de microrganismos ruminais. A maioria destes foram isolados de um pequeno grupo de espécies de bactérias, incluindo *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Actinomyces* (Cheng *et al.*, 1999).

De uma biblioteca metagenômica de rúmen bovino pode ser demonstrado que uma gliocosil hidrolase multifuncional tem potencial industrial para aplicações em processamento de vegetais, incluindo alimentos para animais como reforço alimentar, para indústria têxtil, de celulose e processamento de papel (Palackal *et al.*, 2007). As bactérias do rúmen com relevância para a fibra degradação, para as sequências do genoma que estão disponíveis, são *Succinogenes Fibrobacter*, *Ruminococcus albus* e *Prevotella ruminicola*, *F. succinogenes*, têm sido destacadas como potentes bactérias ruminais para a biodegradação de lignocelulose em reatores anaeróbios de biogás (Lissens *et al.*, 2004). A análise desta biblioteca metagenoma revelou dados significativos no rúmen, conseguindo dados de pelo menos 24 genes que codificam endoglucanases e celodextrinases. Estes foram identificadas por comparação com seis genes identificados por DNA recombinante através de estratégias convencionais (Liles *et al.*, 2003).

Do mesmo modo, em Ferrer *et al.* (2007), uma biblioteca de expressão metagenômica do DNA extraído do conteúdo do rúmen de bovinos foi criada usando fago como vetor, e foi utilizada para explorar a atividade funcional de microrganismos do rúmen. A análise da sequência de enzimas recuperadas revelou que 36% das sequências foram inteiramente novas e formaram linhagens filogenéticas ramificadas

sem parentes próximos, entre as glicosil hidrolases. Os estudos têm demonstrado a utilidade da abordagem metagenômica para identificar novas enzimas hidrolíticas dos ruminantes, enfatizando as aplicações potenciais das enzimas microbianas de rúmen em biocatálise industrial (Ferre *et al.*, 2005; Ferrer *et al.*, 2007). As comunidades microbianas gastrintestinais de ruminantes, e outras espécies de herbívoros em que os sistemas de absorção dos nutrientes é posterior à fermentação, são especialmente eficazes para a conversão de biomassa de plantas em nutrientes para o hospedeiro. Os estudos iniciais sobre o ecossistema microbiano associado ao trato gastrointestinal têm-se centrado na cultura baseada em técnicas de identificação e caracterização das comunidades microbianas habitantes. É evidente, porém que a extensão total da biodiversidade microbiana do trato gastrointestinal de herbívoro não é conhecida, mesmo para as populações microbianas mais intensamente estudadas que estão presentes no rúmen de gados leiteiros (*Bos taurus*) (Liles *et al.*, 2003).

Em Duan *et al.* (2009) uma biblioteca ruminal metagenômica de grandes insertos foi construída e funcionalmente selecionada para as atividades de celulase e 61 clones independentes, expressando as atividades da celulase, foram isoladas. A subclonagem e sequenciamento de 13 positivos clones expressam endoglucanase e 14 genes para celulase em búfalos alimentados com cana de açúcar.

Recentemente, Beloqui *et al.* (2006) mostrou que uma biblioteca metagenômica da comunidade microbiana ruminal de bovinos é uma fonte rica de enzimas, pois caracterizaram uma nova lacase que não exibiu qualquer similaridade com sequências de lacases conhecidas e nem com motivos conservados para lacases funcionais. O mais interessante, que uma proporção significativa de hidrolases recuperado das bibliotecas de rúmen tem sequências com homologia muito baixa às proteínas conhecidas com a mesma função (Ferre *et al.*, 2005) ou até mesmo melhor atividade em comparação com homólogos conhecidos

Brulc *et al.* (2009) utilizando pirosequenciamento, biblioteca 16S rDNA pode concluir que na comunidade bacteriana rúmen de bovinos a colonização inicial de bactérias nas fibras parece ser por organismos que têm enzimas que atacam as cadeias laterais e não as cadeias principais mais recalcitrantes, especialmente da celulose. Assim, propôs que, enquanto as provas anteriores sugeriram que os organismos com conjuntos de genes mais importantes e eficientes para a hidrólise de paredes celulares

das plantas foram associados com a porção de fibras na digesta ruminal (Forsberg *et al.*, 1997). O que parece ocorrer é um processo dinâmico, com a colonização inicial por um subconjunto de organismos, que é provavelmente mais tarde substituído por outro subconjunto de organismos que degradam as principais cadeias de celulose e xilana. Além disso, quando comparado com o intestino grosso da microbiota de cupins, existem diferenças fundamentais nos conteúdos gastrointestinais que aparecem na dieta a ser dirigido tanto para o rúmen de bovinos (forrageiras e leguminosas) ou do intestino grosso de cupins (madeira) (Dethlefsen *et al.*, 2007; Ley, 2008).

No que se diz respeito à utilização de enzimas, o programa de biocombustíveis nos Estados Unidos da América vem-se desenvolvendo com intensidade desde a primeira crise do petróleo. A ênfase desses programas foi colocada na fabricação do álcool etílico produzido a partir do milho, orientado para as misturas com a gasolina. A bioconversão de amido em etanol é um processo com dois passos. O primeiro é a sacarificação, onde o amido é convertido em açúcar utilizando um microrganismo amilolítico ou que produza enzimas, como a glicoamilase e amilase. O segundo é a fermentação, onde o açúcar é convertido em etanol utilizando *Saccharomyces cerevisiae* (Inlow, 1988; Nakamura, 1997). O uso de leveduras para a fermentação amilolítica direta do amido é uma alternativa ao processo convencional multicelular que oferece fraca viabilidade econômica. Embora existam mais de 150 espécies de leveduras amilolíticas, a sua utilização industrial é limitada devido à sua baixa tolerância a etanol (Ma, 2000). Portanto, a maior parte das pesquisas está objetivando o desenvolvimento de engenharia genética amilolítica para linhagens de *S. cerevisiae*, e nestas estirpes, inserir genes de vários organismos que codificam amilase e glicoamilase (Öner, 2005).

O Brasil tem uma longa história de produção de etanol no mercado interno a partir de cana-de-açúcar. Em 2005, 4 bilhões de galões de etanol foram produzidos no Brasil, que representaram 40% do transporte de combustível vendido. Apesar do sucesso do programa brasileiro de etanol em larga escala, com o grande contraste social e regional, outras matérias-primas como o amido de mandioca pode ser uma opção interessante para a produção regional de etanol no futuro (Nichols, 2008).

8. Conclusão

Com o uso de técnicas moleculares foi possível a construção de uma biblioteca metagenômica em vetor de expressão, a partir de uma amostra ambiental de rúmen caprino. A biblioteca é composta de aproximadamente 50.000 clones. A exploração desta biblioteca através de trabalhos de bioprospecção proporcionará a oportunidade de ligação entre a comunidade microbiana em seu ambiente natural com o seu potencial genético e de atividades *in situ*. Através da validação da biblioteca feita por meio de amplificação do gene 16S rDNA e da triagem de enzimas amilolíticas, nos mostrou o grande potencial que a biblioteca gerada pode propiciar. Assim a biblioteca de pequenos insertos gerada utilizando a fração sólido-aderida de rúmen será submetida a ensaios de triagem para avaliação de atividades diversas, incluindo: diversas enzimas hidrolíticas e genes de resistência.

9. Perspectivas Futuras

- Como o protocolo para a construção de bibliotecas metagenômicas a partir de amostras de rúmen foi realizado com sucesso nesse trabalho, foi escrito, submetido, aceito e futuramente publicado um comunicado técnico na revista interna da EMBRAPA-Agroenergia.
- Aplicar estratégias para induzir e selecionar clones de interesse para produção de amilase, lípase, celulase, protease e compostos com atividade antimicrobianos
- Como somente aproximadamente 2000 pb foram sequenciados para o subclone Ra33 G iremos continuar o sequenciamento para concluir a descrição desse fragmento e posterior caracterização desse gene com atividade amilolítica.
- Durante o sequenciamento do clone iremos fazer uma caracterização enzimática do gene responsável pela atividade amilolítica.
- Clonagem do gene responsável pela atividade amilolítica para uma caracterização.
- Modelagem da proteína.
- Purificação da enzima para estudos mais direcionados a sua atividade.
- Para concluir esse trabalho está sendo redigido um artigo científico.

10.Referências

Altschul, S. F., W. Gish, *et al.* Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, v.215, n.3, Oct 5, p.403-10. 1990.

Amann, R. I., W. Ludwig, *et al.* Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiology Reviews, v.59, p.143-169. 1995.

Amann, R. I., W. Ludwig, *et al.* Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev, v.59, n.1, Mar, p.143-69. 1995.

Andrade-Lima, D. The caatingas dominium. Revista Brasileira de Botânica, v.4, p.149-153. 1981.

Andrade, L. A., I. M. Pereira, *et al.* Análise da cobertura de duas fitofisionomias de caatinga, com diferentes históricos de uso, no município de São João do Cariri, Estado da Paraíba. Cernea, v.11, n.3, p.253-262. 2005.

Andrade, L. A., Pereira, I.M., Leite, U.T., Barbosa, M.R.V. Análise da cobertura de duas fitofisionomias de caatinga, com diferentes históricos de uso, no município de São João do Cariri, estado da Paraíba. Cernea, v.11, n.3, p.253-262. 2005.

Arcuri, P., F. C. Lopes, *et al.* Microbiologia do rúmen. In: T. T. P. Berchielli, A.V.; Oliveira, S.G. (Ed.). Nutrição de ruminantes. Jaboticabal: Ed. Funep, 2006. Microbiologia do rúmen., p.111-151

Ashelford, K. E., N. A. Chuzhanova, *et al.* At least one in twenty 16S rRNA sequence records currently held in public repositories estimated to contain substantial anomalies. Applied and Environmental Microbiology v.12, p.7724-7736. 2005.

Atlas, R. M. e R. Bartha. Microbial ecology: Fundamentals and applications. 1998. 694 p.

Barbosa, J. D., S. C. D. Ávila, *et al.* Estudo comparativo de algumas provas funcionais do fluido ruminal e de metabólitos sanguíneos de bovinos e bubalinos. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.23, n.1, p.33-37. 2003.

Beloqui, A., M. Pita, *et al.* Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationship. Journal of Biological Chemistry v.281, p.22933–42. 2006.

Beloqui, A., M. Pita, *et al.* Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationship. Journal of Biological Chemistry, v.281, p.22933–42. 2006.

Bond, P. L., P. Hugenholtz, *et al.* Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. Applied and Environmental Microbiology, v.61, p.1910-1916. 1995.

Borneman, J. e E. W. Triplett. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. Appl Environ Microbiol, v.63, n.7, Jul, p.2647-53. 1997.

Brennan, Y., W. N. Callen, *et al.* Unusual microbial xylanases from insect guts. . Applied and Environmental Microbiology, v.70, p.3609-3617. 2004.

Brulc, J. M., D. A. Antonopoulos, *et al.* Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. PNAS, v.106, p.1948–1953 2009.

Brulc, J. M., Antonopoulos, D.A., Millera, M.E.B., Wilson, M.K., Yannarell, A.C., Dinsdale, E.A., Edwards, R.E., Frank, E.D., Emerson, J.B., Wacklin, P., *Et Al.* Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. PNAS, v.106, p.1948–1953 2009.

Cheng, K. J. e T. A. Mcallister. Comportamentation in the rumen. In the rumen microbial ecosystem. Blackie Academic and Professional, v.2, p.492-522. 1997.

Cheng, K. J., S. S. S. S. Lee, *et al.* Industrial applications of rumen microbes. Journal of Animal Science, v.12, p.84-92. 1999.

Cheng, Y. F., S. Y. Mao, *et al.* Molecular diversity analysis of rumen methanogenic Archaea from goat in eastern China by DGGE methods using different primer pairs. Letters Applied Microbiology, v.48, p.585-592. 2009.

Chou, H. H. e M. H. Holmes. DNA sequence quality trimming and vetor removal. Bioinformatics, v.17, p.1093-1104. 2001.

Coelho, R. M. Efeitos da concentração de matéria seca e do uso de inoculante bacteriano-enzimático na silagem de Tifton 85 (*Cynodon spp.*), sobre a digestão de nutrientes, parâmetros ruminais e comportamento ingestivo em novilho de corte em crescimento. Agronomia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiros". Piracicaba, 2002. 122 p.

Cole, J. R., Q. Wang, *et al.* The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. Nucleic Acids Research, v.37, p.141-145. 2008.

Cole, J. R., Q. Wang, *et al.* The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. Nucleic Acids Research, v.37, n.Database issue, Jan, p.D141-5. 2009.

Costa, L. E. O. resistência a antibióticos em bactérias comensais de bovinos de leite. Programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006. 66 p.

Costa, R. G., J. L. F. Ramos, *et al.* Características morfológicas e volumétricas do estômago de caprinos submetidos a diferentes períodos de aleitamento. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science v.40, p.118-125. 2003.

Courtois, S., C. M. Cappellano, *et al.* Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. Applied Environmental Microbiology, v.69, n.1, Jan, p.49-55. 2003.

Cunningham, J. G. Tratado de fisiologia veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara. 2004

Czerkawski, J. W. e K. J. Cheng. Compartmentation in the rumen. In: P. N. Hobson (Ed.). The Rumen Microbial Ecosystem New York: Elsevier Science Publishing, 1988. Compartmentation in the rumen., p.361-385

Daims, H., J. L. Nielsen, *et al.* In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. Applied Environmental Microbiology, v.67, n.11, Nov, p.5273-84. 2001.

Daniel, H., T. Buckley, *et al.* Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. Environ. Microbiol., v.6, p.441-452. 2003.

Daniel, R. The soil metagenome:-a rich resource for the discovery of novel natural products. Current Opinion Biotechnology, v.15, n.3, Jun, p.199-204. 2004.

Delong, E. F. Microbial Diversity in Time and Space. In: R. R. Colwell, U. Simidu, *et al* (Ed.): Plenum Press, 1996. Microbial Diversity in Time and Space, p.125-134

Desantis, G., Z. Zhu, *et al*. An enzyme library approach to biocatalysis: development of nitrilases for enantioselective production of carboxylic acid derivatives. J Am Chem Soc, v.124, n.31, Aug 7, p.9024-5. 2002.

Desantis, T. Z., P. Hugenholtz, *et al*. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. Applied and Environmental Microbiology, v.72, n.7, Jul, p.5069-72. 2006.

Dethlefsen, L., M. Mcfall-Ngai, *et al*. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. Nature, v.449, p.811–818. 2007.

Drummond, A. J., B. Ashton, *et al*. Geneious v4.8, Available from <http://www.geneious.com/> 2009.

Duan, C. J., L. Xian, *et al*. Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens. Applied Microbiology Biotechnology, v.107, p.245-256. 2009.

Edwads, J. E., N. R. Mcewan, *et al*. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. Antonie van Leeuwenhoek, v.86, p.263-281. 2004.

Edwards, J. E., N. R. Mcewan, *et al*. 16S rDNA libray-based analysis of ruminal bacterial diversity. Antonie van Leeuwenhoek, v.86, p.263-281. 2004.

Farrelly, V., F. A. Rainey, *et al*. Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. Appl Environ Microbiol, v.61, n.7, Jul, p.2798-801. 1995.

Fernandes, A. Fitogeografia brasileira. Fortaleza: Multigraf, v.2. 2000. 341 p.

Ferre, M., O. V. Golyshina, *et al.* Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. Environmental Microbiology, v.7, n.12, p.1996-2010. 2005.

Ferrer, M., A. Beloqui, *et al.* Biochemical structure features of a novel cyclodextrinase from cow rumen metagenome. Biotechnology, v.2, p.207-213. 2007.

Flint, H. The rumen microbial ecosystem some recent developments. Trends in Microbiology, v.5, n.12, p.483-488. 1997.

Forney, L. J., X. Zhou, *et al.* Molecular microbial ecology: Land of the one-eyed king. Current Opinion in Microbiology, v.7, p.210-220. 2004.

Forsberg, C. W., K. Cheng, *et al.* Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In: R. I. A. W. Mackie, B.A. (Ed.). Gastrointestinal Microbiology. New York: Chapman and Hall, 1997. Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine., p.319-379

Gabor, E. M., E. J. De Vries, *et al.* Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. Environmental Microbiology, v.6, n.9, Sep, p.948-58. 2004.

Garcia-Martinez, J., S. G. Acinas, *et al.* Use of the 16S--23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. J Microbiol Methods, v.36, n.1-2, May, p.55-64. 1999.

Gevers, P., F. M. Cohan, *et al.* Reevaluating Prokaryotic Species. Nature Reviews Microbiology, v.3, p.1733-1739. 2005.

Grant, S., D. Y. Sorokin, *et al.* A phylogenetic analysis of Wadi el Natrun soda lake cellulase enrichment cultures and identification of cellulase genes from these cultures. Extremophiles, v.8, p.421-429. 2004.

Gupta, R., H. Mohapatra, *et al.* Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective. Process Biochemistry: <http://www.sciencedirect.com>. 1: 18 p. 2003.

Handelsman, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.68, n.4, Dec, p.669-85. 2004.

Handelsman, J., M. R. Rondon, *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chemistry & Biology, v.5, n.10, Oct, p.R245-9. 1998.

Hayashi, H., T. Abe, *et al.* Direct cloning of genes encoding novel xylanases from the human gut. Canadian Journal of Microbiology, v.51, n.3, p.251-259. 2005.

Head, I. M., J. R. Saunders, *et al.* Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. Microb Ecol, v.35, n.1, Jan, p.1-21. 1998.

Henne, A., R. Daniel, *et al.* Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. Applied Environmental Microbiology, v.65, n.9, Sep, p.3901-7. 1999.

Henne, A., R. A. Schmitz, *et al.* Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. Applied Environmental Microbiology, v.66, n.7, Jul, p.3113-6. 2000.

Hespell, R. B. Biotechnology and modifications of the rumen microbial ecosystem . Proceedings of the Nutrition Society, v.46, p.407-413. 1987.

Hobson, P. N. e C. S. Stewart. The Rumen Microbial Ecosystem. New York: Springer. 1997

Holt, J. G., P. Hirsch, *et al.* Sheathed bacteria. In: J. T. Staley, Bryant, M.P., Pfennig, N. And Holt, J.G. (Ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, v.3, 1989. Sheathed bacteria, p.1994-2009

Huber, T., G. Faulkner, *et al.* Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. Bioinformatics, v.20, n.14, Sep 22, p.2317-9. 2004.

Huber, T., G. Faulkner, *et al.* Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. Bioinformatics, v.20, p.2317-2319. 2004.

Hugenholtz, P., B. M. Goebel, *et al.* Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. J Bacteriol, v.180, n.18, Sep, p.4765-74. 1998.

Hugenholtz, P. e N. Pace. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. Trends Biotechnol, v.14, n.6, Jun, p.190-7. 1996.

Hugenholtz, P. e N. R. Pace. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. Trends in Biotechnology, v.14, n.6, Jun, p.190-7. 1996.

Hughes, J. B., J. J. Hellmann, *et al.* Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. Appl Environ Microbiol, v.67, n.10, Oct, p.4399-406. 2001.

Hungate, R. E. Anaerobic biotransformations of organic matter. In Bacteria in Nature. Plenum Press, v.1, p.39-95. 1985.

Ibge. Pesquisa Pecuária Municipal. 2009 2008.

Ibge, I. B. D. G. E. E. Manual técnico da vegetação brasileira. Rio de Janeiro. 1992. 92 p.

Inlow, D., Mcrae, J. And Ben-Bassat, A. Fermentation of corn starch to ethanol with genetically engineered yeast. Biotechnology Bioengineering, v.32, p.227-234. 1988.

Jaladiun, S., Y. W. Ho, *et al.* Rumen microorganisms of the water buffalo. Buffalo Journal, v.8, n.211-220. 1992.

Jardim, W. R. Criação de caprinos. São Paulo. 1986. 239 p.

Joshi, M. B., P. K. Rout, *et al.* Phylogeography and origin of Indian domestic goats. Mol Biol Evol, v.21, n.3, Mar, p.454-62. 2004.

Kamra, D. N. Rumen microbial ecosystem. Current Science, v.89, n.1, p.124-134. 2005.

Koike, S., S. Yoshitani, *et al.* Philogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. FEMS Microbiology Letters, v.229, p.23-30. 2003.

Krause, D. O. e J. B. Russell. How many rumen bacteria are there? Journal of Dairy Science, v.79, p.1467-1475. 1996.

Krieg, N. R. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, v.1. 1984

Kumar, S., S. K. Bhatia, *et al.* Microbial and biochemical changes in the rumen of cattle and buffalo fed oat hay-concentrate diet. . Indian journal of Animal Nutrition., v.19, n.1, p.78-80. 2002.

Lammel, D. R. Diversidade de rizóbios em florestas de *Araucária angustifolia* no estado de São Paulo. (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007. 117 p.

Lammle, K., H. Zipper, *et al.* Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. Journal of Biotechnology, v.127, n.4, p.575-592. 2007.

Lana, R. P. Nutrição e alimentação animal. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa., v.1. 2005. 343p p.

Lana, R. P. Nutrição e alimentação animal. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa., v.1. 2005. 343 p.

Lane, D. J., B. Pace, *et al.* Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A, v.82, n.20, Oct, p.6955-9. 1985.

Leal, I. R., M. Tabarelli, *et al.* Ecologia e conservação da Caatinga. Recife: Editora Universitária, Universidades Federa do Pernambuco. 2003

Leresche, J. E. e H. P. Meyer. Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. Organic Process Research Development, v.10, p.572-580. 2006.

Ley, R. E., Et Al. Evolution of mammals and their gut microbes. Science, v.320, p.1647–1651. 2008.

Li, D. C. Review of fungal chitinases. Mycopathologia, v.161, p.345-360. 2006.

Liesack, W. e E. Stackebrandt. Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. Journal of Bacteriology, v.174, n.15, Aug, p.5072-8. 1992.

Liles, M. R., B. F. Manske, *et al.* A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. Applied Environmental Microbiology, v.69, n.5, May, p.2684-91. 2003.

Lima, L. A. D. A. Ovinocaprinocultura na Agricultura Familiar. Informativo do Centro de Caprinos CNPC/EMBRAPA, v.11. 2000.

Lissens, G., W. Verstraete, *et al.* Advanced anaerobic bioconversion of lignocellulosic waste for bioregenerative life support following thermal water treatment and biodegradation by

Fibrobacter succinogenes. Biodegradation v.15, p.173-183. 2004.

Londoño, A. A. S., L. F. U. Velásquez, *et al.* Estudo da microfolra intestinal utilizando *Dichantium aritatum* e doi suplementos XXIV Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Juiz de Fora: 137 p. 1997.

Ma, Y. J., Lin, L.L.,Chien,H.R. And Hsu, W.H. . Efficient utilization of starch by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase and isoamylase. Biotechnology and Applied Biochemistry, v.31, p.55-59. 2000.

Machugh, D. E. e D. G. Bradley. Livestock genetic origins:goats buck the trend. Proceeding of the National Academy of Sciences USA, v.98, p.5382-5384. 2001.

Maidak, B. L., J. R. Cole, *et al.* A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). Nucleic Acids Research, v.27, n.1, Jan 1, p.171-3. 1999.

Makkar, R. S. e S. S. Cameotra. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Appl Microbiol Biotechnol, v.58, n.4, Mar, p.428-34. 2002.

Mannen, H., Y. Nagata, *et al.* Mitochondrial DNA reveal that domestic goat (*Capra hircus*) are genetically affected by two subspecies of bezoar (*Capra aegagurus*). Biochem Genet, v.39, n.5-6, Jun, p.145-54. 2001.

Martin, C., A. G. Williams, *et al.* Isolation and Characteristics of the Protozoal and Bacterial Fractions from Bovine Ruminal Contents. Journal of Animal Science, v.72, p.2962-2968. 1994.

Martinez, A. E. A. Genetically modified bacterial strains and novel bacterial artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple expression hosts. Applied Environmental Microbiology, v.70, p.2452-2463. 2004.

Mcallister, T. A., H. D. Bae, *et al.* Microbial attachment and feed digestion in the rumen. Journal of Animal Science, v.72, p.3004-3018. 1994.

Meadow, R. H. Animal domestication in the Middle East: a revised view from the eastern margin. In: O. A. Ibh (Ed.). Harappan Civilization. New Delhi: Possehl, G.L., 1993. Animal domestication in the Middle East: a revised view from the eastern margin., p.295–320

Minato, H., Endo, A., Ootomo, Y. And Uemura, T. Ecological treatise on the rumen fermentation. II. The amylolytic and cellulolytic activities of the fractionated bacterial portions attached to the rumen solids. Journal of General and Applied Microbiology, v.12, p.53-69. 1966.

Minato, H., Mitsumori, M. And Cheng, K.J. Attachment of microorganisms to solid substrate in the rumen. In: K. E. A. Shimada (Ed.). Genetics, Biochemistry and Ecology of Lignocellulose Degradation. Tokyo: Uni Publishers, 1993. Attachment of microorganisms to solid substrate in the rumen., p.139-145

Moir, R. J. Ruminal digestion and evolution. In: C. Ch. (Ed.). Handbook of Physiology, 1968. Ruminal digestion and evolution., p.2673-2694

Muyzer, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Current Opinion in Microbiology, v.2, p.317-322. 1999.

Nakamura, Y., Kobayashi, F., Ohnaga, M. And Sawada, T. Alcohol fermentation of starch by a genetic recombinant yeast having glucoamylase activity. Biotechnology and Bioengineering, v.53, p.21-25. 1997.

Nascimento, A. E. Influência da raça na seleção da dieta por caprinos e ovinos em caatinga nativa e releada no sertão central cearense., Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1988. 69 p.

Nelson, K., S. Zinder, *et al.* Phylogenetic analysis of the microbial populations in the wild herbivore gastrointestinal tract: insights into an unexplored niche. Environmental Microbiology, v.5, p.1212-1220. 2003.

Newman, J. R. E. F., C. Broad - host - range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator. Gene, v.227, p.197-203. 1999.

Nichols, N. N., Monceaux, D.A., Dien, B.S., Bothast, R.J. Production of ethanol from Corn and Sugarcane. Bioenergy, p.3-15. 2008.

Nusslein, K. e J. M. Tiedje. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in tropical soil. Applied and Environmental Microbiology, v.65, n.8, p.3622-3626. 1999.

O'donnell, A. G., M. Goodfellow, *et al.* Theoretical practical aspects of the quantification of biodiversity among microorganism. . Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci., v.345, p.65-73. 1994.

Oates, C. G. Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. Trends in Food Science & Technology, v.8, p.375-388. 1997.

Oliveira, J. S., A. M. Zanine, *et al.* Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. Revista electrónica de Veterinaria v.VIII, n.6. 2007.

Öner, E. T., Oliver, S.G., and Kırdar, B. Production of Ethanol from Starch by Respiration-Deficient Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. . Applied and Environmental Microbiology, v.71, n.10, p.6443-6445. 2005.

Orskov, E. Nutrición proteica de los ruminantes. Acribia: Zaragoza. 1988. 178 p p.

Otero, W. G. Avaliação da diversidade microbiana e degradabilidade *in situ* em animais tratados com preparado de anticorpos policlonais contra bactérias produtoras de lactato e bactérias proteolíticas. Departamento de Pós-graduação em Nutrição e Produção Animal Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008. 86 p.

Ouverney, C. C., Fuhrman, J.A. Marine planktonic Archaea take up amino acids. Applied and Environmental Microbiology, v.66, p.4829-4833. 2000.

Owens, F. N., D. S. Secrist, *et al.* Acidosis in cattle: A review. Journal of Animal Science, v.76, n.1, p.275-286. 1998.

Pace, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science, v.276, n.5313, May 2, p.734-40. 1997.

Palackal, N., C. S. Lyon, *et al.* A multifunctional hybrid glycosyl hydrolase discovered in an uncultured microbial consortium from ruminant gut. Appl Microbiol Biotechnol, v.74, p.113-124. 2007.

Pappas, G. J., Jr., K. Benabdellah, *et al.* Expressed sequence tags from the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. Mol Biochem Parasitol, v.142, n.2, Aug, p.149-57. 2005.

Patterson, J. A. e R. Hespell. Glutamine synthetase activity in the ruminal bacterium *Succinivibrio dextrinosolvens*. Applied and Environmental Microbiology, v.50, n.4, p.1014-1020. 1985.

Pfister, J. A. Nutrition and feeding behavior oh goats and sheep grazing deciduos shrub-woodland in Northeastern Brazil., Utah State University, Utah, 1983. 130 p.

Pimentel, J. C. M., J. A. Araújo Filho, *et al.* Composição Botânica da dieta de ovinos em área de caatinga releada no sertão do Ceará. Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia, v.21, n.02, p.211-223. 1992.

Purcarea, C., G. Herve, *et al.* Cloning, expression and structure analysis of carbamate kinase-like carbamoyl phosphate synthetase from *Pyrococcus abyssi*. Extremophiles, v.5, p.229-239. 2001.

Purdy, K. J. Nucleic acid recovery from complex environmental samples. Methods Enzymology, v.397, p.271-92. 2005.

Qian, M., E. H. Ajandouz, *et al.* Molecular Basis of the Effects of Chloride Ion on the Acid-Base Catalyst in the Mechanism of Pancreatic R-Amylase. Biochemistry, v.44, p.3194-3201. 2005.

Queji, M. F. D., Schemin, M.H.C., Trindade, J.L.F. Propriedades reológicas da massa de farinha de trigo adicionada de alfa-amilase. Exact and Earth Sciences, v.12, n.2, p.21-29. 2006.

Rappe, M., D. Gordon, *et al.* Phylogeny of actinobacteria small subunit (SSU) rRNA gene clones recovered from marine bacterioplankton. Applied Microbiology Biotechnology, v.22, p.106-112. 1999.

Rappe, M. S. e S. J. Giovannoni. The uncultured microbial majority. Annu Rev Microbiol, v.57, p.369-94. 2003.

Reed, G. Enzymes in Food Processing. Academic Press Inc., v.2., p.62-87. 1975.

Reysenbach, A. L., L. J. Giver, *et al.* Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. Applied Environmental Microbiology, v.58, n.10, Oct, p.3417-8. 1992.

Rheims, H., F. A. Rainey, *et al.* A molecular approach to search for diversity among bacteria in the environment. . Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology., v.17, p.159-169. 1996.

Ribeiro, M. N. C., F.F.R. Cruz, G.R.B. Recursos genéticos caprinos e ovinos e suas potencialidades. Simpósio Internacional de Conservação de Recursos Genéticos . Raças Nativas para o Semi-Árido. Recife-PE, 2004. 12-14 p.

Ribeiro, V. L. Comportamento Ingestivo de Caprinos Moxotó e Canindé, Submetidos à Alimentação à Vontade e Restrita Programa de Pós-graduação em zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006. 41 p.

Richardson, T. H. E. A. A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable alpha-amylase. Journal of Biological Chemistry, v.277, p.26501-26507. 2002.

Roh, C. E. V., F. Isolation of a low-temperature adapted lipolytic enzyme from uncultivated micro-organism. Journal of Applied Microbiology, v.115, p.116-123. 2008.

Rolf, D. The metagenomics of soil. Nature Reviews Microbiology, v.3, p.470-478. 2005.

Rondon, M. R., P. R. August, *et al.* Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. Applied Environmental Microbiology, v.66, n.6, Jun, p.2541-7. 2000.

Rondon, M. R., S. J. Raffel, *et al.* Toward functional genomics in bacteria: analysis of gene expression in *Escherichia coli* from a bacterial artificial chromosome library of *Bacillus cereus*. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.11, May 25, p.6451-5. 1999.

Rosseló-Mora, R. e R. Amann. The species concept for prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews, v.25, p.39-67. 2001.

Rothschild, L. J. e R. L. Mancinelli. Life in extreme environments. Nature, v.409, p.1092-1101. 2001.

Russel, J. B., J. D. Connor, *et al.* A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant Fermentation. Journal Animal Science, v.70, p.3553-3561. 1992.

Russell, J. B. e J. L. Rychlik. Factors that alter rumen microbial ecology. Science, v.292, p.1119-1122. 2001.

Russell, S. W., J. L. Pace, *et al.* Comparison of five short-term assays that measure nonspecific cytotoxicity mediated to tumor cells by activated macrophages. Journal of Leukocyte Biology, v.40, n.6, Dec, p.801-13. 1986.

Said, S. e R. C. L. R. Pietro. Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas. In: S. Said e R. C. L. R. Pietro (Ed.). Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão preto: Editora Legis Summa, 2004. Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas, p.3-7

Salyers, A. A., P. Valentine, *et al.* Genetics of polysaccharide utilization pathways of colonic Bacteroides species. New York: M. Sebald. 1993. 505–516 p.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, *et al.* Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989

Sambrook, J. e D. Russell. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001

Santos, F. C. B., B. B. Souza, *et al.* Adaptabilidade da caprinos exóticos e naturalizados ao clima semi-árido do nordeste brasileiro. Ciênc. agrotec., v.29, n.1, p.142-149. 2005.

Schloss, P. D. e J. Handelsman. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. Applied and Environmental Microbiology, v.71, n.3, Mar, p.1501-6. 2005.

Schloss, P. D., B. R. Larget, *et al.* Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. Applied Environmental Microbiology, v.70, n.9, Sep, p.5485-92. 2004.

Schloss, P. D., B. R. Larget, *et al.* Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. Applied and Environmental Microbiology, v.70, n.9, Sep, p.5485-92. 2004.

Schloss, P. D. E. H., J. Status of the microbial census. Microbiol Mol Biol Rev, v.68, n.4, Dec, p.686-91. 2004.

Selinger, L. B., C. Forsberg, *et al.* The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. Anaerobe, v.2, p.263-284. 1996.

Seow, K. T., G. Meurer, *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. . Journal of Bacteriology, v.179, n.23, p.7360-7368. 1997.

Shi, P. J., K. Meng, *et al.* The host species affects the microbial community in the goat rumen. Letters Applied Microbiology, v.46, p.132-135. 2008.

Simplício, A. A. Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos em regiões tropicais semi-áridas. I Simpósio Internacional de Conservação de Recursos Genéticos Raças Nativas para o Semi-Árido. Recife, 2004. 117-137 p.

Singh, B., S. K. Gautam, *et al.* Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: Potential biotechnological prospects. Anaerobe, v.14, p. 138–144. 2008.

Singh, B., Gautam, S.K., Verma, V., Kumar, M., Singh, B. Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: Potential biotechnological prospects. Anaerobe v.14, p. 138–144. 2008.

Singh, M. P., J. E. Janso, *et al.* Cytoskyrins and Cytosporones Produced by *Cytospora* sp. CR200: Taxonomy, Fermentation and Biological Activities. Mar Drugs, v.5, n.3, p.71-84. 2007.

Smith, C. J., R. B. Hespell, *et al.* Regulation of urease and ammonia assimilatory enzymes in *Selenomonas ruminantium*. Applied and Environmental Microbiology, v.42, n.1, p.89-96. 1981.

Smith, C. J., R. A. Welch, *et al.* Two independent conjugal transfer systems operating in *Bacteroides fragilis* V479-1. Journal of Bacteriology, v.151, n.1, p.281-287. 1982.

Sousa, D. X. e S. Lifschitz. Avaliação do E-value para Execução do BLAST sobre Bases de Dados Fragmentadas. (Monografia). Ciência da Computação, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO DE JANEIRO, Rio de Janeiro, RJ, 2007. 18 p.

Spier, M. R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido. (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná., Curitiba, 2005. 178 p.

Sprengel, C. Chemie für Landwirte. Göttingen: Vandenhout and Ruprecht, v.1. 1832

Stack, R. J. e R. E. Hungate. Effect of 3-Phenylpropanoic Acid on Capsule and Cellulases of *Ruminococcus albus* 8. Applied and Environmental Microbiology, v.48, p.218-223. 1984.

Stackebrandt, E. Microbial Diversity in Time and Space. In: R. R. Colwell, U. Simidu, *et al* (Ed.): Plenum Press, 1996. Microbial Diversity in Time and Space, p.19-24

Stahl, D. A., B. Flesher, *et al.* Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. Applied Environmental Microbiology, v.54, p.1079-1084. 1988.

Steele, H. L., K. E. Jaeger, *et al.* Advances in Recovery of Novel Biocatalysts from Metagenomes. Journal Molecular Microbiology and Biotechnology., v.16, p.25-37. 2009.

Streit, W. R., R. Daniel, *et al.* Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. Current Opinion in Biotechnology, v.15, n.4, Aug, p.285-90. 2004.

Suenaga, H., T. Ohnuki, *et al.* Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. . Environmental Microbiology, v.9, n.9, p.2289-2297. 2007.

Sunna, A. e P. L. Bergquist. A gene encoding a novel extremely thermostable 1,4-beta-xylanase isolated directly from an environmental DNA sample. . Extremophiles, v.7, n.1, p.63-70. 2003.

Tajima, K., R. I. Aminov, *et al.* Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. . Applied and Environmental Microbiology, v.67, p.2766-2774. 2001.

Tajima, K., R. I. Aminov, *et al.* Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. FEMS Microbiology Ecology, v.29, p.159-169. 1999.

Tajima, K., S. Arai, *et al.* Rumen bacterial community transition during adaption to high-grain diet. Anaerobe, v.6, p.273-284. 2000.

Tajima, K., T. Nagamine, *et al.* Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from rumen suggest the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. FEMS Microbiology Letters, v.200, p.67-72. 2001.

Tamura, K., J. Dudley, *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol, v.24, n.8, Aug, p.1596-9. 2007.

Tang, K., T. Utairungsee, *et al.* Characterization of a novel cyclomalto-dextrinase expressed from environmental DNA isolated from Bor Khleung hot spring in Thailand. FEMS Microbiology Letters, v.260, n.1, p.91-99. 2006.

Tebbe, C. C. e W. Vahjen. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. . Applied and Environmental Microbiology, v.59, p.2657-2665. 1993.

Terceti, M. S. Diversidade Bacteriana do Gene 16S rRNA em carvão pirogênico de terra preta antropogênica da Amazônia central e oriental. Centro Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009. 125 p.

Torsvik, V., F. L. Daae, *et al.* Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. Journal of Biotechnology, v.64, n.1, Sep 17, p.53-62. 1998.

Towne, G. e T. G. Nagajara. Omasal ciliated protozoa in cattle, bison and sheep. Applied Environment Microbiology, v.56, p.409-412. 1990.

Tsai, Y. L. e B. H. Olson. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol, v.58, n.2, Feb, p.754-7. 1992.

Tsai, Y. L. e B. H. Olson. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. Applied Environmental Microbiology, v.58, n.2, Feb, p.754-7. 1992.

Uchiyama, T., T. Abe, *et al.* Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. . Nature Biotechnology, v.23, n.1, p.88-93. 2005.

Voget, S., C. Leggewie, *et al.* Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. Applied Environmental Microbiology, v.69, n.10, Oct, p.6235-42. 2003.

Von Wintzingerode, F., Gobel, U. B., Stackebrandt, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiol Rev, v.21, n.3, Nov, p.213-29. 1997.

Wexler, H. M. Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. Clinical Microbiology rewies, v.20, n.4, p.593–621. 2007.

Whitford, F. M., R. J. Forster, *et al.* Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. Anaerobe, v.4, p.153-163. 1998.

Whitford, M. F., R. J. Forster, *et al.* Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. Anaerobe, v.4, n.3, Jun, p.153-63. 1998.

Wild, J., Z. Hradecna, *et al.* Conditionally amplifiable BACs: switching from single-copy to high-copy vectors and genomic clones. Genome Research, v.12, n.9, Sep, p.1434-44. 2002.

- Woese, C. R. Bacterial evolution. Microbiol Rev, v.51, n.2, Jun, p.221-71. 1987.
- Wolin, M. J., T. L. Miller, *et al.* Microbe-microbe interactions. In: P. N. E. S. Hobson, C.S. (Ed.). The Rumen Microbial Ecosystem. London: Blackie Academic and Professional Publisher, 1997. Microbe-microbe interactions, p.467-491
- Wood, J., K. P. Scott, *et al.* Estimation of the relative abundance of different Bacteroides and Prevotella ribotypes in gut samples by restriction enzyme profiling of PCR-amplified 16S rRNA gene sequences. Applied and Environmental Microbiology, v.64, p.3683-3689. 1998.
- Woodson, S. A. e N. B. Leontins. Structure and dynamics of ribosomal RNA. Current Opinion in Structural Biology, v.8, n.3, p.294-300. 1998.
- Wright, A. D., Williams, A.J., Winder, B., Christophersen, C.T., Rodgers, S.L. And Smith, K.D. Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia. Appl. Environ Microbiol, v.70, p.1263-1270. 2004.
- Wright, A. D. G., Williams, A.J., Winder, B., Christophersen, C.T., Rodgers, S.L. And Smith, K.D. Molecular Diversity of Rumen Methanogens from Sheep in Western Australia. Applied and Environmental Microbiology, v.70, p.1263–1270. 2004.
- Xu, M., X. Xiao, *et al.* Isolation and characterization of alkane hydroxylases from a metagenomic library of Pacific deep-sea sediment. . Extremophiles, v.12, n.2, p.255-262. 2008.
- Yokoyama, M. T. e K. A. Johnson. The ruminal animal: Digestive physiology and nutrition. In: C. D. Church (Ed.). New Jersey: Waveland Press, 1993. The ruminal animal: Digestive physiology and nutrition
- Yun, J., S. Kang, *et al.* Characterization of a Novel Amylolytic Enzyme Encoded by a Gene from a Soil-Derived Metagenomic Library. Applied and Environmental Microbiology, v.70, n.12, p.7229–7235. 2004.
- Zeder, M. A. e B. Hesse. The initial domestication of goats (*Capra hircus*) in the Zagros Mountain 10,000 years ago. Science, v.287, p.2254–2257. 2000.
- Zhou, J., M. A. Bruns, *et al.* DNA recovery from soils of diverse composition. Appl Environ Microbiol, v.62, n.2, Feb, p.316-22. 1996.

Zoetendal, E. G., A. D. Akkermans, *et al.* The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. Microbiology Ecology Health Disease, v.13, p.129–134. 2001.

t

APÊNDICE

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)