

FERNANDA DE SOUZA FREITAS

**DIVERSIDADE DE GENES CODIFICADORES DE ENZIMAS DO
METABOLISMO SECUNDÁRIO NO MICROBIOMA DO TRATO
GASTROINTESTINAL DE BOVINO DA RAÇA NELORE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F866d
2014

Freitas, Fernanda de Souza, 1988-
Diversidade de genes codificadores de enzimas do
metabolismo secundário no microbioma do trato gastrointestinal
de bovino da raça nelore / Fernanda de Souza Freitas. – Viçosa,
MG, 2014.
x, 47f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Célia Alencar de Moraes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.37-47.

1. Nelore (Zebu). 2. Bovino. 3. Policetídeo sintases.
4. Peptídeo sintetases não ribossomais. 5. Metabolismo
secundário. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 636.20852

FERNANDA DE SOUZA FREITAS

**DIVERSIDADE DE GENES CODIFICADORES DE ENZIMAS DO
METABOLISMO SECUNDÁRIO NO MICROBIOMA DO TRATO
GASTROINTESTINAL DE BOVINO DA RAÇA NELORE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2014.

Maria do Carmo Gouveia Peluzio

Marcos Rogério Tótola

Arnaldo Chaer Borges
(Coorientador)

Poliane Alfnas Zerbini
(Coorientadora)

Célia Alencar de Moraes
(Orientadora)

*Aos meus pais, João Batista e Sabina,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força e coragem.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, por me oferecerem a mais valiosa das ferramentas de trabalho, o conhecimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À professora Célia Alencar de Moraes, pela orientação, confiança e pelos sábios conselhos.

Aos professores Arnaldo Chaer Borges e Marcos Rogério Tótola, por disponibilizarem os seus respectivos laboratórios para a realização de parte desse trabalho, pela coorientação e ensinamentos preciosos.

Aos meus pais, João Batista e Sabina, pelo apoio e por não terem poupado esforços para que eu chegasse até aqui.

A minha irmã, Cristina, pelo suporte emocional nos momentos difíceis.

Ao Paulo Roberto, fiel companheiro nessa caminhada.

A Anna Rita, pela cordialidade e compreensão durante tantos anos de convivência.

As minhas amigas de república, Érica e Thaís, pela convivência amistosa e por todos os conselhos.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial, Alessandra, Eliana, Lisiane, Marcelo e Margarete, pelos ensinamentos em microbiologia, pelo apoio e pelos valiosos conselhos.

Aos amigos que trabalharam comigo no Laboratório de Ecologia Microbiana, Júlio, Larissa, Mayra e Paulo, pela agradável convivência, pelos conselhos e conhecimentos compartilhados. O auxílio de vocês foi fundamental para o meu sucesso.

A todos os professores com quem tive a oportunidade de aprender no decorrer desses dois anos.

Aos funcionários administrativos e técnicos do Departamento de Microbiologia, pela ajuda que sempre me ofereceram.

Aos amigos dos laboratórios de Fisiologia, Genética, Petróleo, Associações Micorrízicas, Anaeróbios e Alimentos.

A todos que de alguma forma me ajudaram na condução desse trabalho.

BIOGRAFIA

FERNANDA DE SOUZA FREITAS, filha de João Batista de Freitas e Sabina de Souza Freitas, nasceu em Manhuaçu - MG, no dia 12 de dezembro de 1988.

Em março de 2007 ingressou na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa – MG, e, em Janeiro de 2012 graduou-se em Bioquímica. Nesse mesmo ano iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, no Departamento de Microbiologia da mesma instituição.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ivii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1.Importância econômica dos metabólitos secundários de origem microbiana.....	4
2.2.Enzimas do metabolismo secundário	5
2.2.1. Policetídeo Sintases	5
2.2.2. Peptídeo Sintetases Não Ribossomais	7
2.3.Micro-organismos como fonte de metabólitos secundários	8
2.4.A busca por novos metabólitos secundários.....	9
2.5.O microbioma do trato gastrointestinal do bovino da raça Nelore como fonte de novos metabólitos secundários	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1.Amostragem.....	15
3.2.Extração do DNA metagenômico.....	15
3.3.Análise da diversidade PKS e NRPS no microbioma do trato gastrointestinal do bovino por PCR-DGGE	17
3.4.Análise de especificidade dos <i>primers</i>	18
3.5.Construção de bibliotecas de clones contendo domínios de adenilação .	21
3.6.Análise das sequências	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1.Amplificação de genes codificadores de enzimas PKS e NRPS a partir do DNA metagenômico do TGI do bovino da raça Nelore	23
4.2.Sequenciamento da UTOs e especificidade dos <i>primers</i>	23
4.3.Diversidade dos genes codificadores dos domínios de adenilação das NRPS por PCR-DGGE.....	28
4.4.Riqueza de UTOs	30
4.5.Diversidade dos genes codificadores dos domínios de adenilação das NRPS pela construção e sequenciamento de bibliotecas de clones.....	32

5. CONCLUSÕES.....	36
REFERÊNCIAS.....	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Bandas referentes às UTOs representativas selecionadas para sequenciamento..... 24
- Figura 2.** Análise de agrupamento dos perfis eletroforéticos da PCR-DGGE gerados a partir das amostras de digesta do rúmen, retículo e omaso, coletadas de um bovino a raça Nelore, utilizando-se *primers* que tem como alvo as sequências codificadoras dos domínios de adenilação das NRPS. À direita estão apresentados os índices de Riqueza de UTOs (R) e de Diversidade de Shannon-Weaver (H). A comparação dos perfis foi gerada com o *software* BioNumerics (versão 6.0). A escala indica o nível de similaridade com base no coeficiente de Dice. RUL – Fração líquida da digesta do rúmen; RUS – Fração sólida da digesta do rúmen; RE – Digesta do retículo; OM – Digesta do omaso..... 29
- Figura 3.** (A) Riqueza de UTOs referentes às sequências codificadoras dos domínios de adenilação das NRPS detectada pela separação dos *amplicons* por DGGE; (B) Diagrama de Venn, construído com base na matriz de presença e ausência de UTOs gerada pelo programa BioNumerics (versão 6.0), demonstrando as UTOs, referentes às sequências codificadoras dos domínios de adenilação das NRPS, únicas e compartilhadas pelas comunidades de diferentes regiões do trato gastrointestinal do bovino. RUL – Fração líquida da digesta do rúmen; RUS – Fração sólida da digesta do rúmen; RE – Digesta do retículo; OM – Digesta do omaso 31
- Figura 4.** Árvore filogenética, reconstruída pelo método Neighbor-Joining, das sequências traduzidas dos domínios A das NRPS. Os valores de *bootstrap* superiores a 50 % estão apresentados. A barra de escala indica 0.2 substituições por posição nucleotídica. A árvore foi reconstruída usando o programa MEGA versão 6.0 com o modelo de correção de Poisson para aminoácidos, deleção completa dos *gaps* e *bootstrap* consistindo de 1000 repetições. Clones 4, 5 e 6 – Fração sólida do rúmen; Clone 9 – Fração líquida do rúmen; Clones 15, 18, 21 e 22 – Retículo; Clones 23 e 28 – Omaso..... 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação e localização das amostras no trato gastrointestinal do bovino da raça Nelore	16
Tabela 2. <i>Primers</i> e condições de amplificação utilizadas para a PCR	19
Tabela 3. <i>Primers</i> e condições de amplificação utilizadas para a PCR-DGGE	20
Tabela 4. Detecção por PCR dos genes codificadores das PKS (KS) e NRPS (A) no TGI do bovino da raça Nelore. (+) – presença do <i>amplicon</i> ; (-) – ausência do <i>amplicon</i>	23
Tabela 5. Resultados das comparações entre as sequências das bandas excisadas com as depositadas no <i>National Center for Biotechnology Information</i> (NCBI) com o número do acesso, o E-value, valor de identidade e os domínios conservados	25
Tabela 6. Resultados das comparações entre as sequências dos clones com as depositadas no <i>National Center for Biotechnology Information</i> (NCBI) com o número do acesso, o E-value, valor de identidade e os domínios conservados. Clones 4, 5 e 6 – Fração sólida do rúmen; Clone 9 – Fração líquida do rúmen; Clones 15, 18, 21 e 22 – Retículo; Clones 23 e 28 – Omaso.....	32

RESUMO

FREITAS, Fernanda de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Diversidade de genes codificadores de enzimas do metabolismo secundário no microbioma do trato gastrointestinal de bovino da raça Nelore.** Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Coorientadores: Arnaldo Chaer Borges, Poliane Alfenas Zerbini e Wendel Batista da Silveira.

O estudo da diversidade de peptídeo sintetases não ribossomais (NRPS) e policetídeo sintases (PKS) de origem microbiana em ambientes naturais é uma importante ferramenta para a busca de metabólitos secundários de interesse industrial. Essa informação, aliada à descoberta da capacidade dos microorganismos anaeróbios em sintetizar metabólitos secundários, torna o microbioma do trato gastrointestinal (TGI) do bovino da raça Nelore, caracterizado recentemente, um ambiente em potencial para a bioprospecção desses compostos. O objetivo desse estudo foi determinar a existência e diversidade de genes codificadores de PKS e NRPS no microbioma do TGI do bovino da raça Nelore por PCR-DGGE e pela construção e sequenciamento de bibliotecas de clones. Foram identificados genes codificadores de NRPS nos microbiomas do rúmen, retículo e omaso de um bovino da raça Nelore. A análise da PCR-DGGE demonstrou a variação da diversidade e da composição desses genes ao longo das comunidades analisadas. Os maiores índices de riqueza e diversidade foram encontrados na amostra da fração sólida do rúmen. Contudo, a maior parte das UTOs é compartilhada pelas quatro comunidades. A análise filogenética das sequências de aminoácidos dos domínios de adenilação (domínios A) das NRPS indica que as NRPS identificadas agrupam-se com peptídeo sintetases não caracterizadas de *Butyrivibrio proteoclasticus* B316, de *Clostridium bolteae*, de *Coprococcus catus* GD/7 e de *Xanthomonas citri*. As sequências traduzidas obtidas apresentaram entre 37 e 91 % de identidade em relação às depositadas no GenBank. A baixa identidade das sequências codificadoras do domínio A das NRPS, obtidas a partir do microbioma do TGI do bovino da raça Nelore, em relação a sequências depositadas no banco de dados do NCBI, indicaram que esse microbioma abriga um potencial inexplorado para a bioprospecção de novos produtos.

ABSTRACT

FREITAS, Fernanda de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Secondary metabolism genes coding diversity in a Nelore steer gastrointestinal tract microbiome.** Adviser: Célia Alencar de Moraes. Co-advisers: Arnaldo Chaer Borges, Poliane Alfenas Zerbini and Wendel Batista da Silveira.

The diversity study of microbial nonribosomal peptide synthetases (NRPS) and polyketide synthases (PKS) in natural environments provides an important tool in the search for secondary metabolites of industrial interest. This information associate to the recent discovery of the ability of anaerobic microorganisms to synthesize secondary metabolites makes the newly described gastrointestinal tract (GIT) microbiome from a Nelore steer an potential environment to bioprospect new secondary metabolites. Thereby, this work aimed to determine the existence and diversity of genes encoding PKS and NRPS in the GIT microbiome of a Nelore steer by PCR-DGGE and by construction and analysis of a clone library. NRPS genes were identified in the rumen, reticulum and omasum microbiomes. The PCR-DGGE analysis demonstrated differences in the diversity and composition of these genes along the communities. The highest levels of richness and diversity were observed for the rumen solid fraction sample, however, most of the OTUs are shared by the four communities. The phylogenetic analysis of amino acid sequences indicate that the identified adenylation domains (A) clustered with those from uncharacterized peptide synthetases from *Butyrivibrio proteoclasticus* B316, *Clostridium bolteae*, *Coprococcus catus* GD/7 and *Xanthomonas citri*. Most of the indentified A domains showed between 37 and 91 % identities at aminoacid level to their closest matches in GenBank. These low identities indicate that this microbiome harbors untapped potential for new products bioprospecting.

1. INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários são produtos do metabolismo não essencial para o crescimento, desenvolvimento ou reprodução de um organismo (VAISHNAV & DEMAINE, 2011).

Muitos metabólitos secundários são utilizados na indústria farmacêutica como fonte de antibióticos, imunossupressores, redutores de colesterol, anti-helmínticos e anti-parasíticos, sendo o mercado anual estimado para esses produtos de U\$ 40 bilhões (DEMAINE, 2013).

As principais classes de metabólitos secundários produzidos por micro-organismos são peptídeos e policetídeos. Esses compostos são sintetizados por grandes complexos enzimáticos multifuncionais denominados Peptídeo Sintetases Não Ribossomais (NRPS) e Policetídeo Sintases (PKS), respectivamente (O'BRIEN & WRIGHT, 2011).

As PKS são enzimas modulares, nas quais cada módulo é responsável pela incorporação de um monômero (unidade acil) ao produto em um processo sequencial. Cada módulo mínimo é constituído de um conjunto de domínios denominados cetoacil sintase (KS), acil transferase (AT) e domínio proteína carreadora de acil (ACP). Outros domínios, denominados cetorredutase (KR), desidratase (DH) e enoil redutases (ER), não são essenciais, mas determinam a diversidade química dos compostos sintetizados (JENKE-KODAMA et al., 2005). De acordo com a organização estrutural desses domínios, as PKS podem ser divididas em três categorias, denominadas PKS I, PKS II e PKS III.

As NRPS, semelhantemente às PKS, são organizadas em módulos, sendo cada módulo responsável pela incorporação de um aminoácido específico ao peptídeo. Um módulo mínimo das NRPS é constituído pelos domínios de adenilação (A), carreador de peptidil (PCP) e de condensação (C). Há também domínios auxiliares, como o de epimerização (E), de epimerização duplo (E/C), de metilação (M), de redução (R) e o de ciclização, (Cy). Domínios tioesterases (TE), normalmente localizados na porção terminal do módulo, liberam o produto peptídico final da enzima por meio de hidrólise ou ciclização (NIKOLOULI & MOSSIALOS, 2012).

Muitos micro-organismos procariotos são amplamente estudados quanto ao potencial para biossíntese de metabólitos secundários, incluindo *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cyanobacteria*, *Myxobacteria*, *Mycobacteria* e *Streptomyces*. Os mais promissores são os do gênero *Streptomyces*, aos quais são atribuídos 50 % dos metabólitos secundários já caracterizados (BERDY, 2005; GOODFELLOW & FIEDLER, 2010). Contudo, é provável que outros micro-organismos sejam também capazes de produzir metabólitos secundários. Esses micro-organismos entram na categoria dos negligenciados, uma vez que poucos esforços têm sido empregados para investigar seu metaboloma secundário (LETZEL et al., 2013).

Os micro-organismos anaeróbios fazem parte do grupo de micro-organismos negligenciados, e por muito tempo acreditou-se que esses micro-organismos fossem incapazes de produzir metabólitos secundários, em razão de seu metabolismo energético menos eficiente em relação aos aeróbios. Contudo, a análise de uma série de genomas desses micro-organismos revelou a ampla ocorrência de *clusters* gênicos órfãos putativamente envolvidos na biossíntese de PKS e NRPS (BEHNKEN & HERTWECK, 2012a; LETZEL et al., 2013). Isso os torna fontes promissoras de novos metabólitos secundários.

O microbioma do TGI do bovino da raça Nelore foi elucidado recentemente (OLIVEIRA et al., 2013) e constitui um ambiente promissor para pesquisa de novos produtos de origem microbiana, dada sua alta e inexplorada diversidade de micro-organismos.

Estudos sobre o microbioma de bovinos têm como foco principal os micro-organismos simbiotes do rúmen, dada sua ligação com características economicamente ou ambientalmente importantes, como a eficiência de conversão alimentar (GUAN et al., 2008; ZHOU et al., 2009), produção de metano (ZHOU et al., 2010) e a descoberta de enzimas e de micro-organismos fermentadores de biomassa para produção de biocombustíveis (HESS et al., 2011). Contudo, com base no conhecimento da estrutura dessa comunidade e na literatura (LETZEL et al., 2013), é provável que esse microbioma abrigue uma ampla gama de funções, incluindo aquelas destinadas ao metabolismo secundário. A descoberta recente do primeiro antibiótico produzido por um anaeróbio, a clostiamida, sintetizada por *Clostridium cellulolyticum* (LINCKE et al., 2010), incentiva a pesquisa futura nesse sentido.

Com base nessas informações, o objetivo deste estudo foi identificar a presença de genes codificadores de PKS (KS) e NRPS (A) no microbioma do TGI do bovino da raça Nelore, abrindo a oportunidade para a descoberta de novos compostos em uma comunidade cujo potencial, nesse sentido, é inexplorado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância econômica dos metabólitos secundários de origem microbiana

Os metabólitos secundários são produtos do metabolismo não essencial para o crescimento, desenvolvimento ou reprodução de um organismo. Entre as funcionalidades a eles atribuídas, encontram-se as de conferir ao organismo produtor vantagens competitivas, participar de mecanismos de defesa e facilitar os processos reprodutivos (VAISHNAV & DEMAINE, 2011). Muitos dos metabólitos secundários de origem microbiana são utilizados na indústria como fonte de antibióticos, imunossuppressores, redutores de colesterol, anti-helmínticos, anti-parasíticos, herbicidas naturais, reguladores de crescimento para plantas, biopesticidas e bioinseticidas. Além disso, muitos produtos utilizados na indústria são derivados semissintéticos de metabólitos secundários, produzidos por conversão química ou por bioconversão (DEMAINE, 2013).

Cerca de 50 % das novas drogas introduzidas no mercado entre 1985 e 2010 foram metabólitos secundários microbianos ou compostos relacionados. Em 2003, o mercado para tais compostos atingiu U\$ 40 bilhões (SINGH & MACDONALD, 2010; DEMAINE, 2013). Cerca de 70 % dos antibióticos em uso são compostos naturais ou derivados (SINGH & MACDONALD, 2010). Adicionalmente, 74 % de todas as novas entidades químicas para o tratamento do câncer, 70 % dos medicamentos anti-enxaqueca e 66 % dos agentes anti-hipertensivos foram obtidos a partir de metabólitos secundários (DEMAINE, 2009; SINGH & MACDONALD, 2010).

Apesar do sucesso obtido na descoberta de novas drogas derivadas de compostos naturais a partir do final dos anos de 1970, a taxa de descoberta de novos produtos caiu significativamente no século 21. O principal motivo foi a perda de interesse das indústrias farmacêuticas nesses compostos, dado ao tempo demandado para o desenvolvimento de estudos pré-clínicos e clínicos e ao curto período de vigência das patentes (DEMAINE, 2013). Contudo, a taxa de descoberta de novos medicamentos a partir de metabólitos secundários ainda

é alta quando comparada à taxa de descoberta por meio da triagem massiva de bibliotecas de compostos sintéticos (SINGH & MACDONALD, 2010).

A pesquisa por novos compostos naturais deve ser estimulada, em razão da demanda não atendida em diversas áreas, como por exemplo, o crescente número de patógenos resistentes a múltiplas drogas. Evidentemente, os compostos naturais apresentam oportunidades que não devem ser ignoradas. Essas incluem sua novidade, complexidade e notável diversidade estrutural e funcional (DEMAIN, 2013). A oportunidade também é representada pela imensidão do mundo microbiano, uma vez que cerca de 95 a 99,9 % dos micro-organismos existentes na natureza ainda não foram cultivados em laboratório, apenas uma proporção mínima desses já foram investigados quanto à capacidade para produção de metabólitos secundários, remanescendo um grande potencial inexplorado (DEMAIN, 2013).

2.2. Enzimas do metabolismo secundário

As principais classes de metabólitos secundários produzidos por micro-organismos são os peptídeos e policetídeos. Estes compostos são sintetizados por grandes complexos enzimáticos multifuncionais denominados Peptídeo Sintetases Não Ribossomais (NRPS) e Policetídeo Sintases (PKS), respectivamente. Outras classes de metabólitos secundários menos comuns incluem carboidratos, lipídeos, terpenóides, esteróides e alcalóides (O'BRIEN; WRIGHT, 2011).

Os genes codificadores dessas enzimas normalmente estão organizados em operons, que incluem genes associados ao transporte, resistência, modificação pós-traducional e outras funções relacionadas ao uso efetivo dos produtos codificados (ZIEMERT & JENSEN, 2012).

2.2.1. Policetídeo Sintases

Os policetídeos são compostos estruturalmente e funcionalmente diversos sintetizados pelas PKS a partir de precursores acil-CoA. Nessa categoria estão incluídas muitas drogas de importância clínica e econômica,

como a tetraciclina, daunorrubicina, eritromicina, rapamicina e lovastatina (SHEN, 2003).

As PKS são altamente diversas e distribuídas entre bactérias, fungos e plantas (JENKE-KODAMA et al., 2005). Essas enzimas são modulares, e cada módulo é responsável pela incorporação de um monômero ao produto em um processo sequencial. Cada módulo é constituído de um conjunto de domínios e, de acordo com a organização estrutural destes domínios, as PKS podem ser divididas em três categorias, denominadas PKS I, PKS II e PKS III (SHEN, 2003).

As PKS I são as mais diversas e geralmente são compostas por pelo menos três domínios: um domínio cetoacil sintase (KS), um domínio acil transferase (AT) e um domínio de proteína carreadora de acil (ACP). O domínio AT é responsável pelo reconhecimento, ligação e transferência do grupo acil-CoA para o domínio ACP. O domínio ACP carrega o grupo acil ativado para o domínio KS, o qual catalisa a condensação descarboxilativa entre dois grupos acil ligados aos domínios ACP de dois módulos adjacentes. Outros domínios, denominados cetorreductase (KR), desidratase (DH) e enoil redutases (ER) não são essenciais, mas determinam a diversidade química dos compostos sintetizados (JENKE-KODAMA et al., 2005). De acordo com a organização e mecanismo de ação desses módulos, as PKS I podem ser divididas em subgrupos. As PKS I modulares cis-AT possuem múltiplos módulos que contêm pelo menos três domínios denominados KS, ACP e AT (JENKE-KODAMA et al., 2005). As PKS I trans-AT não contêm um domínio AT cognato e esta atividade é desempenhada por um domínio AT codificado em *trans*. As PKS I iterativas contêm os domínios característicos das PKS I, mas estes atuam de maneira reiterada, utilizando os domínios de maneira cíclica (JENKE-KODAMA et al., 2005). As PKS I enedinas são responsáveis pela síntese das enedinas, compostos naturais constituídos por um núcleo com dois grupos acetilênicos conjugados por uma ligação dupla a um anel de nove ou dez membros. Essas PKS I são iterativas, mas apresentam um domínio C-terminal que é característico dessa classe de enzimas (SHEN, 2003).

As PKS II são complexos multienzimáticos com apenas um conjunto de domínios que atuam de maneira reiterada e são relacionados à síntese de policetídeos aromáticos (SHEN, 2003). A PKS II mínima é composta por dois

domínios, KS e ACP. Nessas proteínas, cada sítio catalítico KS está localizado em uma proteína distinta. A proteína KS-alfa (KS α) realiza as etapas de condensação e a KS-beta (KS β) determina o número de ciclos repetidos que devem ocorrer (FENG et al, 2011).

O terceiro tipo, PKS III, é constituído por cetoacil sintases homodiméricas que atuam essencialmente de forma reiterada como condensinas independentes de proteínas carreadoras de acil (ACP), e são responsáveis pela síntese de poli-hidroxi-fenóis (SHEN, 2003).

2.2.2. Peptídeo Sintetases Não Ribossomais

A segunda principal categoria de metabólitos secundários, os peptídeos não ribossomais, é sintetizada a partir de aminoácidos precursores pelas NRPS. Esses metabólitos diferenciam-se daqueles sintetizados ribossomalmente pelo fato de conterem em sua estrutura aminoácidos modificados e aminoácidos não usuais. Nessa categoria encontram-se drogas clinicamente importantes como a daptomicina, a bleomicina e a ciclosporina (STRIEKER et al., 2010).

As NRPS, semelhantemente às PKS, são organizadas em módulos, sendo cada módulo responsável pela incorporação de um aminoácido específico ao peptídeo. Um módulo mínimo das NRPS é constituído pelos domínios de adenilação (A), carreador de peptidil (PCP) e de condensação (C). O domínio A é o responsável pelo reconhecimento e ativação de seu aminoácido cognato e pela transferência do substrato ativado para o domínio PCP do mesmo módulo. O domínio C catalisa a formação da ligação C-N entre a cadeia em elongação e o aminoácido ativado e o domínio PCP é responsável pela propagação da cadeia peptídica crescente. Há também domínios auxiliares, como o de epimerização (E), que epimeriza um L-aminoácido a D-aminoácido, o de epimerização duplo (E/C), que é o responsável pela epimerização e condensação, e o de ciclização (Cy). Esses domínios podem substituir o domínio C na incorporação e subsequente ciclização de cisteína, treonina ou serina. O domínio de oxidação (LIN et al., 2010), normalmente com localização posterior ao domínio PCP ou no C-terminal do domínio A, catalisa a formação de um tiazol aromático por meio da oxidação de um anel tiazolina.

Domínios tioesterases (TE), normalmente localizados na porção terminal do módulo, liberam o produto peptídico final da enzima por meio de hidrólise ou ciclização (NIKOLOULI & MOSSIALOS, 2012).

Frequentemente são encontrados sistemas que incluem ambas as funcionalidades, as de PKS e as de NRPS. Tais sistemas híbridos, PKS-NRPS, produzem moléculas compostas por unidades acil e aminoacil, como a bleomicina (DU et al., 2001).

2.3. Micro-organismos como fonte de metabólitos secundários

Os micro-organismos que habitam ambientes naturais têm sido amplamente investigados quanto à capacidade de biossíntese de metabólitos secundários. A competição pela sobrevivência e as pressões ambientais dirigem a diversificação dos mecanismos de defesa que, por sua vez, determinam as diversidades química e biológica e o potencial para biossíntese de metabólitos secundários (SINGH & MACDONALD, 2010).

Os micro-organismos procariotos isolados de ambientes naturais mais amplamente estudados quanto ao potencial para biossíntese de metabólitos secundários incluem *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cyanobacteria*, *Myxobacteria*, *Mycobacteria* e *Streptomyces*. Os mais promissores são os do gênero *Streptomyces*, aos quais são atribuídos 50 % dos metabólitos secundários já caracterizados (BERDY, 2005; GOODFELLOW & FIEDLER, 2010).

Diversos medicamentos, como antibióticos, imunossuppressores e drogas antitumorais em uso foram obtidos de micro-organismos isolados de fontes ambientais (DEMAIN, 2009; SINGH & MACDONALD, 2010).

Cerca de 10 a 15 % dos antibióticos são produzidos por bactérias não filamentosas, 20 % são produzidos por fungos filamentosos e aproximadamente 50 % são produzidos por actinomicetos, sendo que, 75 % destes são produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces* (DEMAIN, 2013).

A descoberta recente do primeiro antibiótico produzido por um anaeróbio estrito, a clostiamida, sintetizada por *Clostridium cellulolyticum* (LINCKE et al., 2010), enfatiza a necessidade de busca por novos metabólitos secundários em fontes não tradicionais.

Estudos de genômica tem demonstrado que bactérias que previamente eram consideradas incapazes de produzir metabólitos secundários possuem potencial genético para essa função (DONADIO et al., 2007; LETZEL et al., 2013). Esses micro-organismos entram na categoria dos negligenciados, uma vez que poucos esforços têm sido empregados para investigar seu metaboloma secundário (LETZEL et al., 2013). Essa categoria inclui bactérias de habitats não usualmente investigados (PIDOT et al., 2013) e anaeróbios (LETZEL et al., 2013). Assim, dado o alto número de *clusters* gênicos órfãos putativamente envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários presentes nos genomas sequenciados e o fato dos micro-organismos cultiváveis e já identificados representarem apenas 1 % do total estimado, acredita-se que somente 10 % do total de metabólitos secundários codificados por micro-organismos já tenham sido isolados e caracterizados (GOODFELLOW & FIEDLER, 2010). Assim, as análises de genomas e metagenomas tornaram-se de grande utilidade na investigação de novas vias de metabolismo secundário (BANIK & BRADY, 2010; PIEL, 2011; NIKOLOULI & MOSSIALOS, 2012).

2.4. A busca por novos metabólitos secundários

No passado, novos compostos eram descobertos pela triagem do potencial antimicrobiano dos metabólitos secundários produzidos por bactérias isoladas, principalmente do solo (ZOTCHEV, 2012). Contudo, devido à alta frequência de redescoberta de compostos já caracterizados, a triagem baseada no cultivo foi quase que completamente abandonada (BALTZ, 2008).

As novas estratégias de triagem de metabólitos secundários, baseadas em DNA, tornaram-se complementares às metodologias tradicionais, e em muitos casos, suplantaram-nas (PIDOT et al., 2013). Durante a última década, em razão do rápido desenvolvimento das ferramentas de bioinformática, das tecnologias de sequenciamento e do número de genomas e metagenomas anotados, a busca e a descoberta de novos compostos sintetizados por PKS e NRPS através da avaliação das sequências depositadas em bancos de dados cresceram significativamente (NIKOLOULI & MOSSIALOS, 2012). Adicionalmente, as análises de genomas de organismos produtores tradicionalmente estudados demonstraram a presença de mais genes para o

metabolismo secundário do que produtos descritos como ocorre para algumas espécies de *Streptomyces* (OMURA et al., 2001; NETT et al., 2009).

As análises de metagenomas têm sido amplamente utilizadas para a identificação de *clusters* gênicos putativamente envolvidos na síntese de metabólitos secundários em ambientes naturais. Essa identificação é realizada através da busca por genes centrais que codificam as PKS e as NRPS em conjunção com a função predita para os genes vizinhos (GOODFELLOW & FIEDLER, 2010).

Uma abordagem amplamente empregada na busca de novos metabólitos secundários em ambientes naturais baseia-se na construção e análise de bibliotecas metagenômicas. Essa abordagem beneficia-se do fato dos genes codificadores das enzimas de biossíntese de metabólitos secundários encontrarem-se normalmente organizados em *clusters*. Assim, clones que contenham um *cluster* gênico completo podem ter seus produtos identificados por expressão heteróloga ou pelo sequenciamento (ZIEMERT et al., 2012). Adicionalmente, as comunidades microbianas desses ambientes podem ser triadas quanto ao potencial para biossíntese de PKS e NRPS pela amplificação direta do DNA metagenômico, utilizando-se *primers* degenerados (SEOW et al., 1997; AYUSO-SACIDO; GENILLOUD, 2005; WAWRIK et al., 2005; WAWRIK et al., 2007; BANIK & BRADY, 2010; FENG et al., 2011). Os produtos são então clonados e sequenciados. Um perfil dos genes codificadores de enzimas do metabolismo secundário em determinado ambiente também pode ser gerado por outras metodologias, como TRFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) (WAWRIK et al., 2005; WAWRIK et al., 2007) e mais recentemente por sequenciamento de última geração (TRINDADE-SILVA et al., 2013; WOODHOUSE et al., 2013).

É importante, contudo, que a escolha da amostra ambiental recaia em uma que potencialize o sucesso da busca, uma vez que os metabólitos descobertos por meio dessa abordagem dependem dos micro-organismos presentes na amostra (SINGH & MACDONALD, 2010).

Análises filogenéticas domínio específicas de módulos distintos têm demonstrado que os domínios A e C das NRPS e os domínios AT e KS das PKS, podem ser mais informativos em termos de predição das vias associadas.

As sequências protéicas da maioria desses domínios são agrupadas em clados específicos, de acordo com a especificidade química de cada via (JENKE-KODAMA et al., 2005; RAUSCH et al., 2007; JENKE-KODAMA & DITTMANN, 2009).

A filogenia dos domínios A e C das NRPS é complexa e refletem diferentes características associadas às enzimas nas quais esses módulos estão presentes (ZIEMERT & JENSEN, 2012). Esses domínios são os mais conservados e evoluíram independentemente na mesma via (ZIEMERT & JENSEN, 2012).

A filogenia do domínio A é altamente informativa e revela clados correspondentes aos *clusters* gênicos aos quais os domínios pertencem, tornando possível a predição estrutural de NRPS desconhecidas, quando comparadas a vias experimentalmente caracterizadas. A desse domínio permite também distinguir domínios associados a enzimas híbridas PKS-NRPS (CRAMER et al., 2006; ZIEMERT & JENSEN, 2012). Outra característica revelada pela filogenia das sequências de aminoácidos desses domínios é a especificidade pelo substrato. Normalmente são observados agrupamentos de acordo com a similaridade entre os aminoácidos reconhecidos pelos domínios A distintos. Por outro lado, a filogenia do domínio C revela a estereoquímica dos aminoácidos adicionados à cadeia peptídica em crescimento e outras características funcionais da enzima (ZIEMERT & JENSEN, 2012).

A filogenia dos domínios KS fornece uma visão sobre as vias nas quais esses domínios estão envolvidos e da arquitetura da enzima (JENKE-KODAMA et al., 2005). Por outro lado, a filogenia do domínio AT delinea clados com base no grupo acil incorporado ao policetídeo (ZIEMERT & JENSEN, 2012).

A análise de genomas possibilitou a descoberta de novos antibióticos e agentes antitumorais (NIKOLOULI & MOSSIALOS, 2012). A metagenômica também tem sido aplicada com sucesso na descoberta de novos compostos produzidos por PKS e NRPS (NIKOLOULI & MOSSIALOS, 2012). A briostatina, um antitumoral, foi identificada através da amplificação de domínios KS do DNA metagenômico do briozoário marinho *Bugula neritina* (HILDEBRAND et al., 2004). Outros compostos descobertos por metagenômica incluem os antitumorais apratoxina A e onamida (NIKOLOULI & MOSSIALOS, 2012).

Tendo em vista o sucesso para a descoberta de novos metabólitos secundários a partir de ambientes naturais e de simbioses e o desenvolvimento das ferramentas de metagenômica, uma série de trabalhos têm sido conduzidos objetivando o estudo da diversidade de novos metabólitos secundários nos microbiomas de solos (SEOW et al., 1997; GINOLHAC et al., 2004; WAWRIK et al., 2005; WAWRIK et al., 2007; FENG et al., 2011; PARSLEY et al., 2011; ZHAO et al., 2012), sedimentos (ZHAO et al., 2008; BECERRIL-ESPINOSA et al., 2013), poríferos (RIESENFELD et al., 2008; FISCH et al., 2009; KALUZHAYAYA et al., 2012; PIMENTEL-ELARDO et al., 2012; REDDY et al., 2012; TRINDADE-SILVA et al., 2013; WOODHOUSE et al., 2013) e endofíticos (JANSO & CARTER, 2010; LIN, et al., 2010).

Os avanços nas tecnologias de sequenciamento e das ferramentas de bioinformática possibilitaram também a descoberta de *clusters* gênicos crípticos, codificadores de PKS e NRPS putativas, em organismos tradicionalmente negligenciados quanto a essa característica, como *Burkholderia* spp. (PIDOT et al., 2013), *Lysobacter* spp. (PIDOT et al., 2013), *Clostridium* spp. (BEHNKEN & HERTWECK, 2012b) e uma série de bactérias anaeróbias (LETZEL et al., 2013).

Em razão dos conhecimentos apresentados, torna-se evidente que a busca por novos metabólitos secundários deve ser realizada em ambientes cujo potencial genético dos micro-organismos em sintetizá-los seja conhecido, mas ainda não estudado (QIN et al., 2011).

2.5. O microbioma do trato gastrointestinal do bovino da raça Nelore como fonte de novos metabólitos secundários

O trato gastrointestinal (TGI) dos ruminantes é composto pela boca, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso, ânus e órgãos acessórios. No entanto, o estômago dos ruminantes é dividido em quatro compartimentos: Rúmen, retículo, omaso (que compõem o pré-estômago) e abomaso (estômago verdadeiro).

O rúmen abriga uma comunidade microbiana densa, dominada por anaeróbios, nas quais as populações de Bactéria, que representa 95 % dessa microbiota, podem superar 10^{11} células por grama (FLINT et al., 2008; JAMI &

MIZRAHI, 2012a). Esses micro-organismos desempenham um papel indispensável à sobrevivência do animal, sendo responsáveis pela digestão e fermentação do material lignocelulósico em compostos prontamente absorvíveis, como os ácidos orgânicos voláteis (JAMI & MIZRAHI, 2012a).

A microbiota do rúmen varia de acordo com o ambiente em que o animal se encontra, com o regime alimentar, com a idade do animal, com o uso de antibióticos e com estado de saúde do animal (TAJIMA et al., 2001; NATHANI et al., 2013; THOETKIATTIKUL et al., 2013). Contudo, estudos demonstraram a existência de um microbioma cerne associada ao rúmen (JAMI & MIZRAHI, 2012a; b). A comunidade do rúmen é dominada pelos filos Firmicutes e Bacteroidetes. As famílias mais abundantes dentro do filo Firmicutes são a *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*, e dentro do filo Bacteroidetes, as famílias *Prevotellaceae* e *Rikenellaceae* (RUSSELL, 2001).

Poucos estudos abordaram a microbiota de outras regiões do TGI do bovino além do rúmen (FREY et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013). Estudos sobre a microbiota do TGI de bovinos têm como foco principal os micro-organismos simbiotes do rúmen, dada a sua ligação com características economicamente ou ambientalmente importantes, como as relacionadas à eficiência de conversão alimentar (GUAN et al., 2008; ZHOU et al., 2010), produção de metano (ZHOU et al., 2009) e a descoberta de enzimas e micro-organismos fermentadores de biomassa para produção de biocombustíveis (HESS et al., 2011). Contudo, com base no conhecimento da estrutura dessa comunidade e na literatura (LETZEL et al., 2013), é provável que esse microbioma abrigue uma ampla gama de funções, incluindo aquelas destinadas ao metabolismo secundário.

A análise funcional do microbioma intestinal de humanos revelou a presença de genes relacionados às vias de biossíntese de metabólitos secundários nesse ambiente (CANDELA et al., 2010). Adicionalmente, o conhecimento da estrutura da comunidade microbiana do TGI do bovino da raça Nelore (OLIVEIRA et al., 2013) fornece evidências que suportam a presença de micro-organismos possuidores de metabolismo secundário nesse ecossistema. Entre os membros do filo Firmicutes presentes no pré-estômago (rúmen, retículo, omaso e abomaso), são dominantes os pertencentes à família *Lachnospiraceae*. Em menor proporção, são encontrados os membros das

famílias *Veillonellaceae*, *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae*, *Family XIII Incertate Sedis* e *Catabacteriaceae*. Em relação ao filo Bacteroidetes, dentro da porção caracterizada em nível de família, encontram-se membros das famílias *Prevotellaceae*, *Porphyromonadaceae* e *Bacteroidaceae* (OLIVEIRA et al., 2013). Já foi demonstrada a presença de *clusters* gênicos putativos codificadores de PKS e NRPS nos genomas de membros anaeróbios de muitas destas famílias (LETZEL et al., 2013; PIDOT et al., 2013).

As informações acerca do metabolismo secundário em anaeróbios são limitadas àquelas obtidas por análises *in silico*, restringindo-se, assim, a micro-organismos com genomas sequenciados. *Cellulosilyticum lentocellum* RHM5 é membro da família *Lachnospiraceae*. Esse micro-organismo é normalmente encontrado no trato-gastrointestinal de ruminantes e possui um *cluster* gênico hipotético para NRPS (LETZEL et al., 2013). Dentro do filo Firmicutes, outras famílias menos abundantes no pré-estômago do bovino estudado, como *Clostridiaceae* e *Ruminococcaceae* (OLIVEIRA et al., 2013), já foram descritos como portadores de *clusters* gênicos de NRPS hipotéticos (LETZEL et al., 2013). Embora a maioria dos membros do filo Bacteroidetes presentes no pré-estômago do bovino estudado não tenham sido classificados em nível de família (OLIVEIRA et al., 2013), membros de famílias menos abundantes, como *Bacteroidaceae*, codificam NRPS em seus genomas (TETA et al., 2010; LETZEL et al., 2013). O micro-organismo *Ruminococcus albus* 7 (ATCC 27210), que habita o TGI de animais herbívoros, é o único representante da família *Ruminococcaceae* cujo genoma completo foi sequenciado. A análise do genoma desse micro-organismo demonstrou que este codifica pelo menos um *cluster* gênico relacionado a uma megassintase híbrida do tipo PKS-NRPS (LETZEL et al., 2013).

Assim, é provável que a microbiota TGI do bovino abrigue uma vasta gama de genes relacionados ao metabolismo secundário, cujo potencial permanece inexplorado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem

As amostras da digesta e das fezes de um bovino da raça Nelore utilizadas neste estudo foram obtidas em um trabalho anterior (OLIVEIRA et al., 2013). O método utilizado para amostragem incluiu as seguintes regiões do TGI: Pré-estômago (rúmen, retículo, omaso), abomaso, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (ceco, cólon e fezes), totalizando 26 amostras (Tabela 1). As amostras de digesta do pré-estômago foram coletadas e estocadas separadamente. As frações sólida e líquida do rúmen foram separadas por filtração em gaze estéril. O duodeno, com aproximadamente 1 m de comprimento, foi dividido em três porções, duodeno proximal, médio e distal, e as amostras coletadas separadamente. As amostras do jejuno foram coletadas em 11 porções de 1,5 m correspondentes às alças intestinais. Dada a curta extensão do íleo, 30 cm, apenas uma amostra foi coletada dessa região. O ceco foi dividido em três porções, inicial, médio e terminal, que foram amostradas separadamente. Na região do cólon, foram coletadas amostras de digesta das porções ascendente e descendente. As amostras de fezes foram coletadas imediatamente após a defecação.

3.2. Extração do DNA metagenômico

Para a extração do DNA metagenômico 50 mg de cada amostra foram adicionados a microtubos de 2,0 mL contendo de tampão de extração [1 M Tris-HCl; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2 % (m/v) brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e 4 % (m/v) polivinipirrolidona (PVP)], de contas de zircônio de 0,1 µm de diâmetro, SDS 20 % e fenol: clorofórmio (1:1). As amostras foram submetidas à agitação em Vortex Genie® 2 Vortex (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) e incubadas em banho-maria a 60 °C. As partículas sólidas foram removidas por centrifugação e o sobrenadante coletado em um novo tubo. Para desproteinização das amostras, foram realizadas duas etapas de extração por fenol: clorofórmio (1:1) seguidas de centrifugação e coleta da fase aquosa e uma etapa de extração por clorofórmio: álcool isoamílico (24:1),

seguida de centrifugação e coleta da fase aquosa. O DNA foi precipitado a partir da fase aquosa pela adição de acetado de amônio 7,5 M e de isopropanol e centrifugação. O sedimento foi lavado em etanol 70 % (v/v) e ressuspendido em TE [10 mM Tris-HCL e 1mM EDTA (pH 8,0)]. Os DNAs obtidos foram tratados com RNase (300 µg/ mL) e verificados quanto à qualidade por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8 % (m/v). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA).

Tabela 1. Identificação e localização das amostras no trato gastrointestinal do bovino da raça Nelore

Número da amostra	Localização	Região do TGI	Segmento do TGI
5	Digesta	Pré-estômago	Fração sólida do rúmen
9	Digesta		Fração líquida do rúmen
15	Digesta		Retículo
21	Digesta		Omaso
27	Digesta		Abomaso
33	Digesta	Intestino delgado	Duodeno proximal
39	Digesta		Duodeno médio
45	Digesta		Duodeno distal
51	Digesta		Jejuno – 1ª alça intestinal
93	Digesta		Jejuno – 5ª alça intestinal
57	Digesta		Jejuno – 10ª alça intestinal
99	Digesta		Jejuno – 15ª alça intestinal
63	Digesta		Jejuno – 20ª alça intestinal
105	Digesta		Jejuno – 25ª alça intestinal
69	Digesta		Jejuno – 30ª alça intestinal
75	Digesta		Jejuno – 40ª alça intestinal
117	Digesta		Jejuno – 45ª alça intestinal
81	Digesta		Jejuno – 50ª alça intestinal
175	Digesta		Jejuno – 55ª alça intestinal
123	Digesta		Íleo
129	Digesta	Intestino grosso	Ceco inicial
135	Digesta		Ceco médio
141	Digesta		Ceco terminal
153	Digesta		Cólon ascendente
165	Digesta		Cólon descendente
171	Digesta		Fezes

3.3. Análise da diversidade de PKS e NRPS no microbioma do trato gastrointestinal do bovino por PCR-DGGE

Para a triagem do potencial das comunidades microbianas do TGI do bovino da raça Nelore em codificar as vias de biossíntese de policetídeos e peptídeos não ribossomais, as sequências codificadoras dos domínios KS das PKS I, KS β das PKS II e A das NRPS foram amplificadas por PCR, a partir do DNA metagenômico obtido das amostras de digesta das 26 regiões anatômicas do TGI do bovino, empregando-se *primers* degenerados (Tabela 2). As reações foram realizadas em um volume total de 25 μ L contendo 100 ng do DNA molde, 0,2 μ M de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs, GoTaq Buffer (Promega, MADISON, WI, USA), 3,0 mM de MgCl₂, 0,1 mg/mL de BSA e 1 U de GoTaq DNA polimerase (Promega, MADISON, WI, USA). As PCRs foram conduzidas de acordo com o protocolo descrito na Tabela 2. Os produtos foram analisados em gel de agarose 2,0 % (m/v).

A segunda PCR foi realizada com os *primers forward* contendo um grampo CG adicionado à extremidade 5' (Tabela 3) em um volume total de 25 μ L, contendo 1 μ L do produto da primeira reação, 0,2 μ M de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs, GoTaq Buffer (Promega, MADISON, WI, USA), 3,0 mM de MgCl₂, 0,1 mg/mL de BSA, 2 % (v/v) de formamida e 1 U de GoTaq DNA polimerase (Promega, MADISON, WI, USA). As PCR foram conduzidas de acordo com os protocolos descritos na Tabela 3. Os produtos foram analisados em gel de agarose 2,0 % (m/v).

A análise por DGGE foi realizada utilizando-se o DCode Universal Mutation System (Bio-Rad, HERCULES, CA, USA). Foram aplicados 24 μ L dos produtos da segunda reação em gel de poliacrilamida (acrilamida: bisacrilamida) a 6 % (m/v) em tampão TAE (Tris base 40 mM; ácido acético glacial 20 mM; EDTA 10 mM, pH 8,0) preparados com gradiente desnaturante de 45 a 70 %, a partir das soluções 100 % desnaturante [7 M de uréia e 40 % (v/v) de formamida], e 0 % desnaturante. A eletroforese foi realizada durante 20 horas sob 60 V e 60 °C. Após a corrida os géis foram corados por 20 minutos com solução de SYBR Gold (InvitrogenTM, CARLSBAD, CA, USA). O DNA foi revelado e a imagem digitalizada pelo fotodocumentador L-PIX Chemi Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia, COTIA, SP, BRASIL). As imagens

dos géis foram processadas no programa BioNumerics versão 6.0 (Applied Maths, Inc., Austin, TX, USA) para a comparação dos perfis de bandas. As análises foram realizadas com base no coeficiente de similaridade de Dice e no método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA). As análises de diversidade e riqueza foram realizadas utilizando-se o software PAST (HAMMER, 2001).

3.4. Análise de especificidade dos *primers*

Para análise da especificidade do *primers* e identificação das UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais), as bandas referentes às UTOs representativas foram excisadas do gel de poliacrilamida, eluídas em 30 µL de água e reamplificadas de acordo com as condições descritas na Tabela 2. Os produtos das PCRs foram analisados em gel de agarose 2,0 % (m/v) e purificados com o kit *PureLink Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen™, CARLSBAD, CA, USA). Os *amplicons* purificados foram separadamente ligados ao vetor pGEM®-T easy Vector System I (Promega, MADISON, WI, USA) conforme as recomendações do fabricante. As reações de ligação entre vetor e inserto foram utilizadas para transformar, por choque térmico, células competentes de *Escherichia coli* JM109 (Promega, MADISON, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Os plasmídeos foram extraídos com uso do *Wizard® SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, MADISON, WI, USA) e sequenciados pela empresa Myleus Biotechnology, com o *primer* M13 F, por eletroforese capilar, em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1.

Tabela 2. Primers e condições de amplificação utilizadas para a PCR

Análise	Alvo	Nome do oligonucleotídeo Sequência do oligonucleotídeo	Referência	Tamanho do amplicon	Ciclos de amplificação
PCR	Domínio KS PKS I	K1F TSAAGTCSAACATCGGBCA M6R CGCAGGTTSCSGTACCAGTA	AYUSO-SACIDO & GENILLOUD, 2004	1000-1200 pb	95 °C, 5 min (8x) 95 °C, 30 seg 59 °C, 2 min (-0,5 °C/ ciclo) 72 °C, 2 min (30x) 95 °C, 30 seg 55 °C, 2 min 72 °C, 2 min (1x) 72 °C, 10 min
PCR	Domínio KSβ PKS II	KS TTCGGSGGITTCCAGWSIGCSATG ACP TCSAKSAGSGCSAISGASTCGTAICC	SEOW et al., 1997	1000-1500 pb	95 °C, 5 min (40 x) 95 °C, 1 min 58 °C, 1 min 42 °C, 1,5 min (1x) 72 °C, 7 min
PCR	Domínio A NRPS	A3F GCSTACSYSATSTACACSTCSGG A7R SASGTCVCCSGTSCGGTAS	AYUSO-SACIDO & GENILLOUD, 2004	750 pb	95 °C, 5 min (35x) 95 °C, 30 seg 58 °C, 2 min 72 °C, 1,5 min (1x) 72 °C, 10 min

Tabela 3. Primers e condições de amplificação utilizadas para a PCR-DGGE

Análise	Alvo	Nome do oligonucleotídeo Sequência do oligonucleotídeo	Tamanho do amplicon	Ciclos de amplificação
PCR-DGGE	KS PKS I-Nested PCR	K1FGC gc.-TSAAGTCSAACATCGGBCA M6R CGCAGGTTSCSGTACCAGTA	1000-1200 pb	95 °C, 5 min (8x) 95 °C, 30 seg 59 °C, 2 min (-0,5 °C/ ciclo) 72 °C, 2 min (30x) 95 °C, 30 seg 55 °C, 2 min 72 °C, 2 min (1x) 72 °C, 10 min
PCR-DGGE	Domínio KS β PKS II-Nested PCR	KSGC gc.-TTCGGSGGITTCCAGWSIGCSATG ACP TCSAKSAGSGCSAISGASTCGTAICC	1000-1500 pb	95 °C, 5 min (40 x) 95 °C, 1 min 58 °C, 1 min 42 °C, 1,5 min (1x) 72 °C, 7 min
PCR-DGGE	Domínio A NRPS-Nested PCR	A3FGC gc.-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG A7R SASGTCVCCSGTSCGGTAS	850 pb	95 °C, 5 min (35x) 95 °C, 30 seg 58 °C, 2 min 72 °C, 1,5 min (1x) 72 °C, 10 min
	Grampo GC	gc. CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGG GCGGGGGCACGGGGGG		

3.5. Construção de bibliotecas de clones contendo domínios de adenilação

As sequências codificadoras dos domínios A das NRPS foram amplificadas a partir do DNA metagenômico da fração sólida do rúmen, fração líquida do rúmen, retículo e omaso, de acordo com as condições descritas na Tabela 2. Os produtos das PCRs foram analisados em gel de agarose 2,0 % (m/v) e purificados com o kit *PureLink Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen™, CARLSBAD, CA, USA). Os *amplicons* purificados foram separadamente ligados ao vetor pGEM®-T easy Vector System I (Promega, MADISON, WI, USA) conforme as recomendações do fabricante. As reações de ligação entre vetor e inserto foram utilizadas para transformar, por choque térmico, células competentes de *Escherichia coli* JM109 (Promega, MADISON, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Foram selecionados 50 clones positivos referentes a cada biblioteca [fração sólida do rúmen (clones 1 a 7), fração líquida do rúmen (clones 8 a 14), retículo (clones 15 a 21) e omaso (clones 22 a 30)]. Os clones foram crescidos em caldo Luria Bertani [triptona 1,0 % (m/v), extrato de levedura 1 % (m/v) e NaCl 0,5 % (m/v)] adicionado de ampicilina em concentração final de 100 µg/mL e estocados no mesmo meio acrescido de glicerol 30 % (v/v). Sete clones de cada biblioteca foram selecionados para o sequenciamento. Os plasmídeos foram extraídos com uso do *Wizard® SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, MADISON, WI, USA) e estes foram sequenciados, pela empresa Myleus Biotechnology, utilizando-se o *primer* M13 F, por eletroforese capilar, em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1.

3.6. Análise das sequências

Todas as sequências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank (NCBI) através da ferramenta BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A ferramenta cds (*conserved domains*) do Blast foi utilizada para busca de domínios conservados.

As sequências nucleotídicas de cada biblioteca foram alinhadas entre si, utilizando a ferramenta bl2seq do Blast para eliminação de sequências

redundantes. As sequências que exibiram mais de 98 % de identidade entre si foram consideradas oriundas do mesmo gene.

Para a análise filogenética, as sequências de aminoácidos preditas para os domínios de adenilação das bibliotecas foram alinhadas juntamente com as sequências nucleotídicas dos domínios A do primeiro módulo de 32 NRPS cujas sequências estão depositadas no Genbank. O alinhamento foi realizado utilizando-se o programa Clustal W e a árvore filogenética não enraizada foi construída pelo método de Neighbor-Joining, utilizando-se o programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013), com o modelo de correção de Poisson para aminoácidos, deleção completa de gaps e *bootstrap* consistindo de 1000 repetições.

A predição do aminoácido reconhecido por cada domínio de adenilação foi realizada no programa NRSPredictor2 (RÖTTIG et al., 2011) e indicados na árvore filogenética com o objetivo de identificar um padrão de agrupamento das sequências de acordo com o substrato reconhecido pelos domínios.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Amplificação de genes codificadores de enzimas PKS e NRPS a partir do DNA metagenômico do TGI do bovino da raça Nelore

Os *amplicons* de tamanhos referentes aos domínios A das NRPS e KS β das PKS II foram obtidos a partir dos DNAs metagenômicos oriundos da fração sólida do rúmen, fração líquida do rúmen, do retículo e do omaso. Os domínios KS das PKS I foram amplificados a partir dos DNAs metagenômicos oriundos das amostras da fração sólida do rúmen, fração líquida do rúmen e do retículo. Não foi possível, por meio da metodologia empregada, detectar *amplicons* relativos às sequências codificadoras dos domínios KS e A utilizando-se os DNAs metagenômicos obtidos da digesta do abomaso e das regiões do intestino delgado e grosso como molde para PCR (Tabela 4).

Tabela 4. Detecção por PCR dos genes codificadores das PKS (KS) e NRPS (A) no TGI do bovino da raça Nelore. (+) – presença do *amplicon*; (-) – ausência do *amplicon*

Região do TGI	Segmento do TGI	NRPS	PKS II	PKS I
Pré-estômago	Fração sólida do rúmen	+	+	+
	Fração líquida do rúmen	+	+	+
	Retículo	+	+	+
	Omaso	+	+	-
	Abomaso	-	-	-
Intestino delgado	Duodeno	-	-	-
	Jejuno	-	-	-
	Íleo	-	-	-
Intestino grosso	Ceco	-	-	-
	Cólon	-	-	-
	Fezes	-	-	-

4.2. Sequenciamento das UTOs e especificidade dos *primers*

Para confirmar a especificidade dos *primers* utilizados, os *amplicons* obtidos pela reação descrita na Tabela 3 foram separados por meio de DGGE e as UTOs representativas foram selecionadas para sequenciamento (Figura 1). A Tabela 5 apresenta os resultados das análises por sequenciamento das

bandas excisadas. Não foi possível a amplificação das bandas 3 e 9 para o sequenciamento.

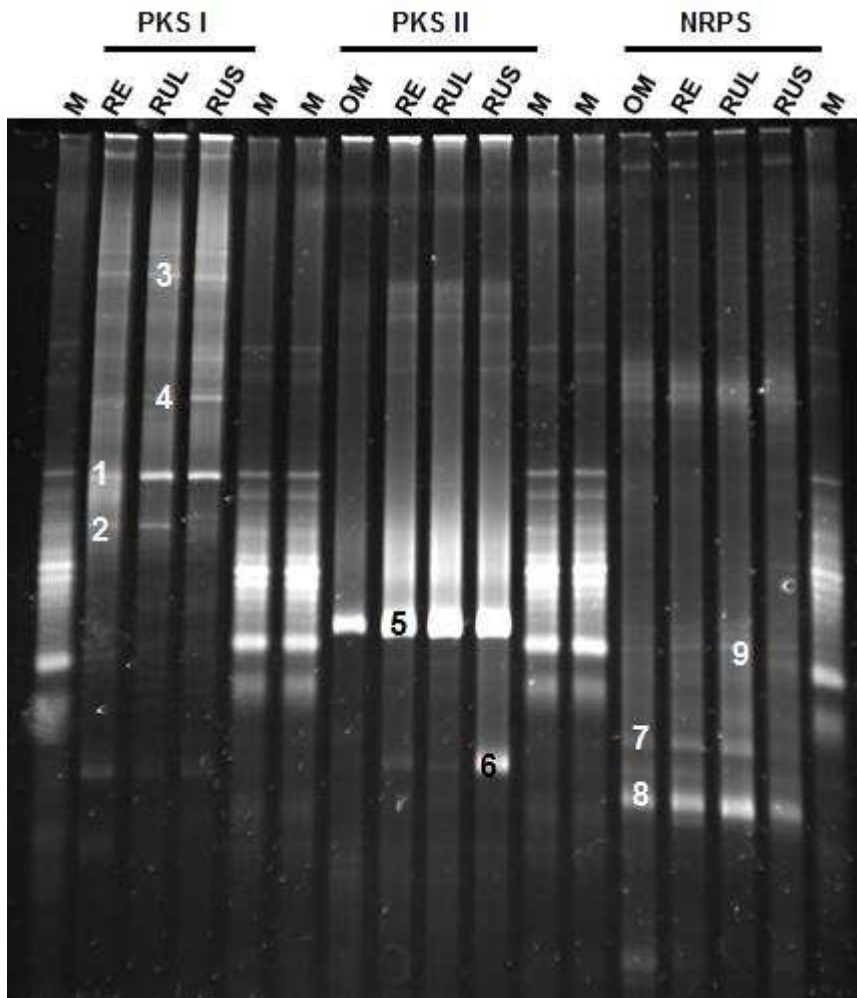


Figura 1. Perfis eletroforéticos da PCR-DGGE gerados a partir do DNA metagenômico de digesta do rúmen, retículo e omaso, coletadas de um bovino a raça Nelore, utilizando-se *primers* que tem como alvo as seqüências codificadoras dos domínios KS das PKS I, domínios KS β das PKS II e domínios A das NRPS. RUL – fração líquida da digesta do rúmen; RUS – fração sólida da digesta do rúmen; RE – digesta do retículo; OM – digesta do omaso; M – marcador. Os números de 1 a 9 indicam as bandas excisadas e utilizadas para o sequenciamento

Tabela 5. Resultados das comparações entre as sequências das bandas excisadas com as depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) com o número do acesso, o E-value, valor de identidade e os domínios conservados identificados

UTO	Sequência do banco de dados (NCBI)	Número de acesso	Identidade	E-value	Domínios conservados
1	hypothetical protein pEA28_01 [Erwinia amylovora ATCC BAA-2158]	NP_758764.1	100 %	2e-78	-
2	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase [Rhodococcus opacus]	WP_005245735.1	56 %	4.6	-
4	ABC transporter-like protein [Gordonia bronchialis DSM 43247]	YP_003272484.1	44 %	0.078	-
5	hypothetical protein [Geopsychrobacter electrophilus]	WP_020676474.1	71 %	6e-42	KR_FAS_SDR_x[cd05274], ketoreductase (KR) and fatty acid synthase (FAS), complex (x) SDRs
6	hypothetical protein [Geopsychrobacter electrophilus]	WP_020676474.1	72 %	2e-41	KR_FAS_SDR_x[cd05274], ketoreductase (KR) and fatty acid synthase (FAS), complex (x) SDRs
7	peptide synthetase [Butyrivibrio proteoclasticus B316]	YP_003829587.1	43 %	2e-47	A_NRPS[cd05930], adenylation domain of nonribosomal peptide synthetases (NRPS)
8	peptide synthetase [Butyrivibrio proteoclasticus B316]	YP_003829587.1	47 %	2e-43	A_NRPS[cd05930], adenylation domain of nonribosomal peptide synthetases (NRPS)

As sequências das bandas 1, 2 e 4, apresentaram entre 43 e 100 % de identidade com sequências não relacionadas à PKS I depositadas no banco de dados (NCBI). Nenhum domínio conservado relacionado ao metabolismo secundário foi encontrado nessas sequências, impossibilitando análises

posteriores relacionadas à diversidade de PKS I no TGI do bovino por PCR-DGGE. Esses resultados foram atribuídos a uma amplificação inespecífica e pela inadequação dos *primers* utilizados no estudo de uma comunidade microbiana dominada por micro-organismos anaeróbios, uma vez que os *primers* utilizados neste estudo foram desenhados com base em sequências disponíveis nos bancos de dados (SEOW et al., 1997; AYUSO-SACIDO & GENILLOUD, 2005), oriundas predominantemente de micro-organismos aeróbios. Diante disso, o sequenciamento das regiões adjacentes às dos *amplicons* de PKS I pode gerar em informações importantes, uma vez que, a inadequação dos *primers* para amplificação desses genes pode representar novidades nos *operons* e *regulons* de PKS I nos micro-organismos presentes nas amostras prospectadas.

As sequências das bandas 5 e 6 apresentaram 71 e 72 % de identidade, respectivamente, com uma proteína hipotética de *Geopsychrobacter electrodiphilus*. Adicionalmente, foram encontrados em ambas as sequências domínios conservados relacionados aos módulos cetorredutase (KR) das PKS, que realizam a redução dependente de NADH de grupos beta-carbonil de policetídeos. Embora essas sequências sejam relacionadas ao metabolismo secundário, é provável que o conjunto de *primers* utilizados não seja adequado para inferir a completa diversidade das PKS II no TGI do bovino, uma vez que não foi possível confirmar a presença de *amplicons* relativos ao domínio KS β . A novidade do assunto tratado neste trabalho e a conseqüente falta de dados para a comparação tornam inconclusivos, porém interessantes, os resultados obtidos.

As sequências traduzidas das bandas 7 e 8 apresentaram 43 e 47 % de identidade, respectivamente, com sequências codificadoras de peptídeo sintetases de *Butyrivibrio proteoclasticus* B316. Adicionalmente, a análise dessas sequências revelou a presença de domínios conservados relacionados ao domínio A de NRPS. Embora valores de identidade dessas sequências em relação às de peptídeo sintetases depositadas nos bancos de dados tenham sido baixos, a presença de domínios conservados confirma a especificidade do *primers* utilizados para amplificação do domínio A. Análises recentes demonstram que as sequências codificadoras das vias de metabolismo secundário de micro-organismos anaeróbios apresentam baixa identidade em

relação àquelas presentes nos bancos de dados (LETZEL et al., 2013). Assim, como os *primers* utilizados foram construídos para amplificar vias semelhantes àquelas já descritas, é provável que muitos genes ainda não caracterizados tenham sido negligenciados nessa análise. Adicionalmente, a investigação da presença dos genes codificadores de NRPS em outros ambientes tem demonstrado resultados similares, em relação aos baixos valores de identidade obtidos (ZHAO et al., 2008; ZHANG et al., 2009). Tais resultados são justificados pelo fato de apenas cerca de 10 % dos metabólitos secundários codificados por micro-organismos já terem sido caracterizados (NIKOLOULI & MOSSIALOS, 2012).

A estrutura das comunidades microbianas nos segmentos do TGI do bovino da raça Nelore determinado por OLIVEIRA et al. (2013) fornece evidências que suportam a presença dos genes do metabolismo secundário nesse ecossistema. O microbioma do TGI do bovino da raça Nelore é representado predominantemente por bactérias dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, sendo os membros do filo Bacteroidetes encontrados em maior proporção no pré-estômago (rúmen, retículo, omaso e abomaso) (OLIVEIRA et al., 2013). Entre os membros do filo Firmicutes presentes no pré-estômago são dominantes os pertencentes à família *Lachnospiraceae*. Em menor proporção, são encontrados os membros das famílias *Veillonellaceae*, *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae*, *Family XIII Incertate Sedis* e *Catabacteriaceae*. Em relação ao filo Bacteroidetes, dentro da porção caracterizada em nível de família, encontram-se membros das famílias *Prevotellaceae*, *Porphyromonadaceae* e *Bacteroidaceae* (OLIVEIRA et al., 2013). Já foi demonstrada a presença de *clusters* gênicos putativos codificadores de NRPS em membros anaeróbios de muitas destas famílias (LETZEL et al., 2013).

As informações acerca do metabolismo secundário em anaeróbios são limitadas àquelas obtidas por análises *in silico*, restringindo-se, assim, a micro-organismos com genomas sequenciados. *Cellulosilyticum lentocellum* RHM5 é membro da família *Lachnospiraceae*. Esse micro-organismo é normalmente encontrado no TGI de ruminantes e possui um *cluster* gênico hipotético para NRPS (LETZEL et al., 2013). Dentro do filo Firmicutes, membros de outras famílias menos abundantes no pré-estômago do bovino estudado, como *Clostridiaceae* e *Ruminococcaceae* (OLIVEIRA et al., 2013). Já foram descritos

como portadores de *clusters* gênicos de NRPS hipotéticos (LETZEL et al., 2013). Embora a maioria dos membros do filo Bacteroidetes presentes no pré-estômago do bovino estudado não tenha sido classificada em nível de família (OLIVEIRA et al., 2013), membros de famílias menos abundantes, como *Bacteroidaceae*, também podem colaborar para a diversidade de NRPS no pré-estômago do bovino da raça Nelore, uma vez que já foram descritos membros dessa família que codificam NRPS em seus genomas (TETA et al., 2010; LETZEL et al., 2013).

A ausência de *amplicons* referentes à NRPS codificados pelas comunidades do intestino grosso e delgado do bovino não pode ser justificada pela estrutura dessas comunidades. Entre as famílias que compõem essa microbiota, pelo menos duas, *Lachnospiraceae* e *Clostridiaceae* (Firmicutes), possuem membros já descritos por apresentarem genes relacionados ao metabolismo secundário. A ausência aparente de metabolismo secundário nos microbiomas dos intestinos grosso e delgado pode ser justificada pela menor disponibilidade de nutrientes disponibilizados para a microbiota nesses ambientes, uma vez que o metabolismo secundário depende de precursores e da energia gerados pelo metabolismo primário. Contudo, deve-se ainda considerar a possibilidade de que parte do potencial genético do microbioma do TGI do bovino Nelore para codificar NRPS não tenha sido acessada pela metodologia empregada.

4.3. Diversidade dos genes codificadores dos domínios de adenilação das NRPS por PCR-DGGE

A análise por PCR-DGGE das sequências codificadoras dos domínios A das NRPS permitiu a determinação de um perfil genotípico variado entre as amostras (Figura 2). O perfil eletroforético revelou a presença de UTOs compartilhadas entre todas as amostras e de UTOs únicas de cada amostra. A análise de agrupamento pelo método UPGMA mostrou maior grau de similaridade (70 %) entre as amostras do retículo e da fração líquida do rúmen. Essas amostras compartilham menos de 50 % de similaridade com as provenientes da fração sólida do rúmen e do omaso. O maior índice de diversidade de Shannon foi observado para a amostra da fração sólida do

rúmen. Embora as amostras das frações líquida do rúmen, retículo e omaso tenham apresentado composições distintas de UTOs, os valores de diversidade obtidos foram similares.



Figura 2. Perfis eletroforéticos da PCR-DGGE gerados a partir das amostras de digesta do rúmen, retículo e omaso, coletadas de um bovino a raça Nelore, utilizando-se *primers* que têm como alvo as sequências codificadoras dos domínios de adenilação das NRPS e resultados da análise de agrupamento. À direita estão apresentados os índices de Riqueza de UTOs (R) e de Diversidade de Shannon-Weaver (H). A comparação dos perfis foi gerada com o *software* BioNumerics (versão 6.0). A escala indica o nível de similaridade com base no coeficiente de Dice. RUL – Fração líquida da digesta do rúmen; RUS – Fração sólida da digesta do rúmen; RE – Digesta do retículo; OM – Digesta do omaso

Uma vez que as comunidades que habitam os diferentes compartimentos do pré-estômago se assemelhem em nível de filo, as diferenças observadas nos perfis eletroforéticos foram atribuídas ao fato de as vias de metabolismo secundário serem distribuídas de maneira restrita entre poucos membros de um gênero ou até mesmo entre as linhagens de uma espécie (O'BRIEN & WRIGHT, 2011; REDDY et al., 2012). Assim, comunidades microbianas de ambientes ecologicamente similares em nível de filo podem conter coleções completamente distintas de genes para biossíntese de metabólitos secundários (REDDY et al., 2012). Adicionalmente, as diferenças nas condições ambientais do abomaso, em relação ao rúmen, retículo e omaso, podem justificar possível ausência do metabolismo secundário nessa comunidade. No rúmen, são mantidas condições aproximadamente constantes de temperatura e pH para a hidrólise e fermentação do material lignocelulósico. A digesta que sai do pré-estômago chega ao abomaso em pH aproximadamente 6,0. No abomaso, o pH cai para

2,5, condição que pode ser considerada extrema frente àquelas apresentadas no pré-estômago. O metabolismo secundário é pouco difundido em micro-organismos anaeróbios de ambientes extremos, sugerindo que esses nichos sejam tão restritos que os metabólitos secundários não sejam necessários para adaptabilidade nesses ambientes (LETZEL et al., 2013).

Alguns trabalhos demonstraram que não há relação entre a diversidade de micro-organismos e a diversidade de genes de metabolismo secundário em um ambiente (WAWRIK et al., 2005; WAWRIK et al., 2007; REDDY et al., 2012). Esses resultados são corroborados pelos resultados obtidos neste trabalho. Embora as comunidades do intestino grosso apresentem valores de diversidade filogenética similares ao da comunidade do retículo (OLIVEIRA et al., 2013), não foram obtidos *amplicons* referente aos genes de metabolismo secundário para as amostras do intestino grosso.

4.4. Riqueza de UTOs

Os índices de riqueza de UTOs, relativas às sequências codificadoras do domínio A das NRPS, foram pouco variáveis entre as amostras analisadas, com valor mínimo na fração líquida do rúmen e valor máximo na fração sólida do rúmen (Figuras 2 e 3B).

Embora sejam observadas diferenças nos valores de riqueza entre os segmentos adjacentes do TGI, a análise das UTOs compartilhadas entre os diferentes compartimentos, representada em diagrama de Venn (Figura 3B), demonstrou que a maioria das UTOs é compartilhada por todos os ambientes, e poucas UTOs são únicas de cada ambiente, revelando, assim, a ocorrência de vias dominantes em todos ambientes.

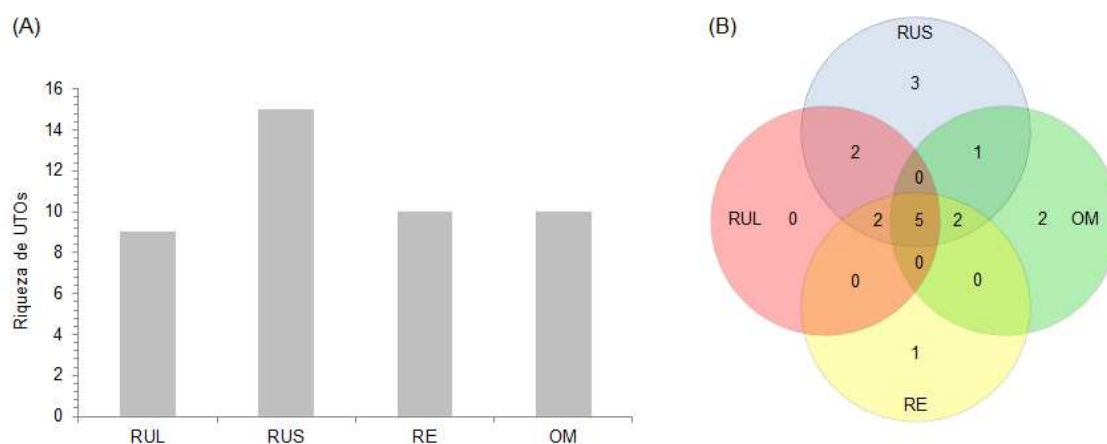


Figura 3. (A) Riqueza de UTOs referentes às sequências codificadoras dos domínios de adenilação das NRPS detectada pela separação dos *amplicons* por DGGE; (B) Diagrama de Venn, construído com base na matriz de presença e ausência de UTOs gerada pelo programa BioNumerics (versão 6.0), demonstrado as UTOS referentes às sequências codificadoras dos domínios de adenilação das NRPS, únicas e compartilhadas pelas comunidades de diferentes regiões do trato gastrointestinal do bovino. RUL – Fração líquida da digesta do rúmen; RUS – Fração sólida da digesta do rúmen; RE – Digesta do retículo; OM – Digesta do omaso

Alguns trabalhos demonstraram que ambientes que abrigam comunidades similares não compartilham vias de metabólitos secundários idênticas, sugerindo que estas vias apresentam uma distribuição restrita (WAWRIK et al., 2005; WAWRIK et al., 2007; REDDY et al., 2012). Esses resultados são contrastantes em relação aos obtidos neste estudo, uma vez que a maioria das UTOs é compartilhada por todas as comunidades analisadas (Figura 3). Isso pode ocorrer em razão das limitações inerentes à técnica de PCR (SUZUKI & GIOVANNONI, 1996), de forma que somente certos grupos de sequências são amplificados dentro de diferentes amostras. É importante considerar também que os fatores ambientais têm papel importante na diversificação do metabolismo secundário. Assim, é provável que dentro dos compartimentos do pré-estômago as pressões ambientais que dirigiram essa diversificação sejam similares, sugerindo um importante papel ecológico dessas vias que são compartilhadas.

4.5. Diversidade dos genes codificadores dos domínios de adenilação das NRPS pela construção e sequenciamento de bibliotecas de clones

A análise das 28 sequências obtidas a partir das quatro bibliotecas demonstrou a presença de apenas dez sequências diferentes. Essas sequências apresentaram entre 37 e 91 % de identidade com sequências de domínios A de NRPS presentes no banco de dados do NCBI (Tabela 6). Adicionalmente, todas as sequências apresentaram domínios conservados relacionados aos domínios A.

Tabela 6. Resultados das comparações entre as sequências dos clones com as depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) com o número do acesso, o E-value, valor de identidade e os domínios conservados. Clones 4, 5 e 6 – Fração sólida do rúmen; Clone 9 – Fração líquida do rúmen; Clones 15, 18, 21 e 22 – Retículo; Clones 23 e 28 – Omaso

Clone	Sequência do banco de dados (NCBI)	Número de acesso	Identidade	E-value
4	Peptide synthetase [<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> B316]	YP_003829587.1	46 %	1e-48
5	Peptide synthetase [<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> B316]	YP_003829587.1	43 %	5e-36
6	Amino acid adenylation domain protein [[<i>Clostridium</i>] <i>difficile</i>]	WP_022618839.1	54 %	1e-14
9	Peptide synthetase [<i>Xanthomonas citri</i>]	WP_003489108.1	91 %	3e-108
15	Amino acid adenylation domain-containing protein [<i>Clostridium boltea</i>]	WP_002577042.1	37 %	1e-15
18	Peptide synthetase [<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> B316]	YP_003829587.1	51 %	1e-54
21	Peptide synthetase [<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> B316]	YP_003829587.1	57 %	2e-33
22	Amino acid adenylation domain [<i>Coprococcus catus</i> GD/7]	YP_007769888.1	65 %	8e-86
23	peptide synthetase [<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> B316]	YP_003829587.1	45 %	9e-46
28	peptide synthetase [<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> B316]	YP_003829587.1	47 %	3e-51

Embora os valores de identidade tenham sido baixos em relação às sequências depositadas no Genbank, eles são válidos uma vez que já se demonstrou que as sequências codificadoras das vias de metabolismo

secundário de micro-organismos anaeróbios apresentam baixa identidade em relação àsquelas presentes nos bancos de dados (LETZEL et al., 2013).

Dentro do espectro de amostragem utilizado, a fração líquida do rúmen apresentou a menor diversidade de sequências. Dos sete clones sequenciados, todos foram considerados idênticos. Esse resultado condiz com a análise por DGGE, que demonstrou que essa amostra apresenta o menor índice de diversidade de Shannon (Figura 2). Na fração sólida do rúmen, foram obtidas três sequências distintas, e nas amostras do retículo e do omaso foram encontradas duas e quatro sequências distintas, respectivamente.

A especificidade do domínio A por seu substrato aminoácido pode ser resolvida filogeneticamente. Além disso, a filogenia do domínio A é altamente informativa no sentido de revelar clados correspondentes ao gene no qual esses domínios estão contidos, permitindo a predição de NRPS desconhecidas quando comparadas a vias experimentalmente caracterizadas (ZIEMERT & JENSEN, 2012). A inferência filogenética construída a partir das sequências traduzidas dos clones e de vias caracterizadas obtidas a partir do Genbank demonstrou um padrão de agrupamento de acordo com o aminoácido reconhecido pelo domínio A (Figura 4).

A árvore filogenética gerada a partir das sequências de aminoácidos de domínios demonstra uma baixa diversidade de domínios A (Figura 4). De forma geral, não foi observada uma tendência de agrupamento das sequências oriundas da mesma biblioteca. Entre os 10 clones analisados, oito formaram um grupo maior incluindo sequências de domínios de adenilação hipotéticos de bactérias anaeróbias que habitam o TGI. Altos valores de *bootstrap* sustentam esse agrupamento. Dentro desse grupo, a maioria das sequências (clones 4, 5, 18, 21, 23 e 28) formou um subgrupo distinto juntamente com uma peptídeo sintetase não caracterizada de *Butyrivibrio proteoclasticus* B316. Essa espécie é membro da família *Lachnospiraceae*, anaeróbio estrito e normalmente encontrada no rúmen e no TGI de mamíferos (MOON et al., 2008). O clone 15 formou um grupo com uma proteína hipotética contendo domínio de adenilação de *Clostridium bolteae*, organismo pertencente à família *Clostridiaceae* normalmente encontrado no trato gastrointestinal de humanos com autismo (SONG et al., 2003). O clone 22 agrupou-se com um domínio de adenilação de *Coprococcus catus* GD/7, um membro da família *Lachnospiraceae* que é

normalmente encontrado em fezes de bovinos (KIM et al., 2013). Assim, é provável que esses domínios façam parte de uma categoria distinta, típica de micro-organismos anaeróbios.

O clone 9 agrupou-se com sequências das peptídeo sintetases de *Xanthomonas citri* e com as peptídeo sintetases responsáveis pelas síntese da onamida e da pederina, compostos antitumorais descobertos através do estudo de metagenomas (PIEL, 2002; PIEL et al., 2004). O clone 6 não agrupou-se com as demais sequências.

De uma forma geral, a diversidade de NRPS acessada foi baixa, o que foi atribuído ao uso de *primers* desenhados com base nas sequências dos domínios A de actinobactérias (AYUSO-SACIDO & GENILLOUD, 2005). Como observado pela análise filogenética, as sequências de aminoácido dos domínios A agrupam-se independentemente das sequências oriundas de actinomicetos. Assim, serão necessários avanços nos estudos do metabolismo secundário de anaeróbios para que seja possível preencher essa lacuna. É provável que a caracterização de novas enzimas do metabolismo secundário a partir desses micro-organismos forneça os subsídios necessários para a exploração mais profunda do metaboloma secundário associado a ambientes anaeróbios.

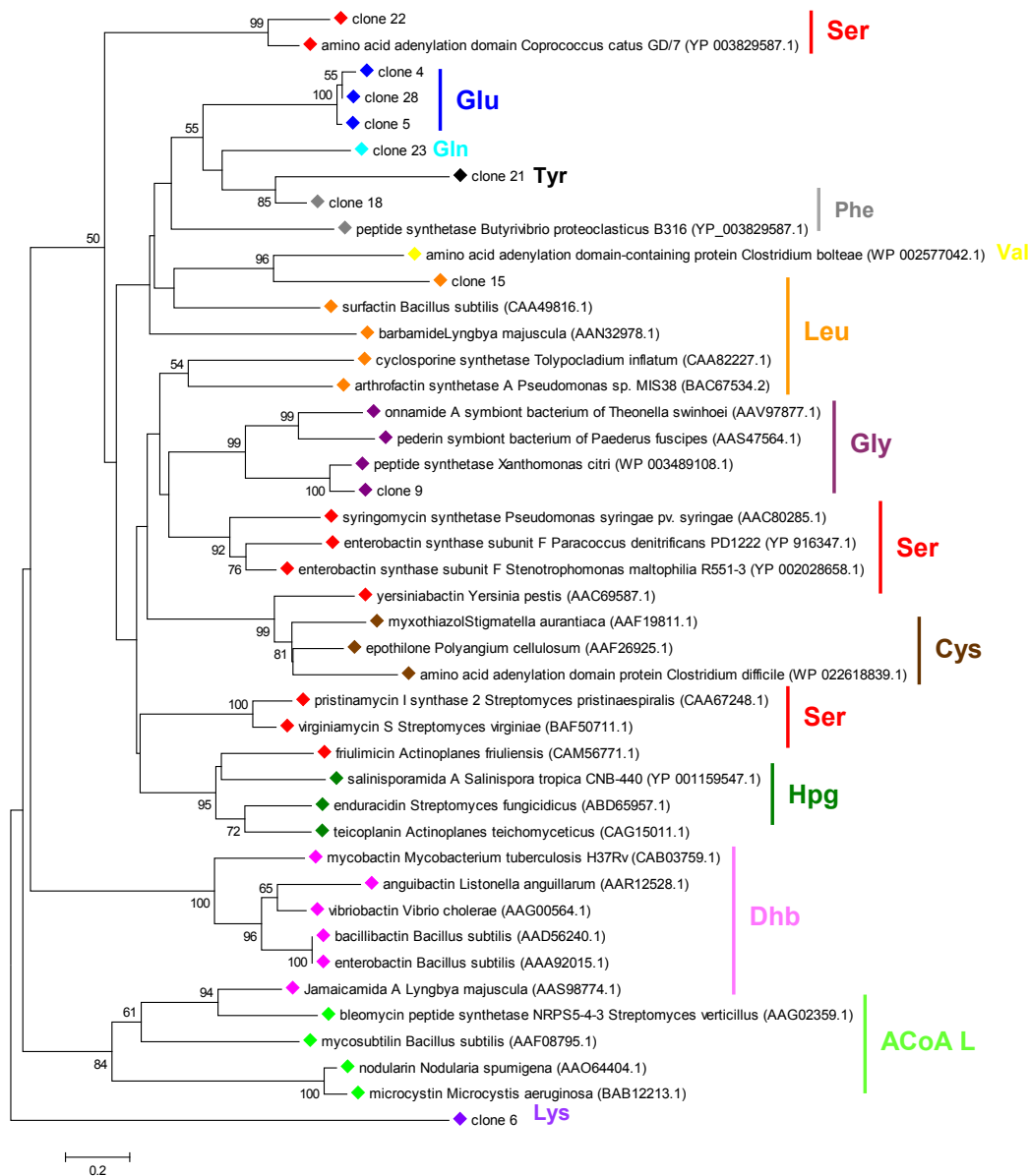


Figura 4. Árvore filogenética, reconstruída pelo método Neighbor-Joining, das sequências traduzidas dos domínios A das NRPS. Os valores de *bootstrap* superiores a 50 % estão apresentados. A barra de escala indica 0.2 substituições por posição aminoacídica. A árvore foi reconstruída usando o programa MEGA versão 6.0 com o modelo de correção de Poisson para aminoácidos, deleção completa dos *gaps* e *bootstrap* consistindo de 1000 repetições. Clones 4, 5 e 6 – Fração sólida do rúmen; Clone 9 – Fração líquida do rúmen; Clones 15, 18, 21 e 22 – Reticulo; Clones 23 e 28 – Omaso. ACoAL – Domínio A de ligação a acil-CoA; Cys – Cisteína; Dhb – Ácido dideidroaminobutírico; Gln – Glutamina; Glu – Glutamato; Gly – Glicina; Hpg – homopropargil glicina; Leu – Leucina; Lys – Lisina; Phe – Fenilalanina; Ser – Serina; Tyr – Tirosina; Val – Valina

5. CONCLUSÕES

O microbioma do trato gastrointestinal de bovino da raça Nelore abriga genes codificadores de NRPS.

Genes codificadores de NRPS foram, pela primeira vez, obtidos a partir do metagenoma de comunidades dominadas por micro-organismos anaeróbios.

A baixa identidade das sequências codificadoras do domínio A das NRPS, obtidas a partir do microbioma do trato gastrointestinal do bovino da raça Nelore, em relação a sequências depositadas no banco de dados do NCBI, indicam que esse microbioma abriga um potencial inexplorado para a bioprospecção de novos produtos.

As sequências de aminoácidos do domínio A das NRPS obtidas a partir do microbioma do trato gastrointestinal do bovino da raça Nelore são, em sua maioria, relacionadas a sequências de NRPS não caracterizadas pertencentes a micro-organismos anaeróbios.

A novidade do assunto e a conseqüente falta de dados para comparação tornam inconclusivos, porém interessantes os resultados obtidos, estimulando estudos posteriores mais aprofundados que incluam o sequenciamento e caracterização do metagenoma completo do TGI de bovinos da raça Nelore.

REFERÊNCIAS

AYUSO-SACIDO, A.; GENILLOUD, O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. **Microbial Ecology**, v. 49, n. 1, p. 10-24, 2005.

BALTZ, R. H. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 557-563, 2008.

BANIK, J. J.; BRADY, S. F. Recent application of metagenomic approaches toward the discovery of antimicrobials and other bioactive small molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 603-609, 2010.

BECERRIL-ESPINOSA, A.; FREEL, K. C.; JENSEN, P. R.; SORIA-MERCADO, I. E. Marine Actinobacteria from the Gulf of California: diversity, abundance and secondary metabolite biosynthetic potential. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 4, p. 809-819, 2013.

BEHNKEN, S.; HERTWECK, C. Anaerobic bacteria as producers of antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 61-67, 2012 a.

BEHNKEN, S.; HERTWECK, C. Cryptic polyketide synthase genes in non-pathogenic *Clostridium* SPP. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29609, 2012 b.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.

CANDELA, M.; MACCAFERRI, S.; TURRONI, S.; CARNEVALI, P.; BRIGIDI, P. Functional intestinal microbiome, new frontiers in prebiotic design. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, n. 2-3, p. 93-101, 2010.

CRAMER, R. A., JR.; STAJICH, J. E.; YAMANAKA, Y.; DIETRICH, F. S.; STEINBACH, W. J.; PERFECT, J. R. Phylogenomic analysis of non-ribosomal peptide synthetases in the genus *Aspergillus*. **Gene**, v. 383, n., p. 24-32, 2006.

DEMAIN, A. L. Antibiotics: natural products essential to human health. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, n. 6, p. 821-842, 2009.

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v., n., p., 2013.

DONADIO, S.; MONCIARDINI, P.; SOSIO, M. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. **Natural Products Reports**, v. 24, n. 5, p. 1073-1109, 2007.

DU, L.; SANCHEZ, C.; SHEN, B. Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. **Metabolic Engineering**, v. 3, n. 1, p. 78-95, 2001.

FENG, Z.; KALLIFIDAS, D.; BRADY, S. F. Functional analysis of environmental DNA-derived type II polyketide synthases reveals structurally diverse secondary metabolites. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v. 108, n. 31, p. 12629-12634, 2011.

FISCH, K. M.; GURGUI, C.; HEYCKE, N.; VAN DER SAR, S. A.; ANDERSON, S. A.; WEBB, V. L.; TAUDIEN, S.; PLATZER, M.; RUBIO, B. K.; ROBINSON, S. J.; CREWS, P.; PIEL, J. Polyketide assembly lines of uncultivated sponge symbionts from structure-based gene targeting. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 7, p. 494-501, 2009.

FLINT, H. J.; BAYER, E. A.; RINCON, M. T.; LAMED, R.; WHITE, B. A. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 121-131, 2008.

FREY, J. C.; PELL, A. N.; BERTHIAUME, R.; LAPIERRE, H.; LEE, S.; HA, J. K.; MENDELL, J. E.; ANGERT, E. R. Comparative studies of microbial populations in the rumen, duodenum, ileum and faeces of lactating dairy cows. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 6, p. 1982-1993, 2010.

GINOLHAC, A.; JARRIN, C.; GILLET, B.; ROBE, P.; PUJIC, P.; TUPHILE, K.; BERTRAND, H.; VOGEL, T. M.; PERRIERE, G.; SIMONET, P.; NALIN, R. Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5522-5527, 2004.

GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H. P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 2, p. 119-142, 2010.

GUAN, L. L.; NKRUMAH, J. D.; BASARAB, J. A.; MOORE, S. S. Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. **FEMS Microbiology Letters**, v. 288, n. 1, p. 85-91, 2008.

HAMMER, Ø., HARPER, D. A.T., RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HESS, M.; SCZYRBA, A.; EGAN, R.; KIM, T. W.; CHOKHAWALA, H.; SCHROTH, G.; LUO, S.; CLARK, D. S.; CHEN, F.; ZHANG, T.; MACKIE, R. I.; PENNACCHIO, L. A.; TRINGE, S. G.; VISEL, A.; WOYKE, T.; WANG, Z.; RUBIN, E. M. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. **Science**, v. 331, n. 6016, p. 463-467, 2011.

HILDEBRAND, M.; WAGGONER, L. E.; LIU, H.; SUDEK, S.; ALLEN, S.; ANDERSON, C.; SHERMAN, D. H.; HAYGOOD, M. bryA: an unusual modular polyketide synthase gene from the uncultivated bacterial symbiont of the marine

bryozoan *Bugula neritina*. **Chemistry & Biology**, v. 11, n. 11, p. 1543-1552, 2004.

JAMI, E.; MIZRAHI, I. Similarity of the ruminal bacteria across individual lactating cows. **Anaerobe**, v. 18, n. 3, p. 338-343, 2012 a.

JAMI, E.; MIZRAHI, I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33306, 2012 b.

JANSO, J. E.; CARTER, G. T. Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 13, p. 4377-4386, 2010.

JENKE-KODAMA, H.; SANDMANN, A.; MULLER, R.; DITTMANN, E. Evolutionary implications of bacterial polyketide synthases. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 10, p. 2027-2039, 2005.

JENKE-KODAMA, H.; DITTMANN, E. Evolution of metabolic diversity: insights from microbial polyketide synthases. **Phytochemistry**, v. 70, n. 15-16, p. 1858-1866, 2009.

KALUZHAYAYA, O. V.; KULAKOVA, N. V.; ITSKOVICH, V. B. Diversity of Polyketide Synthase (PKS) genes in metagenomic community of freshwater sponge *Lubomirskia baicalensis*. **Molecular Biology**, v. 46, n. 6, p. 790-795, 2012.

KIM, M.; KIM, J.; KUEHN, L. A.; BONO, J. L.; BERRY, E. D.; KALCHAYANAND, N.; FREETLY, H. C.; BENSON, A. K.; WELLS, J. E. Investigation of bacterial diversity in the feces of cattle fed different diets. **Journal of Animal Science**, v., n., p., 2013.

LETZEL, A. C.; PIDOT, S. J.; HERTWECK, C. A genomic approach to the cryptic secondary metabolome of the anaerobic world. **Natural Products Reports**, v. 30, n. 3, p. 392-428, 2013.

LIN, X.; HUANG, Y. J.; ZHENG, Z. H.; SU, W. J.; QIAN, X. M.; SHEN, Y. M. Endophytes from the pharmaceutical plant, *Annona squamosa*: isolation, bioactivity, identification and diversity of its polyketide synthase gene. **Fungal Diversity**, v. 41, n. 1, p. 41-51, 2010.

LIN, Z.; TORRES, J. P.; AMMON, M. A.; MARETT, L.; TEICHERT, R. W.; REILLY, C. A.; KWAN, J. C.; HUGHEN, R. W.; FLORES, M.; TIANERO, M. D.; PERAUD, O.; COX, J. E.; LIGHT, A. R.; VILLARAZA, A. J.; HAYGOOD, M. G.; CONCEPCION, G. P.; OLIVERA, B. M.; SCHMIDT, E. W. A bacterial source for mollusk pyrone polyketides. **Chemistry & Biology**, v. 20, n. 1, p. 73-81, 2013.

LINCKE, T.; BEHNKEN, S.; ISHIDA, K.; ROTH, M.; HERTWECK, C. Closthioamide: an unprecedented polythioamide antibiotic from the strictly anaerobic bacterium *Clostridium cellulolyticum*. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 11, p. 2011-2013, 2010.

MOON, C. D.; PACHECO, D. M.; KELLY, W. J.; LEAHY, S. C.; LI, D.; KOPEČNÝ, J.; ATTWOOD, G. T. Reclassification of *Clostridium proteoclasticum* as *Butyrivibrio proteoclasticus* comb. nov., a butyrate-producing ruminal bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2041-2045, 2008.

NATHANI, N. M.; PATEL, A. K.; DHAMANNAPATIL, P. S.; KOTHARI, R. K.; SINGH, K. M.; JOSHI, C. G. Comparative evaluation of rumen metagenome community using qPCR and MG-RAST. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 55, 2013.

NETT, M.; IKEDA, H.; MOORE, B. S. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. **Natural Products Reports**, v. 26, n. 11, p. 1362-1384, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NIKOLOULI, K.; MOSSIALOS, D. Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 8, p. 1393-1403, 2012.

O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 552-558, 2011.

OLIVEIRA, M. N.; JEWELL, K. A.; FREITAS, F. S.; BENJAMIN, L. A.; TOTOLA, M. R.; BORGES, A. C.; MORAES, C. A.; SUEN, G. Characterizing the microbiota across the gastrointestinal tract of a Brazilian Nelore steer. **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 3-4, p. 307-314, 2013.

OMURA, S.; IKEDA, H.; ISHIKAWA, J.; HANAMOTO, A.; TAKAHASHI, C.; SHINOSE, M.; TAKAHASHI, Y.; HORIKAWA, H.; NAKAZAWA, H.; OSONOE, T.; KIKUCHI, H.; SHIBA, T.; SAKAKI, Y.; HATTORI, M. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 98, n. 21, p. 12215-12220, 2001.

PARSLEY, L. C.; LINNEMAN, J.; GOODE, A. M.; BECKLUND, K.; GEORGE, I.; GOODMAN, R. M.; LOPANIK, N. B.; LILES, M. R. Polyketide synthase pathways identified from a metagenomic library are derived from soil Acidobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, n. 1, p. 176-187, 2011.

PIDOT, S. J.; COYNE, S.; KLOSS, F.; HERTWECK, C. Antibiotics from neglected bacterial sources. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 1, p. 14-22, 2014.

PIEL, J. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 99, n. 22, p. 14002-14007, 2002..

PIEL, J.; HUI, D.; WEN, G.; BUTZKE, D.; PLATZER, M.; FUSETANI, N.; MATSUNAGA, S. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 101, n. 46, p. 16222-16227, 2004.

PIEL, J. Approaches to capturing and designing biologically active small molecules produced by uncultured microbes. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, n., p. 431-453, 2011.

PIMENTEL-ELARDO, S. M.; GROZDANOV, L.; PROKSCH, S.; HENTSCHEL, U. Diversity of nonribosomal peptide synthetase genes in the microbial metagenomes of marine sponges. **Marine Drugs**, v. 10, n. 6, p. 1192-1202, 2012.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J. H.; XU, L. H.; LI, W. J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 457-473, 2011.

RAUSCH, C.; HOOF, I.; WEBER, T.; WOHLLEBEN, W.; HUSON, D. H. Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n., p. 78, 2007.

REDDY, B. V.; KALLIFIDAS, D.; KIM, J. H.; CHARLOP-POWERS, Z.; FENG, Z.; BRADY, S. F. Natural product biosynthetic gene diversity in geographically distinct soil microbiomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 10, p. 3744-3752, 2012.

RIESENFELD, C. S.; MURRAY, A. E.; BAKER, B. J. Characterization of the microbial community and polyketide biosynthetic potential in the palmerolide-producing tunicate *Synoicum adareanum*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 11, p. 1812-1818, 2008

RÖTTIG, M.; MEDEMA, M. H.; BLIN, K.; WEBER, T.; RAUSCH, C.; KOHLBACHER, O. NRPSpredictor2—a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl 2, p. W362-W367, 2011.

RUSSELL, J. B. Factors That Alter Rumen Microbial Ecology. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1119-1122, 2001.

SEOW, K. T.; MEURER, G.; GERLITZ, M.; WENDT-PIENKOWSKI, E.; HUTCHINSON, C. R.; DAVIES, J. A study of iterative type II polyketide synthases, using bacterial genes cloned from soil DNA: a means to access and use genes from uncultured microorganisms. **Journal of Bacteriol**, v. 179, n. 23, p. 7360-7368, 1997.

SHEN, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 285-295, 2003.

SINGH, B. K.; MACDONALD, C. A. Drug discovery from uncultivable microorganisms. **Drug Discov Today**, v. 15, n. 17-18, p. 792-799, 2010.

SONG, Y.; LIU, C.; MOLITORIS, D. R.; TOMZYNSKI, T. J.; LAWSON, P. A.; COLLINS, M. D.; FINEGOLD, S. M. *Clostridium bolteae* sp. nov., Isolated from Human Sources. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 84-89, 2003.

STRIEKER, M.; TANOVIC, A.; MARAHIEL, M. A. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 20, n. 2, p. 234-240, 2010.

SUZUKI, M. T.; GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 625-630, 1996.

TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; BENNO, Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2766-2774, 2001.

TETA, R.; GURGUI, M.; HELFRICH, E. J. N.; KÜNNE, S.; SCHNEIDER, A.; VAN ECHTEN-DECKERT, G.; MANGONI, A.; PIEL, J. Genome Mining Reveals trans-AT Polyketide Synthase Directed Antibiotic Biosynthesis in the Bacterial Phylum Bacteroidetes. **ChemBioChem**, v. 11, n. 18, p. 2506-2512, 2010.

THOETKIATTIKUL, H.; MHUANTONG, W.; LAOTHANACHAREON, T.; TANGPHATSORNRUANG, S.; PATTARAJINDA, V.; EURWILAICHITR, L.; CHAMPREDA, V. Comparative analysis of microbial profiles in cow rumen fed with different dietary fiber by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing. **Current Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 130-137, 2013.

TRINDADE-SILVA, A. E.; RUA, C. P.; ANDRADE, B. G.; VICENTE, A. C.; SILVA, G. G.; BERLINCK, R. G.; THOMPSON, F. L. Polyketide synthase gene diversity within the microbiome of the sponge *Arenosclera brasiliensis*, endemic to the Southern Atlantic Ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 5, p. 1598-1605, 2013.

VAISHNAV, P.; DEMAINE, A. L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 2, p. 223-229, 2011.

WAWRIK, B.; KERKHOF, L.; ZYLSTRA, G. J.; KUKOR, J. J. Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2232-2238, 2005.

WAWRIK, B.; KUTLIEV, D.; ABDIVASIEVNA, U. A.; KUKOR, J. J.; ZYLSTRA, G. J.; KERKHOF, L. Biogeography of actinomycete communities and type II polyketide synthase genes in soils collected in New Jersey and Central Asia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 9, p. 2982-2989, 2007.

WOODHOUSE, J. N.; FAN, L.; BROWN, M. V.; THOMAS, T.; NEILAN, B. A. Deep sequencing of non-ribosomal peptide synthetases and polyketide synthases from the microbiomes of Australian marine sponges. **The ISME Journal**, v. 7, n. 9, p. 1842-1851, 2013.

ZHAO, B.; GAO, Z.; SHAO, Y.; YAN, J.; HU, Y.; YU, J.; LIU, Q.; CHEN, F. Diversity analysis of type I ketosynthase in rhizosphere soil of cucumber. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 224-231, 2012.

ZHAO, J.; YANG, N.; ZENG, R. Phylogenetic analysis of type I polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase genes in Antarctic sediment. **Extremophiles**, v. 12, n. 1, p. 97-105, 2008.

ZHOU, M.; HERNANDEZ-SANABRIA, E.; GUAN, L. L. Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 20, p. 6524-6533, 2009.

ZHOU, M.; HERNANDEZ-SANABRIA, E.; GUAN L., L. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 12, p. 3776-3786, 2010.

ZIEMERT, N.; JENSEN, P. R. Phylogenetic approaches to natural product structure prediction. **Methods in Enzymology**, v. 517, n., p. 161-182, 2012.

ZIEMERT, N.; PODELL, S.; PENN, K.; BADGER, J. H.; ALLEN, E.; JENSEN, P. R. The natural product domain seeker NaPDoS: a phylogeny based bioinformatic tool to classify secondary metabolite gene diversity. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e34064, 2012.

ZOTCHEV, S. B. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. **Journal of Biotechnology**, v. 158, n. 4, p. 168-175, 2012.