



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
MOLECULAR

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE
RESISTÊNCIA À ANTIBIÓTICOS POR DIFERENTES
ABORDAGENS METAGENÔMICAS EM AMOSTRAS
BIOLÓGICAS DO CERRADO

PHILIPPE DE CASTRO LINS

ORIENTADOR: Dr.: RICARDO HENRIQUE KRÜGER

BRASÍLIA/DF – 2024



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Philippe de Castro Lins

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À
ANTIBIÓTICOS POR DIFERENTES ABORDAGENS METAGENÔMICAS EM
AMOSTRAS BIOLÓGICAS DO CERRADO

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Biologia Molecular nos conformes do Artigo 51, parágrafo 5º do regulamento da PPGBIOMOL.

Orientador: Prof.: Dr. Ricardo Henrique Krüger

Brasília

2024

À minha família amada por estar sempre ao meu lado e me sustentar nos meus momentos mais difíceis.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar o dom da vida! Por permitir que eu pudesse sobreviver, literalmente, a pandemia da COVID-19 e voltar para minha família. Foi um período de provações e superações em todos os sentidos. Mas por ter visto o horror de perto me sinto privilegiado e feliz por ter voltado graças a Deus e as orações de todos.

À minha família, por sempre me apoiar e me fortalecer nas mais diversas situações. Em especial à minha esposa Camila, por nunca, nunca, nunca e nunca ter saído do meu lado, mesmo no meu momento mais sombrio. À ela todo meu amor, carinho e dedicação. Você é a pessoa que sempre esteve do meu lado me guiando, uma luz que me faz ser a melhor pessoa que eu posso ser. Fruto desse amor, a mais nova integrante da família, minha filha Manuela a quem eu dedico todo meu esforço para poder dar a ela a melhor qualidade de vida que posso proporcionar.

Ao meu orientador, Ricardo Henrique Krüger por sua dedicação na minha orientação.

E um agradecimento mais que especial ao Pedro Ricardo Hamann por ter sido um amigo sem igual! De verdade, uma pessoa de personalidade e caráter ímpar. Sempre demonstrou boa vontade em ajudar e apoiou nos meus momentos de maior dificuldade! O Pedro foi como um tutor durante o projeto, sempre entrando em discussões que só acrescentavam e me faziam crescer durante esse trajeto. Uma pessoa mais que verdadeira que sempre se preocupou em estar do meu lado e ajudando em tudo o que podia. Jamais vou esquecer um singelo gesto de carinho que ele e a família tiveram comigo e com a minha família. Isso, para mim, foi algo que marcou e levarei para sempre na memória! Obrigado por tudo, mesmo sem saber o quanto suas palavras e ações me fizeram bem nas vezes que me encontrei sem saída.

Aos prezados membros da banca, por agregar valor ao meu trabalho. Suas considerações foram fundamentais para minha última formação acadêmica.

Por fim, as instituições de fomento e apoio a pesquisa, CNPQ, CAPES, FAP-DF pelo suporte financeiro.

Muito obrigado!

“The ability to work hard for days on end without losing focus is a talent. The ability to keep absorbing new information after many hours of study is a talent.”

— Garry Kasparov

Momentos difíceis na nossa vida são necessários para sabermos analisar e valorizar o que temos e quem temos.

— Fredson Costa

RESUMO

As bactérias possuem a capacidade de se adaptar a situações de estresse, expressando genes específicos que conferem resistência. No entanto, além dos genes responsáveis pela sobrevivência do microrganismo, é possível que outros genes assumam esse papel fisiológico na ausência dessa classe específica. A complexidade da fisiologia microbiana ainda não está totalmente compreendida. Certos genes, que expressam enzimas responsáveis pelo metabolismo de compostos aromáticos, podem adaptar-se a condições de estresse e conferir resistência a antibióticos. Nesse estudo, foram estudadas duas amostras do Bioma Cerrado identificando enzimas com interesse biotecnológico, sendo a primeira amostra o solo e a segunda intestino de cupim do Cerrado. Para a amostra de solo do Cerrado, foi identificado um clone metagenômico, em cepa de bactéria *Escherichia coli* EPI300, que conferiu resistência ao antibiótico carbenicilina, usada como biblioteca metagenômica, expressando uma dioxigenase, nomeada como CRB2(1)(1). Em relação a CRB2(1)(1), a enzima apresentou atividade ótima em pH 7 e temperatura de 30°C, utilizando íons de ferro como cofator para a clivagem do substrato ácido gentísico. A dinâmica catalítica do CRB2(1), o nome da dioxigenase estudada nesse trabalho, demonstrou valores de $V_{max} = 0,02281 \mu\text{M}/\text{min}$ e $K_M = 97,6$. O modelo tridimensional revelou a ligação do substrato ao domínio cupina, onde o sítio ativo está localizado. Os substratos analisados interagem diretamente com o íon ferro, coordenado por três resíduos de histidina. Alternativamente, a modificação da carga do íon de ferro pode alterar a ligação entre o sítio ativo e os substratos. Em se tratando de amostras do Cerrado, vale ressaltar que artrópodes são fontes naturais de uma complexidade de relações ecológicas entre microrganismos. Portanto, em um segundo momento, foram analisados o metagenoma de intestinos de cupim identificando assim novos genes de beta-lactamase. Para a amostra de intestino de cupim, a anotação do genoma revelou também genes envolvidos no metabolismo da hemicelulose, na produção de glicerol e um possível gene da β -lactamase. A taxonomia baseada nos genes scaffolds do metagenoma revelou que os membros do gênero *Acholeplasma* são mais abundantes em um determinado segmento intestinal do cupim. Dentro desse de *Acholeplasma* a análise computacional revelou beta-lactamases ainda não descritas em banco de dados. A metagenômica permite analisar o potencial genômico e suas aplicações biotecnológicas de vários organismos simultaneamente, com base na análise do metagenoma da amostra e atividade funcional. Atualmente, há uma demanda por enzimas com atividades oxidativas, principalmente em compostos considerados recalcitrantes, uma vez que são de difícil conversão para moléculas menores.

Palavras-chave: metagenômica, dioxigenase, beta-lactamase, resistência microbiana

ABSTRACT

Bacteria have the ability to adapt to stressful situations, expressing specific genes that confer resistance. However, in addition to the genes responsible for the survival of the microorganism, it is possible that other genes assume this physiological role in the absence of this specific class. The complexity of microbial physiology is still not fully understood. Certain genes, which express enzymes responsible for the metabolism of aromatic compounds, can adapt to stress conditions and confer resistance to antibiotics. In this study, two samples from the Cerrado Biome were studied, identifying enzymes with biotechnological interest, the first sample being the soil and the second intestine of termite from the Cerrado. For the Cerrado soil sample, a dioxigenase was identified, which conferred resistance to a strain of bacteria expressing the antibiotic carbenicillin, a beta-lactam. In addition, new beta-lactamase genes were isolated from the termite intestine. In the study, a new dioxigenase was characterized through metagenomic isolation of Cerrado soil. The enzyme showed optimal activity at pH 7 and temperature of 30°C, using iron ions as a cofactor for substrate cleavage. The catalytic dynamics of CRB2(1) demonstrated values of $V_{max} = 0.02281 \mu\text{M}/\text{min}$ and $K_M = 97.6$. The three-dimensional structure revealed substrate binding to the termite domain, where the active site is located. The analyzed substrates interact directly with the iron ion, coordinated by three histidine residues. Alternatively, modifying the iron ion charge can change the binding between the active site and substrates. For the termite intestine sample, genome annotation also revealed genes involved in hemicellulose metabolism, glycerol production and a possible β -lactamase gene. Taxonomy based on scaffold genes from the metgenome revealed that members of *Acholeplasma* are more abundant in the intestinal segment P3 than in P1. Within that of *Acholeplasma*, the computational analysis revealed beta-lactamases not yet described in the database. Metagenomics allows analyzing the biotechnological potential of several organisms simultaneously, based on sequence analysis and functional activity. Currently, there is a demand for enzymes with biotechnological activities of interest

Key words: metagenomics, dioxygenase, beta-lactamase, microbial resistance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore filogenética de CRB2(1) incluída na família de enzimas Gentisate da superfamília cupina-domained de extradiol dioxigenases. Em A, todas as enzimas já descritas conforme [22], mais a inclusão de CRB2(1). De acordo com o alinhamento e projeção da árvore, CRB2(1) está no cluster XIV em um novo galho, sugerindo sua singularidade em relação aos demais. Em B), há uma versão ampliada do ramal do qual o CRB2(1) faz parte. De acordo com [22], os clusters são definidos por análises bootstrap. Se houver algum representante desse cluster com um papel definido, haverá uma definição de um provável papel para o cluster.....32

Figura 2- Modelo de homologia de CRB2(1) e conformações de docking molecular. (A) Representação da superfície e estrutura secundária de CRB2(1) (rosa claro). O centro ferroso dos domínios cupina são representados pelos átomos Fe²⁺ (laranja) e resíduos de histidina (rosa e azul) 61, 63, 100, 102 (domínio N-cupina), 221, 223, 261 e 263 (domínio C-cupina). Interações de ancoragem molecular entre resíduos da cavidade do domínio N-cupina e (B) carbenicilina (verde), (C) Guaiacol (ciano) e (D) ácido gentísico (cinza) ..34

Figura 3. Etapas de expressão heteróloga e purificação em sistema *E. coli* de CRB2(1). Em A) nas cavidades do gel SDS-PAGE 1 e 2 temos a cepa de *E. coli* com o vetor de expressão pet24 intacto em suas fases insolúvel e solúvel respectivamente. Então, nos poços 3 e 4 temos a cepa de *E. coli* em suas fases insolúvel e solúvel com o gene CRB2(1). Há o acúmulo de proteína de tamanho de 40kDa indicando a expressão de CRB2(1). O último poço mostra a purificação de CRB2(1) pela coluna de afinidade Níquel para His-Tag da fração de expressão solúvel. Em B) há coloração com nitrato de prata com CRB2(1) purificado da fração solúvel, para identificar o grau de pureza da proteína expressa. Em C), há WESTERN-BLOT com anticorpo anti-HIS para transferência e confirmação da enzima purificada CRB2(1)...... 35

Figura 4. Caracterização bioquímica da atividade de CRB2(1). Em A), o pH ótimo da enzima CRB2(1) foi 7. Em pH 8 e 9, CRB2(1) apresentou atividade, porém com menor eficiência. Em B), a temperatura com maior atividade enzimática foi de 30°C. No entanto, o CRB2(1) mantém atividade relativa acima de 70% até uma temperatura de 50°C. Em C), o íon que tem maior influência na atividade é o ferro, seguido do cobre. A atividade das dioxigenases com diferentes íons já está descrita. Em D), CRB2(1) apresentou atividade enzimática por 120 minutos. Após este período, não foi identificada a formação de produto da reação catalítica..... 36

Figura 5. Regiões de aminoácidos que determinam o domínio beta-lactamase. De acordo com as anotações, os domínios de beta-lactamases estão incompletos. A sequência P31339 possui um segundo domínio de acetil-transferase..... 44

Figura 6: Análise filogenética da sequência das putativas Beta-lactamases em comparação com o banco de dados construído por P31339 e P32358 se encontram em um ramo diferente do grupo da classe C de beta-lactamases, indicando uma proximidade com o grupo. Isso se justifica principalmente pela presença de resíduos de aminoácidos que são exclusivos dessa sequência, encontrados na posição 276 à 361. P32358_2 se

encontra em um grupo das metalo beta-lactamases, enquanto PU357 se alinha à classe D de beta-lactamases 44

Figura 7: Análise filogenética da sequência da putativas Beta-lactamases P31339 e P32358 em comparação com o banco de dados curado manualmente de estruturas já resolvidas. P31339 e P32358 se encontram em um ramo diferente do grupo da classe C de beta-lactamases, indicando uma relação de diferenciação em relação as sequências já registradas em banco de dados.....45

Figura 8: Análise filogenética da sequência da putativas Beta-lactamase P32358_2 em comparação com o banco de dados curado manualmente de estruturas já resolvidas. P32358_2 se encontra em um ramo diferente do grupo. Apesar de estar relativamente próxima outras proteínas, o valor de bootstrap demonstra uma separação mais acentuada entre as sequências 46

Figura 9: Análise filogenética da sequência da putativas Beta-lactamases PU357 em comparação com o banco de dados curado manualmente de estruturas já resolvidas. PU357 se encontram em um ramo diferente do grupo da classe indicando uma relação de diferenciação em relação as sequencias já registradas em banco de dados.....46

Figura 10: Docking das proteínas P31339 e P32358. A coluna da esquerda mostra P31339 e da direita P32358. Na sequência, os ligantes com os prováveis sítios ativos de cada um: Ampicilina, Amoxicilina, Carbenicilina, Kanamicina e Streptomina. A P31339 como possui um segundo domínio, os ligantes: Ampicilina, Axocilina e Kanamicina, se ligam no domínio de Acetil-transferase.....49

Figura 11: Docking das proteínas P32358_2 e PU357. A coluna da esquerda mostra P31339 e da direita P32358. Na sequência, os ligantes com os prováveis sítios ativos de cada um: Ampicilina, Amoxicilina, Carbenicilina, Kanamicina e Streptomina.....50

Figura 12. A figura demonstra a presença do gene Beta-lactamase no intestino do cupim amostras. A figura a) mostra que o gene está presente na porção total, em P1 e P3, respectivamente. Embora o gene tenha sido identificado e anotado na porção P3, ele pode existir em outra porção do intestino. A Figura b) mostra que as amostras de Laid Lawen, usando dois pares de primers de controle para beta-lactamase (L1 e L2), não possuem o gene P.Blac, sugerindo que já sequências caracterizadas de beta-lactamases de *Acholeplasma* não estão presentes em *S. wheeleri*. Para amostras de intestino de cupinas, P.Blac é amplificado tanto na porção total do intestino quanto na porção P3, onde foi anotado..... 52

Figura 13. Esquema das porções existentes do intestino do cupim *S. wheeleri*. Para amostras de intestino de cupinas, *P.Blac* é amplificado tanto na porção total do intestino quanto na porção P3, onde foi anotado 53

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - Temperatura Celsius

ARGO – Antibiotic Resistance Genes Online

ARGs – Antibiotic Resistance Genes

CARD – Comprehensive Antibiotic Resistance Database

Cm - centímetro

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

E. coli – *Escherichia coli*

FeCl₃ – Cloreto de Ferro

HCL – Ácido clorídrico

Kcat – Constante cinética

LB – Luria Bertani

M - Molar

ML - Mililitros

mM - Milimolar

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

nM – Nanomolar

ORFs – Open Reading Frame

p/v - Parte por volume

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

SDS-page - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio

µg - Micrograma

µL – Microlitro

µmol - micromol

V - Volume

V_{max} – Velocidade máxima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Metagenômica funcional e baseada em sequências	16
2.2 Cerrado: um hotspot de biodiversidade	17
2.3 Solo e sua diversidade taxonômica	18
2.4 Riqueza taxonômica de microrganismos simbioses de artrópodes.....	19
2.5 Prospecção de enzimas com interesse biotecnológico.	20
2.6 Dioxigenases e CRB2(1).....	22
3. JUSTIFICATIVA.....	23

CAPÍTULO 1 ABORDAGEM DA METAGENÔMICA FUNCIONAL CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA DIOXIGENASE ISOLADA DE SOLO DE CERRADO.

4. OBJETIVOS.....	25
4.1 Objetivo geral	25
4.2 Objetivos específicos	25
5. METODOLOGIA.....	25
5.1 Biblioteca metagenômica, identificação, isolamento de CRB	25
5.2 Árvore filogenética da CRB2(1) com proteínas da Família Gentsato....	25
5.3 Modelagem Modelagem de homologia da estrutura tridimensional e análise de docking molecular	26
5.4 Transformação, expressão e purificação	26
5.5 <i>Western Blotting</i>	27
5.6 Atividade enzimática, coeficiente de extinção molar e concentração de proteína	28
5.7 Temperatura, pH, termoestabilidade e efeito de íons nadioxigenase	28
5.8 Cinética enzimática	29
6. RESULTADOS	
6.1 Árvore filogenética	30
6.2 Domínios conservados CRB2(1) e Modelagem tridimensional e docking	32
6.3 Transformação, expressão e purificação	33
6.4 Caracterização Bioquímica de CRB2(1).....	34
7. DISCUSSÃO.....	36

CAPÍTULO 2 ABORDAGEM METAGENÔMICA BASEADA EM SEQUÊNCIAS PARA ESTUDO DE BETA-LACTAMASES DE ACHOLEPLASMA

8 OBJETIVOS.....	39
8.1 Objetivo geral	39

8.2	Objetivos específicos	39
9.	METODOLOGIA	39
9.1	Montagem dos genomas a partir do metagenoma de intestino de cupim	
	Construção da árvore filogenética.....	39
9.2	Seleção de putativas beta-lactamases.....	40
9.3	Análises filogenéticas das sequências de beta-lactamases	40
9.4	Modelagem, predição do sítio ativo das putativas beta-lactamases	40
9.5	Amplificação da P.Blac ao longo do intestino de cupim	41
10.	RESULTADOS	E
	DISCUSSÃO.....	44
11.	CONCLUSÕES.....	54
12.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
13.	ANEXOS.....	62
14.	PRODUÇÃO	O
	DOUTORADO	65

1. INTRODUÇÃO

A microbiota do solo apresenta uma grande diversidade de microrganismos. Consequentemente, suas relações ecológicas e fisiológicas inexploradas têm grande potencial para a descoberta de novos genes de resistência a antibióticos (ARGs – Antibiotic Resistance Genes) (Zhang *et al.*, 2021). A disseminação desses genes produz um efeito catastrófico na saúde pública, uma vez que multirresistentes são capazes de resistir aos antibióticos disponíveis, de modo a prejudicar o tratamento de doenças infecciosas (Zhang *et al.*, 2022). A estratégia metagenômica, aliada à análise bioinformática, tem a possibilidade de elucidar e entender a relação entre os genes e sua função na célula, bem como traçar estratégias para a vigilância e terapias contra bactérias resistentes a antibióticos. (Karthikeyan *et al.*, 2021).

Esses genes estão presentes nos mais variados microbiomas. Onde existe uma comunidade microbiana, os genes de resistência estarão presentes, seja solo, água, regiões salinas, até mesmo intestino de animais (Aalismail *et al.*, 2019; Forsberg *et al.*, 2019). Cada comunidade possui relações intraespecíficas e interespecíficas em seu habitat, podendo ser tanto harmônicas quanto desarmônicas. Por serem abundantes em diferentes habitats, um bioma pode abrigar diferentes comunidades microbianas ainda pouco exploradas e compreendidas. Portanto, o Cerrado abriga milhões de microrganismos que estão em uma rede complexa de interações em diferentes regiões desse bioma demonstrando um potencial ambiente de exploração de genes (de Castro *et al.*, 2011; Hofmann *et al.*, 2021).

Dentro das riquezas de diversidade existentes no Cerrado, destacam-se a variedade de insetos abundantes nesse bioma, bem como o próprio solo. Isso se justifica pela abundância taxonômica microbiana encontrada nesses ecossistemas, uma vez que em insetos, existem uma quantidade enorme de variáveis que afetam microrganismos endossimbiontes (de Castro *et al.*, 2011)(Rafiqi *et al.*, 2022) . Conquanto, o solo é o maior ecossistema que abriga a maior diversidade de microrganismos comparado com outros ambientes. Vale ressaltar que insetos que possuem uma alimentação baseada em resíduos vegetais que naturalmente estão em contato com o solo, aumenta a possibilidade do encontro desses microrganismos do trato digestório do inseto com os que vem do solo (González-Plaza *et al.*, 2018; McMillan *et al.*, 2019).

O solo é o produto final de processos de decomposição da rocha original, ou até mesmo, combinações de rochas, vulcânicas, sedimentares, ígneas. Durante seu processo de formação, várias camadas são formadas, em composições diferentes. Dentre essas camadas, as que mais vão apresentar microrganismos são as mais superficiais, por apresentarem maior quantidade de matéria orgânica (Karthikeyan *et al.*, 2021; Pang *et al.*, 2021).

Devido a sua diversidade microbiana, e consequentemente genética, o solo é um

ambiente muito complexo no que se diz respeito a interações ecológicas entre os organismos desse nicho (Li, Yang *et al.*, 2022) Obviamente, o solo abriga não só microrganismos, mas também espécies mais complexas que interagem constantemente. Um filo de organismos que possuem interações constantes com o solo é dos artrópodes. Diversas espécies de artrópodes estão diretamente em contato com o solo, o que possibilita um mecanismo de interações entre espécies de microrganismos que são originais do solo com aqueles que estão presentes de maneira mutualística com esses invertebrados (Schlachter *et al.*, 2019).

Os cupins são os artrópodes mais abundantes nos ecossistemas de solo tropical, contribuindo para a reciclagem da matéria orgânica. Sua capacidade de digerir compostos celulósicos se deve à relação de digestão simbiótica com sua microbiota intestinal. Taxonomicamente, os cupins pertencentes à família Termitidae são classificados como superiores (Tokuda *et al.* 2001) e abrigam uma comunidade exclusivamente bacteriana (Lima *et al.*, 2020). Seu intestino compartimentado é diferenciado em cinco segmentos (P1-P5) que variam de acordo com a distribuição do nicho microbiano e o gradiente de oxigênio. Estudos anteriores mostraram que o influxo de oxigênio penetra no conteúdo periférico do intestino posterior através da superfície epitelial. Parece então lógico que apenas as regiões intestinais dilatadas (P1 e P3) possam apresentar condições anóxicas em sua região mais interna. Outra peculiaridade é a extrema alcalinização ($\text{pH} > 12$) do intestino posterior anterior (P1), que promove processos autoxidativos (Santana *et al.*, 2015).

Por fim, este trabalho tem como foco o estudo de amostras metagenômicas por diferentes abordagens e diferentes amostras. Por esse motivo, o trabalho irá se dividir em dois capítulos já que existe duas abordagens em amostras diferentes. No entanto, o cerne do trabalho está na elucidação de genes de resistência a antibióticos em amostras do Cerrado, sendo solo e intestino de cupim.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Metagenômica funcional e baseada em sequências

A metagenômica é uma técnica capaz de identificar os genes existentes em uma determinada amostra ambiental. Isso é um avanço nas pesquisas já que é uma técnica que independe de meio de cultivo de microorganismo (de Abreu; Perdigão; Almeida, 2021). Tal metodologia se torna aliada aos estudos porque em amostras ambientais, apenas uma pequena parte dos microrganismos são passíveis de se cultivar *in vitro* (Patel *et al.*, 2022).

Estima-se que o número de microrganismos existentes no planeta seja por volta de 10^{30} , sendo que uma boa parcela desse total seja de procariotos. Por serem bem diversificados e apresentar características únicas, os microrganismos acabam possuindo um reservatório genético para a exploração de enzimas com potencial biotecnológico (Adewale *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2018).

As técnicas tradicionais ou convencionais de laboratório não permitem a exploração de maneira eficiente dessa diversidade genética. Não somente de logística e recursos laboratoriais, como também diferentes condições para o cultivo, tais como: níveis de oxigênio, condições climáticas, nutrientes específicos de determinados ambientes, controle osmótico, interações entre outros organismos, e tantos outros (Zhang *et al.*, 2021).

A busca por metodologias independentes de cultivo vem sendo cada vez mais necessárias para conseguir otimizar os estudos dos microrganismos e seu potencial biotecnológico (Zhang *et al.*, 2021b). A metagenômica possui duas abordagens: a baseada em sequências e a funcional (Li, Wenjun *et al.*, 2022). A primeira se baseia na análise do DNA genômico ambiental, predizendo sequências dos genes e inferindo a ecologia dos microrganismos baseado em seu arcabouço genético (Santos-Pereira *et al.*, 2023). Metabarcoding e sequenciamento shotgun são duas técnicas moleculares usadas para analisar a biodiversidade, com diferenças importantes em sua abordagem e resolução.

O Metabarcoding envolve amplificar e sequenciar um marcador de DNA específico (por exemplo, 16S rRNA, COI), que é então comparado com bancos de dados de referência para identificação taxonômica. Este método é altamente direcionado, mas limitado pela escolha do marcador, muitas vezes faltando espécies não-alvo. Em contraste, o sequenciamento shotgun sequencia todo o DNA de uma amostra sem seleção prévia de marcadores específicos, fornecendo uma visão mais abrangente da diversidade taxonômica e funcional. Embora o metabarcoding seja mais rápido e mais econômico para perfis taxonômicos específicos, o sequenciamento shotgun oferece maior resolução, capturando interações microbianas complexas, funções genéticas e genomas inteiros, embora a um custo e complexidade mais elevados.

A abordagem da metagenômica funcional se baseia em extrair o DNA genômico total de um ambiente e clonar em cepas de bactérias para expressão heteróloga dos genes, submetidos a uma condição de interesse biotecnológico, como por exemplo, clonar as cepas transformadas em placas contendo hidrocarbonetos (dos Santos et al., 2015).

Os resultados identificados nas amostras ambientais são comparados com banco de dados gênicos, utilizando ferramentas de bioinformática, tanto para a abordagem funcional quanto para baseada em sequência. Dessa forma, é possível relacionar por meio análises *in silico* sequências genéticas e identificar suas prováveis funções na célula (Li, Wenjun et al., 2022;

Santos-Pereira et al., 2023.

É de fundamental necessidade a existência de bancos de dados, e que estejam em constante atualização, justamente pela demanda de comparação das novas sequências encontradas em estudos metagenômicos (Bharti; Grimm, 2021; Liu *et al.*, 2022). Contudo, há um certo viés com a quantidade de anotações genômica realizada ao longo dos anos. A maior parte das sequências anotadas vem a partir de outras também anotadas, em outras palavras, a parte experimental vem sendo cada vez mais deixada de lado. Apesar da robustez da predição dos softwares, existe ainda uma cautela sobre as funções observadas experimentalmente. Dessa forma, a metagenômica funcional se torna essencial, já que sua abordagem contribui com a parte experimental dos genes e proteínas encontrados (Bharti; Grimm, 2021; Liu *et al.*, 2022).

Por isso, este trabalho possui como pilar principal, explorar as diferentes abordagens metagenômicas e, caracterizar bioquimicamente uma dioxigenase encontrada pela abordagem funcional em amostras do solo do Cerrado. Bem como analisar recursos genéticos e metabólicos existentes em microrganismos simbiotes de intestino de artrópodes, a fim de identificar possíveis genes com interesse biotecnológico.

2.2. Cerrado: um hotspot de biodiversidade

O Brasil é um país com alta diversidade de espécies, tanto vegetais quanto animais. Sendo um país de proporções continentais apresentando biomas característicos que compõem essa biodiversidade total. O Cerrado é um bioma brasileiro de destaque, uma vez que ocupa uma extensa proporção do territorial, cerca de 23%, sendo o segundo maior bioma brasileiro. Não obstante, o Cerrado se destaca como um bioma importante do país, não somente pelo setor econômico como também abriga uma alta biodiversidade de espécies (Colli; Vieira; Dianese, 2020).

O bioma Cerrado é caracterizado por diferentes fitofisionomias, o que ocasiona diferentes microclimas em sua disposição geográfica. De maneira geral, o clima do Cerrado é definido como tropical sazonal, com duas temporadas bem características e definidas, uma seca de maio a setembro e uma estação chuvosa de outubro a abril. Contudo, existem os microclimas de cada tipo de vegetação que proporciona diferentes habitats e nichos para as mais diversas espécies (Amaral *et al.*, 2017).

Dentro desse bioma, diferentes fitofisionomias compõem a vasta diversidade de espécies tanto microbiológicas e macrobiológicas, divididas em diferentes formações: savânicas, campestres e florestais (Calixto Júnior *et al.*, 2021). Cada uma delas possui recursos hídricos diferentes, vegetações diferentes, o que cria diversos habitats e nichos para uma taxonomia diversificada (Durigan; Hermógenes de Freitas; Rodrigues, 1994).

O Cerrado por suas características físico-químicas precisa de correção dos níveis de acidez para sua utilização no setor agrícola. Após esse processo, conhecido como calagem, o solo do Cerrado se torna um excelente ambiente para monoculturas em larga escala. Aproximadamente, seis a cada 10 hectares são propícios para agriculturas. Isso acarretou um decréscimo da área nativa desse bioma ao longo dos anos. Economicamente, as atividades pecuárias e cultivo de grãos representa um quarto da produção nacional, somente no bioma Cerrado. Graças a sua versatilidade para atividades agropecuárias, mais da metade da sua extensão territorial já foi degradada para essas produções. Por isso, atualmente existe uma enorme pressão para a conservação e manutenção desse bioma (Durigan; Hermógenes de Freitas; Rodrigues, 1994; Matos *et al.*, 2020).

Além disso, naturalmente é característica desse bioma as queimadas. Isso provoca grandes prejuízos à biodiversidade. Há algumas estimativas que uma entre cinco espécies endêmicas do Cerrado consigam sobreviver nas áreas protegidas. Graças a políticas de conservação, existem pequenas áreas protegidas (Durigan; Hermógenes de Freitas; Rodrigues, 1994). No entanto, isso aumenta a necessidade de ampliação de medidas protetivas, a fim de garantir a manutenção e equilíbrio ecológico e atividades humanas. Com isso, tem-se que apenas uma pequena parcela do potencial biológico e biotecnológico foi explorado desse bioma. Sua diversidade ecológica e sua importância ambiental exerce um fundamental equilíbrio natural em muitas espécies existentes no Cerrado (Rodrigues *et al.*, 2022).

Portanto, explorar os diversos nichos genéticos é fundamental para a obtenção de novas aplicações ou processos biológicos capazes de suprir a demanda em diversos setores como: industrial, farmacêutico, científico; bem como ajudar a compreender a complexa rede de interações ecológicas presentes nesse bioma. Esses habitats revelam importantes nichos e reservatórios genéticos com uma complexa rede de interações entre os microrganismos que vivem nesses locais.

2.3. Solo e sua diversidade taxonômica microbiana

O solo é o produto de processos de decomposição da rocha original, ou até mesmo, combinações de rochas, vulcânicas, sedimentares, ígneas. Durante seu processo de formação, várias camadas são formadas, apresentando em umas composições diferentes. Dentre essas camadas, as que mais vão apresentar microrganismos são as mais superficiais, por apresentarem maior quantidade de matéria orgânica. No entanto, apenas uma pequena fração dos microrganismos é cultivável (Li, Yang *et al.*, 2022).

Em especial, o solo do Cerrado possui características físico-químicas bem particulares, como: riqueza de alumínio, pobreza de nutrientes, pH mais ácido. Apesar dessas

características gerais, cada fitofisionomia do Cerrado pode apresentar oscilações físico-químicas devido suas peculiaridades de micro-clima, vegetação e entre outros fatores abióticos e bióticos. Do mesmo modo, o impacto ambiental pode levar a maiores alterações na composição temporária das espécies de microrganismos. Levando ainda em consideração que é possível restabelecer o microbioma por eventuais processos de sucessão ecológica.

Em um contexto geral, já foi descrito em alguns trabalhos a composição do microbioma de algumas amostras do solo de Cerrado, como já descrito em (de Castro *et al.*, 2011; dos Santos *et al.*, 2015; Procópio; Barreto, 2021). Os filos de bactéria mais representativos nas amostras estudadas foram: Proteobacteria, Verrucomicrobia, Acidobacteria. Devido a sua diversidade microbiana, e conseqüentemente genética, o solo é um ambiente muito complexo no que se diz respeito a interações ecológicas entre os organismos desse nicho. Dentro dessas relações, uma que se destaca é a competição, uma vez que microrganismos competem para garantir a obtenção dos melhores recursos (Vuong; Zeng; Man, 2020).

Uma classe de produtos da relação de competição é a expressão de proteínas com função antibiótica, nocivos a outros microrganismos. Em resposta, os competidores ativam genes de resistência contra os antibióticos, na medida que as substâncias entram em contato com a célula (Sanderson *et al.*, 2016).

Nesse sentido, o solo possui um papel fundamental na composição do conjunto de genes de resistência, e, portanto, um potencial para a exploração de novos antibióticos para uso terapêutico (Vaz-Moreira; Nunes; Manaia, 2014). Compreender a relação sobre a produção e função dos genes de resistência a antibióticos é de interesse para a saúde pública. Já que, não necessariamente os genes que promovem resistência possuem essa função exclusiva. Em outras palavras, é possível que esses genes estejam direcionados para outros mecanismos celulares, além da conhecida função de resistência (Jiang *et al.*, 2018).

A fim de elucidar e relacionar a conexão de genes de resistência entre ambientes variados, técnicas biotecnológicas como metagenômica e bioinformática são utilizadas com o intuito de identificar as regiões gênicas comuns a partir do DNA total de uma determinada amostra em distintos habitats.

2.4. Riqueza taxonômica de microrganismos simbiotes de artrópodes

A fim de compreender a dinâmica de um ecossistema, vale ressaltar a importância da biodiversidade para esse processo, sendo incluídos principalmente os microrganismos. Afinal, são os principais personagens para a reciclagem dos elementos envolvidos nos processos biogeoquímicos (Lima *et al.*, 2020; Santana *et al.*, 2015; Schapheer; Pellens; Scherson, 2021).

A comunidade microbiana pode ser classificada em dois grupos principais: de vida

livre e aqueles que estão associados a outros organismos (Cornwallis *et al.*, 2023). Indivíduos multi e pluricelulares tem associação com microrganismos. A interação com seus hospedeiros permite uma dinâmica diferenciada e que talvez não seria compatível com a sobrevivência do hospedeiro caso ela não existisse (Duron; Hurst, 2013).

No caso de invertebrados terrestres, essa interação dos microrganismos simbiotes com seus hospedeiros tem papel fundamental na reciclagem de matéria orgânica tanto animal quanto vegetal. A microbiota participa ativamente de processos biológicos como: nutrição, reprodução entre outros. A alteração do equilíbrio microbiológico do hospedeiro pode acarretar prejuízos a sua saúde e pode provocar ao detrimento de tecidos do organismo pluricelular (Cornwallis *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2023).

Juntamente com a fisiologia do artrópode, os microrganismos simbiotes ajudam nos processos de digestão de matéria orgânica, liberando um complexo enzimático que atua na desconstrução de biopolímeros (Guéganton *et al.*, 2022). São várias espécies que se beneficiam dessa relação ecológica com microrganismos, tais como: formigas, besouros, miriápodes, baratas, cupins, os famosos tatuzinhos de jardim, entre outros (Zhao; Lin; Guo, 2022).

Os cupins são insetos xilófagos, que se alimentam de matéria lignocelulósica. São capazes de consumir celulose e lignina graças à interação com os microrganismos simbióticos (Curtis; Sperandio, 2011). Existe uma diversidade microbiana nesse microbioma, constituído de procariotos e eucariotos. O táxon Flagellatos são responsáveis pela quebra de celulose, enquanto os procariotos contribuem para os outros componentes do material lignocelulósico. Já foi demonstrado que essa associação de cupins e microrganismos é capaz de biodegradar 10% de carbono do solo (Aubé *et al.*, 2022; Duron; Hurst, 2013; Zhao; Lin; Guo, 2022).

Já existem trabalhos que demonstram uma diversidade taxonômica de microrganismos simbiotes de cupim: Firmicutes, Bacteroidetes e Spirochaetes. Justamente por haver sempre uma introdução de microrganismos de solo no intestino de cupim, aumenta a incidência de competição entre essas espécies (Guimaraes *et al.*, 2020). Graças a essa disputa natural, várias respostas biológicas são ativadas para possibilitar a sobrevivência das espécies. Nesse contexto, os genes de resistência a antibióticos permitem que as bactérias suportem esse estresse biótico.

2.5. Prospecção de enzimas com interesse biotecnológico

Tanto o solo como os artrópodes possuem uma riqueza de microbiomas que podem ser explorados em nível genômico. Várias classes de enzimas já são identificáveis por estudos metagenômicos, lipases, dioxigenases, celulases, proteases, entre várias outras. Vários genes aparecem e desaparecem conforme a força de seleção natural, o que indica adaptabilidade gênica dos microrganismos (Prayogo *et al.*, 2020; Wani *et al.*, 2022).

A importância de descrever e caracterizar essas enzimas reside no fato de sua aplicação biotecnológica. Diversas enzimas são utilizadas na indústria, como por exemplo: celulases e amilases para remoção de óleos, lipases são utilizadas para produção de biodiesel e diversas outras (Patel *et al.*, 2022; Robinson, 2015).

Como os microrganismos estão em constantes interações ecológicas, principalmente de competição, seja interespecífica ou intraespecífica, se destacam a presença de genes que permitem a sobrevivência desses microrganismos frente a uma série de toxinas ou outros compostos liberados por seus competidores naturais (Hadi *et al.*, 2021). Graças a essa interação, é possível identificar enzimas, genes, metabólicos que sejam eficientes ou no combate ou na defesa dos microrganismos (Belanger *et al.*, 2022).

Os genes são conhecidos como ARGs (Antibiotic Resistance Genes) e são responsáveis por conferir o fenótipo de resistência microbiana a diferentes tipos de estresses bióticos são conhecidos como genes de resistência a antibióticos (Tóth *et al.*, 2023). Esses genes podem ser transferidos lateralmente e horizontalmente entre as espécies de microrganismos. A existência desses genes já era conhecida, no entanto, existe uma dinâmica no comportamento desses genes em relação ao seu aparecimento e sobretudo sua dispersão ao longo do ambiente (Zhang *et al.*, 2022a).

Existem diferentes tipos de ARGs que atuam de diferentes maneiras nas células, betalactâmicos por exemplo atuam na parede celular, outras ARGs possuem estratégias de inativação das moléculas, bombas de efluxo que secretam os antibióticos para fora da célula e entre outros (Larsson; Flach, 2022).

Análises ambientais mostram a existência de ARGs em diferentes ambientes, entre eles: solo, água, sedimentos; e em todos existe a possibilidade de transferência horizontal de genes. Estudos relatam que os ARGs são considerados potenciais poluentes ambientais e por conta disso atraem atenção de pesquisadores (Larsson; Flach, 2022; Tóth *et al.*, 2023). Isso se justifica pela capacidade desses genes serem os contaminantes e chegar a rede urbana. Portanto, levariam a capacidade da multirresistência para microrganismos patogênicos nos centros urbanos. De acordo com (Vaz-Moreira; Nunes; Manaia, 2014); há hipóteses de que o ciclo de água urbana, juntamente com espécies de organismos superiores possam representar uma rede de conexão entre

diferentes matrizes ambientais.

Existem bancos de dados específicos para caracterização de uma provável sequência de ARGs, como por exemplo: CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance DataBase) (Alcock *et al.*, 2023), ARGO (Antibiotic Resistance Genes Online) (Scaria; Chandramouli; Verma, 2005). Dentre esses o ARGO foca em vancomicina e beta lactâmicos. Além disso, é possível filtrar por sequências curadas manualmente, porém há uma dificuldade de procurar por dados em uma vasta literatura, uma vez que bancos de dados requerem uma grande quantidade de sequências para que seja um banco com uma maior precisão.

Uma vez encontrada uma sequência de interesse biotecnológico, existe a demanda por ensaios bioquímicos para caracterização dessas proteínas ou outras moléculas. Isso abastece e fortalece a predição de sequências pelos softwares e banco de dados em estudos posteriores.

2.6. Dioxigenases e a CRB2(1)

As dioxigenases são um grupo importante de enzimas que catalisam a incorporação de átomos de oxigênio molecular em substratos orgânicos. Estas enzimas desempenham papéis cruciais em várias vias metabólicas, incluindo a degradação de compostos aromáticos e a biossíntese de metabólitos secundários. A compreensão detalhada das dioxigenases, incluindo sua estrutura, mecanismo de ação, classificação e aplicações biotecnológicas, é essencial para o avanço da biotecnologia (Kimura *et al.* 2006).

Essas enzimas, geralmente, contêm um sítio ativo que possui íons, como ferro ou cobre, que são essenciais para a ativação do oxigênio molecular. O mecanismo de ação das dioxigenases envolve a ligação do oxigênio molecular ao íon no sítio ativo, seguida pela ativação e inserção do oxigênio no substrato. Este processo é mediado por uma série de estados de oxidação e rearranjos eletrônicos que permitem a oxidação específica e eficiente dos compostos orgânicos (Lee *et al.* 2011).

As dioxigenases são amplamente classificadas em duas categorias principais com base na posição da inserção de oxigênio no substrato aromático: intradiol e extradiol. As classificadas como dioxigenases intradiol catalisam a clivagem do anel aromático entre dois grupos hidroxila. Já as dioxigenases extradiol catalisam a clivagem do anel aromático entre um grupo hidroxila e uma ligação dupla adjacente. As extradiol dioxigenases têm uma maior diversidade de substratos comparadas às intradiol (Schlachter *et al.* 2019; Sidhu *et al.* 2019).

As dioxigenases têm aplicações biotecnológicas significativas, particularmente nas áreas de bioremediação devido à sua capacidade de degradar compostos aromáticos recalcitrantes. Elas podem ser empregadas no tratamento de solos e águas contaminadas por poluentes orgânicos, como benzeno, tolueno, xilenos e HPAs. Estas enzimas transformam compostos tóxicos em

produtos menos nocivos, facilitando sua remoção do ambiente (Huang et al. 2015; Werwath 1998).

Alternativamente, essas enzimas podem ser aplicadas na engenharia de vias metabólicas para a produção de biocombustíveis e bioplásticos. A inserção de genes codificantes para dioxigenases em microrganismos pode aumentar a eficiência de processos biotecnológicos, permitindo a conversão de resíduos orgânicos em produtos úteis de forma sustentável (Hernández-Ortega et al. 2015; Kałduńska et al. 2021).

As dioxigenases representam uma classe de enzimas com um potencial biotecnológico extraordinário. Sua capacidade de catalisar reações de oxidação complexas e específicas as torna ferramentas indispensáveis em diversas aplicações industriais e ambientais. O avanço no entendimento de sua estrutura, mecanismos de ação e papel em vias metabólicas é fundamental para explorar plenamente suas capacidades e desenvolver novas tecnologias (Adewale et al. 2021; Mark R. HarpelS and John D. Lipscomb 1990).

As gentisato dioxigenases são uma classe específica de enzimas dentro da família das dioxigenases, que desempenham um papel crucial na degradação de compostos aromáticos, particularmente os ácidos fenólicos, em diversos ambientes. Essas enzimas catalisam a incorporação de duas moléculas de oxigênio em seus substratos, resultando na abertura da estrutura aromática e, conseqüentemente, na formação de produtos que são mais facilmente assimilados por organismos (Werwath 1998)

O mecanismo de ação dessas enzimas geralmente envolve a coordenação de um íon metálico, frequentemente ferro, no centro ativo da enzima. Este íon metálico facilita a ativação do oxigênio molecular, permitindo a sua reação com o substrato. A seqüência do evento pode ser descrita em várias etapas, incluindo a formação de um complexo de enzima-substrato, a ativação do oxigênio molecular e a clivagem do anel aromático, culminando na formação do produto final (Subbotina et al. 2021).

As gentisato dioxigenases são de grande interesse biotecnológico devido à sua capacidade de degradar compostos aromáticos, que são comuns poluentes ambientais. Compostos como fenóis, cresóis e outros derivados aromáticos são frequentemente encontrados em efluentes industriais e representam um risco significativo para o meio ambiente devido à sua toxicidade e persistência (Asimakoula et al. 2022).

Além disso, nosso grupo de pesquisa identificou que uma dioxigenase isolada do solo do Cerrado foi responsável por conferir a um clone metagenômico a resistência ao antibiótico carbenicilina, denominada CRB2(1)(1), em *Escherichia coli*. Análises estruturais e enzimáticas indicaram que o inserto é uma extradiol dioxigenase com domínio bicupina, provavelmente uma gentisato 1,2-dioxigenase (GDO). Essas enzimas são cruciais no metabolismo de compostos aromáticos, destacando seu potencial para aplicações em biorremediação. Esse achado revela uma nova função pouco explorada na literatura, onde proteínas de outras vias metabólicas demonstram

capacidades *in vitro* diferentes das esperadas por estudos de seus genomas e proteomas (de Castro et al. 2011; dos Santos et al. 2015).

3. JUSTIFICATIVA

Um grande avanço no tratamento de doenças causadas por microrganismos foi a descoberta de antibióticos. No entanto, algumas bactérias desenvolveram a característica de se tornarem resistentes a esses agentes, demonstrando a capacidade de adaptação perante condições desfavoráveis. Para tanto, a compreensão da disseminação de ARGs pode favorecer e contribuir com o entendimento sobre resistomas dos microrganismos (Larsson; Flach, 2022; Zhang et al., 2022a). Dessa forma, é possível aumentar a busca por uma variedade de antibióticos de origem ambiental.

Muitos estudos demonstram a importância da ecologia microbiana ambiental no aparecimento de ARGs. Não obstante, esses genes podem codificar proteínas que possuam afinidade com mais de um substrato. Dessa forma, é possível utilizar esses genes para aplicações biotecnológicas, uma vez as ARGs podem apresentar dualidade de função. Portanto, o solo ter uma variedade de comunidade de microrganismos se torna um candidato fundamental para o aparecimento de genes de interesse biotecnológico e terapêutico (Cifuentes-Croquevielle; Stanton; Armesto, 2020; de Araujo *et al.*, 2018).

O solo é um ambiente que apresenta uma biodiversidade microbiana vasta e complexa. Por suas características físico-químicas, comporta uma variedade de microrganismos. Não obstante, a disponibilidade de matéria orgânica é relativamente alta, favorecendo o aparecimento de microrganismos heterótrofos. No entanto, existem outros fatores, como por exemplo: a textura, estrutura, componentes do solo, que afetam a distribuição dos microrganismos. Porém, mesmo variando suas características, solos desérticos, úmidos, áridos, todos possuem uma rica biodiversidade microbiana.

Interagindo com esse fator abiótico, existem seres vivos em diferentes níveis de organização e tróficos. Dentro desse contexto, os cupins, artrópodes da classe insecta, se destacam por estarem inseridos em diferentes papéis de importância ecológica em seu nicho. São organismos que vivem no solo, se alimentando de matéria orgânica vegetal. Existem em diferentes locais, possuindo uma variedade de espécies, sendo encontrados inclusive em regiões áridas.

O sucesso da disseminação do cupim tem relação direta com a relação ecológica e os microrganismos simbiotes que habitam o intestino. Existe uma grande diversidade de espécies simbiotes que auxiliam no processo de absorção de matéria orgânica vegetal dentro do corpo do cupim. Ecologicamente, essa associação permite uma interação com o solo ocasionando mudanças do solo, vegetação e eventualmente a paisagem. Não obstante, a associação simbiótica

influência na diversidade microbiana do solo bem como na diversidade de espécies vegetais.

Portanto, esse trabalho se justifica pela compreensão e caracterização de uma dioxigenase encontrada em solo do Cerrado, bem como explorar o potencial genético de microbioma dos simbioses de intestino de cupim. A partir desse momento, a tese se divide em dois capítulos. Isso é motivado pelas diferenças de análises realizadas para cada tipo de amostra, da mesma sorte, seguem abordagens metagenômicas distintas.

**ABORDAGEM DA METAGENÔMICA FUNCIONAL
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA DIOXIGENASE ISOLADA DE
SOLO DE CERRADO.**

4. OBJETIVO

Identificar genes associados à resistência microbiana das bibliotecas metagenômicas isoladas de solo do Cerrado, a fim de caracterizá-los bioquimicamente, explorando também suas características biorremediadoras quando presentes

4.1. Objetivos específicos

1. Identificação por bioinformática das ORFs (Open Reading Frames) na biblioteca metagenômica
2. Transformação de cepas de *Escherichia coli* com o plasmídeo pet24-a contendo o gene da CRB2(1) identificado na biblioteca.
3. Expressar em sistema heterólogo de bactéria *E. coli* o gene da CRB2(1)
4. Purificar a CRB2(1) em colunas de cromatografia
5. Caracterizar a proteína bioquimicamente

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Biblioteca metagenômica, identificação, isolamento de CRB2(1)

A construção da biblioteca metagenômica, a identificação da resistência e o isolamento do fenótipo CRB2(1) foram descritos em estudos anteriores (de Castro et al., 2011; dos Santos et al., 2015). Foram construídas duas bibliotecas metagenômicas com amostras de solo do Cerrado stricto sensu para isolar clones resistentes a nove antibióticos β -lactâmicos, incluindo amoxicilina, ampicilina, carbenicilina, entre outros. No total, foram isolados 62 clones resistentes a cinco dos nove antibióticos testados, em bibliotecas de pequenos e grandes insertos. Quatro clones de pequenos insertos (AMX3, CFX12, CRB2 e PG17) foram selecionados para testes subsequentes. Esses clones demonstraram resistência a múltiplos antibióticos e tiveram sua concentração inibitória mínima determinada. Sequenciamento revelou ORFs relacionados à resistência antimicrobiana, biorremediação de solos e sinalização microbiana. Essas sequências

Manuscrito submetido em forma modificada para a revista Enzyme and Microbial Technology

foram selecionadas para estudos posteriores.

5.2 *Árvore filogenética*

A sequência de aminoácidos da CRB2(1)(1) foi alinhada com um banco de dados de dioxigenase curado com o domínio cupina do banco de dados AromaDeg (Duarte *et al.*, 2014). O alinhamento da sequência de proteínas foi realizado no MAFFT v.7.427 (Katoh, 2002) usando parâmetros padrão. O alinhamento de múltiplas sequências do banco de dados com a dioxigenase foi aparado usando o software trimAl v1.4.rev22 (Capella-Gutierrez; Silla-Martinez; Gabaldon, 2009) com parâmetros padrão. Posteriormente, uma árvore filogenética de máxima similaridade foi construída usando FastTree v.2.1.11 (Price; Dehal; Arkin, 2009) com parâmetros padrão e um teste de 1000 bootstrap.

5.3 *Modelagem de homologia da estrutura tridimensional e análise de docking molecular*

Um modelo 3D de CRB2(1) foi construído usando o software Modeller v9.22 (Webb; Sali, 2016) com base na estrutura cristalina da gentisate 1,2-dioxigenase de *Silicibacter pomeroyi* (GDOsp) (PDB ID 3BU7, resolução 2,80 Å, resíduos 17 - 374) (Chen *et al.*, 2008). Os heteroátomos Fe²⁺ colocados no centro ferroso dos domínios cupina do molde da proteína foram mantidos durante o cálculo do modelo. O modelo foi validado usando os servidores online PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), Verify3D (Lüthy; Bowie; Eisenberg, 1992) e ProSA (Benkert; Künzli; Schwede, 2009).

A análise de *docking* foi realizada entre o modelo de CRB2(1) e as moléculas carbenicilina, ácido gentísico e guaiacol. As simulações de encaixe foram realizadas com AutoDock Vina (Trott; Olson, 2009). As moléculas de água foram removidas da estrutura da proteína. A proteína e os ligantes foram preparados com o software MGLTools. Duas caixas de grade foram selecionadas abrangendo as cavidades dos domínios N- (center_x = 57,552, center_y = 23,744, center_z = 17,684, size_x = 30, size_y = 30, size_z = 30) e C-cupina (center_x = 57,552, center_y = 23,744, center_z = 17,684, size_x = 30, size_y = 30, size_z = 30). Os parâmetros exaustividade, num_modes e energy_range foram definidos com os valores de 256, 20 e 10, respectivamente.

5.4 *Transformação, expressão e purificação*

Células competentes de *Escherichia coli* BL21-DE3 foram transformadas por choque térmico com o vetor pet24-a contendo o gene CRB2(1) carregando uma His-tag C-terminal. Após a transformação, as células foram cultivadas em 1 mL de meio LB por uma hora a 37°C. Em seguida, foram espalhadas em placas com meio LB-ágar contendo canamicina 30 µg/mL, conforme recomendação do fabricante. As colônias positivas foram inoculadas em meio auto-indutor, 100 mL por 16 horas a 26 °C (Studier, 2005). Em seguida, as células foram centrifugadas

Manuscrito submetido em forma modificada para a revista Enzyme and Microbial Technology

a 10.000 g/4°C por 10 minutos. Eles foram ressuspensos em 20 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8 contendo NaCl 1 M e imidazol 10 mM. Posteriormente, a ressuspensão celular foi sonicada a 40% de amplitude por 10 min (os ciclos on/off de 30s) (SONICS® Vibra-Cell TM VC 750, EUA) e armazenada a 4° C para purificação, de acordo com o manual (The QIAexpressionist A handbook For high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, 2016).

A purificação de CRB2(1) foi realizada usando 1 mL de resina Ni-Nta QIAGEN Nickel Agarose (Qiagen, DE) em uma coluna de 25 mL para cromatografia de fluxo por gravidade. A resina foi equilibrada com 25 mL de tampão de suspensão celular, 50 mM Tris-HCl pH 8 adicionado 1 M NaCl e 20 mM Imidazole. Em seguida, 5 mL da parte solúvel do lisado celular contendo CRB2(1) foram carregados. Logo após a resina foi lavada com 100 mL de tampão (50 mM Tris-HCl pH 8, 1 M NaCl, 20 mM Imidazole e 0,2% (v/v) Triton X-100). A proteína foi eluída com 2 mL de tampão de eluição (50 mM Tris- HCl pH 8, 300 mM NaCl e 500 mM Imidazole). A proteína purificada foi armazenada a -20 °C para caracterização. O gel SDS- PAGE foi utilizado para confirmar a expressão da enzima, bem como sua purificação, sendo corado em azul de coomassie e para garantir o grau de pureza, em nitrato de prata. Preparação da solução de corante: 0,1% de Coomassie Blue G-250, 25% de metanol, 5% de ácido acético. O gel foi colocado na solução de Coomassie Blue), para permitir a fixação das proteínas. Após o período de incubação, adicione a solução descolorante (geralmente contém metanol e ácido acético) para remover o excesso de corante e deixar visíveis as bandas de proteína. O gel foi corado com prata utilizando um protocolo que envolve várias etapas. Inicialmente, o gel foi imerso em uma solução fixadora, aquecida por 30 segundos no micro-ondas e deixada por 5 minutos na bancada. Em seguida, foi tratado com etanol a 30 ou 50%, seguindo o mesmo procedimento de 30 segundos no micro-ondas e 5 minutos na bancada. O próximo passo envolveu o uso de tiosulfato, também com 30 segundos de aquecimento no micro-ondas e 2 minutos de repouso. Após duas lavagens com água destilada, o gel foi tratado com solução de prata, aquecido por 30 segundos e deixado por mais 2 minutos na bancada. Após uma lavagem rápida de 1 minuto com água, a solução reveladora foi aplicada. Finalmente, o gel passou por uma etapa de descoloração. As soluções usadas foram preparadas da seguinte maneira: as soluções fixadoras e descolorantes continham 50 mL de etanol e 12 mL de ácido acético, ajustados para um volume final de 100 mL. A solução de tiosulfato foi feita com 0,04 g de tiosulfato em 200 mL de água. A solução de prata foi composta de 0,2 g de nitrato de prata (AgNO₃) e 100 µL de formaldeído, ajustada para 100 mL. A solução reveladora continha 6 g de carbonato de sódio, 100 µL de formaldeído e 2 mL de tiosulfato.

5.5 Western Blotting

Após a purificação, 400 µL de CRB2(1) foram precipitados em 75% de TCA para correr em um gel de 12% SDS-PAGE. Após a eletroforese, o Western Blotting foi realizado de

Manuscrito submetido em forma modificada para a revista Enzyme and Microbial Technology

acordo com o protocolo descrito pelo sistema Mini-PROTEAN (Bio-Rad, Hercules, EUA) e visualizado após coloração com Coomassie Brilliant Blue. As proteínas presentes no SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, EUA) através do sistema de eletroblotting (Trans-Blot Turbo, Bio-Rad, Hercules, EUA) por 15 minutos a 1,3A e 25V. Após esse período, a membrana foi bloqueada com 10mL da solução bloqueadora (1x PBS mais 0,1% Tween-20, com 0,2% (p/v) de leite desnatado) por 30 minutos em temperatura ambiente seguido de três lavagens com 10mL de tampão de lavagem (1x PBS-T) por três minutos também em temperatura ambiente. Após a lavagem, a membrana foi incubada em 10 mL de solução de bloqueio mais anticorpo monoclonal anti-6x HIS tag® (Thermo Fisher, EUA) (0,33 µg/mL) por uma hora em temperatura ambiente, seguido de lavagem com 1 x PBS-T três vezes por três minutos. Posteriormente, a membrana foi incubada em 10mL de 1 x PBS com conjugado anticorpo anti-camundongo (criado por cabra) com fosfatase alcalina (0,33 µg/mL) por uma hora em temperatura ambiente, e após este período, o procedimento de lavagem foi realizado semelhante ao descrito anteriormente. Para a coloração da membrana, foi utilizado o sistema NBT/BCIP (Thermo Fisher Scientific, EUA).

5.6 Atividade enzimática, coeficiente de extinção molar e concentração de proteína

A atividade enzimática de CRB2(1) foi medida pela clivagem do substrato ácido gentísico (ácido 2,5-diidroxibenzoico Sigma-Aldrich, EUA). A clivagem do substrato pela enzima foi medida pelo aumento da absorção de luz em 330nm, indicando a formação de maleilpiruvato, previamente descrito (Huang *et al.*, 2015). A reação enzimática foi realizada em um volume total de 405µL, dividido em 50µL da enzima purificada, 250µL de tampão Tris-HCl pH 7,0, 100µL do substrato (ácido gentísico 10mM) e 5µL de FeCl₃. As reações foram incubadas a 30°C por 30 minutos e a absorbância foi medida no espectrofotômetro, SpectraMax M3 (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA). A concentração de proteína foi obtida por leitura em espectrofotômetro a 280 nm. O coeficiente de extinção molar da proteína foi estimado com base na sua sequência de aminoácidos, no valor de 57870 M⁻¹ cm⁻¹. A concentração de proteína foi de 105 µg/mL. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima que produz 1 µmol de maleilpiruvato por minuto a 23°C

5.7 Temperatura, pH, termoestabilidade e efeito de íons na dioxigenase

O efeito da temperatura na Dioxigenase foi determinado usando o ensaio enzimático, conforme descrito acima, e temperaturas variando de 30 ° C a 80 ° C. O efeito do pH foi medido variando o tampão usado no ensaio enzimático. Para pH 3 a 6, foi utilizado tampão citrato de

sódio. Para pH entre 7 a 9, foi utilizado o tampão Tris-HCl. E para pH 10, o tampão de glicina balanceado com NaOH, todas as soluções em concentração de 50mM dos seus respectivos componentes. A termoestabilidade foi realizada condicionando a enzima purificada a 30°C e coletando alíquotas em intervalos de 30 minutos, seguido do ensaio enzimático. O teste de íons foi realizado trocando o cofator de ferro por manganês, magnésio, cobre e cobalto, todos em concentração de estoque de 50mM. As leituras de absorbância a 280 nm foram determinadas usando um SpectraMax M3 (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA).

5.8 *Cinética enzimática*

A cinética foi realizada de acordo com o teste de atividade enzimática. Os parâmetros cinéticos de K_{cat} , V_{max} e K_m foram determinados usando 150 nM de CRB2(1) purificado. O ácido gentísico variando de 10 mM a 500 mM foi usado como substrato. Todas as medições de atividade enzimática foram realizadas em triplicata. Os dados foram ajustados ao modelo de cinética enzimática de Michaelis-Menten, e a curva com melhor coeficiente de determinação (R^2) foi utilizada para determinar K_m e V_{max} . Os parâmetros cinéticos foram calculados usando o software SigmaPlot da empresa Systat Software Inc. O coeficiente de extinção molar do substrato de $10,8 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ foi usado no cálculo da atividade específica.

6. RESULTADOS

6.1 Árvore filogenética da CRB2(1) com a família Gentisato Dioxigenases

Um total de 426 sequências de proteínas com domínio cupina, do banco de dados Aromadeg, foram usadas para a construção da árvore com CRB2(1). Durante o alinhamento de sequências, o software Trimmal foi usado a edição e limpeza das sequências. A sequência CRB2(1) alinha-se com um subgrupo de proteínas do domínio cupina, e sua sequência difere de todos os grupos (Fig. 1a). As sequências estão disponíveis no arquivo complementar Tabela 1.

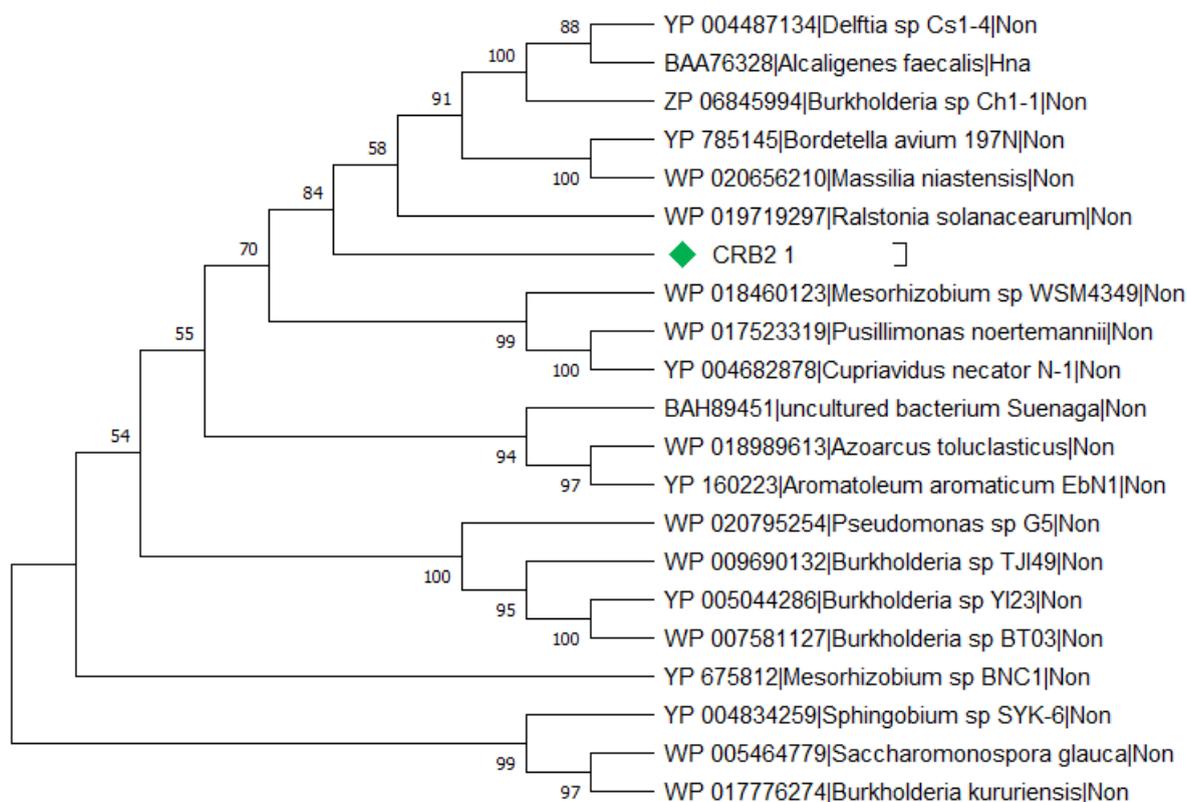


Figura 1: Árvore filogenética mostrando CRB2(1)(1) incluído na família de enzimas gentisato da superfamília de domínio cupin de dioxigenases extradiol. De acordo com o alinhamento e projeção da árvore, CRB2(1)(1) está no cluster XIV em um novo ramo, sugerindo sua singularidade em relação aos outros. Os valores bootstrap maiores que 50% são mostrados na distribuição dos ramos. Segundo Duarte et al. (2014), os clusters são definidos por análises de bootstrap. Se algum representante pertence a este cluster com um papel definido, então haverá uma definição de um papel provável para o cluster.

Muitas dioxigenases que pertencem à superfamília cupina compartilham semelhanças estruturais. Embora enzimas desse grupo sejam responsáveis pela degradação de aminoácidos em diferentes espécies de procariotos, outras, como a 1,2- dioxigenase, são capazes de clivar anéis aromáticos. Essas enzimas ocorrem naturalmente nas vias metabólicas de degradação do 3-hidroxibenzoato e do salicilato, mas como há semelhança nas moléculas que possuem anéis aromáticos, elas podem clivar outras como o dibenzofurano e o naftaleno (Kimura *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2013), adaptação para o reconhecimento de diferentes moléculas que possuem um anel aromático, estudos sobre a capacidade de aplicação biotecnológica de degradação de poluentes ambientais já foram descritos (Huang *et al.*, 2015).

O banco de dados Aromadeg focava no gentisato 1,2 – dioxigenase, então este banco de seqüências foi escolhido para a análise filogenética de CRB2(1). A proteína CRB2(1) foi identificada como uma putativa gentisato dioxigenase por ter dois domínios cupina em sua seqüência de resíduos de aminoácidos. As gentisato dioxigenases (GDO) são um subgrupo de dioxigenases que catalisam a cis-dihidroilação de compostos aromáticos com grupos carboxila, como o gentisato. Elas são essenciais na degradação bacteriana de ácidos aromáticos, contribuindo para o ciclo do carbono e a transformação de substâncias tóxicas em metabólitos menos nocivos. Isso destaca a importância das GDOs na biotecnologia ambiental e na biorremediação de poluentes aromáticos. O mesmo resultado é encontrado na análise filogenética de sua cadeia de aminoácidos ao formar um ramo com cluster (Fig.1b) do banco de dados Aromadeg. (Duarte *et al.*, 2014).

Depois de analisar os domínios conservados e o cluster que o CRB2(1) forma, o substrato foi definido como gentisato para proceder à análise da caracterização cinética da enzima. De acordo com Dunwell J, 2004, as enzimas que possuem esses domínios específicos são caracterizadas pelo substrato suave (Dunwell; Purvis; Khuri, 2004). No entanto, já se sabe que as dioxigenases são capazes de catalisar diferentes moléculas e não se restringem a apenas um substrato específico (Hernández-Ortega *et al.*, 2015).

6.2 Domínios conservados CRB2(1) e Modelagem tridimensional e *docking*

A validação do modelo (figura 2A) foi feita primeiramente pela análise do gráfico de Ramachandran. A maioria dos resíduos, de acordo com as estatísticas do gráfico, foram colocados nas regiões mais favorecidas (87,8%) ou regiões permitidas (11,8%), e apenas 1 resíduo Ala257, localizado em um loop na superfície da proteína, estava em regiões não permitidas. Com relação à avaliação da qualidade do modelo, algumas regiões do modelo CRB2(1) apresentaram valores abaixo do esperado, no entanto, os domínios cupina, onde está localizado o sítio ativo, apresentaram boa qualidade do modelo local.

As três moléculas analisadas no *docking* proteína-ligante, carbenicilina, ácido

gentísico e guaiacol apresentaram altas pontuações colocadas no sítio de ligação do metal do domínio N-cupina. As moléculas interagem diretamente com o íon ferro, que é coordenado por três resíduos de histidina: 61, 63 e 100 (figura 2B – D). Outros resíduos polares ou carregados (Ser 67 e Glu108) localizados na cavidade do sítio ativo interagiram com os ligantes por pontes de hidrogênio. Porém, no domínio C-cupina, as moléculas não apresentaram as mesmas poses de docking interagindo diretamente com o Fe^{2+} , o contato ocorre na entrada do sítio ativo.

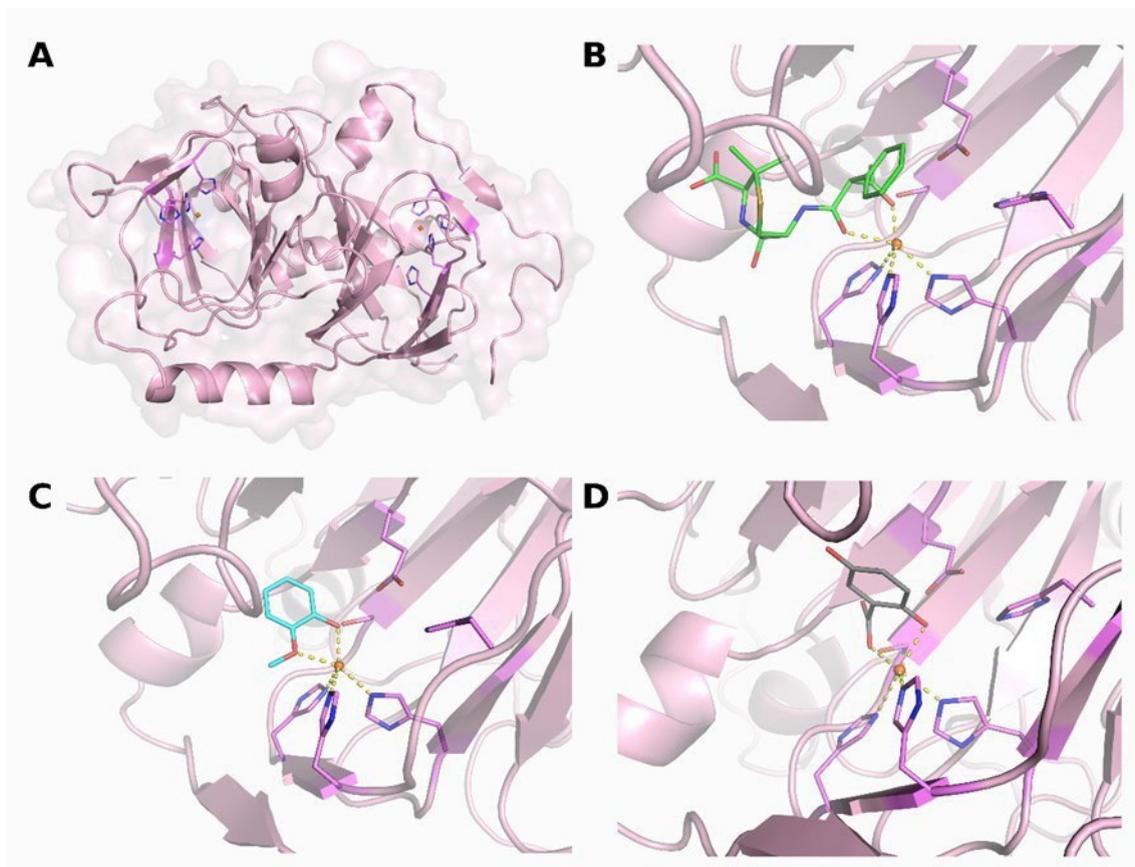


Figura 2- Modelo de homologia de CRB2(1) e conformações de docking molecular. (A) Representação da superfície e estrutura secundária de CRB2(1) (rosa-claro). O centro ferroso dos domínios cupina são representados pelos átomos Fe^{2+} (laranja) e resíduos de histidina (rosa e azul) 61, 63, 100, 102 (domínio N-cupina), 221, 223, 261 e 263 (domínio C-cupina). Interações de ancoragem molecular entre resíduos da cavidade do domínio N-cupina e (B) carbenicilina (verde), (C) Guaiacol (ciano) e (D) ácido gentísico (cinza)

6.3 Transformação, expressão e purificação

Células de *E. coli* cepa BL21(DE3) foram transformadas com DNA de plasmídeo sintetizado quimicamente (dos Santos *et al.*, 2015). Após a confirmação de um clone positivo, seguiu-se para a etapa de expressão da proteína. A indução da expressão foi realizada de acordo com o protocolo de autoindução por 16h (Studier, 2005). Logo após a cultura foi centrifugada, e o pellet foi separado. O pellet foi solubilizado em 20mL de tampão de lise e sonificado por 10 minutos. Em seguida, foram separadas as frações solúveis e insolúveis por 5 minutos de centrifugação. A fração solúvel foi purificada em resina de níquel agarose. Uma amostra do produto de purificação foi aplicada em gel SDS-PAGE, corado posteriormente com COMASSIE BLUE e

nitrato de prata (Fig.3a,b). O gel SDS- PAGE revelou uma banda com tamanho aproximado de 40 kDa, conforme a previsão baseada na sequência de aminoácidos. No entanto, mesmo com uma sequência de histidina em sua sequência C-Terminal, foi realizado um WESTERN-BLOT com anticorpos específicos His-tag (Fig.3c). A Figura 2 mostra que o protocolo de indução e purificação foram eficientes. Portanto, seguiu-se a etapa de caracterização enzimática.

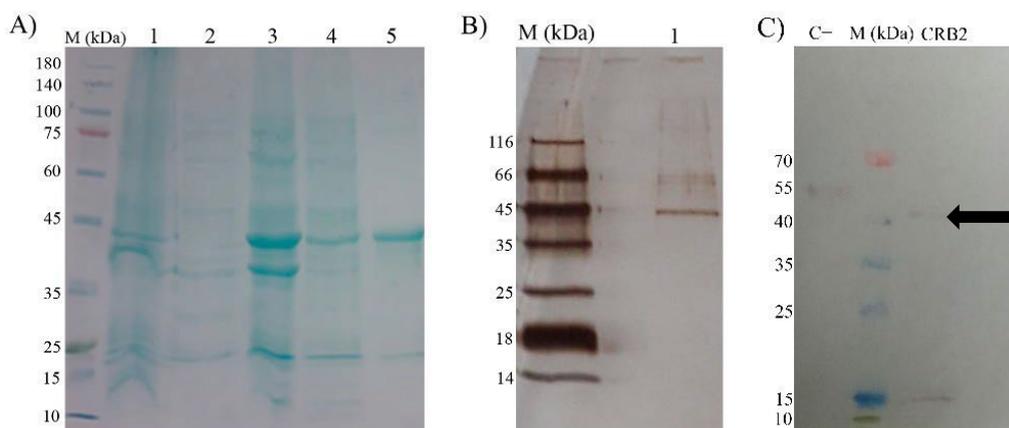


Figura 3. Análise da expressão da proteína recombinante e purificação. Em A) nos poços do gel SDS-PAGE 1 e 2 temos os lisados de *E. coli* com o vetor de expressão pet24 intacto em suas fases insolúvel e solúvel respectivamente. Então, nos poços 3 e 4 temos a cepa de *E. coli* em suas fases insolúvel e solúvel com o gene CRB2(1). Há o acúmulo de proteína de tamanho de 40kDa indicando a expressão de CRB2(1). O último poço mostra a purificação de CRB2(1) pela coluna de afinidade Níquel para His-Tag da fração de expressão solúvel. Em B) há coloração com nitrito de prata com CRB2(1) purificado da fração solúvel, para identificar o grau de pureza da proteína expressa. Em C), há WESTERN-BLOT com anticorpo anti-HIS para transferência e confirmação da enzima purificada CRB2(1).

6.4 Caracterização Bioquímica de CRB2(1)

A atividade da enzima foi identificada pela oxidação do substrato ácido gentísico em comparação com os extratos brutos de *E. coli* das frações solúvel e insolúvel como controles negativos. Para avaliar a atividade enzimática, o valor de absorvância foi convertido em atividade relativa, para que a atividade catalítica da enzima CRB2(1) pudesse ser medida.

Como mostra a Figura 4, a enzima CRB2(1) tem seu pH ótimo próximo a 7, apresentando atividade residual em pH 8 e 9. Em relação à temperatura, o resultado mostrou que a maior atividade enzimática é a 30°C. De acordo com os dados apresentados, a atividade enzimática diminui progressivamente com o aumento da temperatura. A ponto de a 70°C não ser mais possível identificar a atividade enzimática. No ensaio do íon cofator, o CRB2(1) utiliza o íon ferro como cofator, onde foi observado o maior valor de atividade. Embora haja uma atividade enzimática com cobre, a atividade relativa máxima da função enzimática não foi elevada. Com relação à termoestabilidade, a enzima CRB2(1) é estável por aproximadamente 1 hora após a exposição à temperatura ótima. Alcançando uma atividade ainda maior quando exposto a uma temperatura por 1 hora. Então, sua atividade relativa diminui a partir da segunda hora de exposição.

A enzima CRB2(1) perde sua estabilidade termostática após 120 minutos. A enzima CRB2(1) apresenta valores cinéticos de $V_{max} = 0,02281 \mu\text{M}/\text{min}$ e $K_M = 97,6$, $k_{cat} = 0,0025344/\text{s}$ e eficiência catalítica = $0,000026 \text{ s}/\text{M}$, convergindo para um padrão de Michaelis-Menten.

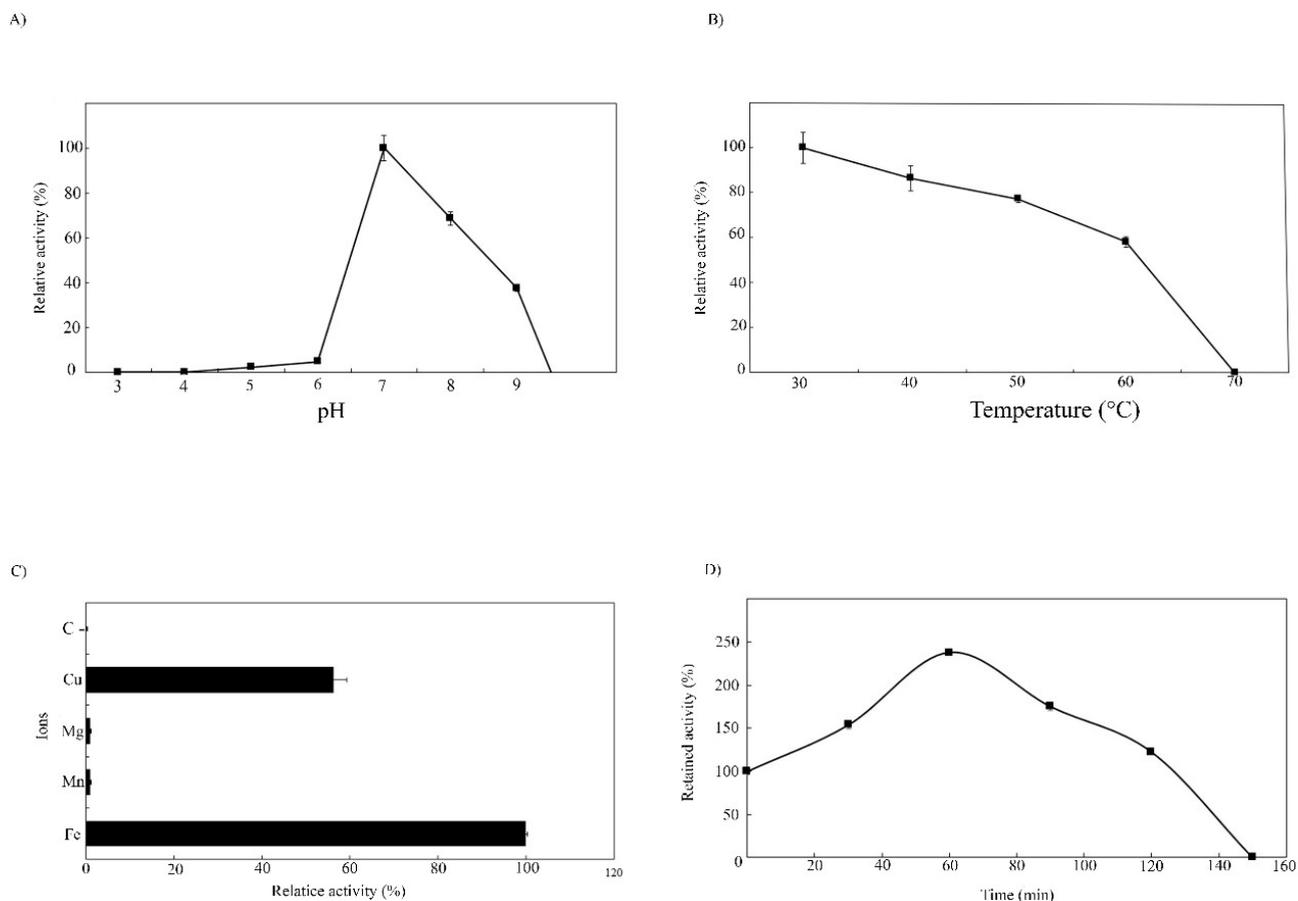


Figura 4. Caracterização bioquímica da atividade de CRB2(1). Em A), o pH ótimo da enzima CRB2(1) foi 7. Em pH 8 e 9, CRB2(1) apresentou atividade, porém com menor eficiência. Em B), a temperatura com maior atividade enzimática foi de 30°C. No entanto, o CRB2(1) mantém atividade relativa acima de 70% até uma temperatura de 50°C. Em C), o íon que tem maior influência na atividade é o ferro, seguido do cobre. A atividade das dioxigenases com diferentes íons já está descrita. Em D), CRB2(1) apresentou atividade enzimática por 120 minutos. Após este período, não foi identificada a formação de produto da reação catalítica.

7. DISCUSSÃO

Um estudo anterior em nosso grupo descreveu que a enzima CRB2(1) foi responsável pelo fenótipo de resistência à carbenicilina (dos Santos *et al.*, 2015). Alternativamente, embora os domínios conservados indiquem afinidade pelo substrato ácido gentísico, foi possível identificar que CRB2(1) oxida outros substratos, como o guaiacol, resultado encontrado em teste aleatório em laboratório, dados não apresentados.

Já é conhecido que as dioxigenases podem reconhecer mais de um substrato em seu sítio ativo. Isso aumenta o interesse em estudar essa classe de enzimas já que elas podem ser utilizadas em diferentes projetos de pesquisa. Possivelmente, isso se justifica pela similaridade nas moléculas aromáticas que são reconhecidas pelas dioxigenases (Adewale *et al.*, 2021). Paralelamente, as enzimas, em geral, podem catalisar reações com diferentes substratos. No entanto, seus valores cinéticos nessas condições e com cada substrato serão diferentes, mas será possível identificar sua atividade (Hanefeld; Hollmann; Paul, 2022). Isso permite uma aplicação paralela de enzimas, que poderão ser utilizadas para diferentes aplicações biotecnológicas.

No entanto, apesar de serem moléculas diferentes, a carbenicilina e o ácido gentísico foram oxidados por CRB2(1). De certa forma, em um clone para expressão heteróloga, o CRB2(1)(1) permitiu que a cultura fosse resistente a um antibiótico. Isso pode ser um indicativo da adaptação dos microrganismos em situações estressantes (dos Santos *et al.*, 2015). Particularmente, se uma bactéria não tiver genes de resistência a antibióticos (ARGs) conhecidos e já caracterizados, seria possível que uma enzima fosse direcionada momentaneamente nessa situação estressante para garantir a sobrevivência nessas condições. São recentes os dados que a CRB2(1) mostra ser uma enzima que possibilita um clone de *E. coli* ser resistente a um antibiótico. A maioria dos trabalhos que discutem resistência se deve a genes de resistência a antibióticos, com base em análises de sequências nos genomas (McMillan *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022). No entanto, a metagenômica funcional pode fornecer novos insights sobre a adaptação de um microrganismo. Porque é possível identificar como a bactéria pode lidar com uma situação estressante sem um ARG (Forsberg *et al.*, 2019). O conceito de adaptação ao meio permite a continuidade da vida do microrganismo. A elucidação dessa proposta de comportamento requer mais estudos para traçar estratégias terapêuticas para evitar futuras cepas resistentes a uma variedade de antibióticos. Bem como entender seu mecanismo de adaptação às condições de estresse (Aalismail *et al.*, 2019).

Para identificar outras enzimas passíveis de conferir resistência a antibióticos que não pertençam necessariamente a esta classe de genes de resistência a antibióticos, é necessário fomentar técnicas que permitam identificar a função enzimática. E não anote e infira a função

apenas partindo de anotações em bancos de dados (dos Santos *et al.*, 2015; Pang *et al.*, 2021; Schlachter *et al.*, 2019).

São estratégias complementares, mas a anotação da sequência é limitada pelo próprio banco de dados. Os dados encontrados podem não refletir a funcionalidade total de um determinado gene ou enzima. A metagenômica funcional permite descobrir essas atividades com outros substratos, uma vez que microrganismos geneticamente modificados podem ser expostos a diferentes condições. Assim, será possível identificar a afinidade da enzima por outros substratos, inferindo assim a possibilidade de diferentes mecanismos de ação e adaptação. Converter essa estratégia de sobrevivência celular em vantagens biotecnológicas é o maior desafio para a pesquisa em geral.

Além disso, de acordo com os resultados apresentados em sua filogenia, o CRB2(1) ainda não havia sido descrito. Esta enzima é agrupada com um subgrupo de dioxigenases. Existe uma semelhança dos aminoácidos CRB2(1) com um representante deste subgrupo das dioxigenases. A análise de sua sequência de aminoácidos mostra semelhanças dos resíduos importantes na função de metabolização dos anéis aromáticos. Após a purificação do CRB2(1), foram realizados ensaios de caracterização bioquímica. CRB2(1) apresentou pH ótimo de 7 e temperatura de 30°C. Esse resultado pode estar relacionado ao clima usual do bioma Cerrado. As temperaturas do cerrado oscilam entre 18°C e 27°C, o que corrobora a temperatura ótima da enzima (Hofmann *et al.*, 2021). Alternativamente, o pH mostrou-se diferente do solo do Cerrado, sendo que para CRB2(1) o pH ótimo é 7. O solo do Cerrado tem um pH mais ácido entre 4 e 5 aproximadamente. Existe a possibilidade dessa diferença ser por conta do meio intra e extracelular. Como dentro da célula haverá tamponamento do pH, essa é a função ideal do metabolismo do microrganismo do qual essa proteína é derivada. Os ensaios de íons foram conduzidos sob pH e temperatura de maior atividade, 7 e 30°C, respectivamente. CRB2(1) demonstrou ter a maior atividade relativa com íons de ferro. Esses dados corroboram as características físico-químicas do solo do Cerrado (Lund *et al.*, 2020).

Em relação aos parâmetros cinéticos de CRB2(1), $V_{max} = 0,02281 \mu\text{M}/\text{min}$, $K_M = 97,6 \mu\text{M}$ e $K_{cat} = 0,0025344/\text{s}$, e eficiência catalítica = $0,000026 \text{ s}/\text{M}$, convergindo para um padrão de Michaelis-Menten, a enzima apresenta valor de maior K_M para gentisar 1,2 dioxigenase da cepa *Halophilic Martelella* AD-3 cepa $26,64 \mu\text{M}$ (Huang, 2015). As dioxigenases isoladas de *Pseudomonas sp* demonstraram valores de K_M mais próximos de CRB2 (1), $85 \mu\text{M}$ e $74 \mu\text{M}$, embora esta seja uma diferença a ser considerada (Harpels and Lipscomb, 1990). No entanto, os valores de pH e temperatura foram mais resistentes às mudanças em relação a outras dioxigenases. No entanto, em parâmetros cinéticos selecionados, o CRB2(1) surge como vantajoso em aplicações biotecnológicas. Isso se deve à sua notável capacidade de acomodar uma gama diversificada de níveis de pH. Dependendo da reação específica em questão, essa adaptabilidade

Manuscrito submetido em forma modificada para a revista Enzyme and Microbial Technology

ao pH aumenta a versatilidade da enzima em vários contextos (Hirano, 2007), (Lee, 2011). Além disso, o CRB2(1) demonstrou resistência contra flutuações significativas de temperatura, restando mais de 70% de sua atividade dentro de um intervalo de 20°C. Isso mostra uma vantagem de usar CRB2(1) em reações, pois suporta uma gama mais ampla desses parâmetros. A Tabela 1 mostra a comparação dos valores cinéticos de CRB2(1) com outros já descritos.

	KM (μM)	V _{máx} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K _{cat}	pH (>70%)	°C (>70%)	Reference
CRB2(1)	97.6	0.02281	0.0025344	7 ~ 8	30 ~ 50	This Study
<i>P. testosteroni</i>	85	--	22,000 min ⁻¹ site- 1	7.4	23	Mark R. HarpelS and John D. Lipscomb 1990)
<i>P. acidovorans</i>	74	--	19,300 min ⁻¹ site- 1	7.4	23	Mark R. HarpelS and John D. Lipscomb 1990)
<i>Halophilic Martelella strain AD-3</i>	26.64	--	161.29	6 ~ 7.5	22.5	Huang et al 2015
<i>Sphingomonas sp. RW5</i>	15	0.119 U/mg		6.8 ~ 8	25	Werwath et al 1998
<i>Xanthobacter polyaromaticivorans 127 W</i>	18.6	--	5,430 min ⁻¹ .site ⁻¹	7.5	23	Hirano et al 2007)
<i>Polaromonas naphthalenivorans CJ2</i>	10	--	--	7.4	--	Lee et al 2011

Tabela 1. A tabela da comparação dos parâmetros cinéticos de CRB2 com dioxigenases já descritas. São exibidos os valores de KM (afinidade da enzima pelo substrato), V_{max} (velocidade máxima da reação), K_{cat} (constante catalítica ou número de turnover), faixa de pH em que a atividade enzimática é maior que 70%, e a temperatura ideal de atuação de cada enzima. A CRB2 é comparada com enzimas de diversas bactérias como *Pseudomonas testosteroni*, *Pseudomonas acidovorans*, *Halophilic Maristeilla strain AD-3*, *Sphingomonas sp. RW5*, *Xanthobacter polyaromaticivorans 127 W*, e *Polaromonas naphthalenivorans CJ2*

Esses dados corroboram as características físico-químicas do solo do Cerrado (Lund *et al.*, 2020). Já que sua acidez vem da alta concentração de íons metálicos no solo. Além do ferro, CRB2(1) apresentou atividade com íons de cobre. Já é conhecido que as dioxigenases podem possuir atividade com diferentes íons como cofatores. Com temperatura, pH e íon estabelecidos, um ensaio de termoestabilidade foi realizado para determinar quanto tempo a enzima permanece ativa em sua temperatura ótima. O resultado foi que após 60 minutos o CRB2(1) apresenta maior atividade, atingindo sua maior eficiência catalítica. Logo após sua atividade começa a diminuir,

não sendo mais possível identificar a atividade 150 minutos após o início da tentativa. Este trabalho demonstrou que os dados encontrados na caracterização enzimática de CRB2(1) corroboram com outras dioxigenases encontradas em diferentes trabalhos.

A utilização de caudas de histidina (His-tag) é uma prática amplamente adotada na purificação de proteínas heterólogas, devido à sua alta afinidade por íons metálicos como níquel e cobalto. Este método facilita a purificação de proteínas recombinantes através de cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC). No entanto, a presença dessas caudas de histidina pode interferir na atividade enzimática de proteínas que requerem íons metálicos como cofatores (Terpe, 2003), (Kimple, 2013).

As caudas de histidina possuem uma alta afinidade por íons metálicos, o que é a base para sua utilização em IMAC. Essa afinidade, no entanto, não é restrita aos íons metálicos utilizados na cromatografia (como Ni^{2+} e Co^{2+}), mas se estende a outros íons metálicos, incluindo Fe^{2+} e Cu^{2+} , que são cofatores essenciais para muitas enzimas. A competição entre a cauda de His-tag e o centro ativo da enzima por esses íons pode resultar na diminuição da disponibilidade do cofator para a enzima, afetando negativamente sua atividade catalítica (Arnau, 2006).

Apesar das potenciais interferências, os resultados laboratoriais obtidos a partir de proteínas com caudas de His-tag ainda têm relevância científica e confiabilidade. A importância desses resultados reside na capacidade de identificar e quantificar a atividade enzimática relativa e de explorar a funcionalidade básica da enzima sob condições controladas (Gräslund, 2008).

De acordo com os resultados identificados nesse trabalho, foi possível observar que ao alterar a concentração do íon ferro nas reações com a CRB2(1), foram obtidos vários resultados sem validade. Aumentar a concentração desse íon, causava interferência na leitura da absorbância pelo equipamento, um caso de limitação da técnica. Além disso, era possível observar que para reações em que o substrato mudava de cor, no caso do guaiacol, apenas aumentar o ferro causava um falso positivo. De forma semelhante, em relação à alteração da concentração do íon, ao diminuir a concentração, a reação enzimática não ocorria. Foram testadas diferentes concentrações do íon de ferro e a que manteve os resultados efetivos e que eram possíveis de replicar, era mantendo a concentração estoque de ferro em 50mM.

Tendo em vista que as atividades catalíticas de anéis aromáticos podem ser úteis para atividades de biorremediação. Uma vez que essas moléculas são recalcitrantes e difíceis de degradar molecularmente. Alternativamente, a presença dessa classe de enzimas pode demonstrar atividades com outras moléculas cuja estrutura possui anéis aromáticos, como os antibióticos beta-lactâmicos. Isso pode gerar resistência fenotípica em cepas de bactérias que não possuem genes específicos para resistência bacteriana. No entanto, a literatura é escassa em trabalhos com proteínas que são específicas para gerar a resistência microbiana, mas que podem assumir essa função adaptativa. Mais estudos são necessários elucidar outras vias de resistência microbiana por enzimas

Manuscrito submetido em forma modificada para a revista *Enzyme and Microbial Technology*

que se adaptam a situações estressantes. Apesar das diferentes aplicações, é possível utilizar o mesmo potencial catalítico para mais conversão do substrato para um produto. Isso é reforçado pela perspectiva da similaridade molecular dos substratos. Mesmo que altere os valores cinéticos, a enzima terá uma função catalítica sobre aquele substrato, podendo então utilizar a mesma enzima para situações diferentes.

ABORDAGEM METAGENÔMICA BASEADA EM SEQUÊNCIAS PARA ESTUDO DE BETA-LACTAMASES DE *ACHOLEPLASMA*

8. OBJETIVO

Identificar genes associados à resistência microbiana das bibliotecas metagenômicas isoladas de intestino de cupim, a fim de caracterizá-los *in silico*, explorando também suas ocorrências ao longo do trato digestório do hospedeiro.

8.1. Objetivos específicos

1. Análises *in silico* do metagenoma de intestino de cupim
2. Seleção de putativas beta-lactamases
3. Análises filogenéticas das sequências de beta-lactamases
4. Modelagem tridimensional das putativas beta-lactamases e predição e identificação do sítio ativo
5. Amplificação das putativas beta-lactamases a partir do intestino de cupim

9. MATERIAIS E MÉTODOS

9.1. Montagem dos genomas a partir do metagenoma de intestino de cupim Construção da árvore filogenética

Cada genoma montado (Metagenome Assembled Genomes -MAGs) foi carregado no sistema Integrated Microbial Genomes (IMG) no Joint Genome Institute do Departamento de Energia dos EUA para anotação (Markowitz *et al.*, 2014). A reconstrução metabólica e o mapeamento da via de cada genoma montado foram concluídos usando o KEGG Automatic Annotation Server (Moriya *et al.*, 2007). Módulos catalíticos e de ligação a carboidratos de enzimas que degradam, modificam ou criam ligações glicosídicas foram identificados por pesquisa no banco de dados de enzimas ativas de carboidratos (CAZy) (<http://www.cazy.org/>) (Lombard *et al.*, 2014) usando Diamond versão 0.9.22 (Buchfink; Xie; Huson, 2015) com um valor E de $1e-60$. Essas enzimas e módulos associados incluem hidrolases de glicosídeos (GHs), enzimas com atividades auxiliares (AAs), esterases de carboidratos (CEs), transferases de glicosil (GTs) e módulos de ligação a carboidratos (CBMs).

9.2 Seleção de putativas beta-lactamases

A partir do resultado da anotação, foi identificado quatro sequências de nucleotídeos que sugerem a expressão de beta-lactamases. As sequências de nucleotídeos e aminoácidos estão na sessão Anexos.

9.3 Análises filogenéticas das sequências de beta-lactamases

Árvore genética da beta-lactamase. Todas as sequências de aminoácidos de Beta-lactamase (BL) disponíveis foram recuperadas do banco de dados construído por Brandt et al., 2017. Múltiplos alinhamentos de Beta-Lactamases foram realizados em MAFFT v.7.427 (Kato; Standley, 2013), usando o extrato do banco de dados de (Brandt *et al.*, 2017). Os alinhamentos múltiplos, incluindo a suposta Beta-Lactamase de *Acholeplasma*, foram aparados usando o software trimAl v1.4.rev22 (Capella-Gutierrez; Silla-Martinez; Gabaldon, 2009) com parâmetros padrão.

Posteriormente, ao identificar o grupo com que cada sequência das provável beta-lactamases foi agrupada, encaminhou-se para uma análise mais precisa e comparativa de sequências do banco de dados PDB para a montagem de uma árvore filogenética com maior precisão de comparação contra beta-lactamases agora de estruturas tridimensionais já caracterizadas.

9.4 Modelagem, predição do sítio ativo das putativas beta-lactamases.

Após identificar o grupo de beta-lactamases ao qual cada anotação pertencia, foi realizada uma predição estrutural tridimensional das supostas beta-lactamases usando o software AlphaFold Colab (Mirdita *et al.*, 2022). Posteriormente, identificar a conexão entre o sítio ativo, prevista com análise por PrankWeb (Jendele *et al.*, 2019) e CB Dock (Liu *et al.*, 2020) para

calcular a melhor posição dos ligantes em relação ao sítio ativo. Os ligantes utilizados para a análise, amoxicilina; ampicilina; carbenicilina; canamicina e estreptomicina, ligadas a diferentes regiões das putativas beta-lactamases. A metodologia *bliding* permite realizar análises de ligantes e sítios ativos de proteínas que não são tão bem caracterizadas experimentalmente (Huang *et al.*, 2023). Uma suposta beta-lactamase p31339 possui outro domínio em sua sequência de resíduos de aminoácidos. Este outro domínio é de uma acetiltransferase.

A partir da análise do melhor modelo gerado pelo software e da sequência do PDB que mais tem relação por homologia de aminoácidos foi realizada uma comparação entre as estruturas tridimensionais, a fim de inferir a existência do sítio ativo da predição das beta-lactamases de *Acholeplasma*. O *docking* foi realizado utilizando o software CB-Dock que faz uma interação *blinding* entre um ligante e a proteína de estrutura resolvida.

9.5 Amplificação da *P.Blac* ao longo do intestino de cupim

Intestinos de cupins foram extraídos para isolamento de DNA total e alguns foram separados para isolamento de DNA de cada porção do intestino. PCRs foram realizadas com o primer *P.Blac* para identificar a presença desse gene ao longo do intestino do cupim. Como controle positivo, foi utilizado DNA total purificado do intestino. O gene *P. Blac* foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico do intestino de *Syntermes wheeleri* e da terceira porção do intestino (P3). Os primers foram projetados como o primer direto 5' ATGAAAATAAGGTTTTAGTTGAA 3' e o primer reverso 5' AAAGTTATATATCATTCCATAGCTCATT 3'. Os primers para controle da beta-lactamase de *Acholeplasma laylawii* foram desenhados sendo o primer forward 1 5' ATGAATTTAGAAGCAAAAATCTATAACTTC 3' e o reverse 5' TTTACTTGTTACTGTAAAGCCATTAAACA 3', aqui denominado L1. O outro conjunto de primer para *A. laidlawii* foi, forward 5' ATGGATAGAATTAAATCGTTTTTACAAA 3' e o reverse 5' TTTTTTCTCTACTTTCATCTCATAAAA 3', e este é denominado L2.

Este conjunto de primers de controle foi desenhado com base nas sequências de beta-lactamases encontradas em *Acholeplasma laylawii*. A amplificação por PCR foi realizada com 20µL de misturas de reação contendo 0,2µM de cada primer, 50ng de molde de DNA, 2µL de tampão taq (reação 10x que contém MgCl₂ 20mM), 0,4µL dNTP (100mM), 0,2µL de Taq polimerase Hot start – Ab+(5 unidades por l) (Cellco Biotec do Brasil). A PCR foi realizada usando o seguinte programa, 5 min a 95 °C e depois 30 ciclos de 30 a 95 °C, 30 s a 55 °C e 1 min 30 s a 72 °C. Os produtos de PCR foram confirmados por gel de agarose 1%.

10. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O alinhamento múltiplo de seqüências demonstrou que a anotação Beta- lactamase de *Acholeplasma* pertence a um grupo de classe C, mostrado na figura 6. Dentro do grupo, o P31339 se diferencia dos demais ao abrir uma nova filial na classe C. Os domínios das seqüências de resíduos de aminoácidos serão mostrados na Figura 5.

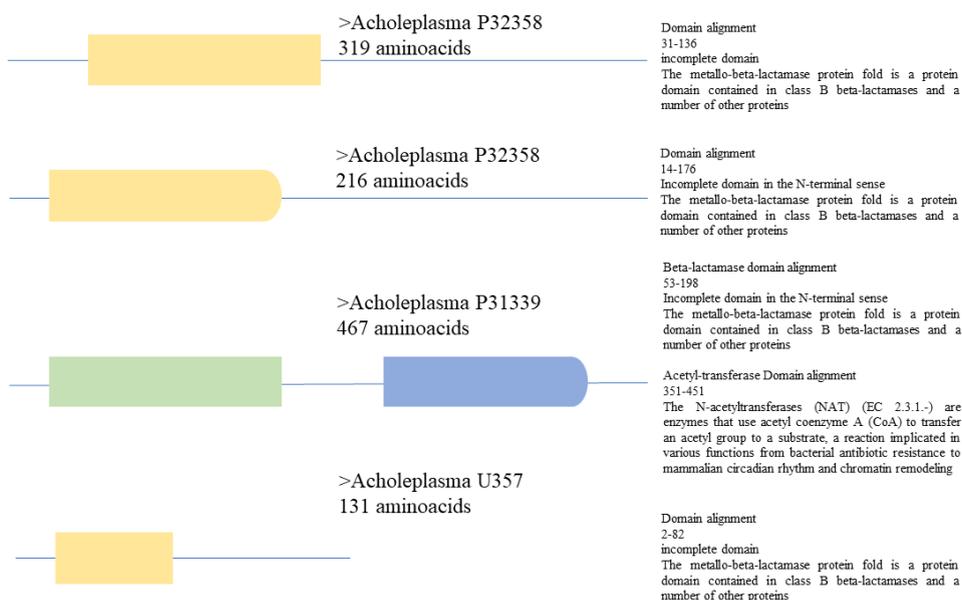


Figura 5. Regiões de aminoácidos que determinam o domínio beta-lactamase. De acordo com as anotações, os domínios de beta-lactamases estão incompletos. A sequência P31339 possui um segundo domínio de acetil-transferase.

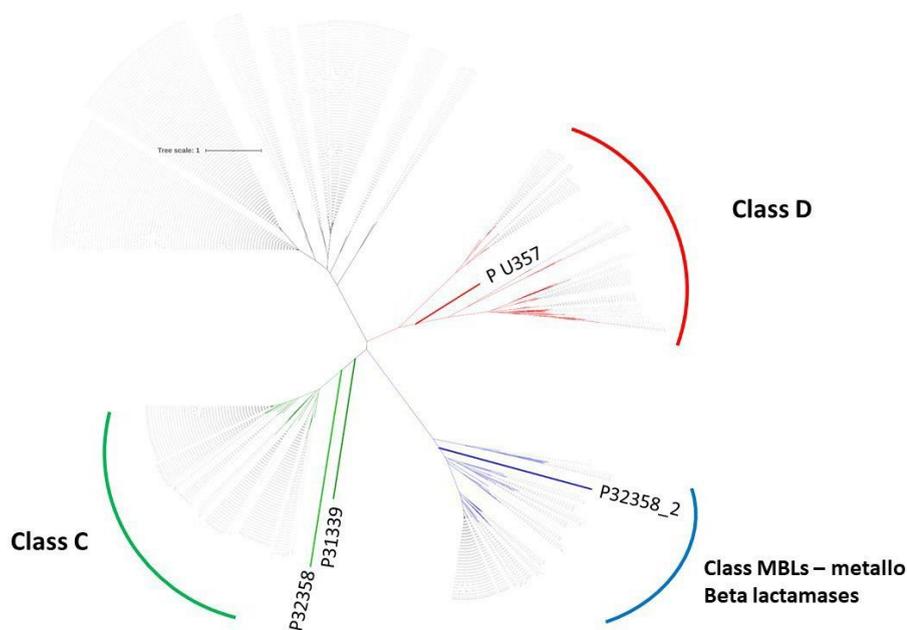


Figura 6: Análise filogenética da sequência das putativas Beta-lactamases em comparação com o banco de dados construído por (Brandt et al., 2017) P31339 e P32358 se encontram em um ramo diferente do grupo da classe C de beta-lactamases, indicando uma proximidade com o grupo. Isso se justifica principalmente pela presença de resíduos de aminoácidos que são exclusivos dessa sequência, encontrados na posição 276 à 361. P32358_2 se encontra em um grupo das metalo beta-lactamases, enquanto PU357 se alinha à classe D de beta-lactamases.

Após a identificação do grupo em que se direciona cada sequência das putativas beta-lactamases de *Acholeplasma*, foi realizado um novo alinhamento e árvore filogenética comparando com sequencias de estruturas tridimensionais já caracterizadas. Esse banco foi curado manualmente de sequências correspondentes de cada uma das classes de beta-lactamases no banco de dados PDB.

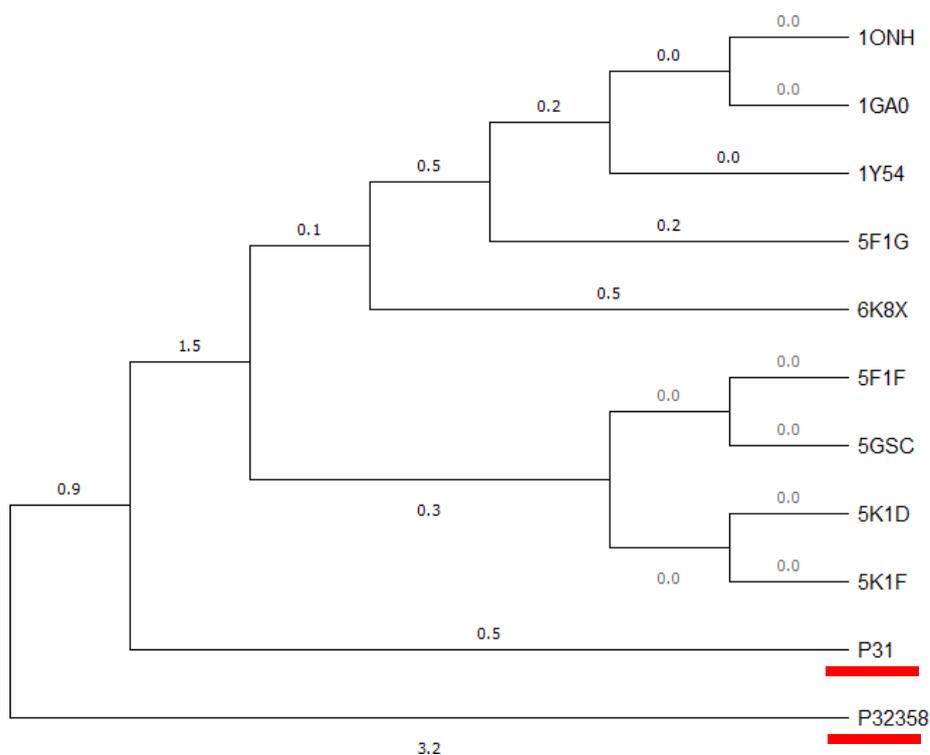


Figura 7: Análise filogenética da sequência da putativas Beta-lactamases P31339 e P32358 em comparação com o banco de dados curado manualmente de estruturas já resolvidas. P31339 e P32358 se encontram em um ramo diferente do grupo da classe C de beta-lactamases, indicando uma relação de diferenciação em relação as sequencias já registradas em banco de dados

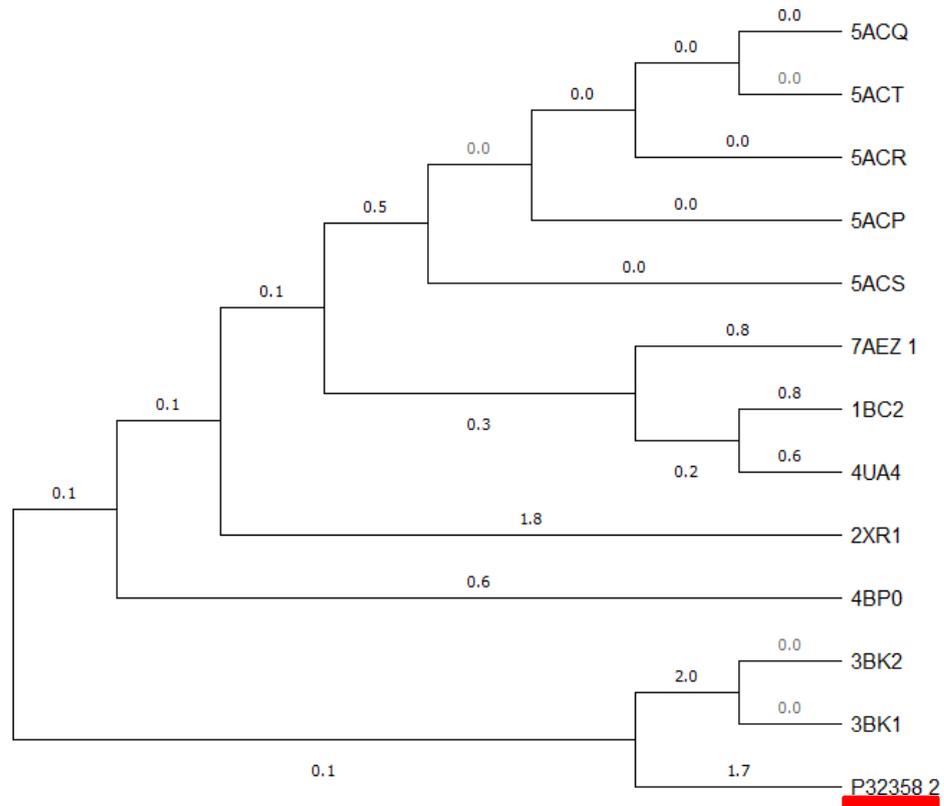


Figura 8: Análise filogenética da sequência da putativa Beta-lactamase P32358_2 em comparação com o banco de dados curado manualmente de estruturas já resolvidas. P32358_2 se encontra em um ramo diferente do grupo. Apesar de estar relativamente próxima outras proteínas, o valor de bootstrap demonstra uma separação mais acentuada entre as sequências.

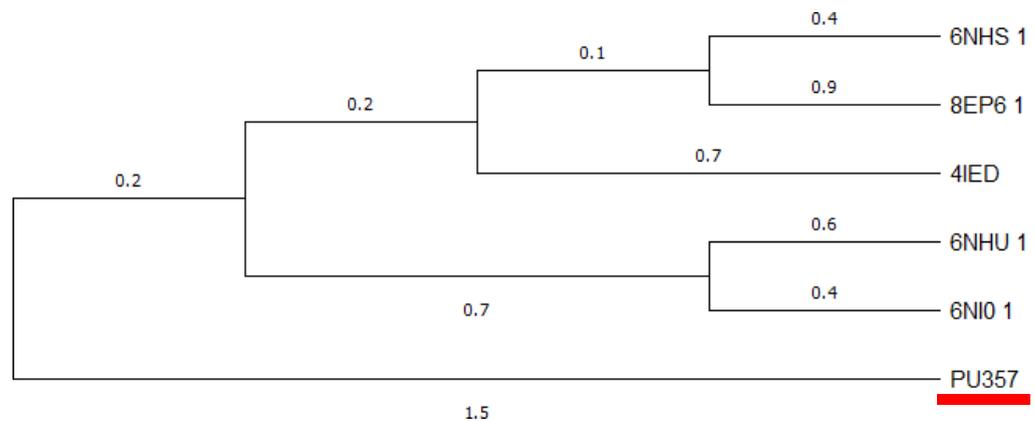


Figura 9: Análise filogenética da sequência da putativas Beta-lactamases PU357 em comparação com o banco de dados curado manualmente de estruturas já resolvidas. PU357 se encontram em um ramo diferente do grupo da classe indicando uma relação de diferenciação em relação as sequencias já registradas em banco de dados

Os resultados permitem inferir que existe uma relação de homologia de sequências entre as putativas beta-lactamases com àquelas de estruturas resolvidas. No entanto, não é ainda uma homologia muito próxima. Isso sugere que as sequencias encontradas em *Acholeplasma* são as mais diferentes em relação aquelas já descritas. Isso desencadeia uma dificuldade na análise,

pois alguns índices que demonstram uma diferença filogenética quando comparada ao que já existe no banco de dados pode desencadear uma sucessão de análises que não correspondem a proteína do estudo. O posicionamento dos ligantes e sítios ativos sofre modificações com base nas variações das moléculas utilizadas. Esta análise leva a uma inferência sobre a funcionalidade biológica de supostas enzimas, uma vez que se houver uma interação molecular entre um ligante e uma região do sítio ativo, é possível inferir que ocorre atividade metabólica (Agu *et al.*, 2023). No entanto, os parâmetros *in silico* podem ser modificados e levar a uma ligação e posicionamento do ligante melhor e mais forte.

Apesar de uma extensa variedade de abordagens de acoplamento, o acoplamento cego permite a ligação sem anotação prévia do local de ligação, o que pode ser usado nos casos em que proteínas e até mesmo ligantes não foram caracterizados experimentalmente (Kitchen *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2020). Portanto, futuras análises experimentais e cristalográficas poderão contribuir para elucidar a atividade enzimática, bem como a posição real e biológica dos ligantes em relação aos sítios ativos das enzimas. A enzima P31339 possui um segundo domínio de acetiltransferase. Já está caracterizado que os antibióticos aminoglicosídeos são vulneráveis a modificações estruturais. Entre as enzimas que podem fazer essas modificações está a acetiltransferase (Liu *et al.*, 2018; WRIGHT, 2005). Por essa proteína possuir esse segundo domínio, foram utilizados outros antibióticos, canamicina e estreptomicina, ambos aminoglicosídeos, para identificar uma possível interação desse segundo domínio com esses antibióticos. Possivelmente, há inferências biológicas de que a necessidade de proteção contra o estresse no intestino dos cupins é fundamental para a sobrevivência dessas espécies.

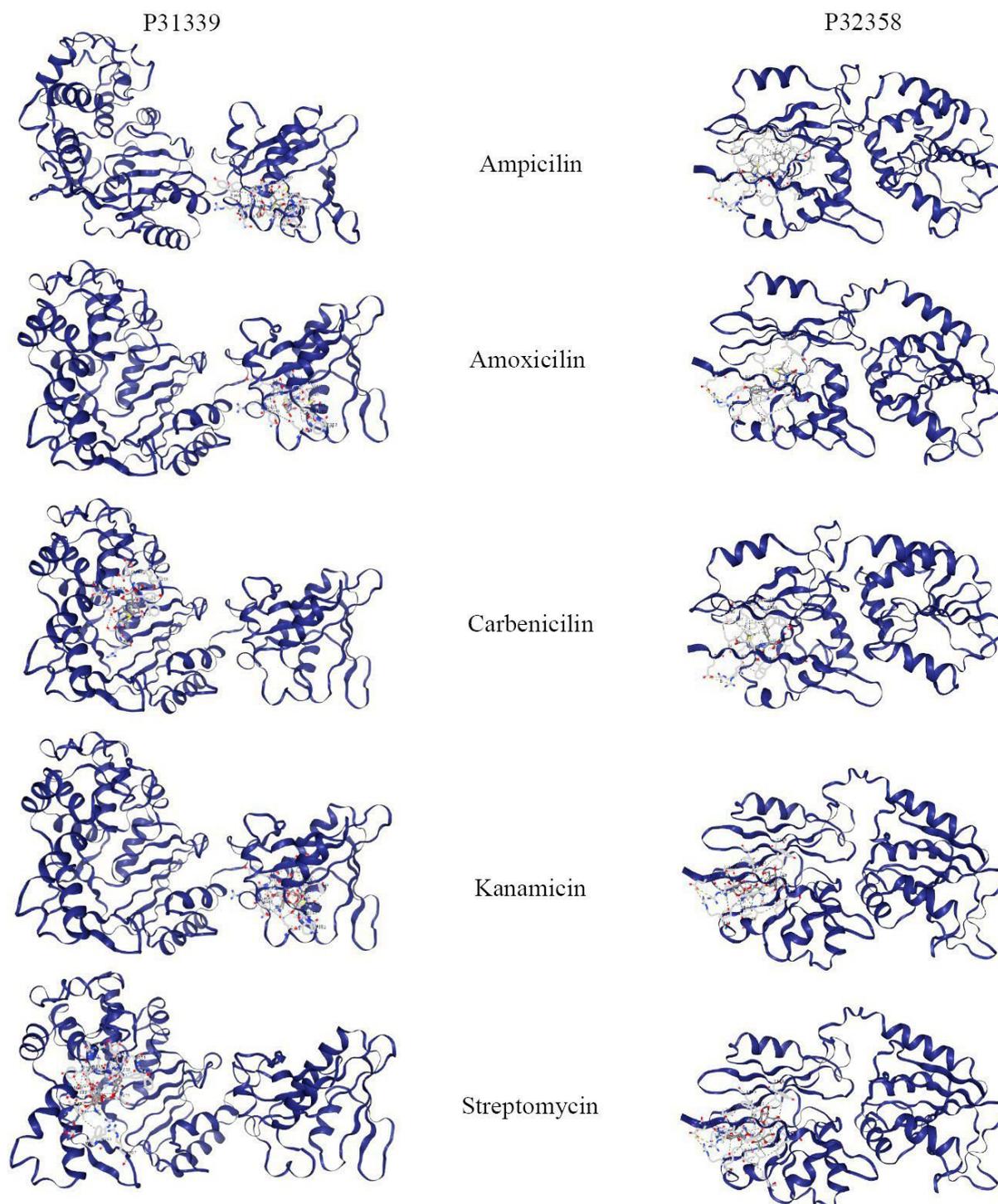


Figura 10: *Docking* das proteínas P31339 e P32358. A coluna da esquerda mostra P31339 e da direita P32358. Na sequência, os ligantes com os prováveis sítios ativos de cada um: Ampicilina, Amoxicilina, Carbenicilina, Kanamicina e Streptomicina. A P31339 como possui um segundo domínio, os ligantes: Ampicilina, Axocilina e Kanamicina, se ligam no domínio de Acetil-transferase.

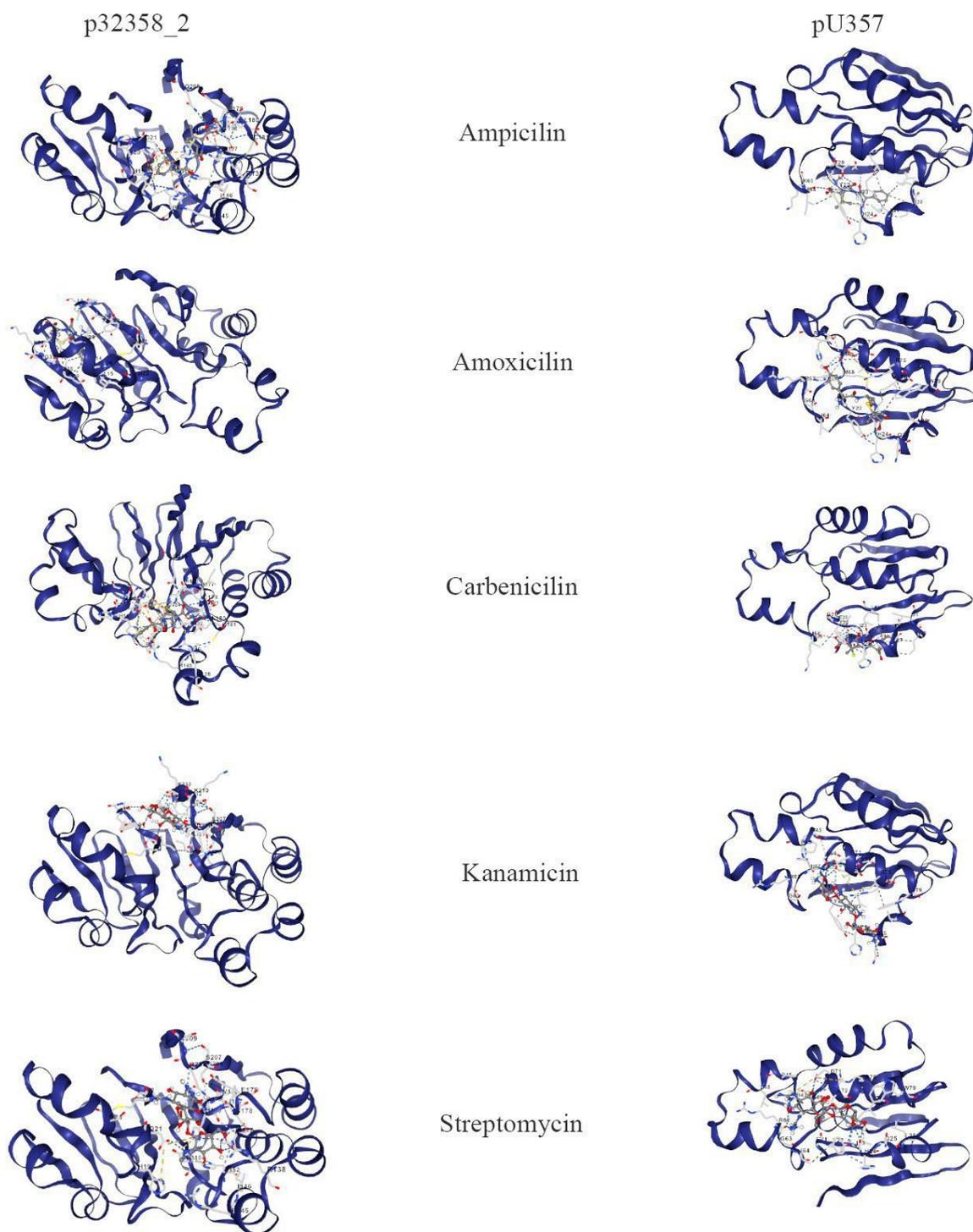


Figura 11: Docking das proteínas P32358_2 e PU357. A coluna da esquerda mostra P31339 e da direita P32358. Na sequência, os ligantes com os prováveis sítios ativos de cada um: Ampicilina, Amoxicilina, Carbenicilina, Kanamicina e Streptomicina.

Posteriormente, foi realizada uma PCR para identificar a presença em determinada região específica de *P.Blac*, no intestino de cupim. Foi possível identificar que *P.Blac* está presente em todas as regiões do intestino do cupim, apesar de ter sido notado na porção P3 (Figura 12 e 13).

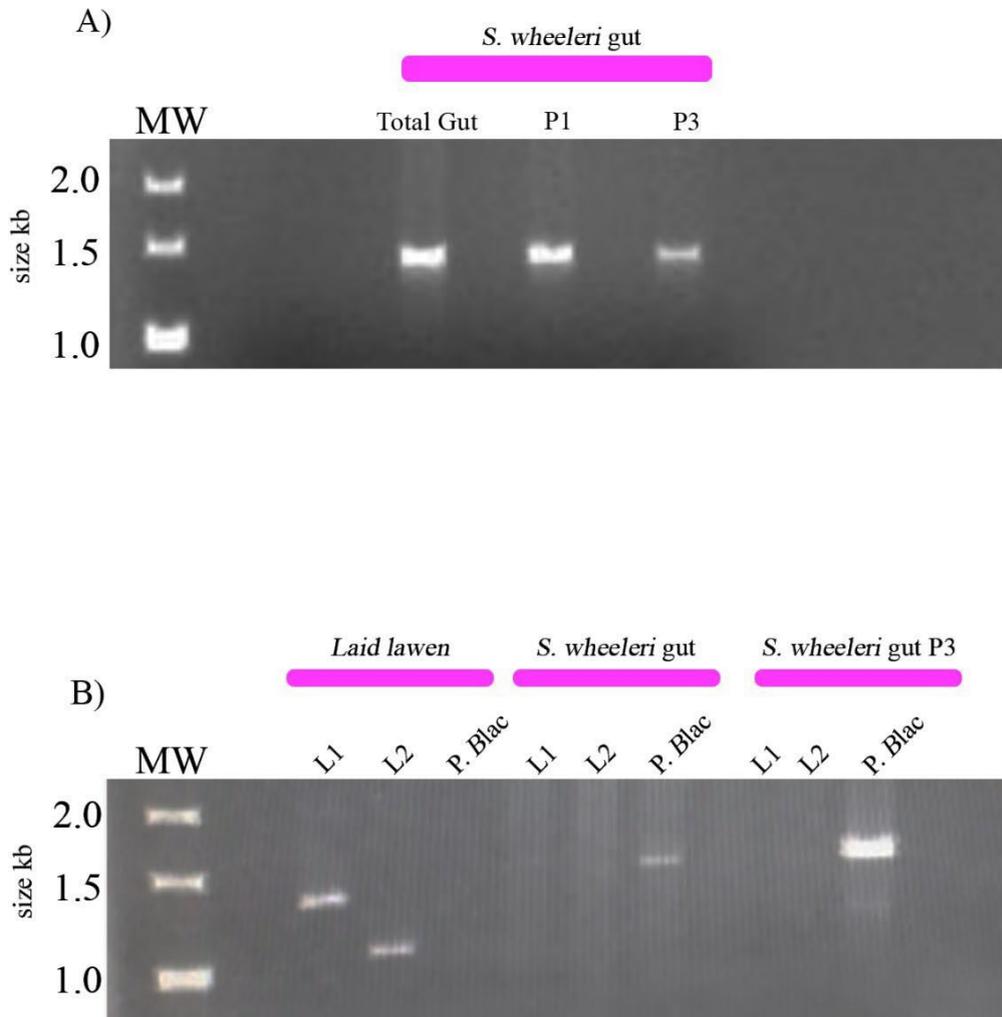


Figura 12. A figura demonstra a presença do gene das putativas *Beta-lactamase* no intestino do cupim amostras. A figura a) mostra que o gene está presente na porção total, em P1 e P3, respectivamente. Embora o gene tenha sido identificado e anotado na porção P3, ele pode existir em outra porção do intestino. A Figura b) mostra que as amostras de *A. laidlawii* usando dois pares de primers de controle para beta-lactamase (L1 e L2), não possuem o gene P.Blac, sugerindo que já sequências caracterizadas de beta-lactamases de *Acholeplasma* não estão presentes em *S. wheeleri*. Para amostras de intestino de cupinas, P.Blac é amplificado tanto na porção total do intestino quanto na porção P3, onde foi anotado.

Porções segmentadas de intestino de cupim *Syntermes wheeleri*

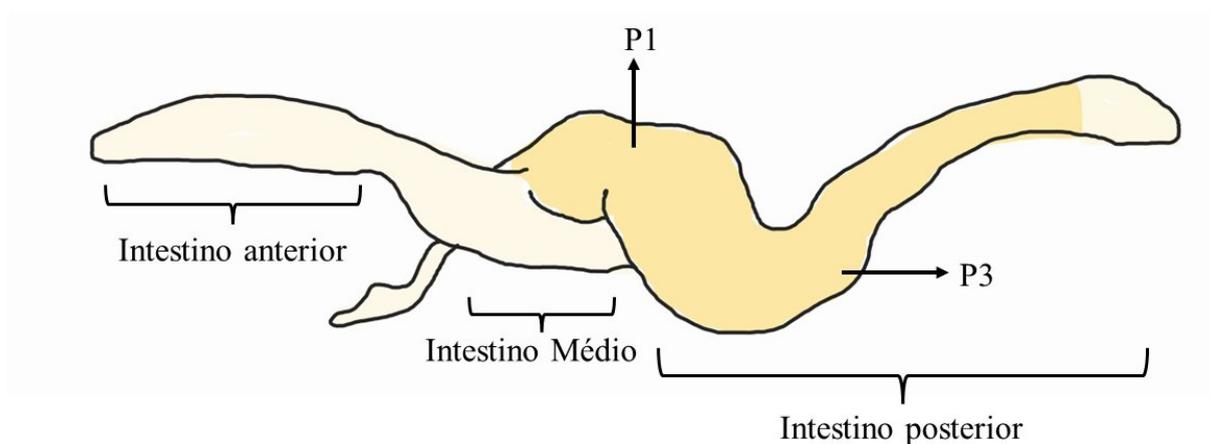


Figura 13. Esquema das porções existentes do intestino do cupim *S. wheeleri*. Para amostras de intestino de cupins, *P.Blac* é amplificado tanto na porção total do intestino quanto na porção P3, onde foi anotado.

A PCR mostrou que nas amostras de *Acholeplasma laidlawii*, *P.Blac* não é amplificado. Foi escolhido como controle amostras de *Acholeplasma laidlawii* por se tratar de um comum que indica contaminações em produtos biotecnológicos. A detecção de *A. laidlawii* é um controle de qualidade exigido pela Farmacopeia Brasileira e Europeia, de maneira frequente. Tendo em vista que o controle negativo não apresenta, portanto, beta-lactamases, há de se inferir que o *Acholeplasma* presente no intestino de cupim é exposto a diversas situações que, ou promoveram o aparecimento do gene de resistência, ou foi transferido horizontalmente, por contato com outros microrganismos. Quando comparado com uma amostra de DNA total isolada do intestino de *S. wheeleri*, foi possível identificar que apenas *P.Blac* foi amplificado. O mesmo resultado é observado na porção P3 do intestino, onde foi identificada e anotada a presença desta sequência. Alternativamente, os controles L1 e L2 não estão amplificados em nenhuma porção do intestino do cupim, sugerindo que sequências já caracterizadas de beta-lactamases de *Acholeplasma* não estão presentes em *S. wheeleri*.

As β -lactamases de classe C ou enzimas AmpC constituem um grupo importante de proteínas amplamente disseminadas; eles são codificados nos cromossomos da maioria dos

bastonetes Gram-negativos, sendo expressos de forma constitutiva ou induzível, embora também possam ser encontrados em expressões estáveis (Page, 2020). Recentemente, eles também foram cada vez mais encontrados como enzimas mediadas por plasmídeos, complicando assim o tratamento de infecções bacterianas. Vale ressaltar também que essas enzimas: (i) costumam apresentar um amplo espectro de hidrólise de β -lactâmicos; (ii) pode ser produzido em excesso em uma célula bacteriana (pelos motivos citados acima); (iii) são geralmente refratários à ação dos inibidores clássicos de β -lactamase; e (iv) como outras β -lactamases, podem evoluir por mutações de um único aminoácido, estendendo assim sua especificidade de substrato (Philippon et al., 2022). Por todas essas razões, atenção especial deve ser dada a essas β -lactamases para entender a especificidade de seu mecanismo de ação, bem como sua falta de resposta à ação dos inibidores clássicos. A busca por inibidores farmacológicos dessas enzimas deve se tornar uma prioridade no futuro (Tooke et al., 2019).

11. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DO TRABALHO DE TESE.

A metagenômica é uma técnica fundamental no estudo tanto da taxonomia microbiana bem como a rede genética complexa de interações entre a comunidade microbiológica presente em determinado ambiente. Isso fica cada vez mais evidente justamente pela incapacidade atual de se conseguir isolar e cultivar em laboratório tantas espécies. As metodologias clássicas de cultivo não reproduzem os nutrientes de uma amostra ambiental com fidelidade. Portanto, a maioria das espécies acaba não sendo descrita por essas metodologias.

A fim de minimizar os efeitos das técnicas tradicionais, a metagenômica com suas diferentes abordagens revelam a taxonomia e aparato genético dos microrganismos de diferentes ecossistemas. Com isso, é possível elucidar as complexas relações ecológicas microbianas bem como caracterizar o funcionamento genético e enzimático desses organismos. Além disso, há a possibilidade de identificar enzimas, bem como outras biomoléculas, capazes de realizar catálises de interesse comercial e biotecnológico.

Este trabalho permitiu caracterizar e identificar enzimas que possuem funções de resistência microbiana em diferentes microbiomas: solo e intestino de cupim. Nas amostras de solo, por meio de metagenômica funcional, foi identificado uma enzima pertencente ao metabolismo de aromáticos, provavelmente relacionado com consumo de matéria orgânica lignocelulósica, uma dioxigenase que conferiu resistência microbiana em cepa de bactéria para a expressão heteróloga dessa enzima. Os resultados obtidos da caracterização bioquímica da dioxigenase não se mostraram muito divergentes dos encontrados na literatura. Mas eventualmente, a capacidade de agir em uma situação de estresse a fim de garantir a sobrevivência da bactéria são fenômenos que devem ser mais explorados futuramente. Uma vez que, a resistência microbiana a antibióticos irá provocar uma dificuldade no tratamento de doenças infecciosas futuramente.

Não obstante, apesar da diferença de microbioma, foi identificado beta- lactamases em intestino de cupim. Sabe-se que os microrganismos estão em constante competição intra e interespecífica contra outros, logo, se faz necessário a existência de genes que sejam responsáveis para garantir a sobrevivência desses seres nessas condições adversas. Intestinos de hospedeiros são ricos em diversidade taxonômica de espécies, ou seja, os microrganismos estão competindo por recursos constantemente. Este trabalho identificou beta-lactamase em intestino de cupim e que ainda não havia sido descrita. Isso demonstra a necessidade de explorar microambientes que estejam próximos de interação com humanos, já que genes de resistência podem ser transferidos horizontalmente para outras espécies. O problema dessa transferência reside no fato de alcançar uma cepa que já seja patogênica para os seres humanos, complicando ainda mais as estratégias terapêuticas existentes para o tratamento dessas infecções.

Em conclusão, a abundância de genes hipotéticos ressalta a necessidade urgente de caracterizar os ARGs (genes de resistência a antibióticos) presentes no ambiente. Essa caracterização é essencial para aprofundar nosso conhecimento sobre os mecanismos de ação e o espectro de atuação desses genes, bem como compreender o papel deles no contexto ambiental.

A identificação e estudo detalhado dos ARGs ambientais são fundamentais para lidar com a crescente preocupação da resistência a antibióticos, pois eles podem representar uma fonte significativa de resistência que se espalha para patógenos humanos e agrícolas. Ao compreender como esses genes funcionam e se disseminam no meio ambiente, podemos desenvolver estratégias mais eficazes para mitigar os riscos associados à resistência microbiana.

As perspectivas desse trabalho são a de explorar com maior alcance as bibliotecas metagenômicas existentes no laboratório tanto em sua abordagem funcional bem como a baseada em sequências. A fim de identificar novas enzimas que possuem ações diferentes do esperado e já previamente identificadas. Bem como clonar esses genes e expressá-los heterologicamente para caracterizar bioquimicamente suas propriedades cinéticas.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALISMAIL, Nojood A. *et al.* Functional metagenomic analysis of dust-associated microbiomes above the Red Sea. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 13741, 2019.
- ADEWALE, Peter *et al.* A novel *Bacillus ligniniphilus* catechol 2,3-dioxygenase shows unique substrate preference and metal requirement. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 23982, 2021.
- AGU, P. C. *et al.* Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 13398, 2023.
- ALCOCK, Brian P *et al.* CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 51, n. D1, p. D690–D699, 2023.
- AMARAL, Aryanne G. *et al.* Richness pattern and phytogeography of the Cerrado herb–shrub flora and implications for conservation. **Journal of Vegetation Science**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 848–858, 2017.
- ARNAU, J.; LAURITZEN, C.; PETERSEN, G. E.; PEDERSEN, J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 48, n. 1, p. 1-13, 2006.
- ASIMAKOULA, Stamatia, Archontoula Giannakopoulou, Eirini Lappa, Epameinondas Tsagogiannis, Alexandra Primikyri, Haralambos Stamatis, and Anna-Irini Koukkou. 2022. “Characterization of Gentisate 1,2-Dioxygenase from *Pseudarthrobacter Phenanthrenivorans* Sphe3 and Its Stabilization by Immobilization on Nickel-Functionalized Magnetic Nanoparticles.” **Applied Microbiology** 2(1):113–32. doi: 10.3390/applmicrobiol2010007.
- AUBÉ, Johanne *et al.* A novel and dual digestive symbiosis scales up the nutrition and immune system of the holobiont *Rimicaris exoculata*. **Microbiome**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 189, 2022.
- BELANGER, Corrie R. *et al.* Surviving the host: Microbial metabolic genes required for growth of *Pseudomonas aeruginosa* in physiologically-relevant conditions. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 13, 2022.
- BENKERT, Pascal; KÜNZLI, Michael; SCHWEDE, Torsten. QMEAN server for protein model quality estimation. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 37, n. suppl_2, p. W510–W514, 2009.
- BHARTI, Richa; GRIMM, Dominik G. Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. **Briefings in Bioinformatics**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 178–193, 2021.
- BRANDT, Christian *et al.* In silico serine β -lactamases analysis reveals a huge potential resistome in environmental and pathogenic species. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 43232, 2017.
- BUCHFINK, Benjamin; XIE, Chao; HUSON, Daniel H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature Methods**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 59–60, 2015.
- CALIXTO JÚNIOR, João Tavares *et al.* Phytosociology, diversity and floristic similarity of a Cerrado

fragment on Southern Ceará state, Brazilian Semi-arid. **Scientia Forestalis**, [s. l.], v. 49, n. 130, 2021.

CAPELLA-GUTIERREZ, S.; SILLA-MARTINEZ, J. M.; GABALDON, T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 25, n. 15, p. 1972–1973, 2009.

CHEN, Jia *et al.* Crystal structure and mutagenic analysis of GDOsp, a gentisate 1,2-dioxygenase from *Silicibacter Pomeroyi*. **Protein Science**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 1362–1373, 2008.

CIFUENTES-CROQUEVIELLE, Camila; STANTON, Daniel E.; ARMESTO, Juan J. Soil invertebrate diversity loss and functional changes in temperate forest soils replaced by exotic pine plantations. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2020.

COLLI, Guarino R.; VIEIRA, Cecília R.; DIANESE, José Carmine. **Biodiversity and conservation of the Cerrado: recent advances and old challenges**. [S. l.]: Springer, 2020.

CORNWALLIS, Charlie K. *et al.* Symbioses shape feeding niches and diversification across insects. **Nature Ecology & Evolution**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 1022–1044, 2023.

CURTIS, M M; SPERANDIO, V. A complex relationship: the interaction among symbiotic microbes, invading pathogens, and their mammalian host. **Mucosal Immunology**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 133–138, 2011.

DE ABREU, Vinicius A. C.; PERDIGÃO, José; ALMEIDA, Sintia. Metagenomic Approaches to Analyze Antimicrobial Resistance: An Overview. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 11, 2021.

DE ARAUJO, Ademir Sergio Ferreira *et al.* Protist species richness and soil microbiome complexity increase towards climax vegetation in the Brazilian Cerrado. **Communications Biology**, [s. l.], v. 1, n. 1, 2018.

DE CASTRO, Alinne Pereira *et al.* Construction and validation of two metagenomic DNA libraries from Cerrado soil with high clay content. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 33, n. 11, p. 2169–2175, 2011.

DOS SANTOS, Débora Farage Knupp *et al.* New dioxygenase from metagenomic library from Brazilian soil: insights into antibiotic resistance and bioremediation. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 37, n. 9, p. 1809–1817, 2015.

DUARTE, Márcia *et al.* AromaDeg, a novel database for phylogenomics of aerobic bacterial degradation of aromatics. **Database**, [s. l.], v. 2014, 2014.

DUNWELL, Jim M; PURVIS, Alan; KHURI, Sawsan. Cupinas: the most functionally diverse protein superfamily?. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 7–17, 2004.

DURIGAN, Giselda; HERMÓGENES DE FREITAS, Leitão Filho; RODRIGUES, Ricardo Ribeiro. Phytosociology and structure of a frequently burnt cerrado vegetation in SE-Brazil. **Flora**, [s. l.], v. 189, n. 2, p. 153–160, 1994.

DURON, Olivier; HURST, Gregory DD. Arthropods and inherited bacteria: from counting the symbionts to understanding how symbionts count. **BMC Biology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 45, 2013.

FORSBERG, Kevin J *et al.* Functional metagenomics-guided discovery of potent Cas9 inhibitors in the

human microbiome. **eLife**, [s. l.], v. 8, 2019.

GONZÁLEZ-PLAZA, Juan J. *et al.* Functional repertoire of antibiotic resistance genes in antibiotic manufacturing effluents and receiving freshwater sediments. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. JAN, 2018.

GRÄSLUND, S.; NORDLUND, P.; WEIGELT, J.; HALLBERG, B. M.; BRAY, J.; GILEADI, O.; Structural Genomics Consortium. Protein production and purification. **Nature Methods**, v. 5, n. 2, p. 135-146, 2008.

GUÉGANTON, Marion *et al.* Anatomy and Symbiosis of the Digestive System of the Vent Shrimp *Rimicaris Exoculata* and *Rimicaris Chacei* Revealed Through Imaging Approaches. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 9, 2022.

GUIMARAES, Helena Ipe Pinheiro *et al.* Seasonal Variations in Soil Microbiota Profile of Termite (*Syntermes wheeleri*) Mounds in the Brazilian Tropical Savanna. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1482, 2020.

HADI, Joshua *et al.* Genetic Factors Affect the Survival and Behaviors of Selected Bacteria during Antimicrobial Blue Light Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 19, p. 10452, 2021.

HANEFELD, Ulf; HOLLMANN, Frank; PAUL, Caroline E. Biocatalysis making waves in organic chemistry. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 594–627, 2022.

HARPELS, Mark R.; LIPSCOMB, John D. Gentisate 1,2-Dioxygenase from *Pseudomonas*. Purification, characterization, and comparison of the enzymes from *Pseudomonas testosteroni* and *Pseudomonas acidovorans*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 15, p. 6301-6311, 1990.

HERNÁNDEZ-ORTEGA, Aitor *et al.* Catalytic Mechanism of Cofactor-Free Dioxygenases and How They Circumvent Spin-Forbidden Oxygenation of Their Substrates. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 137, n. 23, p. 7474–7487, 2015.

HIRANO, S.; MORIKAWA, M.; TAKANO, K.; IMANAKA, T.; KANAYA, S. Gentisate 1,2-Dioxygenase from *Xanthobacter polyaromaticivorans* 127W. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 192-199, jan. 2007. DOI: 10.1271/bbb.60444.

HOFMANN, Gabriel S. *et al.* The Brazilian Cerrado is becoming hotter and drier. **Global Change Biology**, [s. l.], v. 27, n. 17, p. 4060–4073, 2021.

HUANG, YuPeng *et al.* DSDP: A Blind Docking Strategy Accelerated by GPUs. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 63, n. 14, p. 4355–4363, 2023.

HUANG, Ling *et al.* Identification and characterization of a novel gentisate 1,2-dioxygenase gene from a halophilic martellella strain. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, 2015.

JENDELE, Lukas *et al.* PrankWeb: a web server for ligand binding site prediction and visualization. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 47, n. W1, p. W345–W349, 2019.

- JIANG, Haoyu *et al.* Exploring the differences of antibiotic resistance genes profiles between river surface water and sediments using metagenomic approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 161, p. 64–69, 2018.
- KALDUŃSKA, Karolina, Anna Kozakiewicz, Magdalena Wujak, and Andrzej Wojtczak. 2021. “Biological Inspirations: Iron Complexes Mimicking the Catechol Dioxygenases.” **Materials** 14(12):3250. doi: 10.3390/ma14123250.
- KARTHIKEYAN, Smruthi *et al.* Metagenomic Characterization of Soil Microbial Communities in the Luquillo Experimental Forest (Puerto Rico) and Implications for Nitrogen Cycling. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 87, n. 12, 2021.
- KATOH, K. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 30, n. 14, p. 3059–3066, 2002.
- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.
- KIMURA, Nobutada *et al.* Genetic and biochemical characterization of the dioxygenase involved in lateral dioxygenation of dibenzofuran from *Rhodococcus opacus* strain SAO101. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 474–484, 2006.
- KIMPLE, M. E.; BRILL, A. L.; PASKER, R. L. Overview of affinity tags for protein purification. **Current Protocols in Protein Science**, v. 73, n. 1, p. 9-9, 2013.
- KITCHEN, Douglas B. *et al.* Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004.
- LARSSON, D. G. Joakim; FLACH, Carl-Fredrik. Antibiotic resistance in the environment. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 257–269, 2022.
- LASKOWSKI, R. A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.
- LEE, H. J. *et al.* Gentisate 1,2-dioxygenase, in the third naphthalene catabolic gene cluster of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, has a role in naphthalene degradation. **Microbiology (New York)**, v. 157, n. 10, p. 2891-2903, out. 2011. DOI: 10.1099/mic.0.049387-0.
- LI, Yang *et al.* Effects of Salinity on the Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Oilfield Soils Emphasizing Degradation Genes and Soil Enzymes. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2022.
- LI, Wenjun *et al.* Sequence-based Functional Metagenomics Reveals Novel Natural Diversity of Functioning CopA in Environmental Microbiomes. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, [s. l.], 2022.
- LIMA, Raul Alcântara Teixeira *et al.* Functional and structural characterization of a novel GH3 β -glucosidase from the gut metagenome of the Brazilian Cerrado termite *Syntermes wheeleri*.

International Journal of Biological Macromolecules, [s. l.], v. 165, p. 822–834, 2020.

LIU, Yang *et al.* CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein–ligand blind docking. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 138–144, 2020.

LIU, Yuan *et al.* Molecules that Inhibit Bacterial Resistance Enzymes. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 43, 2018. LIU, Sijia *et al.* Opportunities and challenges of using metagenomic data to bring uncultured microbes into cultivation. **Microbiome**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 76, 2022.

LOMBARD, Vincent *et al.* The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 42, n. D1, p. D490–D495, 2014.

LUND, Peter A. *et al.* Understanding How Microorganisms Respond to Acid pH Is Central to Their Control and Successful Exploitation. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, 2020.

LÜTHY, Roland; BOWIE, James U.; EISENBERG, David. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, [s. l.], v. 356, n. 6364, p. 83–85, 1992.

MARKOWITZ, Victor M. *et al.* IMG/M 4 version of the integrated metagenome comparative analysis system. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 42, n. D1, p. D568–D573, 2014.

MATOS, Vanda Fernandes de *et al.* Phytosociology in areas of the Brazilian Cerrado: Cerrado stricto sensu, municipality of Porto Nacional, State of Tocantins. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, [s. l.], v. 42, p. e50353, 2020.

MCMILLAN, Elizabeth A. *et al.* Antimicrobial Resistance Genes, Cassettes, and Plasmids Present in *Salmonella enterica* Associated With United States Food Animals. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2019.

MIRDITA, Milot *et al.* ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nature Methods**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 679–682, 2022.

MORIYA, Y. *et al.* KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 35, n. Web Server, p. W182–W185, 2007.

PAGE, Malcolm G. P. A Unified Numbering Scheme for Class C β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 64, n. 3, 2020.

PANG, Ziqin *et al.* Soil Metagenomics Reveals Effects of Continuous Sugarcane Cropping on the Structure and Functional Pathway of Rhizospheric Microbial Community. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2021.

PATEL, Tithi *et al.* A brief account on enzyme mining using metagenomic approach. **Frontiers in Systems Biology**, [s. l.], v. 2, 2022.

PHILIPPON, Alain *et al.* Class C β -Lactamases: Molecular Characteristics. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 35, n. 3, 2022.

PRAYOGO, Fitra Adi *et al.* Metagenomic applications in exploration and development of novel enzymes from nature: a review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 39, 2020.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree: Computing Large Minimum Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 1641–1650, 2009.

PROCÓPIO, Luciano; BARRETO, Cristine. **The soil microbiomes of the Brazilian Cerrado**. [S. l.]: Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2021.

RAFIQI, Ab. Matteen *et al.* Developmental Integration of Endosymbionts in Insects. **Frontiers in Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 10, 2022.

ROBINSON, Peter K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, [s. l.], v. 59, p. 1–41, 2015.

RODRIGUES, Rafael J. A. *et al.* Phytosociology of weeds on Cerrado Mineiro coffee growing farms. **Advances in Weed Science**, [s. l.], v. 40, 2022.

SANDERSON, Haley *et al.* **Antibiotic resistance genes as an emerging environmental contaminant**. [S. l.]: Canadian Science Publishing, 2016.

SANTANA, Renata Henrique *et al.* The Gut Microbiota of Workers of the Litter-Feeding Termite *Syntermes wheeleri* (Termitidae: Syntermitinae): Archaeal, Bacterial, and Fungal Communities. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 545–556, 2015.

SANTOS-PEREIRA, Cátia *et al.* Functional and sequence-based metagenomics to uncover carbohydrate-degrading enzymes from composting samples. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 107, n. 17, p. 5379–5401, 2023.

SCARIA, Joy; CHANDRAMOULI, Umamaheswaran; VERMA, Sanjay Kumar. Antibiotic Resistance Genes Online (ARGO): A Database on vancomycin and b-lactam resistance genes. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 5–7, 2005.

SCHAPHEER, Constanza; PELLENS, Roseli; SCHERSON, Rosa. Arthropod-Microbiota Integration: Its Importance for Ecosystem Conservation. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2021.

SCHLACHTER, Caleb R. *et al.* Structural and functional characterization of an intradiol ring-cleavage dioxigenase from the polyphagous spider mite herbivore *Tetranychus urticae* Koch. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 107, p. 19–30, 2019.

SEO, Jiyoung *et al.* Amino acid substitutions in naphthalene dioxigenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4 result in regio- and stereo-specific hydroxylation of flavanone and isoflavanone. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 693–704, 2013.

SIDHU, Chandni, Vipul Solanki, Anil Kumar Pinnaka, and Krishan Gopal Thakur. 2019. “Structure Elucidation and Biochemical Characterization of Environmentally Relevant Novel Extradial Dioxigenases Discovered by a Functional Metagenomics Approach.” **MSystems** 4(6). doi: 10.1128/mSystems.00316-19.

SILVA, L. F. *et al.* Distribution pattern of arthropods on the leaf surfaces of *Acacia auriculiformis* saplings. **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], v. 83, 2023.

STUDIER, F. William. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures.

Protein Expression and Purification, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005.

SUBBOTINA, Natalya M., Alexey M. Chernykh, Anton I. Taranov, Anna D. Shebanova, Olga V. Moiseeva, Marta Ferraroni, and Marina P. Kolomytseva. 2021. “Gentisate 1,2-Dioxygenase from the Gram-Positive Bacteria *Rhodococcus Opacus* 1CP: Identical Active Sites vs. Different Substrate Selectivities.” **Biochimie** 180:90–103. doi: 10.1016/j.biochi.2020.10.016.

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 5, p. 523-533, 2003.

THE QIAEXPRESSIONIST A HANDBOOK FOR HIGH-LEVEL EXPRESSION AND PURIFICATION OF 6XHis-TAGGED PROTEINS. [S. l.: s. n.], 2016. Disponível em: www.qiagen.com/HB-2083.

TOKUDA, Gaku, Tomoko Nakamura, Ryutaro Murakami, and Ikuo Yamaoka. 2001. “Morphology of the Digestive System in the Wood-Feeding Termite *Nasutitermes Takasagoensis* (Shiraki) [Isoptera: Termitidae].” **Zoological Science** 18(6):869–77. doi: 10.2108/zsj.18.869.

TOOKE, Catherine L. *et al.* β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 431, n. 18, p. 3472–3500, 2019.

TÓTH, Adrienn Gréta *et al.* A survey on antimicrobial resistance genes of frequently used probiotic bacteria, 1901 to 2022. **Eurosurveillance**, [s. l.], v. 28, n. 14, 2023.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], p. NA-NA, 2009.

VAZ-MOREIRA, Ivone; NUNES, Olga C.; MANAIA, Célia M. **Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: Searching the links with the human microbiome**. [S. l.]: Blackwell Publishing Ltd, 2014. VUONG, Thi Minh Dien; ZENG, Jian Yong; MAN, Xiu Ling. Soil fungal and bacterial communities in southern boreal forests of the Greater Khingan Mountains and their relationship with soil properties. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2020.

WANI, A K *et al.* Metagenomic screening strategies for bioprospecting enzymes from environmental samples. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, [s. l.], v. 974, n. 1, p. 012003, 2022.

WEBB, Benjamin; SALI, Andrej. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, [s. l.], v. 54, n. 1, 2016.

WERWATH, Jörn, *et al.* 1998. “Biochemical and Genetic Characterization of a Gentisate 1, 2-Dioxygenase from *Sphingomonas* Sp. Strain RW5.” **Journal of Bacteriology** 180(16):4171–76.

WRIGHT, G. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 57, n. 10, p. 1451–1470, 2005.

ZHANG, Lu *et al.* Advances in Metagenomics and Its Application in Environmental Microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2021.

ZHANG, Zhenyan *et al.* Assessment of global health risk of antibiotic resistance genes. **Nature Communications**, [*s. l.*], v. 13, n. 1, p. 1553, 2022.

ZHANG, Wenyi *et al.* EDock: blind protein–ligand docking by replica-exchange monte carlo simulation. **Journal of Cheminformatics**, [*s. l.*], v. 12, n. 1, p. 37, 2020.

ZHAO, Man; LIN, Xingyu; GUO, Xianru. The Role of Insect Symbiotic Bacteria in Metabolizing Phytochemicals and Agrochemicals. **Insects**, [*s. l.*], v. 13, n. 7, p. 583, 2022.

ANEXOS

Sequencias das putativas Beta-lactamases encontradas em intestino de cupim.

>*ACHOLEPLASMA* SP. P32358

ATGAATGAAATTCGTTTCTTTGCTCTTGGGGGGCTTGGCGAAAACGTTGATGA
GATCATTCTGATTATAAGATGTTACTAAAAATCAAAGACCGGATTAAGGGA
TTTTCTTTTCGCATGCCCATGAAGACCACATTAGTGCCTTACCCACATTTTAA
AAGAACTAAATGTGCCAGTTTATGCCACTAAATTTACGATGAGTGTGGTAATT
GAAAGTTTAAAAGATGCAGGGCTTAATATTGATGAACTACAACCTAATATTAT
TGATCAAGACTCAATTGTCAAGTTTAATAATGTGAGAGTATCATTTTTTTCAAC
TGCGCATTCAATTCCTGAGTCAGTTGGGATTGCCTTATACACCTTATCAGGCAT
CATTGTATATACCTCGGATTTTACTTTTGTGCAAGGTAAAGACAAAACTATCA
AACTAACTTCCAAAAGATTAATGAATTAGCTAATCGGGGAGTGTTAATGTTAC
TGACCGAAAGTTTAGGTTCACTAACTAACCAAGATACATCTGTCTTTGATTCTT
TAAACCATAAGATTAATTCAATTTTTGCTGATGCTAAGGGTTCGGATTATCGTGA
CGTTGTTTTCTTCTGACTTACAAAAGATTCAAAGGGTAGTTGATATTGCCGTAC
TGCACAAAAACGGATTGCCATCATTGGTCGTAAGGCCAAAAAATTGTTGAT
CTTGCCATCAAACAAGGCTTTTTAAGTATTCCTAGTGAAGCGTTAGTATCGCTA
AAATATATTGATGAGAAAAATAAAAATGACGATCCTGATTTAGTATGTTTTGT
CACAGGCGATCGCCATGAACCATTTTATCAATTACACAAACGAGTGTTGGGGT
GCTCAAGGTGGAATAGGATGGAATTGTCATGCTGGTGGACGTGGTGCATATGT
TCGAGGTTCTTGACTATTCCATCCATGACATTGTTTGTCTGTTGGTGA

>*ACHOLEPLASMA* SP. P32358

ATGATATATGCGCATTTGATNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTTTTAACCCATG
AACACCACGATCATAATCAGGCTTAGCCTCACTACTTAAACAAAATATAATT
AAGCAAGTAATTTTATCAAGTGGCACCTATCAAGGTCTAACAAGTGAGGTAA
AAGCCTTACTGCCACAGGTTATAATTGTTAAGGCTGATTCAGTAATGACAATT
GGTGATTTTAGTATTAATAATTATTCAGCTTTCGCATGATGCAAATGAACCAAT
TGGCTTTATTTTTAACTATTTTGATAAAAAGGTTGTAAGGCTTACTGATACTGG
TTATGTTGATTCATCATATGTTAATGACCTAATGGGGGCAAATTTATATATTTT
AGAGTCAAATCATTGTCCGACATTATTAATGAAATCATCAAGACCTTTCTTTTT
AAAACAACGAATTATTGGGATGCATGGCCATTTATCAAACGATGATGCGGCG
ATGCTTGTTAAAAGTTAGTGACAAAACCATCAACTTGGGTGGTTGCTCATAT
TAGTGAATTATGTAATAAAATTGAATGTATAAATCAAAGTATTGATAAGTATT
TATCAGATATAAATGACTTAAAATCATTTTTTCTTCAACAAACAAAGACGGTG
AAATTAGCCTTATGA

>*ACHOLEPLASMA* SP. P31339

ATGAAAAATAAGGTTTTAGTTGAAAATAAAATCAATGAACTAATTAAGACT
TTGCTTTTGAAGGTGAGGTTTTATTGTTTGATAAGGATGGTTTAGCTTTATCGG
TTGGTAATCTTTCTGAGCCAATTTTACCAATGTACAAATATGATGCTGCTTTTG
TCCAAATTTTAATAATTCAGTTAATTGAACAAAAGGGTTATTCATTTGATCAA
ACAATTGATTTGTTTTCCCTGAGTTAAGGCATGCTGCAAAAATTACTTTGATG
AATTTGTTAAGAGATAACACTGGGTTAGTTGATATTGATGGGTATTTAGCCAA
ATTTACCAAAAATGATAAAAAATATCAAGCACTGACCGATGAGCAAAAAATG
GAGTTTGATGCTAATGCTTCACTTCAAAGAATTGCTGATGAAAAAGTAATTA
TATATATAATCAACTTGATTTAGAGCATAAGCCAGGTGCTAACCTTGATTATA

ATTCAGTGACTGAAAATTTAGGGGTTATTTTATTAGAAAAGAGCCCACCAAAAA
CCATATAGCAAGCTTTTATTAGACCTATTAGCTTCAGTTGATGTCAAGCCAAG
TTATTTTGACCACCCAGTAAAACGTTATATTAACCGTTACTATAACAACAAAA
TCACCTGGCACCTAGATGAGAAAACTTCATTGGCATAACAAGCATTGATGCT
TATAAAATATATATGGCACTAAAAGAATGTAGGCTTGTAAGTAAAAAAGCC
TTAAGCAAATGCAAAAACCTAATTGAGTTAATGGCATTGGTTTTCTGATGTTT
ATCCGTTTGTTCACCTATTTTGATTTTTCAAGATTTGGTATTTATGATTTTAAAG
AGGTTGATTTAGTGGTAGTTGTGACCACATTATTTGCTGGTTATGAAAAAGTA
ATTGATGGTGATAATTTTTCATTTGAATATAAGTTTATGAAACAAATCCTACC
ATTTATCCTAGATTATAAAAGTCCTAAATTGATTAACTAAATAAGAAAAATG
TTTATGATTTGTTACATATTGAAAATGATGAAAACAAATGTGGTTTATGGGT
TCAACTAAATATTCTTTTGCTTATCAATATGTAGAAGATAATGTTTATTGTTAT
TTGCTGGTTGATCATGGATTGGCTGTTGGAACGGTTACTTTACATATTGATCCT
AAAGGTGATTATTTGATATATCTAATGTTTTAATTGATAAAAAGTACCAAAA
TCGCGGCTATGGTAAAGCACTAATTAAGAATCTTTGAAAGTGTTTGCCAAG
ATGGAGCAAAATCTTTAACCTTATATGTTAATAAGGATAATCCAGCAGCATAT
AAAACCTATTTGAGTTGTGGCTTTATTGTAAAGGCAGTATATCCAATGAGCTA
TGAGATGATATATAAGTTTTAA

>*ACHOLEPLASMA* SP. U357

GAACCGGTCGGGTTTGTAAATTTATGAGGATGATAAGAAGCTGGTTTATTTAAC
GGATACTGGCTATATTCACCAAGACCTTTTGCCGATCATTGAAAATGCAGATT
TATATATTTTGGAATGTAATCATTGCCCCCAAATGTTAGAGACTTCTAAACGC
CCTTATCTTCTTAAAGAAAGAATTCGCGGAATTAAAGGTCATATGTCCAATGA
TGCAGCAGCTAGAATCATTAGTTGGGTTGCGAAAAAGCCTTGTGTTTGGGTAG
CTGCCACATTAGCCAAGAATGTAATTCGGTGTTAGCAATCAATAAAGAAACT
CAACGCACATTAAGAATATAAGCATATCAATGTGATTTGGCCAAACAAG
ATGACAATCTAATTATTGAATTATGA

>*Acholeplasma* sp. P32358

MNEIRFFALGGLGENVDEIIPDYKMLLKIKDRIKGIFLSHAHEDHISALPHILKELN
VPVYATKFTMSVVIESLKDAGLNIDELQLNIIDQDSIVKFNNVRVSFFSTAHSIPES
VGIALYTLSGIIVYTSDFTFVQGKDKNYQTNFQKINELANRGVLMMLTESLGSATN
QDTSVFDLNLHKINSIFADAKGRIIVTLFSSDLQKIQRVVDIAVLHKKRIAIIIGRKAQ
KIVDLAIKQGFLSIPSEALVSLKYIDEKNKNDDPDLVCFVTGDRHEPFYQLHKRVL
GCSRWNRMELSCWWTWCICSRFLDYSIHDIVCFCW

>*Acholeplasma* sp. P32358

MIY A H L X X X X X X F L T H E H H D H T S G L A S L L K Q N I I K Q V I L S S G T Y Q G L T S E V K A L
L P Q V I I V K A D S V M T I G D F S I K I I Q L S H D A N E P I G F I F N Y F D K K V V L L T D T G Y V D S S Y V
N D L M G A N L Y I L E S N H C P T L L M K S S R P F L K Q R I I G M H G H L S N D D A A M L V K K L V T
K P S T W V V A H I S E L C N K I E C I N Q S I D K Y L S D I N D L K I I F S S Q T K T V K L A L

>*Acholeplasma* sp. P31339

MKNKVLVENKINELIKDFAFEGEVLLFDKDGALSVGNLSEPILPMYKYDAAFVQ
ILIIQLIEQKGYSDQIDLFFPELRHAAKITLMNLLRDNTGLVDIDGYLAKFHQND
KKYQALTDEQKMEFDANASLQRIADEKVINIYNQLDLEHKPGANLDYNSVTENL
GVILLERAHQKPYSKLLLDLLASVDVKPSYFDHPVKRYINRYNNKITWHLDEKN
FIGITSIDAYKIYMALKECRLVSKKSLKQMQKLIENFNGIGFSDVYPPFVHYFDFSRFG
IYDFKEVDLVVVVTTLFAGYEKVIDGDNFSFEYKFMKQILPFILDYKSPKLIKLNK
KNVYDLLHIENDEKQMWFMGSTKYSFAYQYVEDNVYCYLLVDHGLAVGTVTL
HIDPKGDYFDISNVLIDKKYQNRGYGKALIKESLKVFAKHGAKSLTLYVNKDNPA
AYKTYLSCGFIVKAVYPMSYEMIIYKF

>*Acholeplasma* sp. U357

EPVGFVIYEDDKLVYLTDTGYIHQDLLPIENADLYILECNHCPQMLETSCRPYL
LKERIRGIKGHMSNDAAARIISWVAKKPCVWVAAHISQECNSVLAINKETQRTLK
EYKHINVILAKQDDNLIHEL

Chapter

Oil Palm Fatal Yellowing (FY), a Disease with an Elusive Causal Agent

*Cleiton Barroso Bittencourt,
Philippe de Castro Lins, Alessandra de Jesus Boari,
Betania Ferraz Quirino, Wenceslau Geraldes Teixeira
and Manoel Teixeira Souza Junior*

Abstract

Fatal yellowing disease (FY) is a bud rot-type disease that severely affects oil palm plantations in Latin America. Since 1974, when it was first reported in Brazil, this disorder has been responsible for severe economic losses in the oil palm industry; and, for nearly 50 years, several studies have tried to identify its causal agent, without success. The etiological studies regarding FY in oil palm explored either biotic and abiotic stress scenarios, in a single or combined manner. Most recently, the hypothesis in favor of one biotic cause has lost some grounds to the abiotic one, mainly due to new insights regarding deficient aeration in the soil, which reduces the potential for oxy-reduction, causing changes in the ionic composition of the soil solution. This review presents an overview of the history of this disease and the several efforts done to fulfill Koch's postulates over the last 40 years, besides discussing recent studies that revisited this subject using some omics technics. We conclude by discussing further uses of omics via a multi-omics integration (MOI) strategy to help finally find out what is really behind the genesis of FY. Finding this elusive causal agent of FY out will allow either the development of a more efficient diagnostic tool and the advance in studies trying to find out the source of the genetic resistance hidden in the genome of the American oil palm.

Keywords: *Elaeis guineensis*, palm oil, epidemiology, tropical diseases, etiology, abiotic stress, biotic stress

1. Introduction

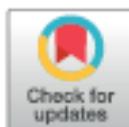
RESEARCH ARTICLE

Bacterial diversity dynamics in microbial consortia selected for lignin utilization

Isis Viana Mendes^{1,2}, Mariana Botelho Garcia^{1,3}, Ana Carolina Araújo Bitencourt^{1,2}, Renata Henrique Santana⁴, Philippe de Castro Lins^{1,2}, Rabeila Silveira², Blake A. Simmons⁵, John M. Gladden^{5,6}, Ricardo Henrique Kruger², Betania Ferraz Quirino^{1,2,3*}

1 Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica (PqEB), PqEB s/n, Brasília, DF, Brazil, **2** Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil, **3** Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil, **4** Instituto Federal de Brasília, Brasília, DF, Brazil, **5** Deconstruction Division, Joint BioEnergy Institute, Emeryville, California, United States of America, **6** Department of Biomass Science and Conversion Technology, Sandia National Laboratories, Livermore, California, United States of America

* betania.quirino@embrapa.br, bq@uwakurmi.com



OPEN ACCESS

Citation: Mendes IV, Garcia MB, Bitencourt AC, Santana RH, Lins PC, Silveira R, et al. (2021) Bacterial diversity dynamics in microbial consortia selected for lignin utilization. PLoS ONE 16(9): e0256083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256083>

Editor: Erika Kothe, Friedrich Schiller University, GERMANY

Received: August 20, 2020

Accepted: July 10, 2021

Published: September 13, 2021

Copyright: This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The data is publicly available at the DOE Joint Genome Institute IMG database (Project ID: 1126255, Proposal ID: 503004).

Funding: This work was supported by grants from FAP-DF (B.F.Q.), CNPq (B.F.Q.), CAPES (J.V.M., M.B.G., A.C.A.B. and P.C.L.) and DOE-JBEI DE-AC02-05CH11231 (J.M.G. and B.A.S.).

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Lignin is nature's largest source of phenolic compounds. Its recalcitrance to enzymatic conversion is still a limiting step to increase the value of lignin. Although bacteria are able to degrade lignin in nature, most studies have focused on lignin degradation by fungi. To understand which bacteria are able to use lignin as the sole carbon source, natural selection over time was used to obtain enriched microbial consortia over a 12-week period. The source of microorganisms to establish these microbial consortia were commercial and backyard compost soils. Cultivation occurred at two different temperatures, 30°C and 37°C, in defined culture media containing either Kraft lignin or alkaline-extracted lignin as carbon source. ITag DNA sequencing of bacterial 16S rDNA gene was performed for each of the consortia at six timepoints (passages). The initial bacterial richness and diversity of backyard compost soil consortia was greater than that of commercial soil consortia, and both parameters decreased after the enrichment protocol, corroborating that selection was occurring. Bacterial consortia composition tended to stabilize from the fourth passage on. After the enrichment protocol, Firmicutes phylum bacteria were predominant when lignin extracted by alkaline method was used as a carbon source, whereas Proteobacteria were predominant when Kraft lignin was used. Bray-Curtis dissimilarity calculations at genus level, visualized using NMDS plots, showed that the type of lignin used as a carbon source contributed more to differentiate the bacterial consortia than the variable temperature. The main known bacterial genera selected to use lignin as a carbon source were *Altererythro bacter*, *Aminobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Lysinibacillus*, *Microvirga*, *Mycobacterium*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Rhizobiales* and *Sphingobium*. These selected bacterial genera can be of particular interest for studying lignin degradation and utilization, as well as for lignin-related biotechnology applications.



Functional characterization of the *pUceS8.3* promoter and its potential use for ectopic gene overexpression

Rodrigo Rocha Fragoso^{1,2,3} · Fabricio Barbosa Monteiro Arraes^{2,3} · Isabela Tristan Lourenço-Fessutti^{2,3} · Vivian Jesus Miranda³ · Marcos Fernando Basso^{2,3} · André Vinicius Júlio Ferreira³ · Antônio Américo Barbosa Viana³ · Camila Barrozo Jesus Lins³ · Philippe Castro Lins³ · Stefanie Menezes Moura³ · João Aguiar Nogueira Batista^{3,4} · Maria Cristina Mattar Silva^{2,3} · Gilbert Engler^{2,5} · Carolina Vianna Morgante^{2,3,6} · Maria Eugênia Lisei-de-Sa^{2,3,7} · Raquel Medeiros Vasques^{2,3} · Janice de Almeida-Engler^{2,5} · Maria Fatima Grossi-de-Sa^{2,5,8} 

Received: 7 July 2022 / Accepted: 19 August 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Main Conclusion The *pUceS8.3* is a constitutive gene promoter with potential for ectopic and strong genes overexpression or active biomolecules in plant tissues attacked by pests, including nematode-induced giant cells or galls.

Abstract Soybean (*Glycine max*) is one of the most important agricultural commodities worldwide and a major protein and oil source. Herein, we identified the soybean ubiquitin-conjugating (E2) enzyme gene (*GmUBC4*; *Glyma.18G216000*), which is significantly upregulated in response to *Anticarsia gemmatilis* attack and *Meloidogyne incognita*-induced galls during plant parasitism by plant nematode. The *GmUBC4* promoter sequence and its different modules were functionally characterized *in silico* and *in planta* using transgenic *Arabidopsis thaliana* and *G. max* lines. Its full-length transcriptional regulatory region (promoter and 5'-UTR sequences, named *pUceS8.3* promoter) was able to drive higher levels of *uidA* (β -glucuronidase) gene expression in different tissues of transgenic *A. thaliana* lines compared to its three shortened modules and the *p35SdAMV* promoter. Notably, higher β -glucuronidase (GUS) enzymatic activity was shown in *M. incognita*-induced giant cells when the full *pUceS8.3* promoter drove the expression of this reporter gene. Furthermore, nematode-specific dsRNA molecules were successfully overexpressed under the control of the *pUceS8.3* promoter in transgenic soybean lines. The RNAi gene construct used here was designed to post-transcriptionally downregulate the previously characterized pre-mRNA splicing factor genes from *Heterodera glycines* and *M. incognita*. A total of six transgenic soybean lines containing RNAi gene construct were selected for molecular characterization after infection with *M. incognita* pre-parasitic second-stage (ppJ2) nematodes. A strong reduction in the egg number produced by *M. incognita* after parasitism was observed in those transgenic soybean lines, ranging from 71 to 92% compared to wild-type control plants. The present data demonstrated that *pUceS8.3* is a gene promoter capable of effectively driving dsRNA overexpression in nematode-induced giant cells of transgenic soybean lines and can be successfully applied as an important biotechnological asset to generate transgenic crops with improved resistance to root-knot nematodes as well as other pests.

Keywords *Anticarsia gemmatilis* · *Glycine max* · *GmUBC4* promoter/gene · *Meloidogyne incognita* · RNA interference · Ubiquitin-conjugating (E2) enzyme gene promoter

Abbreviations

DAI Days after inoculation
GUS β -Glucuronidase enzyme

NBTs New biotechnological tools
ppJ2 Pre-parasitic second-stage juvenile
RKN Root-knot nematode
UBC Ubiquitin conjugating
uidA GUS-encoding gene

Communicated by Dorothea Bartels.

 Maria Fatima Grossi-de-Sa

PUBLICAÇÃO SUBMETIDA

Functional and Structural Characterization of a Cerrado Soil Metagenomic Dioxygenase: bacterial antibiotic resistance and insights into bioremediation.

Philippe de Castro Lins¹; Pedro Ricardo Vieira Hamann¹; Jônatas Cunha Barbosa Lima²; João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa²; João Lucas da Silva Correia¹; Ikaro Alves de Andrade¹; Débora Farage Knupp dos Santos¹; Betania Ferraz Quirino³; Ricardo Henrique Krüger¹

1 Cell Biology Department, Enzymology Laboratory, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

2 Laboratory of Biophysics, Department of Cellular Biology, University of Brasilia, Brasilia-DF 70910-900, Brazil

3 The Brazilian Agricultural Research Corporation, Embrapa Agroenergy, Brasília 70770-901, DF, Brazil

Abstract

Dioxygenases are enzymes involved in the conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), attracting significant biotechnological interest for the conversion of recalcitrant organic compounds. Furthermore, few studies show that dioxygenases can take on the function of resistance genes in clones. This enzymatic versatility opens up new opportunities for elucidating the mechanisms of microbial resistance, as well as its biotechnological application. In this work, a Cerrado soil dioxygenase named CRB2(1) was biochemically characterized. The enzyme was shown to have optimal activity at pH 7; a temperature of 30 °C; and using iron ions as a cofactor for substrate cleavage. The kinetic catalytic parameters of CRB2(1) were $V_{max} = 0.02281 \mu\text{M}/\text{min}$ and $K_M = 97.6$. Its predicted three-dimensional structure obtained using the Modeller software v9.22 based on the crystal structure of gentisate 1,2-dioxygenase from *Silicibacter pomeroyi* (GDOsp) (PDB ID 3BU7, resolution 2.80 Å, residues 17 - 374) revealed substrate binding to the cupin domain, where the active site is located. The analyzed substrates interact directly with the iron ion, coordinated by three histidine residues. Changing the iron ion charge modifies the binding between the active site and the substrates. Currently, there is a demand for enzymes that have biotechnological activities of interest. Metagenomics allows analyzing the biotechnological potential of several organisms at the same time, based on sequence and functional activity analyses.

Keywords: Dioxygenase; Cerrado Soil; Metagenome; Resistome

PUBLICAÇÃO EM PREPARAÇÃO

Phylogenomic analysis and niche specialization of new *Acholeplasma* species in the termite's gut

Helena Ipê Pinheiro Guimarães¹, Otávio H. B. Pinto¹, Philippe de Castro Lins¹ and Ricardo H. Kruger¹.

¹ Department of Enzymology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, 70910-900, Brazil.

² Tocantis

Correspondence should be addressed to Ricardo H. Kruger; kruger@unb.br

Abstract. The gut of a termite has long been an object of study for evolutionary biology between the host and its microbiota. The oxygen and substrate distribution, as well as the activity of the termite gut, creates an interesting environment for microorganisms. In this work, metagenomic sequencing of the *Syntermes wheeleri* gut microbiota resulted in the assembly of three draft genomes from a Tenericutes phylum and *Acholeplasma*-affiliated clade. Metabolic reconstruction revealed that these genomes lack enzymes of the tricarboxylic acid cycle, and instead use simple sugars for anaerobic fermentation along with energy production by ATP synthase. Genome annotation also disclosed other metabolic features such as genes involved in hemicellulose metabolism, glycerol production, and a putative β -lactamase gene. Taxonomy based on metagenome scaffold genes revealed that *Acholeplasma* members are more abundant in the P3 gut segment than in P1. Also, metatranscriptomic data showed that CAZy *Acholeplasma* genes are expressed just in the P3 segment. In this work, we show three organisms belonging to the *Acholeplasmataceae* family, not yet described as present in a particular segment of the gut of the *Syntermes wheeleri* termite, an endemic species to the Brazilian Savannah biome. This niche specialization tells a story about the host and commensal relationship between invertebrates, bacteria, and the environment.