

Construção de uma Biblioteca Metagenômica de Expressão da Microbiota de Rúmen de Caprinos

Isabel de Souza da Cunha¹
Ricardo Henrique Kruger²
Betania Ferraz Quirino³

Resumo

A criação de bibliotecas metagenômicas oferece a oportunidade para a bioprospecção de genes de interesse biotecnológico de microrganismos não-cultiváveis. O rúmen de caprinos é um ambiente anaeróbico ou microaerófilo onde ocorre a degradação de material lignocelulósico pela ação de microrganismos. Assim, a microbiota do rúmen de caprinos foi identificada como potencial fonte de enzimas, genes e de novos produtos para aplicações no desenvolvimento industrial do setor sucroalcooleiro. Por meio da extração direta do DNA total dos microrganismos do rúmen de caprinos foi possível construir uma biblioteca metagenômica de expressão de pequenos insertos, na faixa de 3 a 8 kb, com aproximadamente 50.000 clones. Foi realizada a validação da biblioteca por meio de restrição enzimática de clones aleatórios e da clonagem e sequenciamento de clones do gene 16S rDNA para verificar a diversidade bacteriana representada na biblioteca. Esta biblioteca será utilizada para triagem de clones com diversas

atividades enzimáticas tais como celulases, xilanases e amilases.

Palavras-chave – Metagenoma, Rúmen, Atividades enzimáticas.

Introdução

A indústria de combustíveis hoje busca novas alternativas para a produção de energia e em especial para a produção do etanol. A base da produção do chamado etanol de primeira geração no Brasil é a cana-de-açúcar (NICHOLS et al., 2008). Um salto tecnológico é necessário para viabilizar economicamente o etanol de segunda geração que utiliza material lignocelulósico como matéria-prima. Um dos gargalos identificados para produção de etanol de segunda geração é a produção de enzimas degradadoras da parede celular que sejam eficientes e de baixo custo.

Tradicionalmente, a microbiologia obtém produtos de valor econômico como enzimas e

¹ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Genômica e Bioecnologia da Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, isabelbio_cb@yahoo.com.br.

² Ph. D. em Microbiologia, professor e pesquisador da Universidade de Brasília, Brasília, DF, kruger@unb.br.

³ Ph.D. em Biologia Celular e Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, betania.quirino@embrapa.br.

compostos antimicrobianos a partir do cultivo de microrganismos. Esta abordagem restritiva leva ao subaproveitamento da diversidade metabólica existente que inclui organismos que não se adaptam bem às condições comumente utilizadas para cultivo em laboratórios. Assim, técnicas moleculares onde não haja necessidade de cultivo prévio dos microrganismos para seu aproveitamento biotecnológico são bastante promissoras. O termo metagenoma foi cunhado para designar o DNA total de uma comunidade microbiana e pode ser extraído diretamente do ambiente, sem a necessidade de cultivar os microrganismos (HANDELSMAN et al., 1998). A criação de bibliotecas de expressão a partir de DNA metagenômico oferece a oportunidade para a bioprospecção de genes de interesse biotecnológico. O passo inicial neste processo é a otimização do protocolo de extração de DNA adequado ao ambiente de interesse, para obtenção de DNA em qualidade e quantidade suficientes para clonagem molecular. O DNA extraído é então fragmentado por digestão enzimática ou fragmentação mecânica e ligado ao vetor apropriado (p. ex. plasmídeos para fragmentos menores que 15 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). A biblioteca obtida pode então ser utilizada em vários bioensaios específicos para a identificação de clones que expressem a atividade enzimática desejada (p.ex., celulases, xilanase, amilase). Os genes responsáveis pela atividade enzimática são então sequenciados e ficam disponíveis para caracterização das propriedades cinéticas das enzimas por eles codificadas e expressão heteróloga.

O rúmen é um ambiente microaerófilo ou anaeróbico onde há degradação dos componentes da parede celular vegetal proveniente da dieta do animal (WHITFORD et al., 1998). São os microrganismos presentes no rúmen que produzem enzimas hidrolíticas como celulases, hemicelulases, xilanases, arabinofuranosidasas, endoglucanases, lacases e peroxidases capazes de decompor a parede celular. Assim, a microbiota dos ruminantes é uma fonte potencial de enzimas, genes e de novos produtos para aplicações no desenvolvimento industrial (SELINGER et al., 1996; SINGH et al., 2001). Microrganismos microaerófilos e anaeróbicos exigem técnicas microbiológicas especiais para sua

manutenção e propagação e por isto são menos estudados que os aeróbicos. Apesar do potencial da microbiota dos ruminantes, até o presente momento este ambiente tem sido pouco explorado para gerar produtos biotecnológicos, particularmente aqueles derivados de microrganismos não cultiváveis, os quais podem ser obtidos a partir da abordagem metagenômica.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi extrair DNA total dos microrganismos presentes no rúmen caprino e construir uma biblioteca metagenômica de expressão visando a obtenção de genes de interesse biotecnológico para produção de etanol lignocelulósico.

Material e Métodos

Animais e dieta

Para esse estudo foram escolhidas, aleatoriamente, três fêmeas da raça Moxotó pertencentes ao Projeto de Conservação das raças de caprinos nativas do Nordeste do Brasil, localizado na Embrapa- Caprinos e Ovinos (Sobral, CE). A coleta foi realizada durante a estação chuvosa no mês de Março de 2008 devido à grande disponibilidade de material vegetal e ausência de suplementação alimentar.

A porção sólida do rúmen foi coletada manualmente no período vespertino pós-prandial. Foi considerado material sólido o material resultante da filtração do material vegetal com gaze. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer -80°C até a sua utilização.

Recuperação 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 et al. (1994) e Handelsman et al. (1998). A amostra contendo a parte sólida do rúmen caprino (em volume aproximado de 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 a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e reservado no gelo. O pellet resultante foi ressuspenso em 50 mL de solução de NaCl 0,9% gelada, colocado no liquidificador em velocidade máxima por 1 minuto e centrifugadas a 1.000

x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo reservado no gelo e o pellet ressuscitado, liquidificado e centrifugado conforme descrito anteriormente por mais duas vezes. O conteúdo dos 8 tubos reservados no gelo foram centrifugados a 27.000 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foram adicionados 75 mL de Tampão Z (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM fosfato de sódio; 100 mM EDTA, pH 8,0; 1,5M NaCl; 1% (p/v) CTAB). Os tubos foram colocados em banho de gelo seco com isopropanol, por 1 h e logo após transferidos para banho a 65°C por mais 1 h. Este processo foi repetido por mais uma vez. Em cada tubo foram adicionados 9 mL de SDS 20% (p/v) e 4,5 mL de GITC 5M e esses incubados a 65°C por 2 h, sendo gentilmente agitados periodicamente. Os tubos foram então centrifugados por 20 minutos a 15.000 x g a 10°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo (utilizando gaze para filtrar). Foram adicionados 25 mL de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) homogeneizando-se a amostra gentilmente por 1 minuto. Os tubos foram então centrifugados a 15.000 x g por 2 minutos a 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 à temperatura ambiente, os tubos foram colocados overnight a 4°C.

Depois da incubação a 4°C, os tubos foram centrifugados por 40 minutos a 15.000 x g a 10°C, o sobrenadante descartado e o pellet de DNA 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 a 10°C. O pellet de cada tubo foi ressuscitado em 5 mL de TE (10 mM EDTA e 100 mM Tris-Cl 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 temperatura ambiente.

Os sobrenadantes foram transferidos para tubos falcons de 15 mL e o DNA extraído com um volume igual de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugado por 5 minutos a 2.500 x rpm à temperatura ambiente, por duas

vezes. Após a centrifugação, a camada aquosa contendo o DNA foi extraída uma vez com um volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) seguida de centrifugação por 5 minutos a 600 x g a temperatura ambiente. O sobrenadante de DNA foi transferido para um novo tubo onde ocorreu acréscimo de um volume de isopropanol e incubação por 1 hora à temperatura ambiente seguida de centrifugação por 20 minutos a 15.000x g a 20°C.

O sobrenadante foi retirado e o pellet, após secado ao ar, foi lavado com etanol 70%, centrifugado por 5 minutos a 13.400 x g e ressuscitado com TE (10 mM EDTA e 100 mM Tris-Cl). Um gel preparativo com agarose low melting 1% foi feito para limpar o DNA que foi posteriormente eluído.

Construção da biblioteca metagenômica de pequenos insertos

O DNA metagenômico total foi digerido com a enzima de restrição Pst I (Promega, EUA) a 37°C overnight. O sucesso da digestão foi verificado em gel agarose 0,8% com brometo de etídio (2µg/mL).

Para clonagem, o DNA digerido foi submetido a uma seleção de tamanho em gel de agarose low melting 1% (TAE 1X), seguido da excisão e purificação dos fragmentos com tamanho entre 2 e 8 kb utilizando o 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. 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 através 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 a uma concentração final 20% e armazenada em placas em freezer -80°C.

Validação da biblioteca metagenômica

Para validação da biblioteca metagenômica de pequenos insertos, foi feita uma caracterização das bactérias nela representadas através da amplificação e sequenciamento de 16S rDNA a partir de DNA metagenômico da biblioteca. Primeiramente foi inoculada uma amostra da biblioteca metagenômica

(diretamente do estoque), em LB tetraciclina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por um período de incubação de 16 horas a 37°C. Para extração de DNA plasmidial da biblioteca 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™ ATP-Dependent DNase (Epicentre), conforme as instruções do fabricante.

A amplificação do 16S rDNA bacteriano foi realizada através de PCR, utilizando os primers universais 1492R 5' GGY* TAC CTT GTT ACG ACT T 3' e o primer 27F 5' AGA GTT TGA TCM* TGG CTC AG 3', específicos para o domínio Bacteria (REYSENBACH et al., 1992). A reação foi montada com tampão da Taq 10x, 0.25 μmol 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 20 μL 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 incubação final a 72°C por 7 minutos. O protocolo do ULTRA CLEAN DNA purification Kit (MoBio, EUA) foi utilizado para purificação dos fragmentos amplificados.

Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pGEM-T easy (Promega, EUA), conforme as instruções do fabricante. A transformação foi realizada por eletroporação e a seleção dos clones transformados foi feita através do plaqueamento em meio LB Agar contendo IPTG e Sgal™ (SIGMA) e ampicilina (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Noventa e seis colônias brancas foram crescidas em 130 μL de LB com ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), overnight. Uma miniprep foi realizada para extração plasmidial por lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989)

O sequenciamento de 96 clones foi realizado na plataforma automática 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 os programas Phred (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998) e Lucy (CHOU; HOLMES, 2001) disponíveis pelo Departamento de Bioinformática da Universidade Católica de Brasília no site <http://www.bioinformatica.ucb.br/eletro.html>. As sequências que não alcançaram qualidade foram descartadas e as sequências restantes classificadas em relação à hierarquia taxonômica com o programa Classifier do banco Ribossomal Database Project (WANG et al., 2007), disponível no site: <http://rdp.cme.msu.edu/>. O Confidence threshold utilizado foi de 90%.

Resultados e discussão

Neste trabalho foi possível adaptar protocolos disponíveis na literatura para realizar a extração direta do DNA total dos microrganismos do rúmen caprino associados a partículas sólidas. Esta metodologia permitiu que a microbiota associada ao material lignocelulósico fosse separada do mesmo e fosse então obtido seu DNA total, havendo minimização da contaminação de DNA do material vegetal. Esta baixa contaminação de DNA de origem vegetal é altamente desejável para a construção de biblioteca de expressão em *E. coli* visando o descobrimento de enzimas procarióticas. A partir deste DNA foi possível construir uma biblioteca metagenômica de pequenos insertos com aproximadamente 50.000 clones. Para comprovação da inserção dos fragmentos no plasmídeo pCF4-30 foi realizada digestão de 10 clones aleatórios com a enzima Pst I (Figura 1). Pela análise dos fragmentos liberados foi possível calcular o tamanho médio dos insertos como sendo de 5 kb.

A diversidade bacteriana representada na biblioteca foi amostrada através do sequenciamento de 16S rDNA amplificados utilizando DNA plasmidial da biblioteca como molde na reação de PCR. As sequências obtidas para 88 clones foram comparadas a outras sequências disponíveis no banco de dados público Ribossomal Database Project para conhecimento da biodiversidade

representada na biblioteca. Análise destas sequências demonstrou a presença de três grupos filogenéticos, a saber, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, além da presença de bactérias não classificadas (Figura 2). O filo predominante, com 45 clones, foi Bacteroidetes, bactérias já

conhecidas por apresentar um papel importante na degradação de fibras (EDWARDS et al., 2004). Esta diversidade de filios bacterianos demonstra que os clones da biblioteca metagenômica apresentam diversidade, validando, portanto, a biblioteca construída.



Fig. 1. Padrão de digestão do DNA plasmidial dos clones para confirmar a inserção dos fragmentos no plasmídeo. 1 e 14 Marcador 1Kb; 2 e 13 DNA do plasmídeo pCF430 vazio digerido com Pst I; 3 a 12 clones da biblioteca metagenômica de rúmen de caprinos escolhidos aleatoriamente digeridos com Pst I.

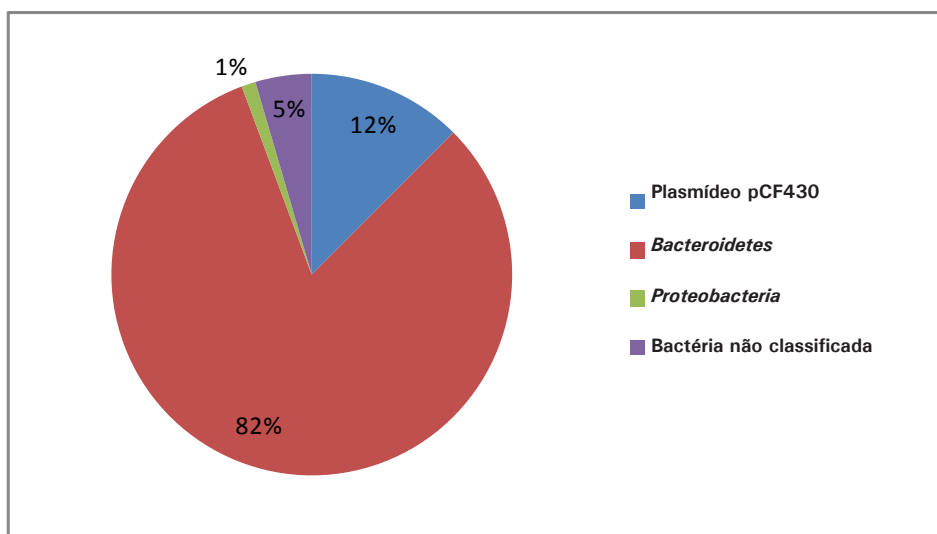


Fig. 2. Grupos filogenéticos encontrados na biblioteca de pequenos insertos de rúmen de caprinos segundo análise de 16S rDNA.

Conclusão

Nesse trabalho foi descrita uma metodologia para a extração de DNA da microbiota associada ao material lignocelulósico presente no rúmen de caprinos. Esta metodologia possibilitou a extração de DNA microbiano com minimização da contaminação de DNA proveniente do material vegetal, apesar da proximidade física entre as mesmas. Com o DNA extraído foi construída uma biblioteca de expressão de DNA metagenômico de rúmen de caprinos. Os clones da biblioteca serão triados para diversas atividades enzimáticas e caracterizadas. Espera-se que algumas destas novas enzimas possuam propriedades cinéticas interessantes e venham a gerar produtos biotecnológicos úteis em rotas para produção de etanol de segunda geração.

Referências

- CHOU, H. H.; HOLMES, M. H. DNA sequence quality trimming and vector removal. *Bioinformatics*, v. 17, p. 1093-1104, 2001.
- EDWARDS, J. E.; MCEWAN, N. R.; TRAVIS, A. J.; WALLACE, R. J. 16s rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v. 86, p. 263-281, 2004.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. ii. error probabilities. *Genome Research*, Cold Spring Harbor, v. 8, p. 186-194, 1998.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, Cold Spring Harbor, v. 8, p. 175-185, 1998.
- HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, Cambridge, v. 5, n. 10, p. R245-249, 1998.
- MARSH, T. L.; SAXMAN, P.; COLE, J.; TIEDJE, J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 66, p. 3616-3620, 2000.
- MARTIN, C.; WILLIAMS, A. G.; MICHALET-DOREAU, B. Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 72, p. 2962-2968, 1994.
- NEWMAN, J. R. E. F. C. Broad host range expression vectors that carry the l-arabinose-inducible *Escherichia coli* arabid promoter and the arac regulator. *Gene*, Amsterdam, 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.
- REYSENBACH, A. L.; GIVER, L. J.; WICKHAM, G. S.; PACE, N. R. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 58, n. 10, p. 3417-3418, 1992.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SELINGER, L. B.; FORSBERG, C. W.; CHENG, K. J. The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe*, v. 2, p. 263-284, 1996.
- SINGH, B.; BHAT, T. K.; SINGH, B. Exploiting gastrointestinal microbes for livestock and industrial development. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, v. 14, p. 567-586, 2001.
- WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 2007.
- WHITFORD, M. F.; FORSTER, R. J.; BEARD, C. E.; GONG, J.; TEATHER, R. M. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16s rRNA genes. *Anaerobe*, v. 4, n. 3, p. 153-163, 1998.
- WILD, J.; HRADECNA, Z.; SZYBALSKI, W. Conditionally amplifiable BACs: switching from single-copy to high-copy vectors and genomic clones. *Genome Research*, Cold Spring Harbor, v. 12, n. 9, p. 1434-1444, 2002.

Agradecimentos

Os autores agradecem pelo suporte recebido Embrapa Caprinos e Ovinos, CNPq, FAP-DF e ao Grupo de Pesquisa em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília.

Comunicado Técnico, 02

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroenergia
Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB s/n,
 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4246
Fax: (61) 3448-1589
E-mail: sac.cnpae@embrapa.br

1ª edição 2009

Comitê de publicações

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias.
Secretária-Executiva: Rachel Leal da Silva.
Membros: Betânia Ferraz Quirino, Daniela Garcia Collares, Esdras Sundfeld.

Expediente

Supervisão editorial: José Manuel Cabral de Sousa Dias.
Revisão de texto: José Manuel Cabral de Sousa Dias.
Editoração eletrônica: Maria Goreti Braga dos Santos.
Normalização bibliográfica: Maria Iara Pereira Machado.