



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

DAVI JOSUÉ MARCON

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ISOLADAS
DO PARQUE ESTADUAL UTINGA - PARÁ**

**Belém
2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

DAVI JOSUÉ MARCON

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ISOLADAS
DO PARQUE ESTADUAL UTINGA - PARÁ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Azevedo Baraúna

**Belém
2022**

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	3
1.1	Contexto	3
1.2	Justificativa	3
2	OBJETIVOS	4
2.1	Objetivo Geral	4
2.2	Objetivos Específicos	4
3	REFERENCIAIS TEÓRICOS	5
3.1	Metabólitos secundários	5
3.2	Actinomicetos	5
3.2.1	<i>Rhodococcus</i>	6
3.3	<i>Brevibacillus</i>	6
3.3.1	<i>Brevibacillus brevis</i>	7
3.4	Estudo genômico de MIB's	7
4	METODOLOGIA	9
4.1	Seleção de amostras	9
4.2	Extração de DNA	9
4.3	Sequenciamento e análise genômica	9
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
6	CONCLUSÃO	11
	REFERÊNCIAS	12

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contexto

- Necessidade de novos Compostos
- Uso de Biotecnologia para solução de problemas industriais A biotecnologia

Os ambientes amazônicos são um reservatório de biodiversidade muito importantes, a riqueza de espécies e o uso da biotecnologia como ferramenta para a solução de problemas relacionados a saúde humana e animal, industriais e patrimônio genético são fontes interessantes para o desenvolvimento sustentável baseado no uso de tecnologia de ponta para a formulação de novas tecnologias. Microorganismos do solo amazônico podem ser a fonte de novos fármacos para doenças já conhecidas, a cura para doenças emergentes, biofábricas para novos processos industriais e biorremediadores de impactos ambientais.

1.2 Justificativa

Bactérias ambientais são interessantes alvos para a descoberta de compostos de relevância biotecnológica, especialmente como solução para os crescentes níveis de resistência a antimicrobianos encontrados em microorganismos patogênicos. A caracterização genômica e prospecção de genes de interesse desses microorganismos, especialmente do ambiente amazônico, são passos importantes em busca de compostos de potencial farmacológico e industrial.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Predizer o potencial biotecnológico de bactérias ambientais utilizando ferramentas *in silico*

2.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar os organismos sequenciados utilizando seus genomas
2. Predizer as características metabólicas dos organismos
3. Categorizar os microorganismos quanto a capacidade de produção de compostos de interesse biotecnológico

3 REFERENCIAIS TEÓRICOS

3.1 Metabolitos secundários

O metabolismo celular bacteriano é o conjunto de processos bioquímicos anabólicos e catabólicos no qual as células bacterianas produzem novas substâncias a partir de substrato ou outras substâncias, os produtos dessas reações são conhecidos como metabólitos. Podendo ser classificados como primários ou secundários, sendo os primários o conjunto de substâncias essenciais para a sobrevivência do organismo, relacionadas à produção de energia e as funções vitais da célula, já os secundários não estão relacionados à sobrevivência da célula, mas sim sua perpetuação no ambiente utilizando estratégias de resistência a situações adversas (GOKULAN; KHARE; CERNIGLIA, 2014).

A maquinaria responsável pela produção desses compostos, normalmente está relacionada a aglomerados de genes biossintéticos (*Biosynthetic Genes Cluster - BGC*) que são dois ou mais genes agrupados codificam a via biosintética para a produção de um metabólito, sendo capazes de produzir compostos das seguintes classes: alcalóides, carboidratos, esteróides, lipídeos, peptídeos (com ou sem modificações pós-traducionais), policetídeos e terpenóides (MEDEMA et al., 2015).

Esses metabólitos possuem uma diversa gama de funções, seja como metodologia de "guerra química" com outros microorganismos, mediadores de atividade mutualística entre espécies ou simbiose química (O'BRIEN; WRIGHT, 2011). Apesar de não serem considerados essenciais para a vida desses organismos (DEMAIN; SANCHEZ, 2009) são de grande importância para sua dispersão e adaptação em ambientes hostis e escassos de nutrientes.

3.2 Actinomicetos

Actinomicetos são um filo de microorganismos gram-positivos de alto conteúdo guanina e citosina que contém as classes: Acidimicrobiia, Actinobacteria, Coriobacteriia, Nitriliruptoria, Rubrobacteria, e Thermoleophilia (YADAV et al., 2018). Dentre suas principais características podemos ressaltar a presença de micélios e a produção de hifas filamentosas (CHATER, 2016). Sua dispersão ambiental é enorme e já foram isolados de ambientes diversos como: lagos salinos, mar profundo e solo (CLAVO et al., 2021; FELÍCIO et al., 2021; SAPKOTA et al., 2020). Além da simbose com animais, fungos, insetos, líquens e plantas (HEI et al., 2021; MEIJ et al., 2017). A capacidade de se adaptar a diversos ambientes está intimamente relacionada com a capacidade de produzir substâncias bioativas com funções igualmente diversas (BERGEIJK et al., 2020)

Essas bactérias foram uma fonte importante para o desenvolvimento de compostos de funções diversas como: antibactericidas, antifúngicos, antihelmínticos, antitumorais, anticancerígenos, anti-inflamatórios, antivirais, imunossupressores, inseticidas e herbicidas (DEMAIN;

SANCHEZ, 2009; JOSE; MAHARSHI; JHA, 2021). 64% dos antibióticos derivados de produtos naturais foram obtidos a partir de actinomicetos filamentosos, especialmente durante a era de ouro dos antibióticos (1940-1960) sendo 20 utilizados clinicamente (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). Segundo Genilloud (2017), continuam sendo uma fonte relevante para o isolamento de caracterização de compostos de interesse biotecnológicos, e com o emprego de metodologias modernas de investigação podem continuar a fornecer substâncias relevantes para mercado.

3.2.1 *Rhodococcus*

O gênero *Rhodococcus* contem actinomicetos de diversidade genômica e fisiológica, contendo alguns membros patogênicos para humanos, animais e plantas. Sua importância biotecnológica é encontrada principalmente por conter algumas cepas com capacidade de degradar compostos orgânicos. Devido seu grande tamanho genômico (8.5-10Mb) esses microorganismos possuem grande liberdade para modificar seu genoma com recombinações, translocações e inserções, contendo diversas vias catabólicas, e mantendo múltiplas funções metabólicas (CAPPELLETTI et al., 2019).

Rhodococcus são os microorganismos mais adequados para o desenvolvimento de tecnologias de remediação de ambientes por serem capazes de degradar poluentes persistentes e por terem sido isolados de ambientes contaminados com hidrocarbonetos (inclusive em forma gasosa)(KUYUKINA; IVSHINA, 2019). Sua resistência a intemperes como frio, calor, acidez, salinidade, pode ser explorada para o desenvolvimento de biorremediadores de derramamento de derivados de petróleo.

Além da capacidade de remediação biológica, podemos ressaltar o potencial de produção de diversas moléculas como: biosurfactantes, biofloclantes, carotenoides, ácidos graxos poli-insaturados, poli-hidroxi-alcalóides e triacil-gliceróis (CAPPELLETTI et al., 2020). Essas estruturas especialmente as mais complexas como os Carotenoides e os Ácidos graxos Poli-Insaturados são de grande interesse industrial pois sua síntese é complexa e custosa, o uso de microorganismos pode facilitar e reduzir os custos nesses processos.

Dentre as possibilidades para o uso biotecnológico de *Rhodococcus* temos o uso como biofábricas para óleo, biocatálise em processos industriais e valorização de rejeitos (ALVAREZ et al., 2021; KRIVORUCHKO; KUYUKINA; IVSHINA, 2019; ANTHONY et al., 2019; CHATTERJEE et al., 2020).

3.3 *Brevibacillus*

Brevibacillus (anteriormente *Bacillus brevis*) é um gênero com grande potencial para uso organismo para uso como organismo de expressão heteróloga por ter crescimento rápido, baixa produção de proteases extracelulares e boa eficiência de transformação por eletroporação,

além disso diversos membros do gênero produzem substâncias com atividades larvicidas e antimicrobianas e tem grande importância agroecológica por sua relação mutualística com plantas promovendo seu crescimento, protegendo de doenças e removendo metais pesados do solo (PANDA et al., 2014; ??).

Yao, Zhang e Wu (2020) ressaltam a capacidade prolífica de *Brevibacillus sp.* para expressão heteróloga especialmente sua capacidade de produzir moléculas com eficiência ao ser mediada por promotores endógenos com repetição em tandem e peptídeos sinal, sugerindo a importância do uso de estratégias eficazes de otimização do hospedeiro, do vetor, do processo fermentativo e o estudo detalhado dos promotores do gênero para melhoria desse modelo.

Exemplos importantes de metabólitos obtidos de *Brevibacillus* temos os peptídeos antimicrobianos (AMP), sendo esses classificados pela sua síntese ribossomal ou não, tendo diversos usos como o biocontrole em plantas, preservantes para alimentos em prateleiras (YANG; YOU-SEF, 2018). Além dos AMPS podemos citar a probdigiosina com atividade algicida e compostos ainda não elucidados com grande atividade antiproliferativa (ZHANG et al., 2022; ARUMUGAM et al., 2018). Além dos metabólitos, algumas vias bioquímicas dos *Brevibacillus* são interessantes pela capacidade de degradar Ácido Polilático (plástico biodegradável), a síntese de exopolissacarídeos e a biodegradação de polietileno (YU et al., 2022; YILDIZ et al., 2015; HADAD; GERESH; SIVAN, 2005; ALI; ZAKARYA; KHALED, 2022).

3.3.1 *Brevibacillus brevis*

A espécie *B. Brevis* contém espécies majoritariamente mesofílicas, e sua distinção é baseada em similaridade genômica, sondagem molecular e análises quimiotaxonômicas (??).

3.4 Estudo genômico de MIB's

- Nesse tópico podemos iniciar abordando a questão do desinteresse em prospectar novas moléculas por conta dos processos padrões serem custosos, e que isso levou ao desinteresse da indústria. - No entanto com o advento de novas tecnologias (escreve um pouco de cada), estão sendo retomadas a exploração pelo potencial biossintético de microrg. - Que antes do sequenciamento do genoma pouco se sabia sobre o potencial biossintético das bactérias - Depois inicia sobre a importância das análises genômicas, cita estudos que mostram o amplo conteúdo de genes biossintéticos - Podemos abordar sobre cada ferramenta que vais utilizar, apesar de que eu acho que metodologia não deve ter na introdução.

Ramírez-Rendon et al. (2022) resalta a relevância de bactérias para a descoberta de importantes fármacos e propõe que organismos de fontes não convencionais como cavernas, fontes termais, áreas de alta salinidade, solos áridos, oceanos e mares continuem sendo estudados especialmente com tecnologias como metagenômica e mineração genômica pois podem ter um

papel importante no combate de possíveis surtos de doenças como a SARS-COV2 e epidemias causadas por bactérias resistentes.

Em condições laboratoriais, muitos genes relacionados a síntese de compostos bioativos são silenciados, limitando a produção a produção desses produtos, propondo que o uso de eliciadores é necessário para expressão dos genes relacionados a produção desses compostos (RUTLEDGE; CHALLIS, 2015). Felício et al. (2021) propõe o uma metodologia de eliciação para expressão, purificação e caracterização desses compostos além de ressaltar que até 45% dos compostos produzidos por microorganismos são metabólitos secundários eliciados.

Através de Tecnologias modernas como a ferramenta ANTI-SMASH (MEDEMA et al., 2011) é possível prever genes putativos e *clusters* gênicos relacionados a produção de metabólitos secundários e de síntese ribossomal. Essa tecnologia de mineração *in silico* permite prever redes metabólicas e possíveis promotores da expressão desses compostos, principalmente por utilizar bancos de dados produzidos a partir de outras ferramentas como BAGEL, NORINE e CLUSEAN (JONG et al., 2010; HEEL et al., 2013; CABOCHE et al., 2007; WEBER et al., 2009). A incorporação de diversas ferramentas e banco de dados permite uma análise robusta e completa utilizando tecnologias do estado da arte da biologia computacional.

4 METODOLOGIA

4.1 Seleção de amostras

Foram selecionados 2 microorganismos de espécies diferentes do banco de amostras ambientais provenientes do parque estadual Utinga - Belém, PA gentilmente disponibilizadas pelo Centro de Genômica e Biologia de Sistemas. Incluindo uma actinobactéria do gênero *Rhodococcus* e uma bactéria do filo *Firmicutes*: *Brevibacillus brevis*. Essas amostras foram previamente identificadas utilizando sequenciamento do gene de RNA ribossomal 16s utilizando os primers universais 8F: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' e 1492R: 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3' com o sequenciador ABI Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied BioSystems). Posteriormente as espécies foram preditas utilizando homologia baseada no alinhamento contra o banco de dados de RNA ribossomal do NCBI utilizando a ferramenta blast.

4.2 Extração de DNA

As amostras foram cultivadas em meio Tryptone Soy Broth (TSB) por 48 horas a 28 graus, e seu DNA foi extraído utilizando o kit HiPureA Multi-sample DNA Purification Kit(HI-MEDIA) seguindo as orientações do fabricante. O DNA foi quantificado usando quantificador Quibit(TODO) e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% complementado com brometo de etídio 0.5%.

4.3 Sequenciamento e análise genômica

As bibliotecas foram preparadas utilizando o protocolo do fabricante e sequenciadas no equipamento Ion GeneStudio S5 Plus (Thermo Fisher) Após o sequenciamento as amostras foram submetidas ao pipeline Bactopia, o qual filtrou as leituras, montou e anotou o genoma. Após isso, foram utilizadas as ferramentas do Bactopia para análise de resistência, genes patogênicos, genes de produção de compostos, clusters gênicos e elementos moveis. Foram utilizados os softwares GoFeat, Anti-Smash versão 6, BRIG e R para criação de figuras a partir dos dados gerados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6 CONCLUSÃO

REFERÊNCIAS

- ALI, S. A.; ZAKARYA, S.; KHALED, S. Screening and optimisation of the biodegradation potential for low density polyethylene (ldpe) films by fusarium equiseti and brevibacillus parabrevis. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, Biosciences Biotechnology Research Asia, v. 19, n. 1, p. 215, 2022.
- ALVAREZ, H. M. et al. Rhodococcus as biofactories for microbial oil production. **Molecules**, MDPI, v. 26, n. 16, p. 4871, 2021.
- ANTHONY, W. E. et al. Development of rhodococcus opacus as a chassis for lignin valorization and bioproduction of high-value compounds. **Biotechnology for biofuels**, Springer, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2019.
- ARUMUGAM, T. et al. Isolation, structure elucidation and anticancer activity from brevibacillus brevis egs 9 that combats multi drug resistant actinobacteria. **Microbial pathogenesis**, Elsevier, v. 115, p. 146–153, 2018.
- BERGEIJK, D. A. van et al. Ecology and genomics of actinobacteria: new concepts for natural product discovery. **Nature Reviews Microbiology**, Nature Publishing Group, v. 18, n. 10, p. 546–558, 2020.
- CABOCHE, S. et al. Norine: a database of nonribosomal peptides. **Nucleic acids research**, Oxford University Press, v. 36, n. 1, p. D326–D331, 2007.
- CAPPELLETTI, M. et al. Biotechnology of rhodococcus for the production of valuable compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Springer, v. 104, n. 20, p. 8567–8594, 2020.
- CAPPELLETTI, M. et al. Genomics of rhodococcus. In: **Biology of Rhodococcus**. [S.l.]: Springer, 2019. p. 23–60.
- CHATER, K. F. Recent advances in understanding streptomyces. **F1000Research**, Faculty of 1000 Ltd, v. 5, 2016.
- CHATTERJEE, A. et al. Bioconversion of renewable feedstocks by rhodococcus opacus. **Current opinion in biotechnology**, Elsevier, v. 64, p. 10–16, 2020.
- CLAVO, R. F. et al. Evaluation of antimicrobial and antiproliferative activities of actinobacteria isolated from the saline lagoons of northwestern peru. **PloS one**, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 16, n. 9, p. e0240946, 2021.
- DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of antibiotics**, Nature Publishing Group, v. 62, n. 1, p. 5–16, 2009.
- FELÍCIO, R. de et al. Chemical elicitors induce rare bioactive secondary metabolites in deep-sea bacteria under laboratory conditions. **Metabolites**, MDPI, v. 11, n. 2, p. 107, 2021.
- GENILLOUD, O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. **Natural product reports**, Royal Society of Chemistry, v. 34, n. 10, p. 1203–1232, 2017.

- GOKULAN, K.; KHARE, S.; CERNIGLIA, C. Production of secondary metabolites of bacteria. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. (Ed.). **Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)**. Second edition. Oxford: Academic Press, 2014. p. 561–569. ISBN 978-0-12-384733-1. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300002032>>.
- HADAD, D.; GERESH, S.; SIVAN, A. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *brevibacillus borstelensis*. **Journal of applied microbiology**, Wiley Online Library, v. 98, n. 5, p. 1093–1100, 2005.
- HEEL, A. J. V. et al. Bagel3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-) bactericidal posttranslationally modified peptides. **Nucleic acids research**, Oxford University Press, v. 41, n. W1, p. W448–W453, 2013.
- HEI, Y. et al. Antimicrobial activity and biosynthetic potential of cultivable actinomycetes associated with lichen symbiosis from qinghai-tibet plateau. **Microbiological Research**, Elsevier, v. 244, p. 126652, 2021.
- HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72–80, 2019. ISSN 1369-5274. Antimicrobials. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527419300190>>.
- JONG, A. D. et al. Bagel2: mining for bacteriocins in genomic data. **Nucleic Acids Research**, Oxford University Press, v. 38, n. suppl_2, p. W647–W651, 2010.
- JOSE, P. A.; MAHARSHI, A.; JHA, B. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. **Microbiological Research**, Elsevier, v. 246, p. 126708, 2021.
- KRIVORUCHKO, A.; KUYUKINA, M.; IVSHINA, I. Advanced rhodococcus biocatalysts for environmental biotechnologies. **Catalysts**, MDPI, v. 9, n. 3, p. 236, 2019.
- KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B. Bioremediation of contaminated environments using rhodococcus. In: **Biology of Rhodococcus**. [S.l.]: Springer, 2019. p. 231–270.
- MEDEMA, M. H. et al. antismash: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. **Nucleic acids research**, Oxford University Press, v. 39, n. suppl_2, p. W339–W346, 2011.
- MEDEMA, M. H. et al. Minimum information about a biosynthetic gene cluster. **Nature chemical biology**, Nature Publishing Group, v. 11, n. 9, p. 625–631, 2015.
- MEIJ, A. Van der et al. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. **FEMS microbiology reviews**, Oxford University Press, v. 41, n. 3, p. 392–416, 2017.
- O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, Elsevier, v. 22, n. 4, p. 552–558, 2011.
- PANDA, A. K. et al. *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Springer, v. 105, n. 4, p. 623–639, 2014.
- RAMÍREZ-RENDON, D. et al. Impact of novel microbial secondary metabolites on the pharma industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Springer, p. 1–24, 2022.
- RUTLEDGE, P. J.; CHALLIS, G. L. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. **Nature reviews microbiology**, Nature Publishing Group, v. 13, n. 8, p. 509–523, 2015.

SAPKOTA, A. et al. Isolation, characterization, and screening of antimicrobial-producing actinomycetes from soil samples. **International journal of microbiology**, Hindawi, v. 2020, 2020.

WEBER, T. et al. Clusean: a computer-based framework for the automated analysis of bacterial secondary metabolite biosynthetic gene clusters. **Journal of biotechnology**, Elsevier, v. 140, n. 1-2, p. 13–17, 2009.

YADAV, A. N. et al. Actinobacteria from rhizosphere: molecular diversity, distributions, and potential biotechnological applications. In: **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**. [S.l.]: Elsevier, 2018. p. 13–41.

YANG, X.; YOUSEF, A. E. Antimicrobial peptides produced by *brevibacillus* spp.: structure, classification and bioactivity: a mini review. **World journal of microbiology and biotechnology**, Springer, v. 34, n. 4, p. 1–10, 2018.

YAO, D.; ZHANG, K.; WU, J. Available strategies for improved expression of recombinant proteins in *brevibacillus* expression system: a review. **Critical reviews in biotechnology**, Taylor & Francis, v. 40, n. 7, p. 1044–1058, 2020.

YILDIZ, S. Y. et al. Genomic analysis of *brevibacillus thermoruber* 423 reveals its biotechnological and industrial potential. **Applied microbiology and biotechnology**, Springer, v. 99, n. 5, p. 2277–2289, 2015.

YU, J. et al. Comparison of polylactic acid biodegradation ability of *brevibacillus brevis* and *bacillus amyloliquefaciens* and promotion of PLA biodegradation by soytone. **Biodegradation**, Springer, p. 1–11, 2022.

ZHANG, Y. et al. Transcriptome analysis reveals the algicidal mechanism of *brevibacillus laterosporus* against *microcystis aeruginosa* through multiple metabolic pathways. **Toxins**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 14, n. 7, p. 492, 2022.