

# Identificação de um Microrganismo de Interesse Biotecnológico Isolado de Solo de Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil

Marcella Novaes Franco  
Rosalie Reed Rodrigues Coelho  
Andrew Macrae

## 1. Introdução

Atualmente verifica-se um crescente interesse no isolamento e identificação de espécies bacterianas com potencial biotecnológico. Neste trabalho, foi estudada a estirpe bacteriana 606, pertencente ao grupo dos actinomicetos, isolada de solo de Mata Atlântica, descrita como pertencente ao gênero *Streptomyces* (SACRAMENTO *et al.*, 2004). Os actinomicetos são bactérias filamentosas, gram-positivas, que contém um alto índice de guanina e citosina no seu genoma (HEUER *et al.*, 1997). Estes microrganismos têm sido descritos como grandes produtores de substâncias bioativas de grande importância biotecnológica, tais como antibióticos e enzimas de aplicação industrial (PARADKAR *et al.*, 2003). Sendo assim, é de grande importância a busca e a identificação de novas espécies com alto potencial na produção dessas substâncias. A estirpe 606 foi estudada e reconhecida com potencial atividade contra fungos, bactérias, leveduras e vírus (SACRAMENTO *et al.*, 2004) sugerindo ser um microrganismo promissor na produção de antibióticos.

A identificação de novos microrganismos envolve a ciência da taxonomia e no caso dos actinomicetos é bastante complexa. Para identificar espécies, é necessário o emprego de diferentes técnicas taxonômicas. A utilização em conjunto de técnicas de taxonomia convencional, taxonomia numérica, quimiotaxonomia e taxonomia molecular é denominada taxonomia polifásica. (HOFLING *et al.*, 1997). A taxonomia bacteriana vem passando por grandes mudanças em decorrência da disponibilidade de novas categorias de informação. Como exemplos, temos a quimiotaxonomia, seqüenciamento do DNA, hibridização DNA-DNA e ribotipagem. Outros

fatores importantes foram os avanços recentes em técnicas de análises filogenéticas. Atualmente, a filogenia molecular é uma base importante na classificação de bactérias (CANHOS *et al.*, 1999).

A utilização de ferramentas da biologia molecular tem grande potencial na identificação de bactérias. Através da técnica de PCR (reação da polimerase em cadeia), é possível amplificar ácidos nucleicos através do uso de iniciadores homólogos a regiões conservadas no genoma. Os ácidos nucleicos podem ser seqüenciados e gerar informações taxonômicas. Estes dados constituem a base para inferências filogenéticas. Muitos grupos de actinomicetos têm sido detectados e caracterizados através da sua seqüência do gene *rrn* 16S rDNA (HEUER *et al.*, 1997). A ampla utilização desse gene se deve principalmente à rapidez de geração de dados e à facilidade na comparação com as seqüências disponíveis nos bancos de dados públicos. Através dessas análises, é possível determinar a posição de muitos organismos em quase todos os níveis taxonômicos (WANG *et al.*, 1999).

Os dados biológicos obtidos através de técnicas de biologia molecular são analisados através de ferramentas computacionais da bioinformática, uma nova disciplina dentro da biologia (CAÑEDO & ARENCIBIA, 2004). Atualmente, muitos procedimentos como pesquisa em bancos de dados de seqüências, comparação e análise de seqüências são práticas comuns em bioinformática (GIBAS, 2001). O presente trabalho teve como objetivo principal identificar em nível de espécie, a estirpe de actinomiceto 606, através do seqüenciamento do gene 16S rDNA e análise dos resultados através das ferramentas de bioinformática.

## 2. Material e Métodos

A estirpe 606, pertencente ao gênero *Streptomyces* e isolada de solo de Mata Atlântica, pertence à Coleção de Actinomicetos do Laboratório de Biotecnologia de Actinomicetos do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Para a confirmação de sua pureza, a estirpe foi inoculada, pela técnica de esgotamento, em placa contendo meio de ágar extrato de malte-extrato de levedura (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966) por sete dias em estufa a 28°C. Foram obtidas colônias isoladas as quais foram inoculadas em caldo extrato de

malte-extrato de levedura, crescidas a 22°C, por três dias em agitador rotatório (120 rpm). A partir deste cultivo em meio líquido foi realizada a extração do DNA genômico (FRANCO, 2007).

O produto obtido na extração do DNA foi submetido à uma corrida de eletroforese em gel de agarose a 1,2% em TBE 0.5X (Tris-Borato 0,5X: 0,045M Tris-Borato, 0,001 M EDTA), a 75 volts, durante uma hora. O marcador utilizado foi o 1Kb (Invitrogen - 4µl). Em cada poço foram depositados 4µl de amostra e 1µl do corante azul de bromofenol. Após a corrida, o gel foi corado por 10 minutos em Brometo de Etídio e observado em transiluminador ultravioleta UV GEN™ (Bio Rad).

Em seguida foi realizada a amplificação do gene que codifica o 16S rDNA, utilizando-se a técnica de PCR em um termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Os iniciadores utilizados na reação de PCR foram: 27F - 5' AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG 3' (HAYASHI *et al.*, 2004) e 1541 R - 5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3' (LÖFFLER *et al.*, 2000). A técnica foi realizada com o uso do KIT GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation) e o volume total da reação foi de 25 µl. Como controle positivo da reação foi utilizado DNA de *Staphylococcus aureus*. Para a purificação do produto obtido na amplificação foi utilizado o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega Corporation).

A reação de sequenciamento da região 16S rDNA foi realizada através do uso do Big Dye® Terminator V31 Cycle Sequencing Kit, Part. N° 4336917 (Applied Biosystems), no aparelho ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser, seguindo orientações do fabricante. Foram utilizados os seguintes iniciadores na reação de sequenciamento:

519 R - 5' - G (AT)ATTACCGCGGC(GT)GCTG- 3', 1100 R - 5' - GGGTTGCGCTCGTTG - 3', 530 F 5' - GTGCCAGC(AC)GCCGCGG - 3' e 1114 F - 5' - GCAACGAGCGCAACCC - 3' (KATO *et al.*, 1997), 1392 R - 5' - ACGGGCGGTGTGT(AG)C - 3' (TAL *et al.*, 2006), 357 F - 5' - CTC CTA CGG GAG GCA GCA G-3' (SCHWARTZ *et al.*, 2000) e a precipitação do DNA foi obtida com Isopropanol/Etanol (FRANCO, 2007).

As seqüências fornecidas pelo sequenciamento foram analisadas quanto a sua qualidade através do eletroforetograma e editadas

pelo uso do programa BioEdit versão 7.0.5.3. Através de uma ferramenta de alinhamento múltiplo presente neste programa (Clustal W), foi possível efetuar o alinhamento das seqüências resultantes do seqüenciamento realizado com cada iniciador, visando à montagem da seqüência do gene de 16S rDNA. Após o seqüenciamento da região 16S rDNA da estirpe 606, a seqüência obtida foi submetida ao BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), ferramenta presente no site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Após o seqüenciamento parcial da região 16S rDNA e a utilização da ferramenta BLAST, a seqüência da estirpe 606 foi alinhada com dez seqüências similares encontradas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), e em seguida foi construída a árvore filogenética utilizando-se o programa MEGA versão 3.1 (KUMAR *et al.*, 1993). A distância filogenética foi inferida e corrigida de acordo com o modelo Kimura 2 parâmetros (KIMURA, 1980). A topologia da árvore foi construída usando Neighbour-Joining (SAITOU & NEI, 1987), com análise de Bootstrap com 1000 repetições.

### 3. Resultados

O DNA da estirpe 606 foi extraído através do método empregado. O DNA foi visualizado através da eletroforese em gel de agarose e foi de pureza suficiente para a amplificação através da técnica de PCR. Com o uso do KIT GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega Corporation) e dos iniciadores 27 F (HAYASHI *et al.*, 2004) e 1541R (LÖFFLER *et al.*, 2000), foi realizada a amplificação do gene 16S rRNA visualizada pela eletroforese em gel de agarose.

Foram seqüenciadas 1493 pares de base e, após os alinhamentos realizados, destacamos que a seqüência mais parecida foi a de *Streptomyces* RCQ1071. Assim sendo, foi realizado um novo alinhamento entre essas duas seqüências, e das 1465 bases utilizadas foram encontrados sete eventos de inserção ou deleção, e três eventos de substituição. As relações evolutivas entre a estirpe 606 e dez seqüências similares encontradas no BLAST poderão ser observadas na árvore filogenética mostrada na Figura 1.

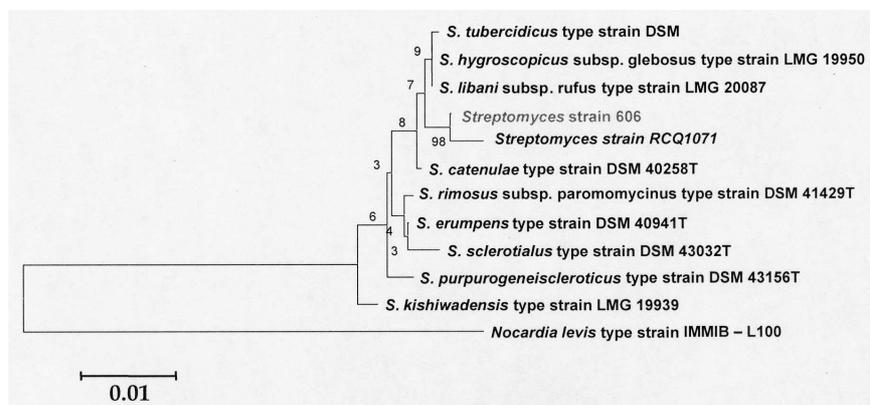


Figura 1 - Árvore filogenética para a estirpe 606. Esta árvore filogenética foi inferida tendo como base um alinhamento de 1401 bases de 16S rDNA. A distância evolutiva foi corrigida de acordo com o modelo Kimura 2 parâmetros (KIMURA, 1980) e a topologia da árvore foi construída usando Neighbour-Joining (SAITOU & NEI, 1987), com análise de Bootstrap com 1000 repetições.

#### 4. Discussão

Por sua longa história e sua importância na produção de compostos bioativos incluindo antibióticos, antivirais e enzimas hidrolíticas (celulases, amilases, quitinases, proteases, etc.), a descrição de estirpes de *Streptomyces* tem recebido muita atenção desde meados do Século XX. Mais de 500 espécies do gênero *Streptomyces* foram descritas no último *Bergey's Manual* (MADIGAN *et al.*, 2004), sendo a maioria destas descritas antes da revolução da Biologia Molecular, onde se iniciou o seqüenciamento de ácidos nucleicos.

Durante o desenvolvimento do presente trabalho foram encontradas 5859 seqüências de 16S rRNA do gênero *Streptomyces* no banco de dados “*The Ribosomal Database Project - RDP*” (<http://rdp.cme.msu.edu>). Comparando os dados, vemos que existem 10 vezes mais seqüências de *Streptomyces* do que espécies tipo no *Bergey's Manual* (MADIGAN *et al.*, 2004). Com isso, surge a questão: como identificar com segurança uma nova espécie dentro do gênero *Streptomyces*, tendo em vista que muitas das espécies que já foram descritas não tiveram seu 16S rDNA seqüenciados, e um grande número de estirpes de *Streptomyces* tiveram seu 16S rDNA seqüenciado mas não foram descritas fenotipicamente?

A estirpe 606 isolada de solo de Mata Atlântica (RJ), após seqüenciamento, mostrou-se similar à estirpe *Streptomyces* RCQ1071, isolada de solo de Cerrado (MS) por pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia de Actinomicetos (GOMES *et al*, 2001). As duas estirpes apresentaram seqüências de 16S rDNA altamente similares, entretanto seus fenótipos são diferentes. A estirpe 606 foi selecionada para estudos mais profundos devido a sua atividade contra bactérias, fungos, leveduras e vírus. A estirpe RCQ1071 foi selecionada para estudos por sua atividade quitinolítica. O próximo passo na identificação da estirpe 606 será um teste de hibridização de DNA genômico. Se as estirpes apresentarem uma similaridade acima de 70%, teremos duas estirpes com fenótipos diferentes, mas com genótipos da mesma espécie (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994).

Em conclusão, no presente trabalho, a estirpe estudada (estirpe *Streptomyces* sp 606) apresentou seu 16S rDNA com mais de 99.9% de similaridade com outra estirpe do mesmo gênero, a *Streptomyces* sp RCQ1071. No entanto, apesar disso, ambas possuem fenótipos diferentes, a primeira sendo produtora de substâncias antimicrobianas e a outra apresentando uma alta atividade quitinolítica. A estirpe 606 foi então identificada como uma provável subespécie da estirpe RCQ 1071, atualmente candidata para reconhecimento como espécie nova com o nome de *Streptomyces lunalinharesii* (SOUZA, 2006). O Brasil abriga uma vasta biodiversidade e isto é internacionalmente reconhecido. Foi estimado que essa biodiversidade pode valer em torno de 3 trilhões de reais para o país em biotecnologia nos próximos vinte anos. Apesar disso, para que toda essa biodiversidade seja catalogada será necessário muito trabalho. Quando um organismo ainda não foi descrito, não é possível determinar seu destino e utilidade. Este estudo foi um exemplo do trabalho de taxonomistas a descrição e proteção da biodiversidade através do seu reconhecimento. Os antibióticos da estirpe 606 serão estudados em mais detalhes quanto a sua aplicação para o benefício da sociedade. ◆

## 5. Referências

CAÑEDO, A. R & ARENCIBIA, J. R. **Bioinformática: em busca de los secretos moleculares de la vida**. Acimed, 2004; 12(6). Disponível em: [http://bvs.sld.cu/revistas/aci/vol12\\_6\\_04/aci02604.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/aci/vol12_6_04/aci02604.htm). Consultado em: 10/11/2006.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P.; VAZOLLER, R. F.; PELLIZARI, V. H. **Diversidade do Domínio Bacteria**. In: Carlos Alfredo Joly; Carlos Eduardo de Mattos Bicudo. (Org.). Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. 1 ed. São Paulo: FAPESP, 1999; 1: 1-14.

FRANCO, M. N. **Identificação molecular de duas possíveis espécies novas de actinomicetos isoladas em solo de Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil (*Streptomyces sp.*)**. Rio de Janeiro; 2007 Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Microbiologia do Departamento de Pós Graduação (NUDES) da Fundação Técnico-Educacional Souza Marques visando a obtenção do grau de Especialista em Microbiologia.

GIBAS, C. **Desenvolvendo Bioinformática: ferramentas de software para aplicações em biologia** / Cyntia Gibas e Per Jambeck: tradução Milarepa Ltda. Rio de Janeiro: campus, 2001a; p.8.

GOMES, R. C.; SÊMEDO, L. T. A. S.; SOARES, L. F.; ULHOA, C. J.; ALVIANO, C. S.; COELHO, R. R. R. Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RCQ1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. **Journal of Applied Microbiology**. 2001; 90: 653-661.

HAYASHI, H.; SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. *Evaluation of three different forward primers by terminal restriction fragment length polymorphism analysis for determination of fecal Bifidobacterium spp. in healthy subjects.* **Microbiology and Immunology**. 2004; 48(1): 1-6.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SAMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. **Applied and Environmental Microbiology**. 1997; 63(8): 3233–3241.

HOFLING, J. F.; ROSA, E. A. R.; BAPTISTA, M. J.; SPOLIDÓRIO, D. M. P. New Strategies on Molecular Biology Applied to Microbial Systematics. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 1997; 39(6):345-352.

KATO, C.; LI, L.; TAMAOKA, J.; HORIKOSHI, K. Molecular analyses of the sediment of the 11000-m deep Marina Trench. **Extremophiles**. 1997; 1:117-123.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**. 1980; 16(2):111-120.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. **Oxford Journals**. 1993; 10(2): 189-191.

LÖFFLER, F. E.; SUN, Q.; LI, J.; TIEDJE, J. M. 16S rRNA Gene-Based Detection of Tetrachloroethene-Dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* Species. **Applied And Environmental Microbiology**. 2000; 66(4): 1369-1374.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004a; p. 394.

PARADKAR, A.; TREFZER, A.; CHAKRABURTTY, R.; STASSI, D. 2003. *Streptomyces* genetics: a genomic perspective. **Critical Reviews in Biotechnology**. 23:1-27.

SACRAMENTO, D. R.; COELHO, R. R. R.; WIGG, M. D.; LINHARES, L. F. T. L.; SANTOS, M. G. M.; SEMÊDO, L. T. A. S., et al. 2004. Antimicrobial and antiviral activities of an actinomycete (*Streptomyces* sp.) isolated from a Brazilian tropical forest soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. (20): 225-229.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**. 1987; 4(4): 406-425.

SOUZA, R. F. Controle biológico de *Rhizoctonia solani*: Actinomicetos e suas enzimas hidrolíticas. Rio de Janeiro; 2006. Tese de doutorado em Microbiologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SCHWARTZ, E.; TRINH, S. V.; SCOW, K. M. 2000. Measuring growth of a phenanthrene-degrading bacterial inoculum in soil with a quantitative

competitive polymerase chain reaction method. *FEMS Microbiology Ecology*. 34: 1-7.

SHIRLING, E. B. & GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 1966; 16(3):312-340.

STACKEBRANDT, E. & GOEBEL, B. M. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 1994; 44(4): 846-849.

TAL, Y.; WATTS, J. E. M.; SCHREIER, H. J. Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Bacteria and Associated Activity in Fixed-Film Biofilters of a Marine Recirculating Aquaculture System. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006; 72(4): 2896-2904.

WANG, Y.; ZHANG, Z. S.; RUAN, J. S.; WANG, Y. M.; ALI, S. M. Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 1999; 23: 178-187.