



Universidade de Brasília - UnB  
Instituto de Ciências Biológicas - IB  
Departamento de Biologia Celular - CEL  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana - PPGBM

**Desenvolvimento de sistema baseado na produção de GFP  
dependente de densidade celular para a detecção e triagem  
funcional de genes com atividade antibacteriana**

Autor: Samuel Dias Araújo Júnior  
Orientador: Dr. Ricardo Henrique Krüger

Brasília - DF  
2014

**SAMUEL DIAS ARAÚJO JÚNIOR**

**Desenvolvimento de sistema baseado na produção de GFP  
dependente de densidade celular para a detecção e triagem  
funcional de genes com atividade antibacteriana**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre em Biologia  
Microbiana pelo Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Microbiana da Universidade de Brasília.

Orientador: Dr. Ricardo Henrique Krüger

**Brasília - DF**

**2014**



Dissertação de Mestrado, de autoria de Samuel Dias Araújo Júnior, intitulada “**Desenvolvimento de sistema baseado na produção de GFP dependente de densidade celular para a detecção e triagem funcional de genes com atividade antibacteriana**”, apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana pela Universidade de Brasília, aprovado em 26 de fevereiro de 2014 pela banca examinadora abaixo relacionada:

**Dr. Ricardo Henrique Krüger**

Orientador e presidente da banca

Universidade de Brasília - Instituto de Ciências Biológicas/Departamento de Biologia Celular

**Dra. Eliane Ferreira Noronha**

Membro interno

Universidade de Brasília - Instituto de Ciências Biológicas/Departamento de Biologia Celular

**Dra. Cristine Chaves Barreto**

Membro externo

Universidade Católica de Brasília/Laboratório de Ciências Genômicas e Biotecnologia

**Dra. Cynthia Maria Kyaw**

Suplente

Universidade de Brasília - Instituto de Ciências Biológicas/Departamento de Biologia Celular

**Brasília - DF**

**2014**

*Dedico este trabalho aos meus queridos e amados pais, Samuel e Socorro, e irmãos,  
Samantha e Filipe, e à minha bela namorada e futura esposa, Ana Paula.*

## RESUMO

Referência: ARAÚJO JR, Samuel Dias. **Desenvolvimento de sistema baseado na produção de GFP dependente de densidade celular para a detecção e triagem funcional de genes com atividade antibacteriana.** 2014. Dissertação de Mestrado em Biologia Microbiana. Universidade de Brasília - UnB.

Vários estudos demonstram que a clonagem e expressão de enzimas e compostos bioativos utilizando a abordagem metagenômica é uma ótima alternativa para a exploração funcional de microrganismos ainda não cultiváveis. A detecção de clones com atividade antimicrobiana pode ser realizada atualmente por meio de visualização direta por alteração fenotípica do clone, como pigmentação e morfologia da colônia ou formação de halo de inibição quando realizado ensaios de sobreposição contra microrganismos indicadores. Essas estratégias já identificaram clones metagenômicos com atividade antimicrobiana, mas demonstraram, mesmo utilizando diversos hospedeiros, baixa resolução e sensibilidade, indicando a necessidade de métodos de triagem mais robustos para limites inferiores de detecção. Neste estudo é relatado o desenvolvimento de um sistema de detecção de atividade antibacteriana baseado na produção de fluorescência, por meio da expressão do gene *gfp*, decorrente à ativação por moléculas homoserina lactonas (HSL), que estão diretamente relacionadas à densidade celular da bactéria produtora utilizada no ensaio antibacteriano. Essa metodologia, denominada CEDDEX, apresentou sensibilidade significativamente superior quando comparada aos métodos tradicionais de triagem, além de poder ser executada de maneira relativamente simples em um curto período de dias e com um baixo custo operacional.

Palavras-chave: antibacteriano, biossensor, CEDDEX, GFP, HSL, metagenômica funcional

## ABSTRACT

Reference: ARAÚJO JR, Samuel Dias. **Development of system based on production of cell-density-dependent GFP for the detection and functional screening of genes with antibacterial activity.** 2014. Master's Dissertation in Microbial Biology. University of Brasilia - UnB.

Several studies demonstrate that the cloning and expression of enzymes and bioactive compounds utilizing the metagenomics approach is a great alternative for the functional exploitation of microorganisms not-yet cultivable. The detection of clones with antimicrobial activity can currently be performed through direct visualization by phenotypic alteration clone as pigmentation and colony morphology or formation of inhibition zone when performed overlay assays versus indicator microorganisms. Those strategies have already identified metagenomic clones with antimicrobial activity, but demonstrated, even using different hosts, low resolution and sensitivity, indicating the need for more robust methods of screening for lower detection limits. In this study is reported the development of an antibacterial activity detection system based in the production of fluorescence by the expression of the *gfp* gene due to activation molecules homoserine lactone (AHL), which are directly related to cell density of the producing bacterium used the antibacterial assay. This methodology, denominated CEDDEX, showed significantly higher sensitivity when compared to traditional methods of screening, and can be performed relatively easily in a short period of days and at a low operational cost.

Keywords: antibacterial, biosensor, CEDDEX, GFP, AHL, functional metagenomics

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Detecção clássica de clones com atividade antimicrobiana.....	16
<b>Figura 2</b> – Exemplo de clone metagenômico ou isolado produtor de composto com atividade antimicrobiana e detecção em ensaio clássico por meio de visualização de halo de inibição. ....	17
<b>Figura 3</b> – Esquema de construção e utilização de um biossensor bacteriano de HSL.....	23
<b>Figura 4</b> – Curva-padrão da concentração de HSL OdDHL e produção de fluorescência.....	26
<b>Figura 5</b> – Curva de crescimento e ensaio antibacteriano para a produção de OdDHL.....	29
<b>Figura 6</b> – Cultivo líquido de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 com diferentes concentrações de gentamicina e visualização de níveis de turvação e densidade óptica.....	30
<b>Figura 7</b> – Cultivo em placa de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 em diferentes concentrações de gentamicina e visualização de halos de inibição em ensaio de sobreposição. ....	31
<b>Figura 8</b> – Curva padrão da concentração de OdDHL e produção de fluorescência. ....	33
<b>Figura 9</b> – Localização do gene <i>pvdQ</i> , responsável pela síntese da HSL OdDHL, no genoma de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.....	34
<b>Figura 10</b> – Curva de crescimento e curva de inibição de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.....	35
<b>Figura 11</b> – Curva de produção de fluorescência a partir dos sobrenadantes coletados da curva de crescimento de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, entre 16 e 24 horas.....	37
<b>Figura 12</b> – Curva de produção de fluorescência a partir dos sobrenadantes coletados da curva de inibição de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, entre 16 e 24 horas. ....	37
<b>Figura 13</b> – Curva de fluorescência comparativa a partir das amostras coletadas da curva de crescimento (CC) e curva de inibição (CI) de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853. ....	41
<b>Figura 14</b> – Esquema geral representativo do princípio utilizado no sistema CEDDEX.....	48
<b>Figura 15</b> – Esquema geral para triagem e identificação de clones ou isolados produtores de compostos com atividade antibacteriana utilizando o sistema CEDDEX.....	49

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
2.1. IMPORTÂNCIA DA METAGENÔMICA .....	11
2.2. TRIAGEM FUNCIONAL DE CLONES METAGENÔMICOS .....	12
<b>2.2.1. Métodos de triagem funcional</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2.2. Triagem funcional de antimicrobianos</b> .....	<b>15</b>
2.3. UTILIZAÇÃO DE GFP PARA DETECÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA .....	17
2.4. QUORUM SENSING .....	20
<b>2.4.1. Quorum sensing em bactérias</b> .....	<b>20</b>
<b>2.4.1. Quorum sensing em <i>P. aeruginosa</i></b> .....	<b>21</b>
2.5. BIOSENSORES DE HSL .....	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
3.1. VETORES, CEPAS DE BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	24
3.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	25
<b>3.2.1. Cultivo líquido</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2.2. Cultivo sólido em placa</b> .....	<b>25</b>
3.3. SISTEMA BIOSSENSOR DE HSL .....	25
<b>3.3.1. Preparo do biossensor de HSL</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3.2. Curva padrão de HSL e fluorescência</b> .....	<b>26</b>
3.4. PRODUÇÃO DE HSL EM CULTIVO .....	27
<b>3.4.1. Preparo da célula produtora de HSL</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4.2. Curva de crescimento e produção de HSL</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4.3. Curva de crescimento com inibição e produção de HSL</b> .....	<b>28</b>
<b>3.4.1. Coleta de amostras e curva de fluorescência</b> .....	<b>28</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>52</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos principais obstáculos em ecologia microbiana é a incapacidade de cultivar a maior parte da diversidade microbiana presente nos ecossistemas sob as atuais condições de laboratório. Desta forma, a abordagem metagenômica, introduzida por Handelsman e colaboradores (Handelsman *et al.*, 1998), é uma opção que permitiu o acesso direto aos genomas complexos desses ecossistemas para a expressão heteróloga de genes e exploração funcional de microrganismos ainda não cultiváveis (Cowan *et al.*, 2005; Li e Qin, 2005).

Para a expressão heteróloga eficiente de novos genes ou mesmo de agrupamentos de genes de microrganismos a partir de bibliotecas metagenômicas é necessária a utilização de (a) metodologias eficazes de extração e preparo do DNA metagenômico, (b) utilização de vetores com características específicas, (c) hospedeiros adequados para clonagem e expressão eficientes e de (d) técnicas sensíveis para triagem funcional dos clones positivos das bibliotecas (Van Elsas *et al.*, 2008).

Atualmente, a detecção funcional de clones com atividade antimicrobiana pode ser realizada por meio de visualização direta por alteração fenotípica do clone, como pigmentação e morfologia da colônia ou formação de halo de inibição quando realizado *overlays* (sobreposição) contra microrganismos indicadores (patogênicos ou não) (Handelsman *et al.*, 2002; Brady, 2007; Banik e Brady, 2010; Lloyd, 2012). Essas estratégias já identificaram clones metagenômicos com atividade antimicrobiana, mas demonstraram, mesmo utilizando diversos hospedeiros, baixa resolução e sensibilidade (Craig *et al.*, 2010), indicando a necessidade de métodos de triagem mais robustos para limites inferiores de detecção.

Dessa maneira, para melhorar a possibilidade de detecção e triagem de genes com atividade antibacteriana a partir de clones metagenômicos e isolados, ou até mesmo a partir de extratos e compostos de outras fontes, foi desenvolvido um método de ensaio antibacteriano denominado “Expressão Dependente de Densidade Celular” ou “Cell-Density-Dependent Expression” (CEDDEX), mais sensível do que os ensaios antibacterianos baseados somente na visualização de halos de inibição utilizados em métodos tradicionais.

Ensaio antibacteriano em geral se baseia na capacidade de um composto ou microrganismo em inibir o crescimento ou causar a morte de uma determinada bactéria, o que caracteriza, respectivamente, os conceitos de bacteriostáticos e bactericidas. Independente do tipo de ação contra a bactéria que é testada, a atividade antibacteriana causa uma diminuição da densidade celular, sendo ela absoluta ou não, ao longo da curva de crescimento do

microrganismo. Assim, o método CEDDEX foi fundamentado na capacidade de um clone metagenômico (ou qualquer composto) com atividade antibacteriana em inibir ou retardar o crescimento de uma célula bacteriana que produza um composto que esteja diretamente relacionado à densidade celular e que esse fosse detectável e quantificável.

Muitas bactérias Gram-negativas utilizam um sistema de comunicação célula-célula e que dependem da concentração de moléculas homoserina lactonas (HSL) difusíveis que estão relacionadas à densidade da população microbiana em um processo conhecido como *Quorum Sensing* ou sensoriamento populacional (Waters e Bassler, 2005; Williams *et al.*, 2007; Deep *et al.*, 2011). Para viabilizar e otimizar o método, essa característica foi combinada com a capacidade de monitorar moléculas HSL *in vivo* por meio de biossensores de HSL que utilizam plasmídeos repórteres não tóxicos que expressam uma proteína verde fluorescente (GFP) que pode ser detectada por microscopia de epifluorescência ou qualquer outro sistema de detecção de fluorescência, em nível de uma única célula (Riedel *et al.*, 2001; Steidle *et al.*, 2001; Steindler e Venturi, 2007). Desta forma, métodos que se baseiem na densidade celular e não somente na observação de halos de inibição em *overlays* ou pigmentação e mudanças na morfologia, podem ser utilizados como estratégias para a triagem de clones com atividade antibacteriana a partir de bibliotecas metagenômicas.

O objetivo deste estudo foi desenvolver um sistema de detecção de atividade antibacteriana baseado na produção de fluorescência, por meio da expressão do gene *gfp*, decorrente à ativação por moléculas HSLs, que estão diretamente relacionadas à densidade celular da bactéria produtora utilizada no ensaio antibacteriano. Assim, essa nova metodologia poderá ser utilizada como estratégia para aumentar a sensibilidade de triagem de clones com atividade antibacteriana a partir de bibliotecas metagenômicas e/ou isolados, expandindo, significativamente, o potencial de bioprospecção de clones positivos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. IMPORTÂNCIA DA METAGENÔMICA

Um dos principais obstáculos em ecologia microbiana é a incapacidade de cultivar a maior parte da diversidade microbiana presente nos ecossistemas sob as atuais condições de laboratório. A divergência observada entre o número de células de bactérias que formam colônias em placas e contagem de células obtidas por observação microscópica é conhecida como “grande anomalia da contagem em placa” (Staley e Konopka, 1985). Estudos recentes baseados em técnicas dependentes e independentes de cultivo mostraram que a maioria dos microrganismos presentes nos mais diversos ambientes ainda é desconhecida (Torsvik, Goksoyr, *et al.*, 1990; Béjà *et al.*, 2000; Rondon *et al.*, 2000; Hentschel *et al.*, 2002; Mincer *et al.*, 2002; Torsvik e Ovreas, 2002; Venter *et al.*, 2004; De Castro *et al.*, 2010; Mocali e Benedetti, 2010).

Análises baseadas em rDNA 16S indicam que existem centenas de novas famílias, inclusive novos filos, de bactérias nos ecossistemas, sugerindo um alto potencial biotecnológico a partir dos metabólitos secundários e enzimas destes microrganismos. Assim, devido à atual necessidade de novos tipos de antibióticos para agir rapidamente contra patógenos multirresistentes e novos agentes infecciosos emergentes, a quimiodiversidade ambiental é uma das metas para a busca de medicamentos naturais (Brady *et al.*, 2001; Gillespie *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2005; Banik e Brady, 2010; Torres-Cortes *et al.*, 2011; Garmendia *et al.*, 2012; Mcgarvey *et al.*, 2012).

Estudos metagenômicos demonstram, por exemplo, que 99% das bactérias de solos ainda não podem ser cultivadas pelos métodos convencionais (Handelsman *et al.*, 1998; Rondon *et al.*, 2000; Handelsman *et al.*, 2002; Handelsman, 2004; Langer *et al.*, 2006; Sabree *et al.*, 2009). Desta forma, a abordagem metagenômica, introduzida por Handelsman e colaboradores (1988), tem surgido como uma opção para permitir o acesso direto aos genomas complexos desses ecossistemas para a expressão heteróloga de genes e exploração funcional de microrganismos ainda não cultiváveis (Cowan *et al.*, 2005; Li e Qin, 2005).

A metagenômica envolve a construção de bibliotecas de clones por meio da clonagem direta do DNA de amostras ambientais em vetores apropriados, a fim de facilitar a análise dos genes e das sequências dentro dessas bibliotecas (Handelsman *et al.*, 1998; Handelsman, 2004). A metagenômica foi inicialmente empregada para estudar a microbiota ainda não

cultivável e concentrou-se principalmente no entendimento da ecologia global em diferentes nichos ambientais. Atualmente muitos estudos estão utilizando a metagenômica para fins biotecnológicos (Lorenz e Eck, 2005).

Até o momento, a principal área de aplicação da metagenômica é a exploração de genes metagenômicos que codifiquem novos biocatalisadores e drogas antimicrobianas (Lorenz e Eck, 2005). Vários estudos demonstram que a clonagem e expressão de enzimas e compostos bioativos utilizando a abordagem metagenômica é uma ótima alternativa para a exploração funcional de microrganismos ainda não cultivados (Torsvik, Goksås, Yr, *et al.*, 1990; Handelsman *et al.*, 1998; Hugenholtz *et al.*, 1998; Rondon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Brady *et al.*, 2001; Macneil *et al.*, 2001; Brady *et al.*, 2002; Gillespie *et al.*, 2002; Torsvik e Ovreas, 2002; Courtois *et al.*, 2003; Rappe e Giovannoni, 2003; Martinez *et al.*, 2004; Piel *et al.*, 2004; Brady e Clardy, 2005; Schirmer *et al.*, 2005; Uchiyama *et al.*, 2005; Wexler *et al.*, 2005; Lam, 2006; Brady, 2007; Lämmle *et al.*, 2007; Newman e Cragg, 2007; Kennedy *et al.*, 2008; Taylor e Wright, 2008; Xu *et al.*, 2008; Craig *et al.*, 2009; Craig *et al.*, 2010; Bijtenhoorn *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2011; Torres-Cortes *et al.*, 2011; Garmendia *et al.*, 2012; Iqbal *et al.*, 2012; Mcgarvey *et al.*, 2012).

## 2.2. TRIAGEM FUNCIONAL DE CLONES METAGENÔMICOS

A maioria dos biocatalisadores utilizados para fins biotecnológicos ou industriais são de origem microbiana. Isso reflete o fato de que a maior variedade genética na biosfera pode ser encontrada nas diferentes comunidades microbianas presentes nos vários ecossistemas da Terra (Ferrer *et al.*, 2009). A aplicação da abordagem metagenômica (independente de cultura) permite explorar esse recurso quase ilimitado de novas biomoléculas (Cowan *et al.*, 2005). Várias técnicas têm sido utilizadas para identificar e recuperar genes e agrupamentos de genes a partir de bibliotecas metagenômicas. Devido à complexidade dessas bibliotecas, técnicas de alto desempenho e triagens cada vez mais sensíveis têm sido empregadas.

Bibliotecas metagenômicas podem ser analisadas para o descobrimento de novos genes e vias metabólicas com técnicas baseadas na sequência ou por meio da seleção da atividade com análise da expressão de novos fenótipos em hospedeiros heterólogos (Sabree *et al.*, 2009). A vantagem da triagem funcional é que a mesma pode detectar atividades provenientes de genes cujas funções não podem ser previstas por meio de análise de

bioinformática das sequências de DNA ou da proteína. Ou seja, a principal vantagem da abordagem por triagem funcional é que são detectados apenas genes de comprimento total e os produtos dos genes funcionais. Por outro lado, a identificação de novas atividades utilizando a triagem funcional é dependente de transcrição e tradução bem sucedida dos genes clonados, ou seja, a incapacidade do hospedeiro para expressar os genes estranhos e para formar as proteínas recombinantes ativas (Aakvik *et al.*, 2009).

### **2.2.1. Métodos de triagem funcional**

A capacidade para detectar, isolar e caracterizar os genes expressos em uma biblioteca metagenômica depende do método de avaliação do clone com a atividade em questão. Uma ampla variedade de métodos de triagem funcional pode ser utilizada. Entre eles, três estratégias gerais de detecção são distinguíveis: “Detecção de Inserção Fenotípica” (DIF), “Detecção Modulada” (DM) e “Expressão de Genes Induzidos” (EGI) (Ekkers *et al.*, 2011; Simon e Daniel, 2011). A combinação dessas três estratégias pode ser utilizada para aperfeiçoar a triagem funcional.

A abordagem DIF é a mais comumente utilizada para triagem funcional de bibliotecas metagenômicas e é baseada na detecção de características fenotípicas específicas. Esses traços fenotípicos podem ser detectados de várias maneiras. O primeiro se baseia na expressão direta, como por exemplo, através da detecção de pigmentação ou morfologia de colônias (Brady, 2007), ambas as quais podem resultar diretamente a partir do gene inserido expresso (Craig *et al.*, 2010). Outra maneira (indireta) é a reação ou interação de uma substância adicionada com o produto do gene expresso ou de um produto que é uma consequência da expressão (clones com atividade proteolítica ou lipolítica identificados por formação halo de degradação do substrato correspondente). Por último, a detecção pode ser baseada na coexpressão de um gene repórter, que está ligado ao gene alvo na biblioteca. A intensidade (nível) da expressão do gene é uma questão importante, pois sinais tênues de expressão podem ser facilmente perdidos em triagens de alto desempenho. Uma ajuda possível é oferecida por abordagens usando volumes de microlitros a nanolitros (Taupp *et al.*, 2011).

A estratégia MD se baseia na produção de um produto que é necessário para o crescimento sob condições seletivas e é adequado para triagens de elevada produtividade. Utiliza detecção indireta de um gene expresso, por meio de uma rota de expressão pré-desenhada. Hospedeiros ou vetores podem ser modulados para a expressão de genes repórteres (produção de beta-galactosidase pela expressão do gene *LacZ*) (Schipper *et al.*,

2009) ou complementação heteróloga (produção de DNA polimerase I em hospedeiros deficientes para esta enzima) (Simon *et al.*, 2009). Isso resulta em triagens mais específicas e sinais detectáveis padronizados.

A utilização da abordagem EGI é baseada na expressão induzida do gene clonado por meio de um substrato ou produto específico. Até o momento foram desenvolvidas duas técnicas utilizando a abordagem EGI baseado na indução pelo substrato, acoplados com sistemas repórteres de produção de fluorescência: *Substrate-induced gene expression* (SIGEX) ou Expressão Induzida pelo Substrato (Uchiyama *et al.*, 2005) e *Metabolite-regulated Expression* (METREX) ou Expressão Regulada pelo Metabólito (Williamson *et al.*, 2005). Recentemente, foi desenvolvido outro método, baseado na indução pelo produto, também acoplado com sistema repórter de produção de fluorescência, denominado *Product-Induced Gene Expression* (PIGEX) (Uchiyama e Miyazaki, 2010). Essas técnicas demonstraram que sistemas repórteres são sensíveis e eficientes para a exploração e detecção de alto desempenho de atividades específicas em clones metagenômicos.

O sistema SIGEX foi desenvolvido como um método de triagem para determinados genes catabólicos (Uchiyama *et al.*, 2005; Uchiyama e Watanabe, 2007; Uchiyama e Miyazaki, 2009). Este método emprega um operon *gfp*-trap em um vetor de expressão. A triagem é baseada no fato de que a expressão do gene catabólico é induzida principalmente por substratos específicos que são controlados por elementos reguladores localizados próximos ao gene regulado. Para realizar o SIGEX, o DNA metagenômico é clonado à montante do gene *gfp*, colocando a expressão de *gfp* sob o controle de promotores presentes no DNA metagenômico inserido no vetor. Os clones que influenciam a expressão de *gfp* após a adição do substrato de interesse são isolados por um método de separação de células ativas por fluorescência. Pelo método SIGEX já foram isolados genes induzidos por hidrocarbonetos aromáticos a partir de uma biblioteca metagenômica derivada de águas subterrâneas (Uchiyama *et al.*, 2005).

Semelhante ao sistema SIGEX, a triagem pelo método METREX (Williamson *et al.*, 2005) foi desenvolvido para identificar clones metagenômicos que produzem pequenas moléculas sinalizadoras. METREX utiliza um biossensor que detecta pequenas moléculas difusíveis de sinalização que induzem quorum sensing dentro da mesma célula, utilizando um vetor clonado com DNA metagenômico. O principal componente do biossensor é um promotor que detecta moléculas de quorum sensing e controla o gene repórter *gfp*. Quando a molécula, codificada pelo DNA metagenômico, alcança um limiar de concentração, a fluorescência verde é produzida. Subsequentemente, os clones positivos são identificados por

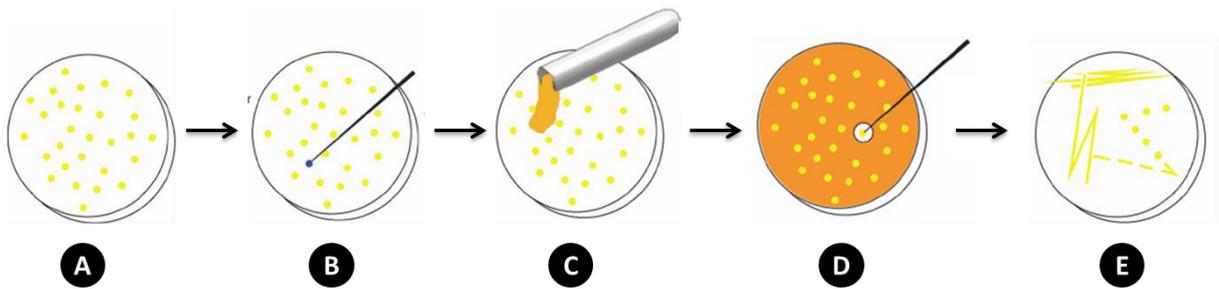
microscopia de fluorescência. Por meio dessa estratégia já foi identificada uma nova classe de indutores de quorum sensing a partir da microbiota do intestino médio de larvas de mariposa cigana (Guan *et al.*, 2007).

Recentemente, foi desenvolvido o método PIGEX (Uchiyama e Miyazaki, 2010), baseado na abordagem SIGEX. Nesse sistema de ensaio repórter, as atividades enzimáticas também são detectadas pela expressão da *gfp*, que é induzida pela formação de produto. De modo a rastrear amidases, foi utilizado como sensor o regulador transcricional de benzoato, *BenR*. Clones metagenômicos de células recombinantes de *E. coli* contendo o sensor foram cultivadas na presença do substrato benzamida. Em resposta a produção de benzoato, produzidos pelos clones metagenômicos, as células sensores produziram fluorescência. Por meio dessa estratégia já foram identificados três novos genes que codificam amidases.

### **2.2.2. Triagem funcional de antimicrobianos**

A detecção de clones com atividade antimicrobiana pode ser realizada por meio de visualização direta por alteração fenotípica do clone, como pigmentação e morfologia da colônia ou formação de halo de inibição quando realizado *overlays* (sobreposição) contra microrganismos indicadores (patogênicos ou não) (Brady, 2007; Banik e Brady, 2010) (Figura 1). Essas estratégias já identificaram clones metagenômicos com atividade antimicrobiana (Torsvik, Goksoyr, *et al.*, 1990; Handelsman *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000; Brady *et al.*, 2001; Macneil *et al.*, 2001; Brady *et al.*, 2002; Brady e Clardy, 2005; Newman e Cragg, 2007; Taylor e Wright, 2008; Craig *et al.*, 2010), mas demonstraram, mesmo utilizando diversos hospedeiros, baixa resolução e sensibilidade (Craig *et al.*, 2010), indicando a necessidade de métodos de triagem mais robustos para limites inferiores de detecção.

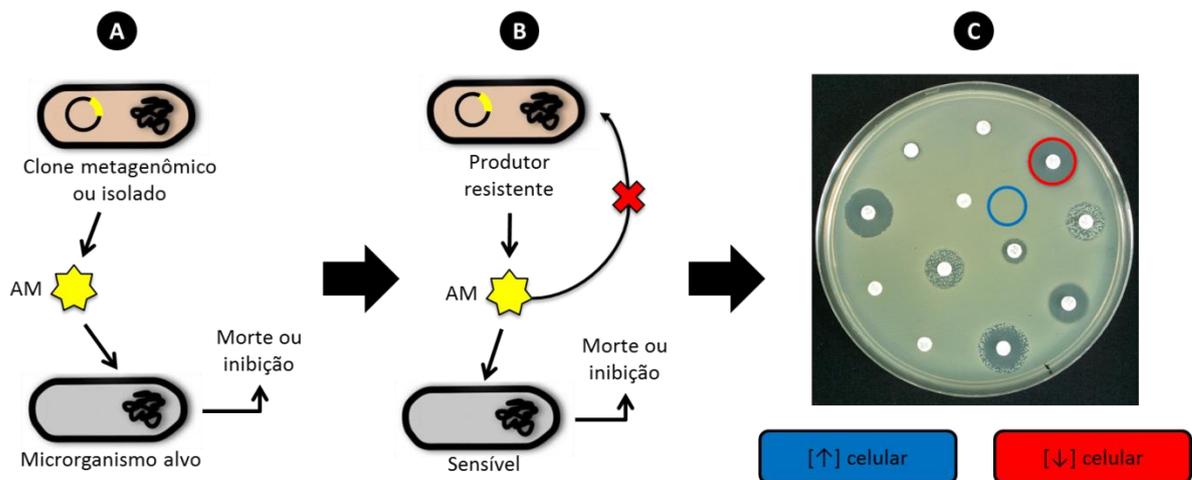
Além da visualização de alterações fenotípicas e/ou formações de halos de inibição em *overlays*, também podem ser realizados ensaios antibacterianos em cultura com a determinação da densidade óptica para verificar clones que possuam atividade microbicida ou microbiostática. Ensaio semelhantes, utilizando os mesmos princípios, também podem ser utilizados para o descobrimento de compostos, extratos (de plantas, secreções, etc), microrganismos isolados, ou qualquer substância que possua atividade antimicrobiana. No entanto, independente da fonte da atividade, esses métodos não possuem sensibilidade suficiente para revelar e detectar a atividade em condições onde o composto antimicrobiano está ou foi produzido em concentrações inferiores aos limites de detecção desses métodos.



**Figura 1** – Detecção clássica de clones com atividade antimicrobiana. Após crescimento dos clones por alguns dias (A), é realizada a identificação de colônias com alterações fenotípicas, como por exemplo, de pigmentação ou morfologia (B). Posteriormente é realizado *overlay* (sobreposição) com um microrganismo indicador (C) e após a incubação é identificado o clone com atividade antimicrobiana por meio da formação de halo de inibição (D), que posteriormente é repicado e isolado (E). Adaptado de (Brady, 2007).

Em uma situação hipotética (Figura 2), em um experimento clássico de antibiose utilizando *overlay*, um clone metagenômico ou um isolado microbiano produz um composto com atividade antimicrobiana capaz de inibir ou causar a morte de um microrganismo alvo (Figura 2A). Necessariamente, para ser possível a formação do halo de inibição em torno do clone ou isolado, o produtor da atividade deve ser resistente ao antimicrobiano produzido e o microrganismo alvo deve ser sensível (Figura 2B) Nesta situação, a presença da atividade é detectada por meio da formação de um halo de inibição e, ocasionalmente, o tamanho do halo de inibição caracteriza a potência dessa inibição (Figura 2C). Ou seja, quanto maior o halo de inibição, maior a capacidade de inibição ou morte pelo composto secretado, como observado na Figura 2C pelos diferentes tamanhos de halo de inibição produzidos por diferentes microrganismos hipotéticos. No entanto, a não formação de halo de inibição visível não caracteriza uma ausência de composto com atividade antimicrobiana, mas tão logo, somente uma concentração do composto em níveis inferiores para a formação do halo de inibição visivelmente detectável.

Como visualizado na Figura 2C, os locais onde houve crescimento do microrganismo indicador possuem alta concentração celular desse microrganismo e, contrariamente, os locais onde houve a formação do halo de inibição, possuem nenhuma ou baixa concentração celular, não capaz de formar colônias ou crescimento celular visível.



**Figura 2** – Exemplo de clone metagenômico ou isolado produtor de composto com atividade antimicrobiana e detecção em ensaio clássico por meio de visualização de halo de inibição. O clone metagenômico ou isolado produz composto que possui atividade antimicrobiana contra um microrganismo alvo, causando sua morte ou inibição de seu crescimento (A). O produtor do composto antimicrobiano, necessariamente, é resistente ao mesmo, e o microrganismo alvo é sensível a este composto (B). Nos locais de formação de halo de inibição existem nenhuma ou baixa concentração celular do organismo alvo utilizado no ensaio, enquanto que as áreas sem formação de halo de inibição possuem grande concentração desse microrganismo (C).

### 2.3. UTILIZAÇÃO DE GFP PARA DETECÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA

A GFP é uma pequena proteína encontrada na água viva *Aequorea victoria* e foi relatada pela primeira vez em 1962 por Shimomura e colaboradores, durante experimentos que visavam identificar a molécula capaz de promover a emissão de bioluminescência da água viva (Shimomura, 2009). O alvo do estudo era a proteína quimioluminescente aquarina, entretanto, outra proteína capaz de emitir forte fluorescência verde foi identificada como um subproduto do processo de purificação da aquarina, e foi nomeada posteriormente como GFP.

Em 1974, Morise e colaboradores elucidaram a relação entre as proteínas aquarina e GFP na bioluminescência de *Aequorea sp.* A aquarina é responsável pelo fornecimento de energia necessária para a emissão de luz, que promove a excitação das moléculas de GFP. A GFP possui a propriedade de fluorescer quando excitada por UV ou por luz azul de onda curta. A sequência de aminoácidos da cadeia primária da GFP foi elucidada em 1992 por Prasher e colaboradores, por meio da clonagem e sequenciamento do DNA genômico e complementar (cDNA) do gene correspondente, denominado *gfp*. Foi determinado que a

proteína possuía 238 resíduos de aminoácidos e massa molecular calculada de 26.888 Da (Chalfie, 1995).

A fluorescência de GFP é explicada pela presença de um cromóforo denominado *p-hidroxibenzilideneimidazolidinona* formado pela ciclização e oxidação autocatalítica dos resíduos de três aminoácidos contínuos próximos ao aminoácido terminal da proteína (Ser-Tyr-Gly), nas posições 65-67 (Cody *et al.*, 1993). A formação do cromóforo ocorre independente da adição de cofatores e com a proteína solubilizada, uma vez que em estado insolúvel a cadeia polipeptídica é incapaz de adquirir a conformação ativa da proteína (Reid e Flynn, 1997).

Com a expressão heteróloga de GFP ativa, as perspectivas de utilização dessa proteína como ferramenta para pesquisa *in vivo* se tornaram ilimitadas. As primeiras clonagens foram realizadas em células de *E. coli* e *Caenorhabditis elegans* (Chalfie *et al.*, 1994) e em *Drosophila melanogaster* (Wang e Hazelrigg, 1994), demonstrando a capacidade de expressão de GFP tanto em organismos procariotos como em eucariotos. Também foi possível confirmar que a formação do cromóforo não necessita de substrato ou de enzima específica de *A. victoria*, assim como nenhum cofator para induzir a fluorescência.

A utilização da GFP pode ser utilizada no monitoramento de expressão de genes e localização de proteínas, dentro outros usos, devido à necessidade de essa marcação não afetar os membros da comunidade. A utilização da GFP em análises biológicas tem aumentado muito, pois não necessita da destruição das células e nem da adição de nenhum substrato exógeno (Chalfie *et al.*, 1994).

O emprego de GFP tornou-se mais atraente graças ao sucesso na rastreabilidade genética de muitos organismos, além da maneira fácil e rápida que pode ser expressa nos diversos sistemas e condições biológicas. A utilização de GFP como molécula repórter teve um impacto comparável à aplicação de *LacZ* para o estudo de localização de macromoléculas *in vivo*, incluindo bactérias. Estudos de macromoléculas, até então por imunomarcação utilizando ouro e por microscopia de imunofluorescência, eram limitados, pois necessitavam de anticorpos diretos contra a proteína alvo e a fixação da amostra, impossibilitando a investigação em células vivas. A obtenção de anticorpos é um processo trabalhoso e com rendimento baixo e, por esse motivo, o uso de uma proteína repórter de fácil visualização como a GFP proporcionou rápido desenvolvimento no estudo de diversas moléculas (Phillips, 2001).

Com o desenvolvimento das metodologias de monitoramento da expressão de GFP, diversos estudos sobre localização, tanto de proteínas como de DNA foram facilitados. Esses

estudos proporcionaram o entendimento de uma variedade de processos como a divisão celular, replicação e divisão de cromossomo, esporulação, transdução de sinais, etc. Essa metodologia proporcionou, também, um grande avanço no esclarecimento da organização celular bacteriana (Phillips, 2001), o monitoramento da expressão gênica, do transporte de proteínas, perturbando minimamente as células, tecidos ou organismos (Heim *et al.*, 1994).

A estratégia geral para construção de fusões do gene repórter *gfp* utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR), ou outras técnicas de clonagem, modificando sítios de restrição tanto na sequência do gene *gfp*, quanto na sequência do alvo. O gene *gfp* repórter pode ser fusionado em ambas as extremidades da sequência do gene alvo, gerando fusões traducionais amino ou carboxi-terminais. Essas fusões devem considerar a estrutura da proteína alvo, respeitando as condições para que esta permaneça funcional (Phillips, 2001).

Apesar das inúmeras vantagens da GFP nativa, sua utilização pode ser limitada pela formação lenta do cromóforo, que requer, em média, duas horas após a síntese para ser formado. Essa característica limita estudos que requerem monitoramento dentro desse intervalo de tempo, como é o caso da detecção de proteínas com meia-vida curta. A GFP selvagem tende a formar corpos de inclusão, principalmente quando em altas temperaturas (superiores a 37°C), além da intensidade da fluorescência ser relativamente baixa, o que pode induzir a interpretação incorreta dos resultados (Heim *et al.*, 1994; Phillips, 2001). Dessa forma, com o objetivo de contornar as limitações da GFP selvagem, foram realizadas, por exemplo, alterações para a otimização no tempo de formação do fluoróforo, o aumento da emissão de fluorescência e a alteração das propriedades espectrais, gerando proteínas variantes mais eficientes que a GFP nativa (Cormack *et al.*, 1996).

## 2.4. QUORUM SENSING

### 2.4.1. Quorum sensing em bactérias

Muitas bactérias Gram-negativas utilizam um sistema de comunicação célula-célula e que depende da concentração de moléculas homoserina lactonas (HSL) difusíveis que estão relacionadas à densidade da população bacteriana em um processo conhecido como *Quorum Sensing* ou sensoriamento populacional (Waters e Bassler, 2005; Williams *et al.*, 2007; Deep *et al.*, 2011).

O mecanismo de percepção de quorum foi relatado pela primeira vez em *Vibrio fischeri*, uma bactéria que vive livremente na água do mar ou em simbiose com lulas e peixes. O exemplo mais estudado envolve a simbiose entre *V. fischeri* e *Euprymna scolopes*, uma pequena lula que possui órgãos luminescentes, devido à presença em alta densidade da bactéria simbiote. A luminescência produzida por estes vibrios marinhos é resultante de um processo mediado por homoserina lactonas (HSL), conhecidas como autoindutores (AI) (Ruby, 1996; Visick e Mcfall-Ngai, 2000).

HSL são sintetizadas no citoplasma bacteriano e se difundem através da membrana plasmática, acumulando-se no meio externo durante o crescimento da bactéria. A percepção de HSL pelas bactérias é parte de um crescimento complexo de monitoramento das mudanças do meio e de respostas cooperativas (Fuqua e Greenberg, 1998).

Tipicamente esse sistema de comunicação depende de duas proteínas, uma HSL sintase, geralmente membro da família *LuxI* de proteínas, e uma proteína receptora de HSL, a qual pertence à família *LuxR* de reguladores transcricionais. Em baixa densidade populacional as células produzem um nível basal de HSL por meio da atividade da HSL sintase. À medida que se aumenta a densidade de células a molécula sinal difusível HSL se acumula no meio de crescimento. Ao atingir um limiar de concentração intracelular crítico, a HSL liga-se ao receptor cognato tipo *LuxR*, que por sua vez leva a indução/repressão de genes alvos (Riedel *et al.*, 2001; Waters e Bassler, 2005; Rice *et al.*, 2008). Ou seja, bactérias são capazes de perceber a densidade celular através da detecção da concentração do autoindutor, que está intimamente relacionado à densidade celular.

A detecção de moléculas sinalizadoras envolvidas na percepção de quorum tem sido bastante facilitada devido ao desenvolvimento de sistemas repórteres já que elas são produzidas em concentrações extremamente baixas pelas células bacterianas.

### 2.4.1. Quorum sensing em *P. aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria altamente adaptável que pode colonizar o solo, águas, plantas e animais, incluindo humanos (Van Delden e Iglewski, 1998; De Kievit *et al.*, 2002). A patogenicidade de *P. aeruginosa* baseia-se na sua habilidade de produzir e secretar diversos fatores de virulência extracelulares como proteases, hemolisinas, exotoxina A, exoenzima S e piocianina. Estes fatores são capazes de causar extensivo dano aos tecidos do hospedeiro (Nicas e Iglewski, 1985; Van Delden e Iglewski, 1998). A regulação dos genes codificadores destes produtos depende de um sistema de sinalização que engloba pelo menos dois grupos de homólogos *LuxRI*, *las* e *rhl* (também referido como *VsmRI*). Estes sistemas estão interligados de maneira hierárquica, e o sistema *las* controla o sistema *rhl* em ambos os níveis: transcricional (Latifi *et al.*, 1996; De Kievit *et al.*, 2002) e traducional (Pesci *et al.*, 1997). Em *P. aeruginosa*, um dos sistemas de percepção de quórum melhor estudados, a percepção de moléculas de sinalização afeta direta e/ou indiretamente a expressão de cerca de 200 genes (Whiteley *et al.*, 1999).

O sistema *las* consiste de um regulador de transcrição, *LasR*, e sua molécula sinalizadora, N-(3-oxododecanoil) homoserina lactona (3O-C12-HSL ou OdDHL), sintetizada por uma AHL sintase, codificada pelo gene *lasI* (Gambello e Iglewski, 1991; Pearson *et al.*, 1994). O sistema *LasRI* regula a expressão da elastase *LasA*, elastase *LasB*, exotoxina A e protease alcalina (Toder *et al.*, 1991; Passador *et al.*, 1993).

O sistema *rhl* consiste da proteína *RhlR* e uma AHL sintase (*RhlI*), que está envolvida na produção de N-butilil homoserina lactona (C4-HSL) (Pearson *et al.*, 1994; Winson *et al.*, 1995). Esta AHL interage com *RhlR* para ativar a expressão de *rhlAB*, um operon que codifica uma ramnosil-transferase necessária para a produção de ramnolipídeos surfactantes (Ochsner *et al.*, 1994). A presença destes componentes reduz a tensão superficial que permite às células de *P. aeruginosa* deslizarem sobre superfícies semi-sólidas (Kohler *et al.*, 2000). Diversos resultados mostram que o sistema *RhlRI* é também necessário para indução da expressão de outros fatores, incluindo protease alcalina, piocianina, cianeto de hidrogênio, lectina e elastase (Brint e Ohman, 1995; Pessi e Haas, 2000). Latifi e colaboradores (1996) sugeriram que *RhlR* ativado pode ser capaz de ativar a transcrição de *rpoS* (codificador de  $\sigma_s$ , o fator sigma da fase estacionária).

Os sistemas *Las* e *Rhl* também são requeridos para a expressão de dois genes (*xcpP* e *xcpR*) que codificam componentes do sistema secretor *Xcp* de *P. aeruginosa* (Chapon-Herve *et al.*, 1997). O sistema secretor *Xcp* media a passagem de exoproteínas (tais como exotoxina

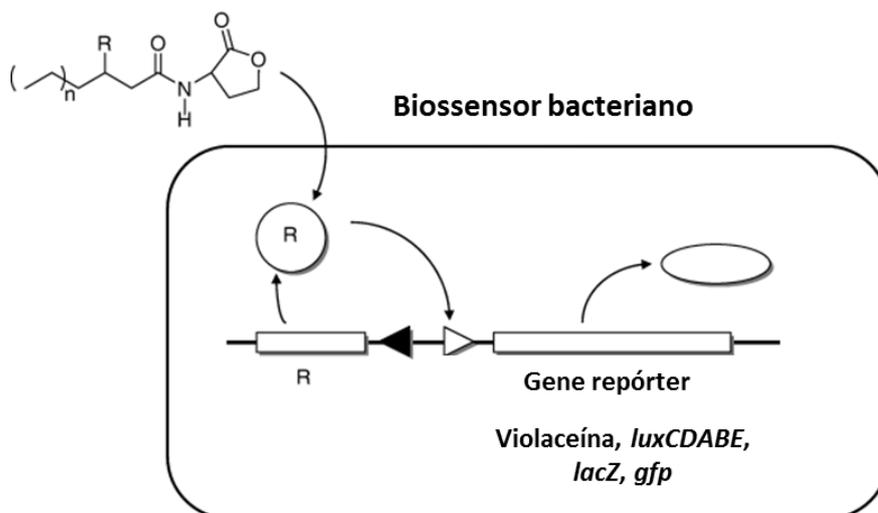
A, elastase e fosfolipase) através da membrana do microrganismo (Tommasen *et al.*, 1992). A vantagem deste sistema regulatório é que as células de *P. aeruginosa* controlam a produção dos fatores virulentos para que este seja expresso somente em alta densidade populacional. Isto impede que a bactéria alerte o hospedeiro da sua presença, impedindo a ativação de sistemas de defesa específicos.

Pesci e colaboradores (1999) identificaram outra molécula sinalizadora no sobrenadante de culturas de *P. aeruginosa*. A síntese desta molécula, identificada como 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS), é dependente de *LasR*. A adição de PQS exógena induziu a expressão de *lasB* e *rhlI* e, em menor extensão, de *lasR* e *rhlR*, sugerindo portanto outra ligação entre os sistemas *Las* e *Rhl* (Pesci *et al.*, 1997; Mcknight *et al.*, 2000). Populações de *P. aeruginosa* sintetizam PQS na fase estacionária de crescimento (Mcknight *et al.*, 2000). McKnight e colaboradores (2000) sugeriram que *P. aeruginosa* poderia usar PQS para regular a expressão de *rhlI* e, como consequência, os genes regulados pelo sistema *rhl* durante a fase estacionária de crescimento, como um meio de obter nutrientes pelo hospedeiro.

## 2.5. BIOSSENSORES DE HSL

Um grande número de sistemas HSL foi identificado por meio da utilização de biossensores bacterianos que são capazes de detectar a presença de HSL. Esses biossensores não produzem HSL e contém uma proteína funcional da família *LuxR* clonada juntamente a um promotor cognato (normalmente o promotor cognato da enzima *luxI* sintase), o qual regula positivamente a transcrição de um gene repórter (bioluminescência,  $\beta$ -galactosidase, proteína verde fluorescente GFP, violaceína) (Steindler e Venturi, 2007) (Figura 3).

Biossensores de HSL podem ser utilizados para quantificar HSL em determinadas condições, medindo a atividade do sistema repórter presente na estirpe bacteriana biosensora. Isso é útil para o estudo da regulação da síntese de HSL e para a identificação de diferentes níveis de produção de HSL. Para quantificar e determinar com precisão a quantidade mínima de HSL necessários para uma resposta mínima, bem como a quantidade necessária para uma resposta saturada, HSLs sintéticos podem ser utilizados para traçar a resposta em dose linear.



**Figura 3** – Esquema de construção e utilização de um biossensor bacteriano de HSL. Na parte superior da figura é mostrada a estrutura genérica de uma HSL. A HSL exógena interage com uma proteína da família *LuxR* dentro do biossensor bacteriano (não produtor de HSL), que resulta na produção de um gene(s) repórter (violaceína, *luxCDABE*, *lacZ*, *gfp*) regulado por um promotor da família *LuxR*-HSL, como mostrado pelo triângulo branco. O gene da família *LuxR* está usualmente expresso a partir de um promotor constitutivo, como mostrado pelo triângulo preto. O biossensor HSL pode, então, ser utilizado em ensaios de detecção específicos para cada tipo de gene repórter utilizado. Adaptado de (Steindler e Venturi, 2007).

A capacidade de monitorar moléculas HSL *in vivo* foi determinada principalmente pela criação de biossensores de HSL que utilizam plasmídeos repórteres não tóxicos que expressam uma proteína verde fluorescente (GFP) que pode ser detectada por microscopia de epifluorescência (Steindler e Venturi, 2007). Alguns plasmídeos repórteres já foram desenvolvidos utilizando essa estratégia, como por exemplo, pJBA132, baseado no sistema *luxR* de *Vibrio fischeri* (Andersen *et al.*, 2001), pKR-C12, baseado no sistema *las* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, e pAS-C8, baseado no sistema *CepI/R* de *Burkholderia cepacia* (Riedel *et al.*, 2001). Esses três vetores contêm uma fusão traducional do gene *gfp(ASV)*, que codifica a proteína Gfpmut3\* (Andersen *et al.*, 1998). A grande vantagem desses sensores é a possibilidade de detecção de HSL em nível de uma única célula.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. VETORES, CEPAS DE BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As características do vetor e cepas bacterianas utilizados neste estudo estão relacionadas na Tabela 1. O vetor repórter pKR-C12 (Riedel *et al.*, 2001), clonado na cepa *P. putida* F117 (Steidle *et al.*, 2001), foi utilizado como célula biossensora de *N*-(3-Oxododecanoil)-*L*-homoserine lactone (OdDHL) por meio da produção de fluorescência após os ensaios antibacterianos utilizando a cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853, produtora da HSL *N*-(3-oxododecanoil) homoserina lactona (3O-C12-HSL ou OdDHL).

As cepas *P. aeruginosa* e *P. putida* foram cultivadas em meio Luria-Bertani/Luria Broth (caldo LB) (10 g/L NaCL, 10 g/L peptona, 5 g/L extrato de levedura) ou LBA (LB ágar) (12 g/L ágar) e LBM (LB modificado) (4 g/L NaCL, 10 g/L peptona, 5 g/L extrato de levedura) ou LBAM (LB ágar modificado) (12 g/L ágar) a 30°C, de acordo com o indicado. O antibiótico gentamicina foi utilizado nas seguintes concentrações: 25 µg/ml para *P. putida* e concentrações diversas para *P. aeruginosa*, de acordo com o indicado. As bactérias foram estocadas com glicerol 10% e armazenadas a -80°C (Lee, 1992), quando necessário.

**Tabela 1** – Características dos vetores e cepas bacterianas utilizadas neste estudo

Cepas bacterianas	Características	Fonte ou referência
pKR-C12	Vetor repórter pBBR1MCS-5- <i>PlasB-gfp</i> (ASV)- <i>Plac-lasR</i> sensível a OdDHL; Gm <sup>R</sup>	(Riedel <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. putida</i> F117 pKR-C12	Cepa biossensora não produtora de HSL derivada de <i>P. putida</i> IsoF, $\Delta$ <i>ppuI</i> , sensível a OdDHL	(Steidle <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. aeruginosa</i> 27853	Cepa de teste de atividade antibacteriana e produtora de HSL (OdDHL)	ATCC

A cepa *P. putida* F117 clonada com o vetor pKR-C12 foi gentilmente cedida pela Dra. Cristina Dantas Vanetti da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e a *P. aeruginosa* 27853 foi gentilmente cedida pelo Dr. Octávio Luiz Franco da Universidade Católica de Brasília (UCB).

## 3.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

### 3.2.1. Cultivo líquido

Foi utilizado o método da microdiluição em caldo para se determinar a CIM em meio LBM. O inóculo foi preparado a partir de uma suspensão a 0,5 *McFarland* (ou  $10^8$  UFC/ml), obtida de colônias isoladas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 em meio LBA. Foi realizada uma cultura para cada uma das seguintes concentrações finais de gentamicina: 25 µg/ml, 20 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml e 0,1 µg/ml. As culturas foram incubadas a 30°C por 24 horas, com agitação constante (180 RPM). No dia seguinte foi avaliada a turvação e medida a OD600nm de cada cultura para determinar a concentração mínima de gentamicina capaz de inibir o crescimento visível da bactéria. Após as análises, as culturas foram reinoculadas em LBM sem antibiótico e incubadas por 24 horas a 30°C.

### 3.2.2. Cultivo sólido em placa

Foram preparadas placas de Petri contendo 25 ml de meio LBAM cada. Após a solidificação do meio de cultura, em cada uma das placas foi realizado um furo central de cerca de 1 cm de diâmetro utilizando a base de uma ponteira P1000 estéril. Em cada furo foi adicionado meio LBAM ainda líquido contendo as diferentes concentrações de gentamicina utilizadas no cultivo líquido, até preencher todo o espaço do furo e alcançar o mesmo nível da superfície. Em cada uma das placas foram inoculadas e espalhadas homogeneamente 100 µl da suspensão de *P. aeruginosa* ATCC 27853 preparada como descrito anteriormente. As placas foram incubadas durante a noite (16-20 horas) a 30°C. No dia seguinte foi avaliada e registrada, sob luz ultravioleta, a formação de halo de inibição em cada placa e determinada a concentração inibitória mínima de gentamicina capaz de formar halo visivelmente detectável.

## 3.3. SISTEMA BIOSENSOR DE HSL

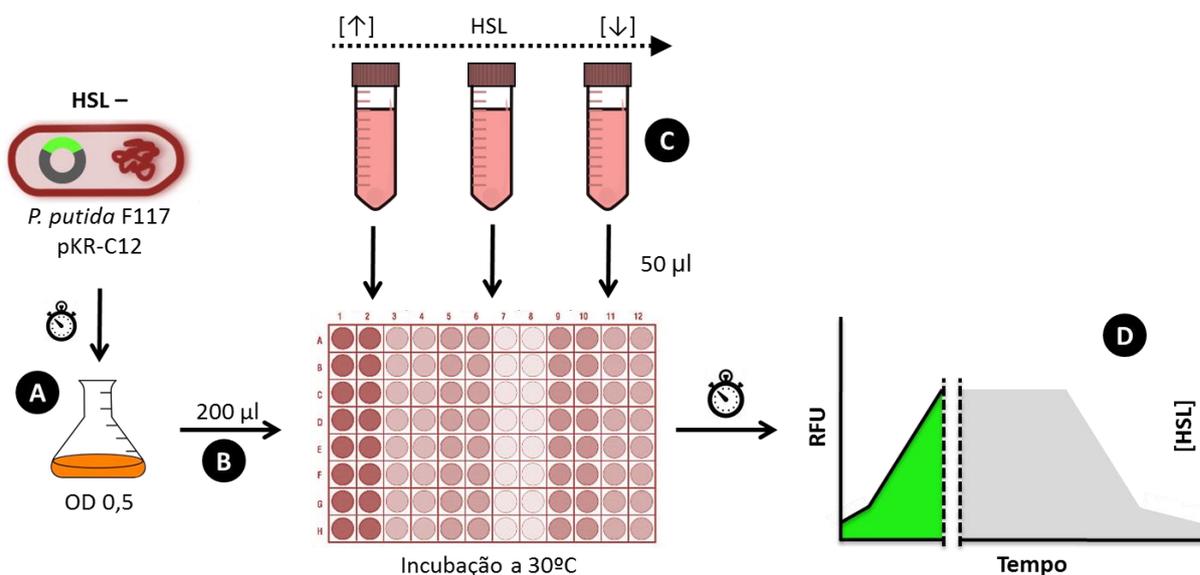
### 3.3.1. Preparo do biossensor de HSL

Para preparar a célula biossensora para o ensaio de produção padrão de fluorescência foi realizado o inóculo de *P. putida* F117 pKR-C12 em 50 ml de meio LBM suplementado com 25 µg/ml de gentamicina e posterior incubação a 30°C com agitação (180 RPM) durante

a noite (16-20 horas). No dia seguinte, 10 ml da cultura anterior foram inoculados em 100 ml de meio LBM suplementado com 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de gentamicina. Essa nova cultura foi incubada nas mesmas condições descritas até atingir uma densidade óptica de 0,5 (Figura 4A).

### 3.3.2. Curva padrão de HSL e fluorescência

Para obter a curva dose-resposta da concentração de homoserina lactona e produção de fluorescência (Figura 4), após a célula biossensora atingir a densidade óptica indicada, foram transferidos 200  $\mu\text{l}$  da cultura para os poços de uma microplaca estéril de 96 poços em poliestireno preto com fundos planos transparentes (Corning) (Figura 4B). Em cada um dos poços foram adicionados 25  $\mu\text{l}$  de LBM e 25  $\mu\text{l}$  de acetonitrila (Sigma) contendo a concentração adequada de OdDHL (Sigma) para alcançar as respectivas concentrações finais: 0,5 nM, 1 nM, 5 nM, 10nM, 50nM, 100nM, 500nM, 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  (Riedel *et al.*, 2001) (Figura 4C). Como controle de crescimento e produção de fluorescência foram utilizados 200  $\mu\text{l}$  da cultura de *P. putida* F117 pKR-C12, com o acréscimo de 25  $\mu\text{l}$  de LBM e  $\mu\text{l}$  25  $\mu\text{l}$  de acetonitrila sem adição de OdDHL. Para cada um dos ensaios foram realizadas 6 repetições.



**Figura 4** – Curva-padrão da concentração de HSL OdDHL e produção de fluorescência. A cepa biossensora *P. putida* F117 pKR-C12 foi preparada (A) e transferida para uma microplaca (B) com a adição de diferentes concentrações de HSL OdDHL (C). Durante a incubação foi realizada a leitura de fluorescência verde, representada em RFU (D).

A microplaca foi transferida para o Spectramax M3 (Molecular Devices) e incubada por 4 horas a 30°C. A fluorescência verde (FV) foi detectada e medida cineticamente utilizando um comprimento de onda de excitação de 475nm e de emissão de 515nm (Andersen *et al.*, 2001; Riedel *et al.*, 2001) com um *cutoff* de 495nm. As leituras foram realizadas pelo fundo da microplaca a cada 20 minutos, com agitação de 2 segundos após cada intervalo de leitura (Figura 4D).

### 3.4. PRODUÇÃO DE HSL EM CULTIVO

A bactéria *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como bactéria produtora de OdDHL nos ensaios de atividade antibacteriana deste estudo. Para confirmar a presença do gene que codifica a HSL *N*-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (OdDHL) no genoma da *P. aeruginosa* utilizada como modelo neste estudo, foi comparada a sequência que codifica o gene da HSL OdDHL (NCBI Gene ID: 882260 - *pvdQ*) do genoma anotado de *P. aeruginosa* PAO1 (GenBank accession number NC\_002516.2) contra o genoma sequenciado de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (GenBank: AJKG00000000.1) (Fang *et al.*, 2012).

#### 3.4.1. Preparo da célula produtora de HSL

Para preparar a célula produtora de HSL para a curva de crescimento e o ensaio antibacteriano, foi realizado o inóculo de *P. aeruginosa* 27853 em 5 ml de meio LBM e posterior incubação a 30°C com agitação (180 RPM) durante a noite (16-20 horas). No dia seguinte, a cultura foi centrifugada a 4300 RPM por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, o sedimento bacteriano foi ressuspensionado em 5 ml de meio LBM e seguiu-se com nova centrifugação de acordo como descrito. A amostra foi novamente ressuspensionada no mesmo volume de meio LBM e 500 µl foram inoculados em 50 ml de meio LBM. Essa cultura diluída foi utilizada nos experimentos seguintes (Figura 5A).

#### 3.4.2. Curva de crescimento e produção de HSL

Para obter a curva de crescimento e produção de HSL (Figura 5), foram transferidos 190 µl da cultura diluída de *P. aeruginosa*, preparada anteriormente, para os poços de uma microplaca estéril de 96 poços em poliestireno transparente com fundos planos (Corning) (Figura 5B). Em cada um dos poços foram adicionados 10 µl de água purificada (Figura 5C).

O ensaio foi realizado em triplicata e cada triplicata foi repetida 9 vezes (para posterior coleta). As amostras deste ensaio foram nomeadas como CC (curva de crescimento de *P. aeruginosa*). As amostras coletadas receberam a mesma designação acompanhada do tempo (em minutos) de incubação.

### **3.4.3. Curva de crescimento com inibição e produção de HSL**

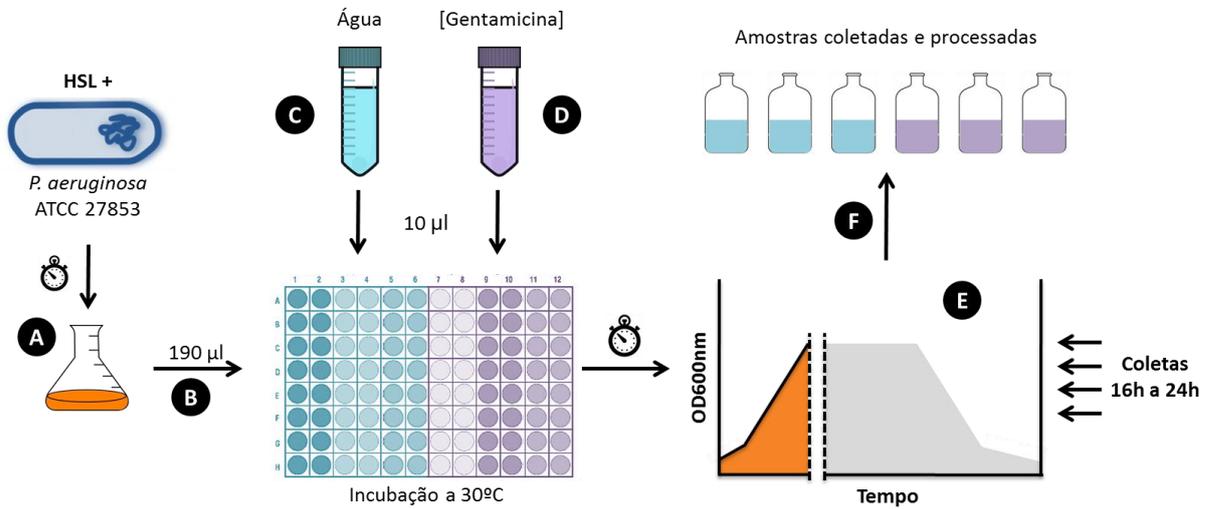
Para obter a curva de crescimento com inibição e produção de HSL (Figura 5), foram transferidos 190 µl da cultura diluída de *P. aeruginosa*, preparada anteriormente, para os poços da mesma microplaca estéril de 96 poços utilizada no ensaio anterior (Figura 5B). Em cada um dos poços foram adicionados 10 µl de água purificada contendo a concentração adequada de gentamicina para alcançar a concentração final de 0,1 µg/ml (Figura 5D). O ensaio foi realizado em triplicata e cada triplicata foi repetida 9 vezes (para posterior coleta). As amostras deste ensaio foram nomeadas como CI (curva de crescimento de *P. aeruginosa* com inibição). As amostras coletadas receberam a mesma designação acompanhada do tempo (em minutos) de incubação.

### **3.4.1. Coleta de amostras e curva de fluorescência**

A microplaca, contendo as amostras para a curva de crescimento padrão e a curva de inibição com gentamicina (CC e CI), foram transferidas para o Spectramax M3 (Molecular Devices) e incubada por 24 horas a 30°C, sem agitação. Durante todo o período de incubação, foi realizada a leitura de densidade óptica a 600nm, a cada 30 minutos (Figura 5E). Após 16h de crescimento foi realizada a coleta de 200 µl de uma triplicata CC e de uma triplicata CI. As coletas foram realizadas a cada 1h até completar o período total de incubação de 24 horas, resultando em 9 coletas para cada uma das culturas CC e CI. Imediatamente após cada coleta, cada uma das amostras foi centrifugada a 13.000 RPM por 10 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados a 4°C até o momento do uso (Figura 5F).

Para realizar o ensaio de fluorescência, 50 µl de cada uma das triplicatas dos sobrenadantes coletados foram transferidos para uma microplaca estéril de 96 poços em poliestireno preto com fundos planos transparentes (Corning). Posteriormente, em cada um dos poços foi adicionado 200 µl de uma cultura da célula biossensora *P. putida* F117 pKR-C12 preparada de acordo como descrito anteriormente (Figura 4BC).

A microplaca foi transferida para o Spectramax M3 (Molecular Devices) e incubada por 6 horas a 30°C. A fluorescência verde foi detectada e medida cineticamente assim como descrito anteriormente (Figura 4D).

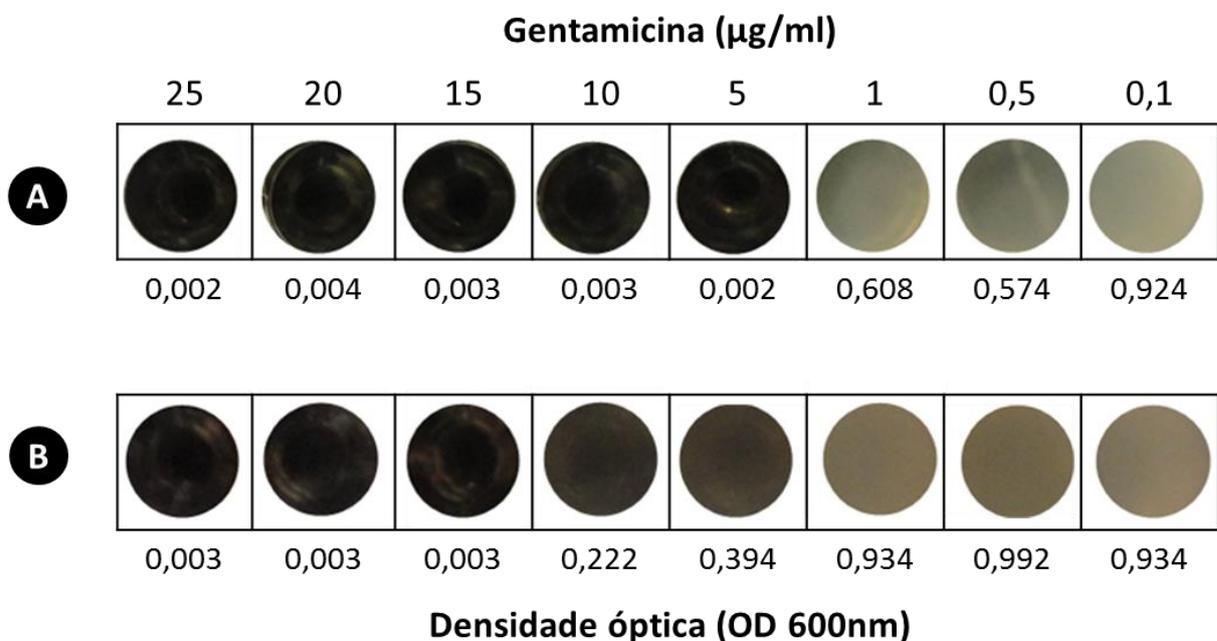


**Figura 5** – Curva de crescimento e ensaio antibacteriano para a produção de OdDHL. A cepa produtora de OdDHL, *P. aeruginosa* ATCC 27853, foi preparada (A) e transferida para uma microplaca (B) com a adição de diferentes concentrações de gentamicina (C). Para o controle foi adicionado água estéril (D). Durante a incubação foi realizada a leitura de densidade óptica a 600nm e a coleta de amostras nos intervalos de tempo indicados (E). As amostras coletadas foram processadas e os sobrenadantes foram reservados para serem utilizadas no ensaio de fluorescência (F).

#### 4. RESULTADOS

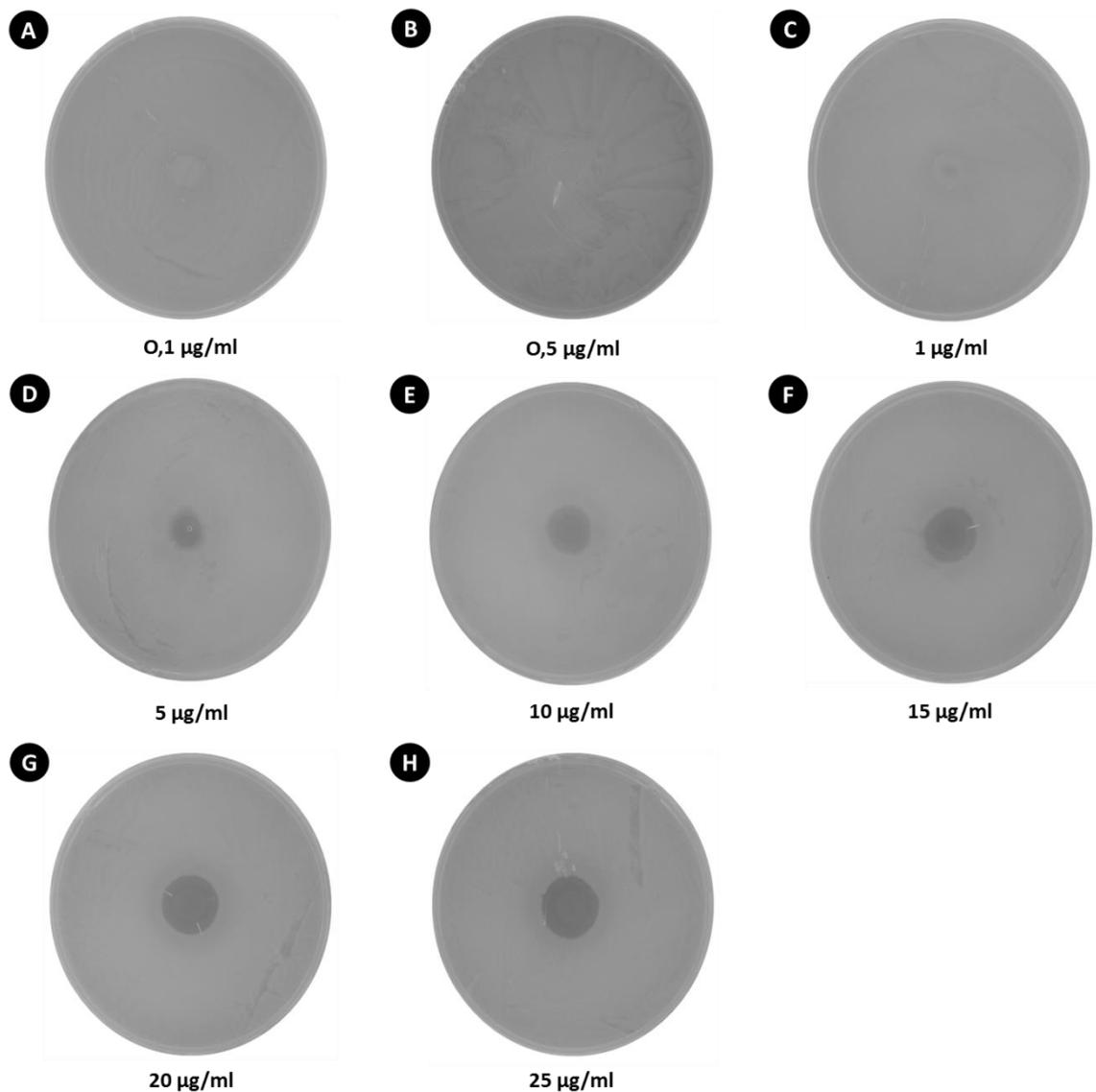
Para simular um ensaio antibacteriano e estabelecer a capacidade de um suposto antibiótico em produzir halo de inibição visível em placa ou turvação detectável em cultura, foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de gentamicina para a cepa bacteriana *P. aeruginosa* ATCC 27853. A CIM foi determinada em meio sólido (placa) e líquido (cultura) com o objetivo de se definir a menor concentração do antibiótico capaz de inibir o desenvolvimento visível do microrganismo.

No cultivo líquido foi possível observar turvação, em nível crescente, somente nas culturas de *P. aeruginosa* contendo 1 µg/ml, 0,5 µg/ml e 0,1 µg/ml de gentamicina (Figura 6A). O resultado foi comprovado por meio dos valores de OD medidos. Após o reinóculo em meio de cultura sem gentamicina e incubação por 24 horas, foi observado que as mesmas culturas apresentaram-se mais turvas e os valores de OD aumentaram. No entanto, nos reinóculos das culturas que anteriormente continham 10 µg/ml e 5 µg/ml foi observada turvação mais discreta em relação às outras culturas turvas, não sendo observada turvação das outras culturas negativas nas primeiras 24 horas de incubação (Figura 6B).



**Figura 6** – Cultivo líquido de *P. aeruginosa* ATCC 27853 com diferentes concentrações de gentamicina e visualização de níveis de turvação e densidade óptica. O cultivo foi realizado com diferentes concentrações de gentamicina (A) e depois foi realizado o recultivo das mesmas amostras em meio de cultura sem gentamicina (B).

No cultivo em placa foi observada a formação de halo de inibição nas culturas de *P. aeruginosa* contendo 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml e 25 µg/ml de gentamicina a partir do furo central da placa (Figura 7). No entanto, na placa contendo 5 µg/ml de gentamicina, considerando o diâmetro do furo central onde foi adicionado o meio de cultura com o antibiótico e descontando essa área do halo de inibição formado, observa-se que o halo de inibição somente seria facilmente visualizado nas placas contendo de 10 µg/ml a 25 µg/ml de gentamicina.



**Figura 7** – Cultivo em placa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 em diferentes concentrações de gentamicina e visualização de halos de inibição em ensaio de sobreposição. Foram realizados furos centrais e adicionado meio de cultura contendo diferentes concentrações de gentamicina para cada placa.

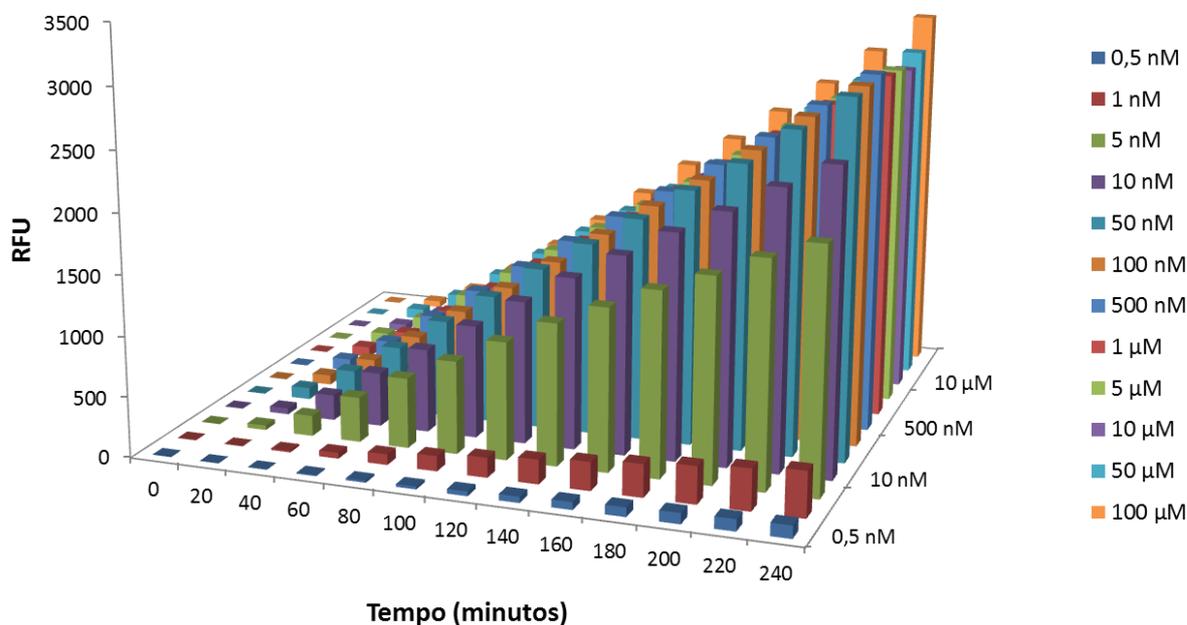
Dessa forma, avaliando os resultados do cultivo líquido e do cultivo em placa, de acordo com as condições estipuladas neste estudo, determinou-se que a concentração inibitória mínima de gentamicina para inibição visivelmente detectável de *P. aeruginosa* foi de aproximadamente 10 µg/ml. Este resultado será utilizado para comparar a sensibilidade do método tradicional de triagem de isolados, clones ou compostos com possível atividade antibacteriana (halo de inibição em placa ou inibição em cultura líquida) com o novo método proposto neste estudo.

Para estabelecer a capacidade e sensibilidade da célula biossensora *P. putida* F117, clonada com o vetor repórter pKR-C12, para produzir fluorescência verde (GFP) na presença de concentrações crescentes de OdDHL, foi definida, inicialmente, a concentração celular, por meio da OD, necessária para iniciar o ensaio de fluorescência. Desta maneira, a partir de um pré-inóculo de 10% (10 ml de cultura de *P. putida* F117 em 100 ml de LBM suplementado com 25 µg/ml de gentamicina), foi estabelecida uma concentração celular com OD de aproximadamente 0,5 (fase exponencial), com 2 horas de incubação a 30°C, com agitação.

Foi determinado o limite inferior e superior de produção de fluorescência da célula biossensora *P. putida* F117 pKR-C12, na presença de concentrações crescentes de OdDHL, no intervalo de tempo de 4 horas. Os valores de fluorescência verde foram expressos em um diagrama de barras, relacionando o tempo de incubação, a concentração da OdDHL utilizada e a respectiva fluorescência produzida, representada em RFU (unidades de fluorescência relativa) (Figura 8). Os valores de RFU para cada concentração de OdDHL, em cada intervalo de incubação e leitura, foram corrigidos subtraindo-se dos valores de RFU do ensaio controle (sem adição de OdDHL). Para a construção dos gráficos a leitura inicial de fluorescência foi considerada como zero e os valores seguintes foram calculados subtraindo-se do valor da primeira leitura.

De acordo com os gráficos da Figura 8 observa-se que a quantidade de fluorescência produzida está diretamente relacionada com a concentração de OdDHL. No entanto, não existe uma proporcionalidade entre a concentração de OdDHL e produção de fluorescência. Nos primeiros 20 minutos não existem diferenças consideráveis em relação à produção de fluorescência, mas, a partir de 40 minutos, os ensaios com concentração de OdDHL maior que 5 nM já possuem uma tendência exponencial. Ao final do período de incubação, as concentrações de 0,5 e 0,1 nM produziram menos do que 400 RFUs e as concentrações acima de 5 nM produziram acima de 2000 RFUs (5x mais fluorescência com 5x a concentração de OdDHL). Com 10 nM de OdDHL foram produzidos 2500 RFUs. As concentrações de 50 nM

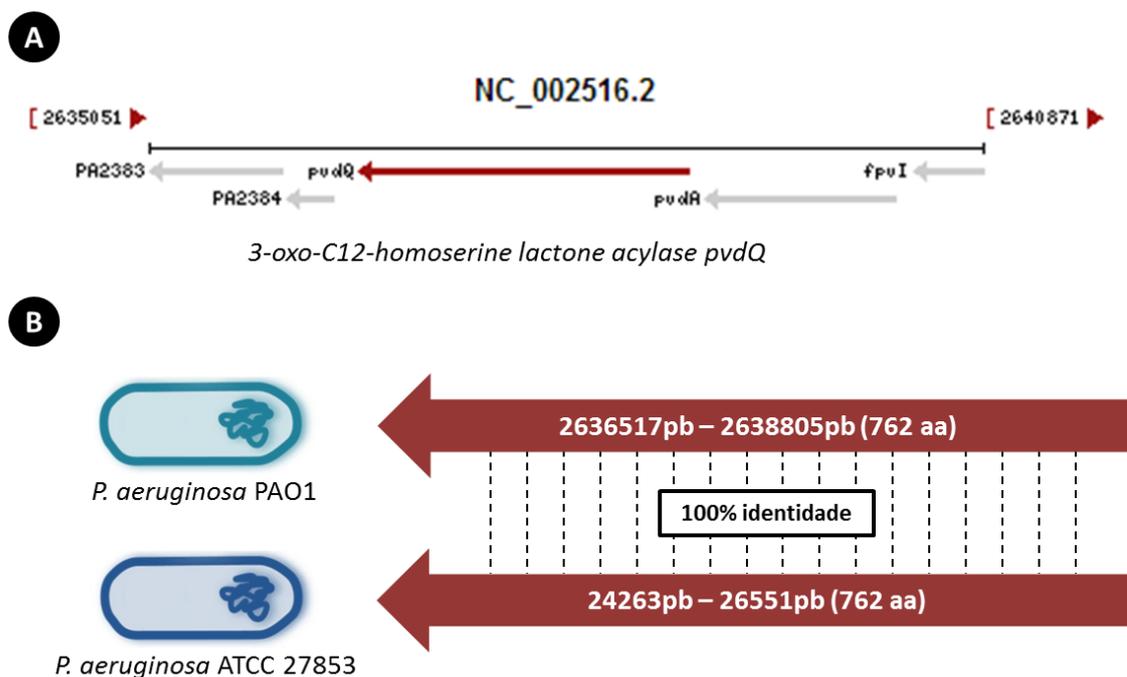
a 100  $\mu\text{M}$  de OddHL produziram de 2700 a 3000 RFUs, no entanto, de acordo com os desvios padrão, não existem diferenças significativas entre os valores de RFUs produzidos.



**Figura 8** – Curva padrão da concentração de OddDHL e produção de fluorescência. Produção de fluorescência verde, representada em RFU (unidades de fluorescência relativa), para diferentes concentrações de OddDHL, durante o período de incubação de 4 horas.

Após definir a capacidade e sensibilidade do sistema biossensor para detectar concentrações variadas de OddDHL e produzir fluorescência, foi realizada a escolha de uma cepa capaz de produzir HSL, principalmente OddDHL, em concentrações detectáveis pelo sistema biossensor, em condições de cultivo de laboratório, e que pudesse ser utilizada em ensaios antibacterianos. Desta maneira, foi escolhida a cepa comercial *P. aeruginosa* ATCC 27853. A sequência do gene que codifica a HSL *3-oxo-C12-homoserine lactone acylase pvdQ* (OddDHL), encontrada no genoma anotado de *P. aeruginosa* PAO1, também foi encontrada no genoma *P. aeruginosa* utilizada neste estudo (Figura 9).

O gene *pvdQ* responsável síntese da OddDHL de *P. aeruginosa* PAO1 possui 2288pb e produz uma proteína com 762 aminoácidos (Figura 9A). Em *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi encontrada a mesma sequência contendo os mesmos 2288pb, formando uma proteína também de 762 aminoácidos, com 100% de identidade (Figura 9B).

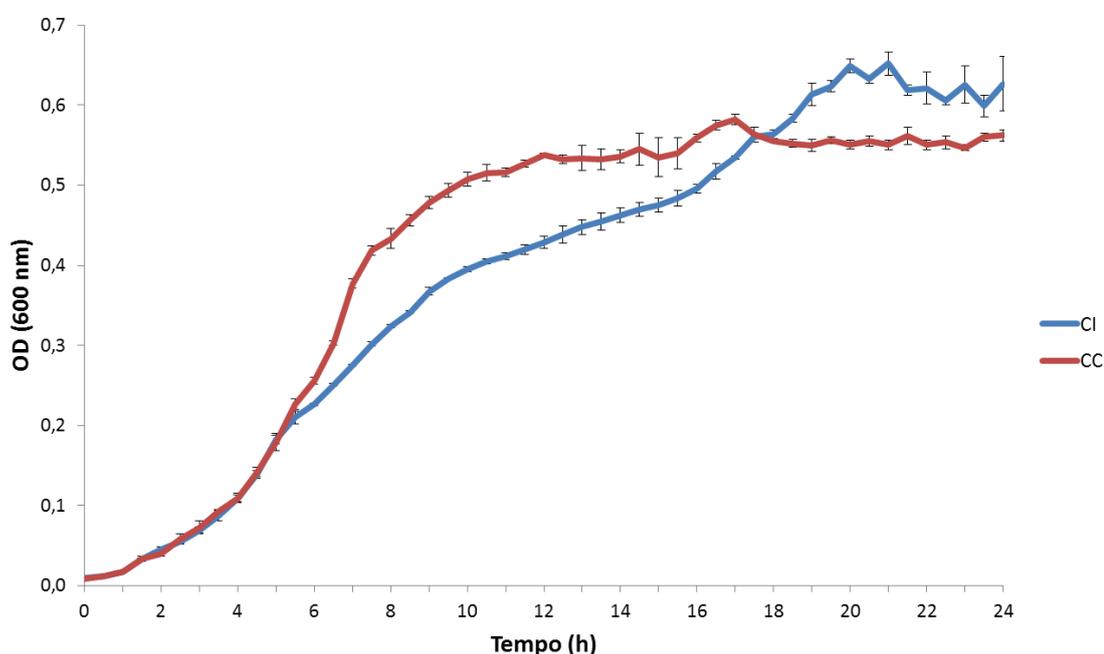


**Figura 9** – Localização do gene *pvdQ*, responsável pela síntese da HSL OdDHL, no genoma de *P. aeruginosa* PAO1 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Após determinar que a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 possuía capacidade gênica para sintetizar a OdDHL, foi realizado ensaio para verificar e estabelecer a produção de HSL em cultivo, com e sem inibição. Inicialmente, foi preparado um pré-inóculo diluído em novo meio de cultura, para evitar a introdução de possíveis OdDHL nos ensaios seguintes, devido a uma possível síntese de HSL durante a produção do pré-inóculo. Dessa forma, foram realizadas lavagens das células em meio LBM sem antibiótico.

Para obter a curva de crescimento, nas condições sem inibição (CC) e com inibição (CI), foi preparado um inóculo de *P. aeruginosa* ATCC 27853, a partir do pré-inóculo diluído, com 1% do volume do inóculo (500 µl em 50 ml de LBM sem antibiótico). Nas amostras CC não foram adicionadas nenhum antibiótico e nas amostras CI foram adicionadas concentrações variadas de gentamicina, assim como descrito anteriormente. As amostras foram incubadas conjuntamente e foram realizadas leituras de OD600nm em intervalos definidos. Foram realizadas coletas de ambas as amostras nos tempos de 16 a 24 horas, com 1h de intervalo entre as coletas. Todas as amostras coletadas foram processadas e preparadas para serem utilizadas no ensaio de fluorescência. Os valores de densidade óptica foram expressos em um diagrama de barras, relacionando o tempo de incubação e os valores de OD obtidos para cada uma das curvas CC e CI (Figura 10).

As curvas de crescimento (CC e CI) apresentaram comportamento semelhante ao longo do gráfico, com algumas alterações. Foi possível identificar as principais etapas de um típico crescimento bacteriano. Para ambas as curvas, a fase de latência ocorreu na primeira hora, seguida do início da fase exponencial. Não houve alterações significantes até as duas curvas atingirem uma OD de aproximadamente 0,2, o que ocorreu entre 5 e 6 horas. Por volta de 6 horas de incubação foi possível verificar um crescimento mais lento da cultura CI, que se manteve mais tempo em fase exponencial (das 2h às 20h, aproximadamente). A cultura CC atingiu uma OD superior a 0,5 por volta de 10 horas de incubação, enquanto que a cultura CI atingiu essa mesma OD somente após 16 horas do início do período de incubação. A cultura CC se manteve em fase exponencial por 16 horas (das 2h às 18 horas), momento no qual se iniciou a fase estacionária e o encontro com os valores de OD da cultura CI, que ainda estava em fase exponencial. A fase estacionária da cultura CI foi iniciada somente por volta de 21 horas, ou seja, cerca de 3 horas após a cultura CC. Ao final do período de 24 horas de incubação, os valores de OD da curva de crescimento com inibição (CI) foram maiores que os valores de OD da curva de crescimento sem adição de antibiótico (CC).



**Figura 10** – Curva de crescimento e curva de inibição de *P. aeruginosa* ATCC 27853. A curva de crescimento (CC) e a curva de inibição (CI), utilizando gentamicina, foram realizadas com incubação a 30°C, por 24 horas, com leitura de densidade óptica a 600nm a cada 30 minutos. As barras representam os desvios padrão das triplicatas realizadas para cada amostra representada.

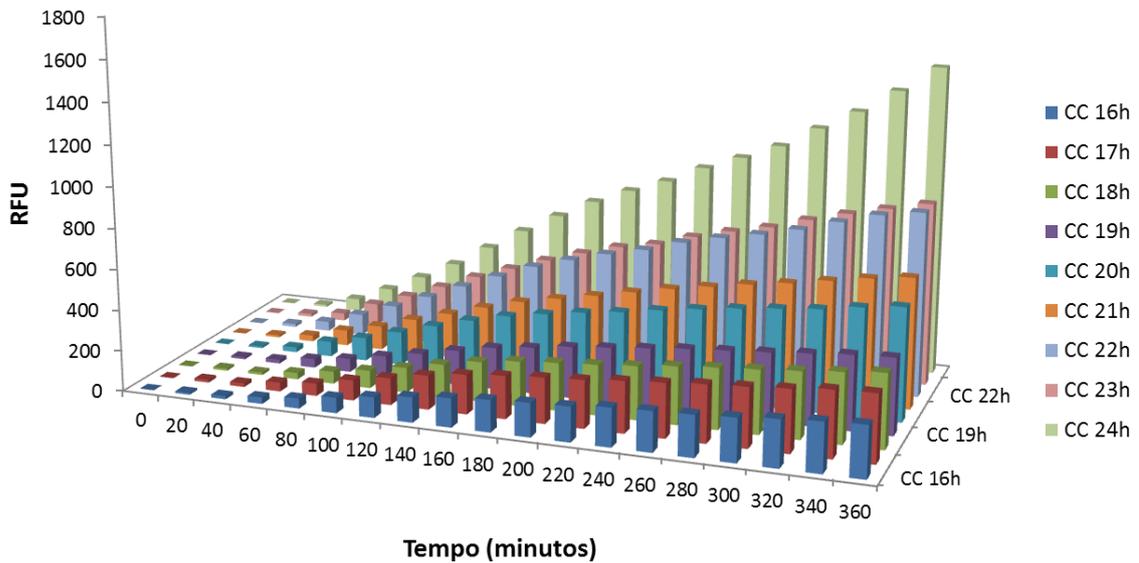
O ensaio de fluorescência com as amostras coletadas (de 16 a 24 horas) foi realizado de acordo com a curva de fluorescência padrão descrita anteriormente, mas neste caso, foram utilizados como fonte de OdDHL os sobrenadantes coletados das amostras CC e CI, nos diferentes tempos de coleta. Os valores de RFU para cada amostra coletada foram corrigidos subtraindo-se dos valores de RFU do ensaio controle. Para a construção dos gráficos a leitura inicial de fluorescência foi considerada como zero e os valores seguintes foram calculados subtraindo-se do valor da primeira leitura.

Os valores de fluorescência verde para as amostras coletadas nos ensaios CC e CI, entre 16h e 24h, foram expressos em um diagrama de barras, relacionando o tempo de incubação, a concentração da OdDHL utilizada e a respectiva fluorescência produzida, representada em RFU (unidades de fluorescência relativa) (Figura 11). Os valores de RFU também foram representados aos pares em um diagrama de barras, para comparar a produção de fluorescência em cada uma das coletas para os ensaios CC e CI (Figura 12).

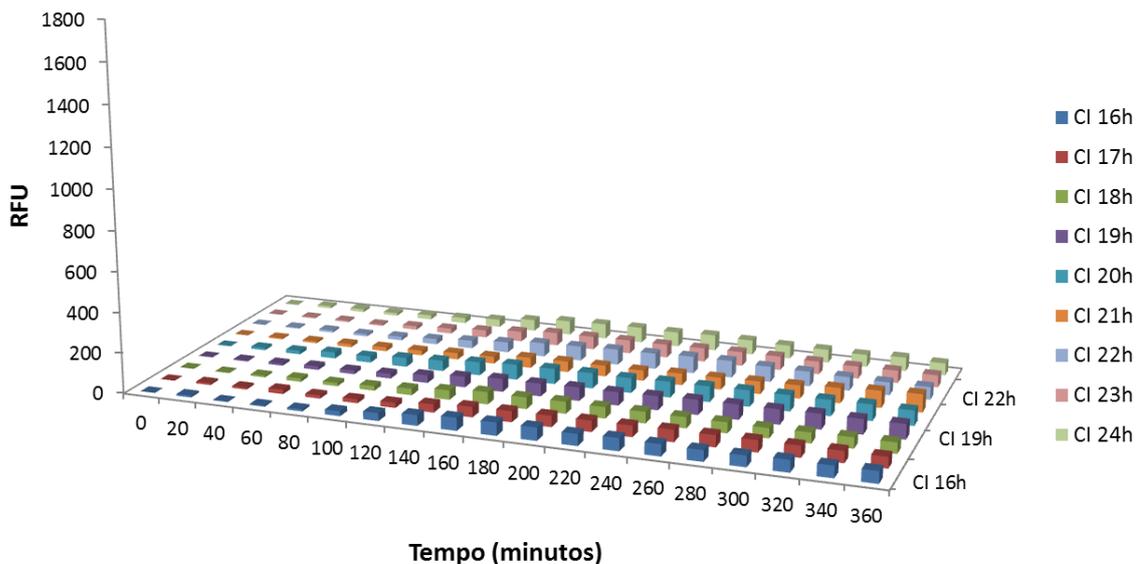
De acordo com o gráfico da Figura 11, que demonstra os valores de RFU produzidos para as amostras de sobrenadantes coletadas entre 16 e 24 horas da cultura sem inibição (CC), observa-se que a quantidade de fluorescência produzida está diretamente relacionada com o tempo de incubação das amostras. Ainda, no decorrer do ensaio de fluorescência, é possível verificar o aumento da produção de RFU para cada um dos tempos das amostras coletadas. Nos primeiros 20 minutos todas as amostras produziram em média 10 RFUs. Ao final do período de incubação do ensaio de fluorescência, a amostra CC16h produziu menos de 300 RFUs, enquanto que as amostras CC17h, CC18h e CC19 produziram aproximadamente 350 RFUs. As amostras CC20h e CC21h produziram entre 550 e 650 RFUs. As amostras CC22h e CC23h produziram praticamente de fluorescência, quase 900 RFUs. A amostra de sobrenadante coletada com mais tempo de incubação, 24 horas, foi a que gerou a maior produção de fluorescência, ultrapassando 1500 RFUs.

Os valores de fluorescência das amostras coletadas entre 16 e 24 horas das culturas com inibição (CI) estão relacionados no gráfico da Figura 12. Diferentemente das amostras que foram incubadas sem inibição, os sobrenadantes das culturas em questão não apresentaram uma produção de fluorescência diretamente relacionada com o tempo de incubação para cada amostra coletada. Todas as amostras produziram uma quantidade mínima de fluorescência nos primeiros 20 minutos de ensaio, mas não de forma homogênea de acordo com o tempo de coleta de cada um dos sobrenadantes, como observado para os sobrenadantes das culturas incubadas sem inibição. Ao final do período de incubação do ensaio, nenhuma amostra produziu mais de 100 RFUs. As amostras CI16h, CI17h e CI18h produziram

aproximadamente 55 RFUs e as amostras CI22h, CI23h e CI24h produziram cerca de 60 RFUs. As amostras que mais produziram fluorescência ao final do ensaio foram as CI20h e CI21h, com um total de cerca de 75 RFUs e 90 RFUs, respectivamente.

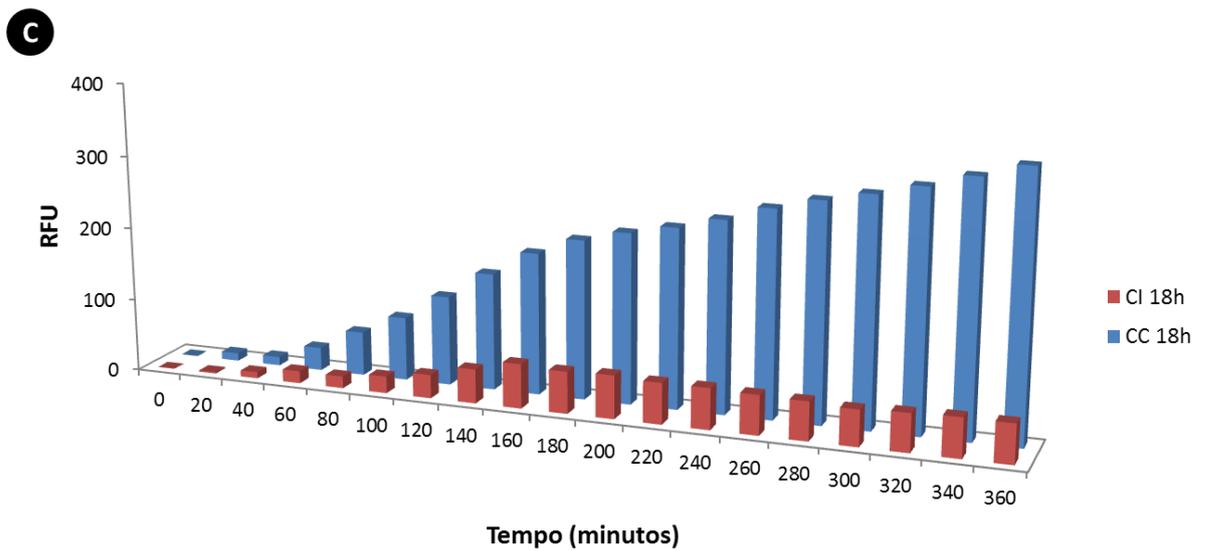
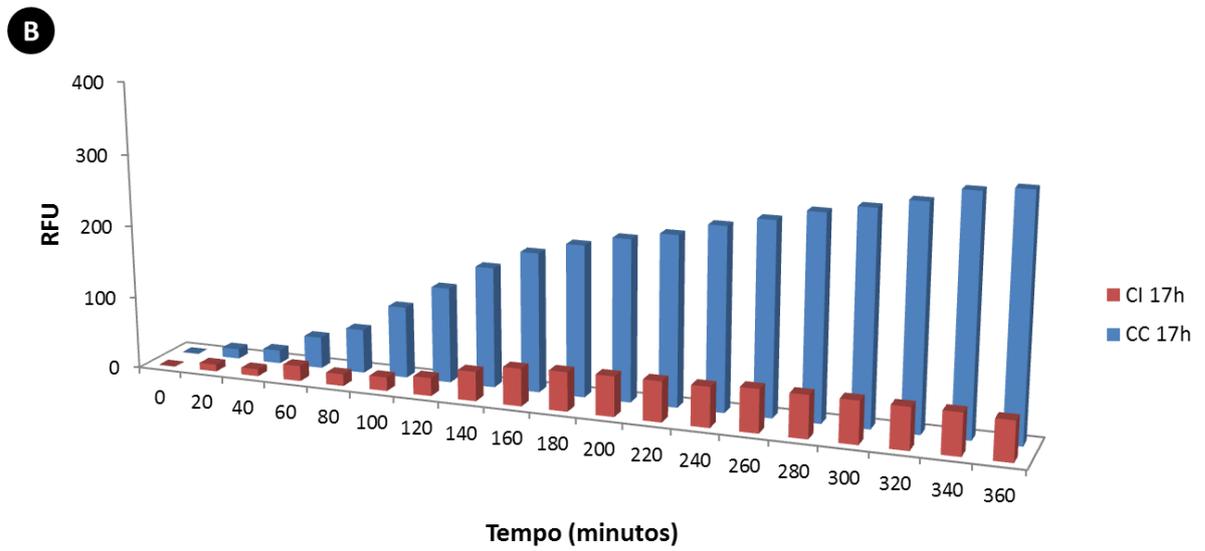
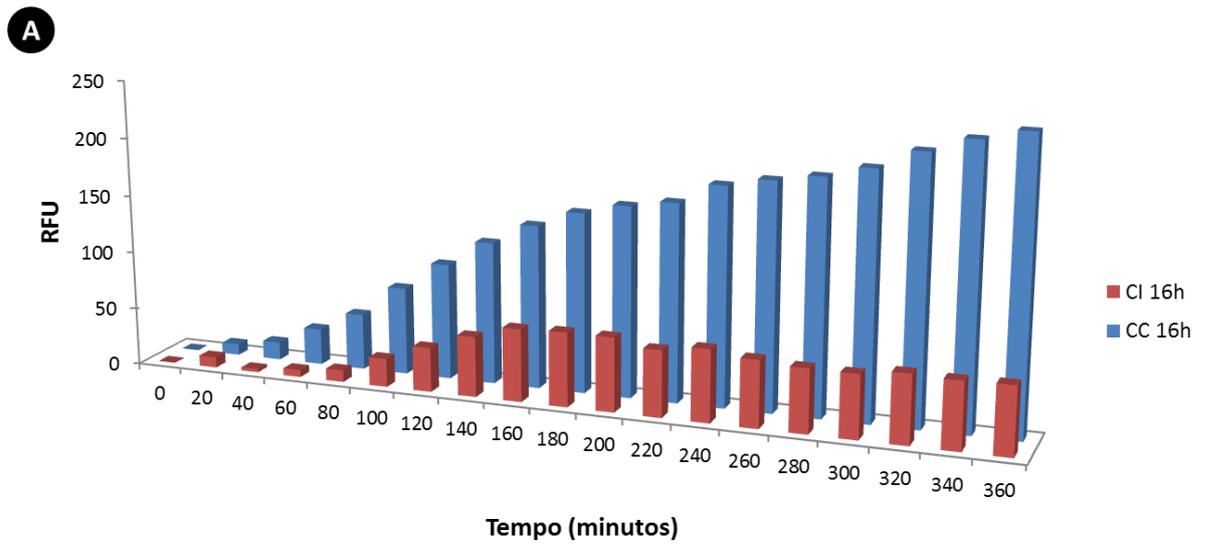


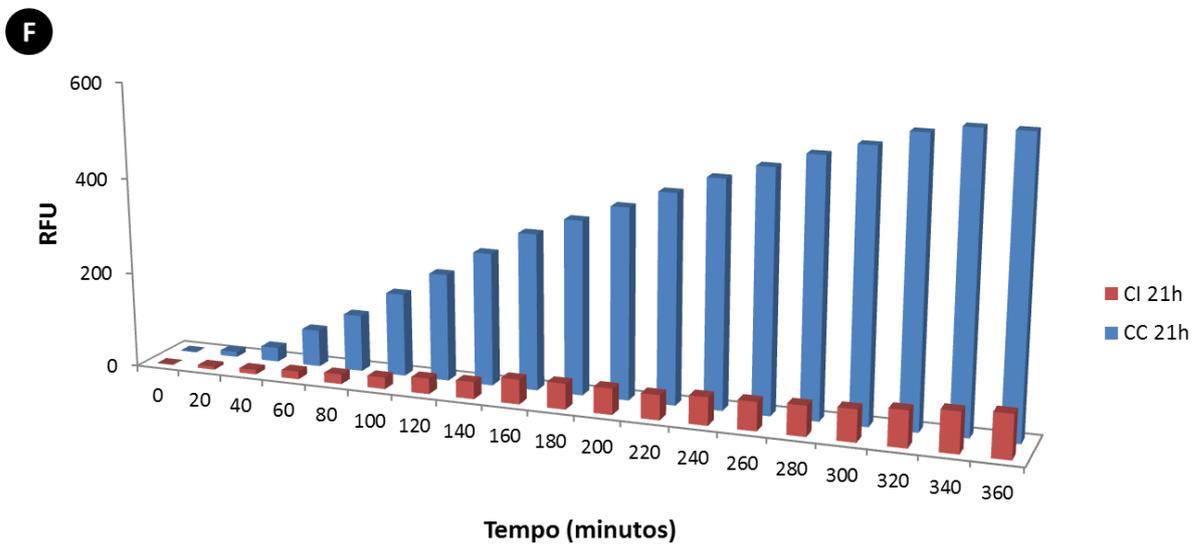
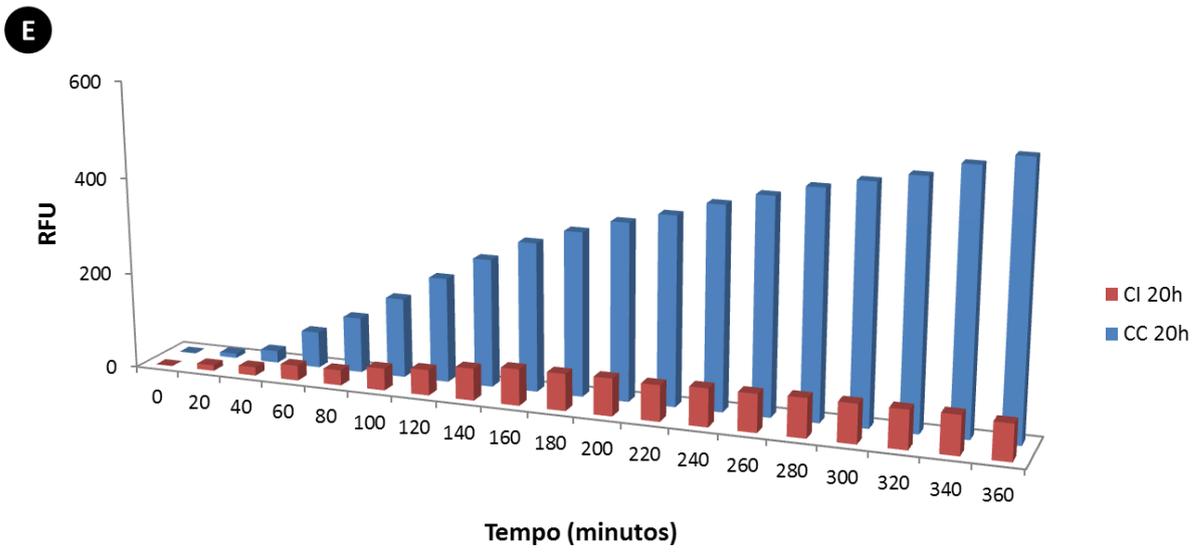
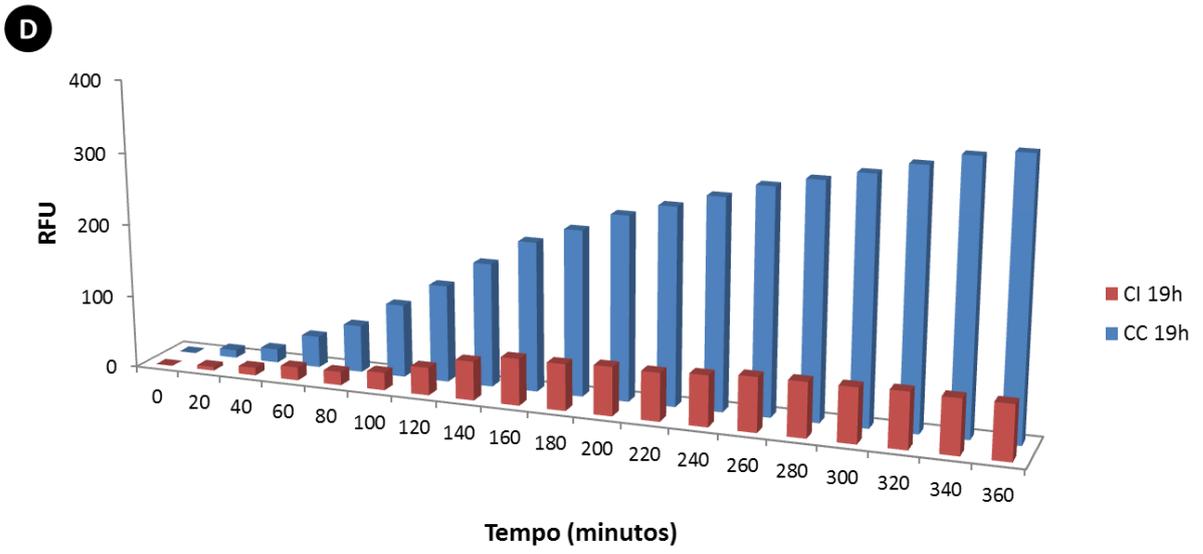
**Figura 11** – Curva de produção de fluorescência a partir dos sobrenadantes coletados da curva de crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853, entre 16 e 24 horas. Valores de fluorescência representados em RFU para cada amostra no período de 6 horas.

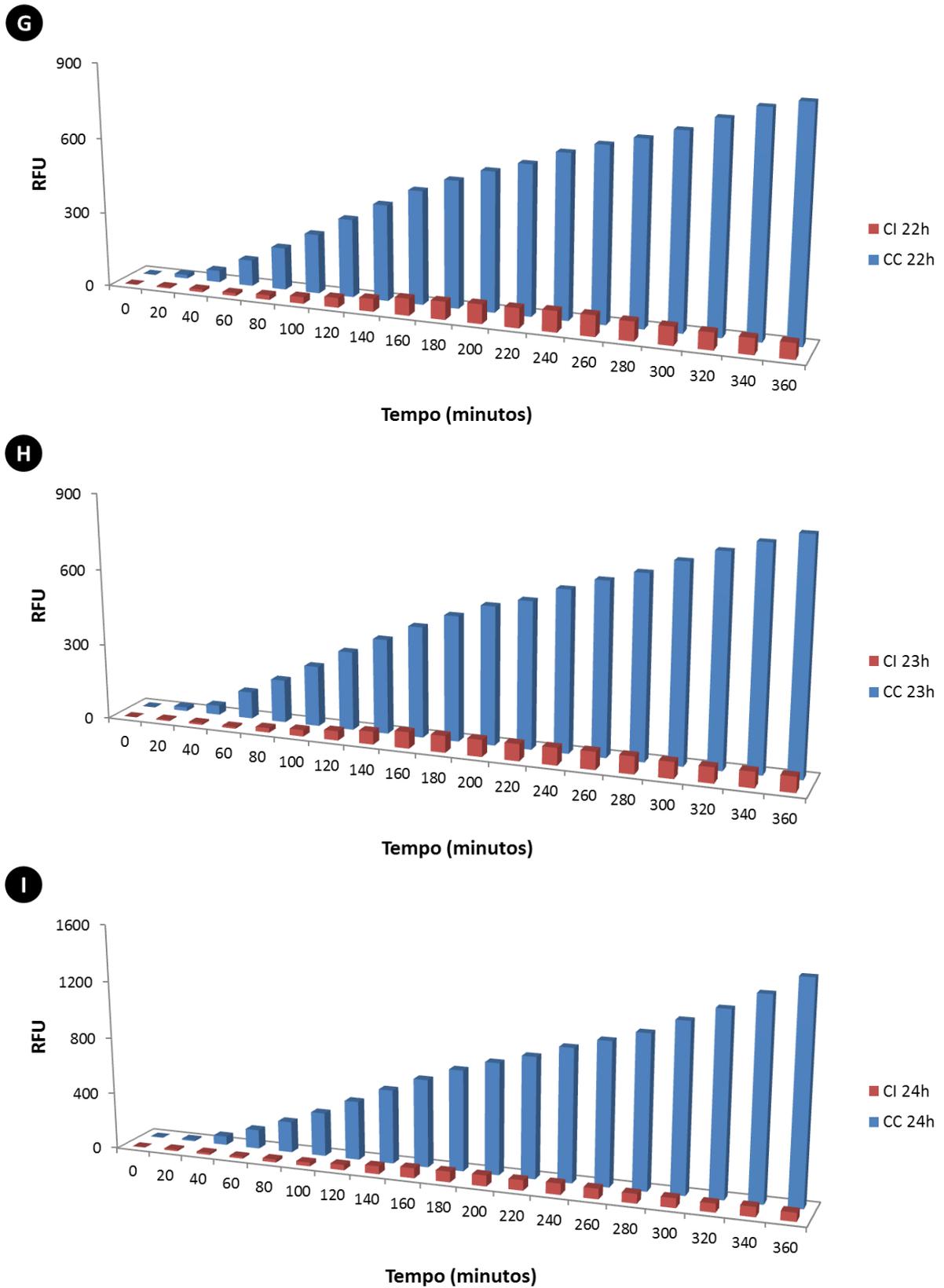


**Figura 12** – Curva de produção de fluorescência a partir dos sobrenadantes coletados da curva de inibição de *P. aeruginosa* ATCC 27853, entre 16 e 24 horas. Valores de fluorescência representados em RFU para cada amostra no período de 6 horas.

Os gráficos da Figura 12 demonstram a comparação entre os níveis de produção de fluorescência a partir dos sobrenadantes coletados nas duas condições de cultivo, com e sem inibição, para cada um dos tempos de incubação, entre 16h e 24 horas. É possível verificar em todos os gráficos que nos primeiros 20 minutos não houve diferenças significativas na quantidade de produção de fluorescência para ambas as amostras (CC e CI). No entanto, a partir de 40 minutos já é possível observar um aumento mais expressivo do nível de fluorescência das amostras CC, que é verificado até o final do ensaio. Comparativamente, ao final do ensaio de fluorescência, o menor valor de RFUs produzidos pelos sobrenadantes das culturas CC foram pelo menos 5x maiores que os menores valores produzidos pelos sobrenadantes das culturas CI. Ainda, o maior nível de produção de fluorescência das amostras CC foram pelo menos 16x maiores que os maiores níveis de produção de fluorescência das amostras CI.







**Figura 13** – Curva de fluorescência comparativa a partir das amostras coletadas da curva de crescimento (CC) e curva de inibição (CI) de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Valores de fluorescência representados em RFU para cada amostra no período de 6 horas.

## 5. DISCUSSÃO

A metagenômica funcional é uma ferramenta utilizada para expressão heteróloga de genes de diversas comunidades microbianas. Atualmente é um campo emergente na área de biotecnologia. Nos últimos anos, a possibilidade de descoberta de novos compostos utilizando a metagenômica tem-se desenvolvido rapidamente. Assim, a metagenômica é considerada uma estratégia promissora para a busca de recursos para a indústria biotecnológica e farmacêutica. No entanto, apesar do trabalho inovador no campo da genômica funcional, nos últimos anos, a produção de estudos de metagenômicas funcionais não gerou quantidades significativas de novos produtos. Assim, um novo conjunto de estratégias é necessário para a expressão gênica e identificação dos produtos em comparação às estratégias tradicionais. Estas novas estratégias devem se basear não somente na produção das bibliotecas metagenômicas ou expressão heteróloga dos genes clonados, mas também nas metodologias utilizadas para a detecção, identificação e isolamento dos clones positivos para as atividades de interesse.

A maior parte das triagens de bibliotecas metagenômicas para o isolamento de genes que codificam para novas biomoléculas é baseada nas atividades metabólicas dos clones. Desta forma, a triagem funcional é a única estratégia, até o momento, que tem o potencial para identificar inteiramente novas classes de genes para funções conhecidas ou novas funções. É a capacidade para detectar, isolar e caracterizar os genes expressos em uma biblioteca metagenômica que determina o sucesso de qualquer avaliação baseada em metagenômica funcional.

Inúmeros métodos de triagens funcionais foram desenvolvidos para as mais diversas classes de moléculas (Simon e Daniel, 2009; Ekkers *et al.*, 2011), em especial para genes catabólicos. No entanto, os métodos utilizados para a triagem de genes com atividade antimicrobiana, ainda são escassos e baseados em técnicas com pouca sensibilidade. Neste caso, os testes são baseados em características fenotípicas específicas. Esse método visual de triagem fenotípica é relativamente simples, porém, bastante trabalhoso.

Este método funciona através da triagem de clones positivos que exibem uma característica que é diretamente observável. Podem ser citados como exemplos dessas características observáveis a pigmentação de colônias, morfologia irregular de colônias ou formação de halos em ensaios antimicrobianos utilizando sobreposição. Uma desvantagem desse método é a sua relativamente baixa resolução e sensibilidade. Por exemplo, se a

expressão é baixa em um determinado clone positivo, uma característica fenotípica pode não ser imediatamente detectável, resultando em falsos-negativos. Em um estudo recente (Craig *et al.*, 2010), foram construídas bibliotecas metagenômicas em diversos hospedeiros e os mesmos foram avaliados com base nas características fenotípicas mencionadas anteriormente. Essas características foram escolhidas porque são comumente associadas à produção de moléculas com atividade antimicrobiana. Apesar da realização da triagem em grande desempenho, utilizando diversos hospedeiros (o que aumenta a possibilidade de expressão do gene, pois utiliza maquinarias de expressão e processamento diversas), muitos estudos, que utilizam dessa abordagem, não estão conseguindo resultados favoráveis para a detecção, identificação e caracterização de novos genes com atividade antimicrobiana.

Dessa forma, o estudo em questão abordou o desenvolvimento de uma nova sistemática para melhorar e otimizar a detecção e identificação de clones metagenômicos que tenham a capacidade de expressar genes com atividade antibacteriana, mesmo em condições de subexpressão, aumentando dessa forma a sensibilidade e resolução dos ensaios de triagem utilizados para este fim.

Para desenvolver um sistema de triagem para genes com atividade antibacteriana, baseado nessas características, foi elaborada uma metodologia capaz de identificar um composto que estivesse intimamente relacionado ao crescimento populacional da bactéria utilizada no ensaio antibacteriano e que o mesmo fosse detectado e quantificado de forma sensível, rápida e não laboriosa. Assim, foi utilizada a capacidade de determinadas bactérias de produzir e secretar moléculas homoserina lactonas (HSL) quando a população bacteriana atinge certo limiar. No entanto, era necessário que essa bactéria produtora de HSL também fosse algum organismo padrão para ser utilizado em ensaios antibacterianos.

A maioria dos estudos baseados na produção de moléculas HSL utiliza a bactéria *P. aeruginosa* PAO1 como organismo modelo (Brint e Ohman, 1995; Shaw *et al.*, 1997; Cha *et al.*, 1998; Andersen *et al.*, 2001; Brelles-Marino e Bedmar, 2001; Riedel *et al.*, 2001; Steidle *et al.*, 2001; Williamson *et al.*, 2005; Steindler e Venturi, 2007; Bijtenhoorn *et al.*, 2011; Saeidi *et al.*, 2011). No entanto, este organismo não está disponível de forma comercial para fácil aquisição. Deste modo, foi escolhida para este estudo a cepa comercial *P. aeruginosa* ATCC 27853, que também possuía a capacidade gênica e funcional para produzir moléculas HSL (Figura 9) e é usualmente utilizada como organismo teste em ensaios antibacterianos ou de resistência.

Antes de determinar a capacidade de produção de HSL da bactéria *P. aeruginosa* ATCC 27853, foi necessário escolher um sistema para detectar e identificar a produção de

HSL de forma sensível e relativamente fácil. Desta maneira, foi escolhido um biossensor bacteriano capaz de identificar e responder a presença de concentrações mínimas de HSL, a cepa *P. putida* F117 clonada com o vetor repórter pKR-C12, produtor de GFP na presença de HSL. A detecção de AHL em diversos organismos é frequentemente realizada através da utilização de plasmídeos que contém promotores sensores de HSL fusionados aos genes repórter *gfp* ou *lacZ* (Shaw *et al.*, 1997; Andersen *et al.*, 2001).

O plasmídeo sensor pKR-C12 contém uma fusão traducional do gene *lasB* de *Pseudomonas aeruginosa* (Riedel *et al.*, 2001) com o gene *gfp*(ASV), que codifica a proteína Gfpmut3\* (Andersen *et al.*, 1998). Esta forma mutante da proteína GFP emite fluorescência numa intensidade 21 vezes maior e é degradada mais rapidamente que a do tipo selvagem, o que confere vantagens em ensaios de detecção. Este plasmídeo contém o gene *lasR*, que codifica a proteína receptora de 3-O-C12-HSL (OdDHL), sob controle do promotor *lac*. Este sistema sensor é mais sensível a 3-O-C12-HSL e, com menor sensibilidade a HSLs de cadeia longa (3-O-C10-HSL, C10-HSL e C12-HSL).

Apesar de este plasmídeo sensor responder com variado grau de sensibilidade a mais de uma molécula de HSL (Riedel *et al.*, 2001; Steidle *et al.*, 2001), estudos comprovam que a produção na presença de OdDHL é muito superior em relação às outras HSLs. Riedel e colaboradores (2001) ao testarem a sensibilidade de pKR-C12 a diferentes moléculas de HSLs, em cepas HSLs negativas de *P.aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*, mostraram que o perfil na emissão da fluorescência é estirpe dependente. Em *B. cepacia* H111-I, pKR-C12 exibiu menor sensibilidade por 3-OH-C12-HSL que em *P. aeruginosa* PAO1-JP2. Quando testada com C12-HSL a estirpe H111-I foi sensível, enquanto PAO1-JP2 foi insensível, mesmo em altas concentrações desta AHL. Além disso, alguns microrganismos podem produzir sinais que não são detectáveis pelo sensor ou podem produzir moléculas em concentrações abaixo dos níveis de detecção do sensor (Shaw *et al.*, 1997). A modulação da produção de HSL por outros circuitos regulatórios e também pelo meio e condições de cultivo da bactéria, podem influenciar na quantidade de moléculas produzidas necessárias para a detecção pelo sensor (Pearson *et al.*, 1994; Shaw *et al.*, 1997).

Entre muitas bactérias gram-negativas que utilizam sistemas de sensoriamento populacional modulados por HSLs, como *P. aeruginosa*, é comum a produção de múltiplas moléculas de HSLs (Winson *et al.*, 1995; Rosemeyer *et al.*, 1998). O tipo de moléculas de HSLs produzidas por uma determinada espécie pode ser estirpe dependente, por refletir os diferentes ambientes que as estirpes individuais colonizam (Eberl, 1999).

Para determinar a capacidade de detecção e produção de fluorescência do biossensor *P. putida F117* pKR-C12, foi realizado ensaio de produção de fluorescência utilizando concentrações variadas de OdDHL. De acordo com os resultados (Figura 8), a menor concentração utilizada de OdDHL (0,1 nM) já é capaz de produzir fluorescência em níveis detectáveis, com apenas 20 minutos de ensaio. Concentrações a partir de 5 nM já são suficientes para produzir grandes quantidades de GFP (acima de 2000 RFUs). Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Riedel e colaboradores (2001), desenvolvedores do plasmídeo repórter pKR-C12 (Riedel *et al.*, 2001).

Após definida a sensibilidade do sistema biossensor de HSL era necessário determinar se a produção extracelular de OdDHL por *P. aeruginosa* ATCC 27853 seria capaz de ativar precocemente o plasmídeo repórter para a produção detectável de fluorescência. Dessa forma, foi realizada uma curva de crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 com coletas de amostras a partir do final da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento (Figuras 5 e 10). Essas amostras temporais foram utilizadas como fonte de HSL para a produção de GFP no ensaio de fluorescência (Figura 4ABD).

De acordo com os dados da Figura 11, que relaciona a produção de fluorescência para as amostras coletadas entre 16h e 24h da curva de crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853, é possível verificar que a amostra CC16h, que quando coletada apresentava uma OD600nm entre 0,5 e 0,6, ou seja, no final da fase exponencial, produziu cerca de 10 RFUs nos primeiros 20 minutos do ensaio de fluorescência e pouco menos de 300 RFUs ao final do experimento, demonstrando que é possível com pouco tempo de incubação, produzir quantidade suficiente de OdDHL capaz de ser detectada pelo sistema biossensor utilizado neste estudo. Avaliando a produção final de fluorescência das amostras CC16h a CC19h (Figura 11), é possível constatar que a *P. aeruginosa* utilizada produziu de 0,1 a 0,5 nM de OdDHL, quando este resultado é comparado ao gráfico padrão de fluorescência (Figura 8). Ainda, constata-se, que no período de 24h de incubação, a *P. aeruginosa* ATCC 27853 é capaz de secretar OdDHL capaz de produzir pouco mais de 1500 RFUs, o que representa até 5 nM de OdDHL. Esses resultados são muito inferiores quando comparados com os dados de estudos anteriores que determinaram a concentração extracelular estimada de OdDHL produzida por biofilmes de *P. aeruginosa* nas proximidades dos sítios de infecção, entre 1  $\mu$ M a 100  $\mu$ M (Pearson *et al.*, 1995; Charlton *et al.*, 2000). Ou seja, as características de cultivo utilizadas neste estudo proporcionaram condições para a produção de níveis inferiores de OdDHL que viabilizam a sensibilidade do biossensor bacteriano de HSL.

A produção de moléculas sinalizadoras HSLs é um processo estritamente dependente dos parâmetros de crescimento, como fontes de carbono e temperatura (Pearson *et al.*, 1994; Shaw *et al.*, 1997; Cha *et al.*, 1998). Assim, o estágio de crescimento bacteriano e a composição do meio de cultivo exercem grande influência no nível de moléculas sinalizadoras de quorum produzidas (Brelles-Marino e Bedmar, 2001).

Muitos autores têm utilizado meios mínimos para a produção de moléculas sinalizadoras de percepção de quorum em bactérias, com a extração dessas moléculas no final da fase exponencial de crescimento ou no início da fase estacionária (Pearson *et al.*, 1994; Shaw *et al.*, 1997; Cha *et al.*, 1998). Eberhard (1972) detectou a presença de um inibidor da sinalização celular quando realizado o crescimento de *V. fischeri* em meio complexo, e a ausência desse inibidor quando em meio mínimo, sugerindo que o fenômeno da autoindução ocorreria somente em meio mínimo (Eberhard, 1972). Pearson e colaboradores (1994) observaram que a concentração de moléculas sinalizadoras foi muito maior na metade da fase logarítmica de crescimento de *P. aeruginosa* quando comparada à fase estacionária (Pearson *et al.*, 1994). Contrariamente, Lithgow e colaboradores (2000) detectaram concentrações maiores de moléculas sinalizadoras produzidas por *Rhizobium leguminosarum* em meio complexo, durante a fase estacionária (Lithgow *et al.*, 2000). As razões para essas diferenças nos estágios de crescimento ainda são desconhecidas.

Esses resultados têm demonstrado que a privação nutricional e a densidade populacional são monitoradas pelas células e determinam o momento de início da fase estacionária. Em outro estudo, utilizando meio mínimo, foi demonstrado que a produção de HSL em *P. aeruginosa* é detectada no final da fase exponencial, e que a concentração desse autoindutor é muito maior na fase logarítma de crescimento do que na fase estacionária (Pearson *et al.*, 1994). De acordo com a metodologia de cultivo empregada neste estudo para a produção de HSL (Figura 5), foi constatado que, em meio complexo (LBM), *P. aeruginosa* ATCC 27853 também é capaz de produzir HSL detectável no final da fase exponencial, no entanto, a produção é muito maior durante a fase estacionária de crescimento. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que, em meio mínimo, a taxa de crescimento bacteriano é mais lenta e os nutrientes disponíveis são esgotados rapidamente, provocando uma maior taxa de morte celular durante a fase estacionária, o que acarreta em menor concentração de células para produzir moléculas HSL nessa fase. Em contrapartida, utilizando meio complexo, como o LBM, a disponibilidade de nutrientes é maior, o que favorece a uma maior taxa de crescimento, ocasionando uma maior concentração de células ativas, produzindo maiores

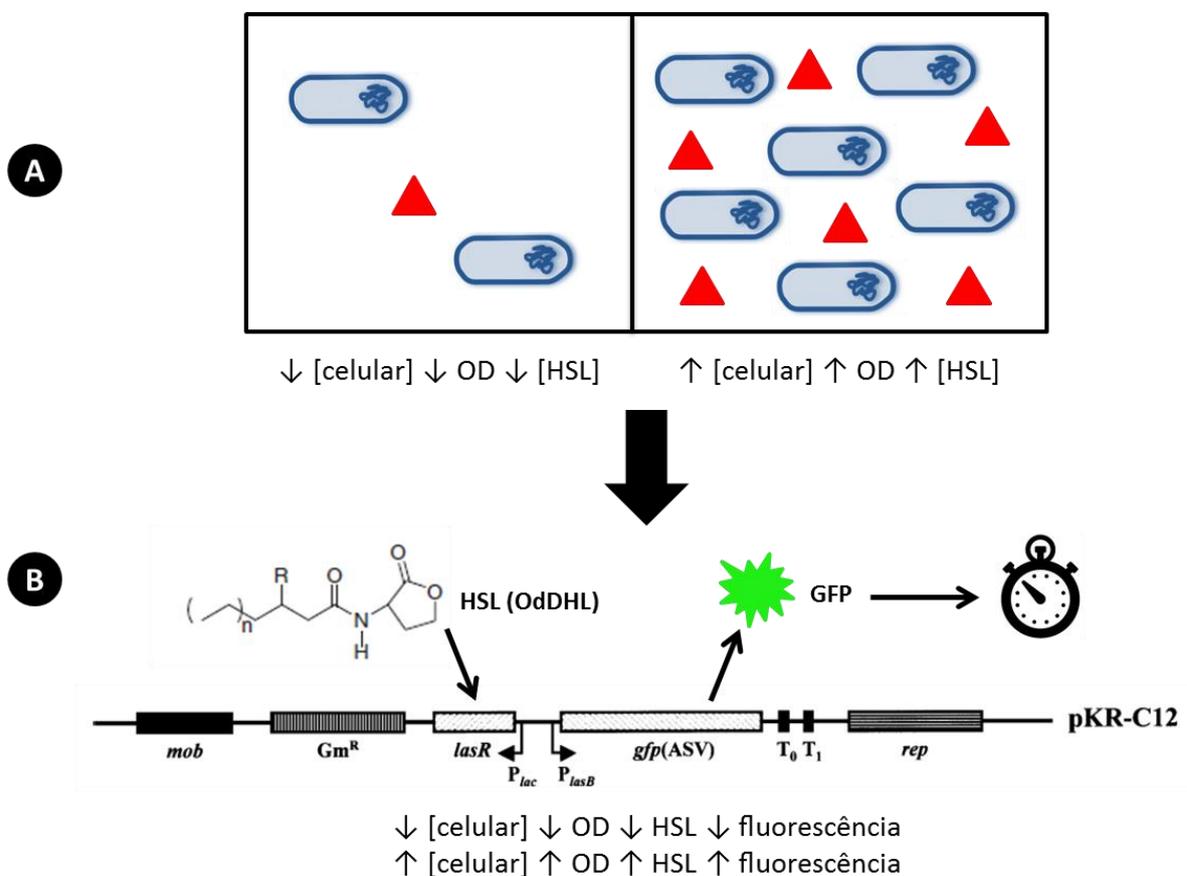
quantidades de autoindutores HSL durante a fase estacionária em relação à fase exponencial, que ocasionalmente ainda possui nutrientes em abundância.

Relacionando os níveis de produção de fluorescência gerados a partir das amostras da curva de inibição de *P. aeruginosa* (Figura 12) com os níveis de produção da curva de crescimento sem inibição (Figura 11) é possível constatar que as condições de cultivo, na presença de um antibiótico, podem alterar significativamente a produção de HSLs. Sem relacionar os mecanismos de controle de quorum sensing e todas as outras moléculas envolvidas, pode-se inferir que o deslocamento para a esquerda da curva de crescimento, ocasionada pela presença de gentamicina (Figura 10), na curva de inibição (CI), foi capaz de alterar os níveis de produção de HSL que, conseqüentemente, produziu quantidades extremamente inferiores de fluorescência em relação às amostras que não tiveram o seu crescimento inibido por esse antibiótico (Figura 13).

Em geral, compostos utilizados como antibióticos, tem sua capacidade bactericida ou bacteriostática relacionada à concentração de uso. De acordo com o ensaio líquido de inibição (Figura 6), pode-se observar que a concentração de gentamicina utilizada neste estudo produziu um efeito bactericida somente em 15 µg/ml, comprovado após o reinóculo em meio de cultura sem antibiótico (Figura 6B). O efeito bacteriostático (que tem relação com a concentração inibitória mínima) foi demonstrado, em meio líquido, com 1 µg/ml de gentamicina. No ensaio em placa, para a visualização de halo de inibição (Figura 7), foi possível verificar que as amostras contendo de 0,1 a 1 µg/ml não favoreceram a formação de nenhum halo de inibição. No entanto, desconsiderando o furo central da placa, só é possível detectar visualmente o halo de inibição nas culturas contendo pelo menos 10 µg/ml de gentamicina.

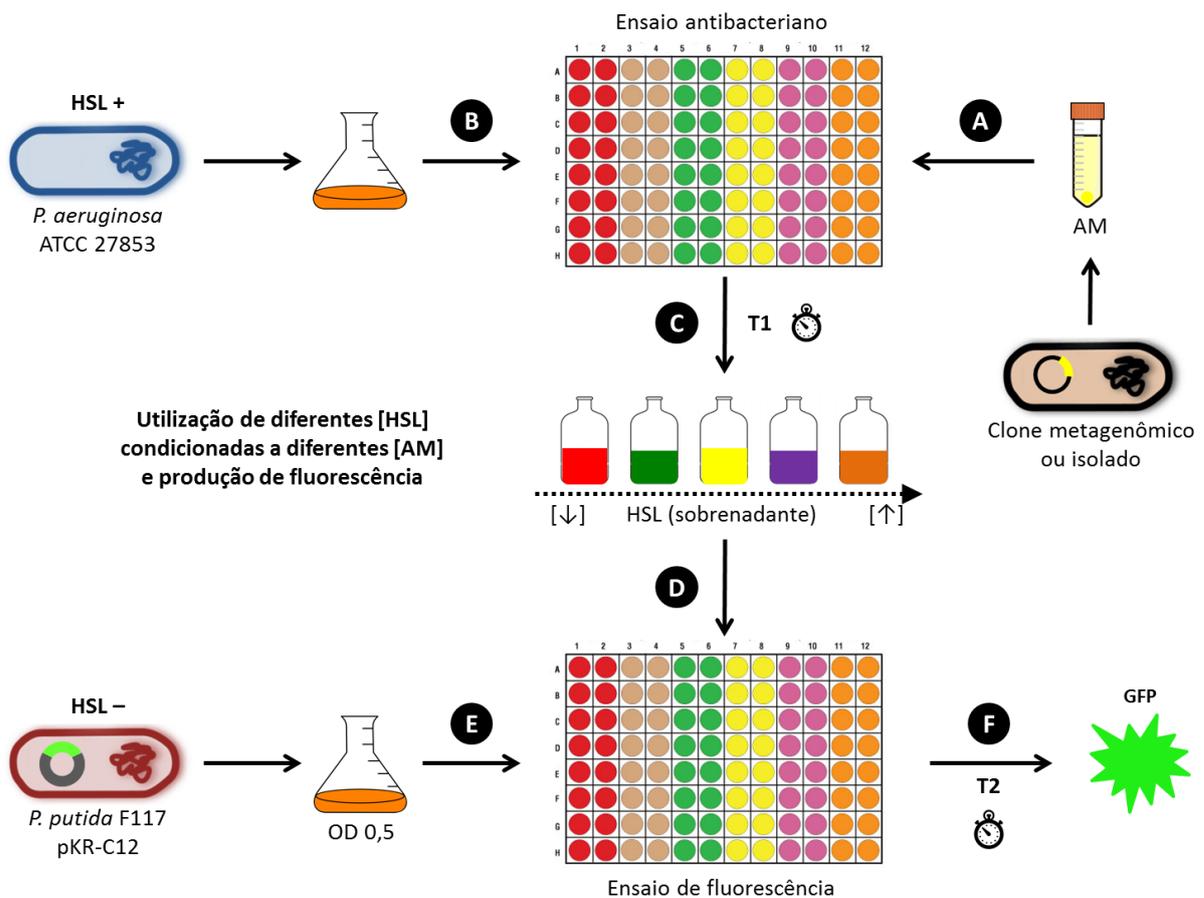
Comparando os dados de turvação e OD do ensaio líquido (Figura 6) e do ensaio em placa (Figura 7) com os dados de produção de fluorescência (Figura 13), é possível confirmar que a metodologia desenvolvida neste estudo é pelo menos 100 vezes mais sensível do que os métodos tradicionalmente utilizados para a triagem de genes com atividade antibacteriana a partir de clones metagenômicos ou isolados. Ou seja, enquanto que ensaios antibacterianos empregando a visualização de turvação, determinação de densidade óptica ou observação de halos em ensaios de sobreposição com microrganismos indicadores, conseguiriam detectar a atividade antibacteriana de gentamicina somente com concentrações acima de 10 µg/ml, o método proposto neste estudo foi capaz de detectar e identificar essa atividade com concentrações inferiores a 0,1 µg/ml do mesmo antibiótico.

Desse modo, este estudo desenvolveu uma metodologia inovadora e altamente sensível para a detecção e identificação de genes e/ou compostos que possuem atividade antibacteriana. Devido ao fato de essa metodologia empregar o uso de um sistema biossensor baseado na produção de GFP decorrente à ativação por moléculas HSLs, especificamente OdDHL, produzidas previamente em um ensaio antibacteriano e que são diretamente relacionadas à densidade celular da bactéria produtora, essa abordagem foi denominada “Expressão Dependente de Densidade Celular” ou “Cell-Density-Dependent Expression” (CEDDEX) (Figura 14).



**Figura 14** – Esquema geral representativo do princípio utilizado no sistema CEDDEX. Em uma condição de baixa densidade populacional, ocorre a produção de nenhuma ou pouca quantidade de moléculas autoindutoras HSL (triângulos vermelhos). Em contrapartida, uma alta concentração celular, demonstrada, por exemplo, por um alto valor de densidade óptica (OD), produz uma maior concentração de HSLs (A). As HSLs OdDHL produzidas são detectadas por um biossensor bacteriano, que contém um plasmídeo repórter, pKR-C12, capaz de expressar *gfp* na presença de OdDHL, ou seja, dependente da densidade celular da cepa produtora de HSL (B).

A metodologia CEDDEX desenvolvida neste estudo possui características específicas para a detecção e identificação de compostos com atividade antibacteriana e foi idealizada para ser utilizada na triagem de clones metagenômicos ou isolados microbianos positivos (Figura 15). No entanto, essa abordagem poderá ser utilizada também para a identificação de compostos antibacterianos advindos de outras fontes de bioprospecção (extratos de plantas, secreções de animais, etc).



**Figura 15** – Esquema geral para triagem e identificação de clones ou isolados produtores de compostos com atividade antibacteriana utilizando o sistema CEDDEX. Um clone metagenômico ou isolado é cultivado por alguns dias para a expressão e produção do composto antibacteriano. Uma alíquota do sobrenadante dessa cultura é transferida para uma microplaca (A) para ser cultivada com uma cultura padronizada da cepa produtora de HSL *P. aeruginosa* ATCC 27853 (B). O ensaio bacteriano é realizado por um período determinado (T1) (C) e os sobrenadantes são transferidos para outra microplaca (D) para serem cultivados com uma cultura padronizada do biossensor *P. putida* F117 pKR-C12 (E). O ensaio de fluorescência é realizado por um período determinado (T2) e posteriormente é realizada a leitura de produção de GFP (F).

Comparativamente ao método tradicional de triagem de clones metagenômicos positivos para atividade antibacteriana (Brady, 2007), o sistema CEDDEX, além de possuir limite de detecção e identificação consideravelmente inferiores, apresenta outras vantagens, como o tempo necessário para realizar os procedimentos e o custo do método.

A abordagem apresentada por Brady (2007), comumente utilizada para realizar a triagem em larga escala de clones produtores de compostos com atividade antibacteriana, após a construção de bibliotecas metagenômicas, demora aproximadamente de 7 a 10 dias, o que corresponde ao período de 1 dia para o crescimento dos clones em placas, na temperatura ótima de crescimento do hospedeiro, e de 3 a 7 dias para a produção heteróloga do possível composto antibacteriano, em temperatura ambiente. Os procedimentos para a preparação do microrganismo indicador, ensaio de sobreposição, incubação para formação do halo de inibição e isolamento do clone positivo, demoram cerca de 4 dias e podem ser iniciados 1 dia antes de finalizar o período de incubação dos clones. Para realizar todo esse processo são utilizados, basicamente, placas de Petri, meio de cultura líquido com e sem ágar e o microrganismo indicador resistente ao mesmo antibiótico utilizado para selecionar os clones da biblioteca, ou clonado com o mesmo vetor sem o inserto utilizado na clonagem.

Utilizando o sistema CEDDEX, serão requeridos de 7 a 9 dias para realizar todos os procedimentos de triagem. Os clones metagenômicos serão crescidos em 24 horas, na temperatura ótima de crescimento do hospedeiro ou isolado, e depois serão mantidos de 3 a 7 dias em temperatura ambiente, para a produção heteróloga do possível composto antibacteriano. O ensaio antibacteriano será realizado de 16 a 24 horas, seguido de mais 6 horas para realizar o ensaio de fluorescência (Figura 15). Depois de identificado, o clone positivo será então repicado e isolado para confirmar a atividade. Para realizar todos esses procedimentos serão utilizadas, essencialmente, microplacas de 96 poços, meio de cultura líquido, o microrganismo indicador produtor de HSL (*P. aeruginosa* ATCC 27853) e o biossensor de HSL produtor de GFP (*P. putida* F117 pKR-C12), além do equipamento para a leitura de fluorescência em microplacas.

## 6. CONCLUSÃO

Até o momento, a utilização de técnicas tradicionais já identificaram clones metagenômicos ou isolados com atividade antimicrobiana. No entanto, mesmo com melhorias no processo de clonagem e expressão dos genes, como a utilização de diversos hospedeiros, essas metodologias estão se tornando cada vez mais ineficazes, pois, sozinhas, apresentam baixa resolução e sensibilidade, indicando a necessidade de métodos de triagem mais robustos para limites inferiores de detecção.

O sistema CEDDEX, desenvolvido neste estudo, possui características até hoje nunca utilizadas para a triagem de genes com atividade antibacteriana a partir de clones metagenômicos, isolados ou até mesmo a partir de extratos e compostos de outras fontes. Apresentou sensibilidade pelo menos 100 vezes superior quando comparado aos métodos clássicos de triagem, além de poder ser executado de maneira relativamente simples em um período de tempo igual ou inferior e não possuir custos elevados para operação.

Dessa maneira, as diversas abordagens de construção e expressão de bibliotecas metagenômicas em conjunto com a utilização do sistema CEDDEX, para realizar a triagem e identificação de clones produtores de compostos antibacterianos, terão potencial para gerar novos compostos químicos e drogas bioativas assim como acelerar a descoberta de novos genes com atividade antibacteriana de interesse biotecnológico.

## REFERÊNCIAS

AAKVIK, T. et al. A plasmid RK2-based broad-host-range cloning vector useful for transfer of metagenomic libraries to a variety of bacterial species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 296, n. 2, p. 149-158, 2009. ISSN 1574-6968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19459950> >.

ANDERSEN, J. B. et al. gfp-based N-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 2, p. 575-85, Feb 2001. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11157219](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11157219) >.

ANDERSEN, J. B. et al. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. **Appl Environ Microbiol**, v. 64, n. 6, p. 2240-6, Jun 1998. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9603842](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9603842) >.

BANIK, J. J.; BRADY, S. F. Recent application of metagenomic approaches toward the discovery of antimicrobials and other bioactive small molecules. **Curr Opin Microbiol**, v. 13, n. 5, p. 603-9, Oct 2010. ISSN 1879-0364 (Electronic) 1369-5274 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20884282](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20884282) >.

BÉJÀ, O. et al. Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. **Environmental Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 516-529, 2000. ISSN 1462-2912. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11233160> >.

BIJTENHOORN, P. et al. A novel metagenomic short-chain dehydrogenase/reductase attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence on *Caenorhabditis elegans*. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26278, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22046268](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22046268) >.

BRADY, S. F. Construction of soil environmental DNA cosmid libraries and screening for clones that produce biologically active small molecules. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1297-1305, 2007. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17546026> >.

BRADY, S. F.; CHAO, C. J.; CLARDY, J. New natural product families from an environmental DNA (eDNA) gene cluster. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 34, p. 9968-9969, 2002. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12188643> >.

BRADY, S. F. et al. Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. **Organic Letters**, v. 3, n. 13, p. 1981-1984, 2001. ISSN 1523-7060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11418029> >.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. Cloning and heterologous expression of isocyanide biosynthetic genes from environmental DNA. **Angewandte Chemie (International Ed. in English)**, v. 44, n. 43, p. 7063-7065, 2005. ISSN 1433-7851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16206308> >.

BRELLES-MARINO, G.; BEDMAR, E. J. Detection, purification and characterisation of quorum-sensing signal molecules in plant-associated bacteria. **J Biotechnol**, v. 91, n. 2-3, p. 197-209, Oct 4 2001. ISSN 0168-1656 (Print) 0168-1656 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566391> >.

BRINT, J. M.; OHMAN, D. E. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. **J Bacteriol**, v. 177, n. 24, p. 7155-63, Dec 1995. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8522523> >.

CHA, C. et al. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 11, n. 11, p. 1119-29, Nov 1998. ISSN 0894-0282 (Print) 0894-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9805399> >.

CHALFIE, M. Green fluorescent protein. **Photochem Photobiol**, v. 62, n. 4, p. 651-6, Oct 1995. ISSN 0031-8655 (Print) 0031-8655 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7480149> >.

CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, n. 5148, p. 802-5, Feb 11 1994. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8303295> >.

CHAPON-HERVE, V. et al. Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol Microbiol**, v. 24, n. 6, p. 1169-78, Jun 1997. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9218766> >.

CHARLTON, T. S. et al. A novel and sensitive method for the quantification of N-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm. **Environ Microbiol**, v. 2, n. 5, p. 530-41, Oct 2000. ISSN 1462-2912 (Print) 1462-2912 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11233161> >.

CODY, C. W. et al. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. **Biochemistry**, v. 32, n. 5, p. 1212-8, Feb 9 1993. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8448132> >.

CORMACK, B. P.; VALDIVIA, R. H.; FALKOW, S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). **Gene**, v. 173, n. 1 Spec No, p. 33-8, 1996. ISSN 0378-1119 (Print)  
0378-1119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8707053> >.

COURTOIS, S. et al. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 49-55, 2003. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12513976> >.

COWAN, D. et al. Metagenomic gene discovery: past, present and future. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 321-329, 2005. ISSN 0167-7799. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TCW-4G0495B-4/2/ede00b8f38e8b33cac541012e111870e> >.

CRAIG, J. W.; CHANG, F.-Y.; BRADY, S. F. Natural products from environmental DNA hosted in *Ralstonia metallidurans*. **ACS Chemical Biology**, v. 4, n. 1, p. 23-28, 2009. ISSN 1554-8937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19146479> >.

CRAIG, J. W. et al. Expanding small-molecule functional metagenomics through parallel screening of broad-host-range cosmid environmental DNA libraries in diverse proteobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1633-1641, 2010. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20081001> >.

DE CASTRO, A. P. et al. Bacterial community associated with healthy and diseased reef coral *Mussismilia hispida* from eastern Brazil. **Microbial Ecology**, v. 59, n. 4, p. 658-667, 2010. ISSN 1432-184X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20352207> >.

DE KIEVIT, T. R. et al. Role of the *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in rhlI regulation. **FEMS Microbiol Lett**, v. 212, n. 1, p. 101-6, Jun 18 2002. ISSN 0378-1097 (Print)  
0378-1097 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12076794> >.

DEEP, A.; CHAUDHARY, U.; GUPTA, V. Quorum sensing and Bacterial Pathogenicity: From Molecules to Disease. **J Lab Physicians**, v. 3, n. 1, p. 4-11, Jan 2011. ISSN 0974-7826 (Electronic)  
0974-2727 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21701655](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21701655) >.

EBERHARD, A. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. **J Bacteriol**, v. 109, n. 3, p. 1101-5, Mar 1972. ISSN 0021-9193 (Print)  
0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5011244> >.

EBERL, L. N-acyl homoserinelactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. **Syst Appl Microbiol**, v. 22, n. 4, p. 493-506, Dec 1999. ISSN 0723-2020 (Print)  
0723-2020 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794136> >.

- EKKERS, D. M. et al. The great screen anomaly--a new frontier in product discovery through functional metagenomics. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 93, n. 3, p. 1005-20, Feb 2011. ISSN 1432-0614 (Electronic)  
0175-7598 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22189864](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22189864) >.
- FANG, X. et al. Draft genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 27853. **J Bacteriol**, v. 194, n. 14, p. 3755, Jul 2012. ISSN 1098-5530 (Electronic)  
0021-9193 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22740676](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22740676) >.
- FENG, Z.; KALLIFIDAS, D.; BRADY, S. F. Functional analysis of environmental DNA-derived type II polyketide synthases reveals structurally diverse secondary metabolites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 31, p. 12629-34, Aug 2 2011. ISSN 1091-6490 (Electronic)  
0027-8424 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21768346](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21768346) >.
- FERRER, M. et al. Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v. 16, n. 1-2, p. 109-23, 2009. ISSN 1660-2412 (Electronic)  
1464-1801 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18957866> >.
- FUQUA, C.; GREENBERG, E. P. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. **Curr Opin Microbiol**, v. 1, n. 2, p. 183-9, Apr 1998. ISSN 1369-5274 (Print)  
1369-5274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066485> >.
- GAMBELLO, M. J.; IGLEWSKI, B. H. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. **J Bacteriol**, v. 173, n. 9, p. 3000-9, May 1991. ISSN 0021-9193 (Print)  
0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1902216> >.
- GARMENDIA, L. et al. Metagenomics and antibiotics. **Clin Microbiol Infect**, v. 18 Suppl 4, p. 27-31, Jul 2012. ISSN 1469-0691 (Electronic)  
1198-743X (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22647044](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22647044) >.
- GILLESPIE, D. E. et al. Isolation of antibiotics turbomycin a and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4301-4306, 2002. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200279> >.
- GUAN, C. et al. Signal mimics derived from a metagenomic analysis of the gypsy moth gut microbiota. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 11, p. 3669-76, Jun 2007. ISSN 0099-2240 (Print)  
0099-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17435000> >.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004. ISSN 1092-2172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15590779> >.

HANDELSMAN, J. et al. Cloning the metagenome: Culture-independent access to the diversity and functions of the uncultivated microbial world. In: (Ed.). **Functional Microbial Genomics**: Academic Press, v. Volume 33, 2002. p.241-255. ISBN 0580-9517.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p. R245-249-R245-249, 1998. ISSN 1074-5521. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9818143> >.

HEIM, R.; PRASHER, D. C.; TSIEN, R. Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 26, p. 12501-4, Dec 20 1994. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7809066> >.

HENTSCHEL, U. et al. Molecular Evidence for a Uniform Microbial Community in Sponges from Different Oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4431-4440, 2002. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC124103/> >.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **J Bacteriol**, v. 180, n. 18, p. 4765-74, Sep 1998. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9733676](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9733676) >.

IQBAL, H. A.; FENG, Z.; BRADY, S. F. Biocatalysts and small molecule products from metagenomic studies. **Curr Opin Chem Biol**, v. 16, n. 1-2, p. 109-16, Apr 2012. ISSN 1879-0402 (Electronic) 1367-5931 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22455793](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22455793) >.

KENNEDY, J.; MARCHESI, J. R.; DOBSON, A. D. Marine metagenomics: strategies for the discovery of novel enzymes with biotechnological applications from marine environments. **Microbial Cell Factories**, v. 7, p. 27-27, 2008. ISSN 1475-2859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18717988> >.

KOHLER, T. et al. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. **J Bacteriol**, v. 182, n. 21, p. 5990-6, Nov 2000. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11029417> >.

LAM, K. S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 245-251, 2006. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16675289> >.

LÄMMLE, K. et al. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 4, p. 575-592, 2007. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16963141> >.

LANGER, M. et al. Metagenomics: an inexhaustible access to nature's diversity. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 7-8, p. 815-821, 2006. ISSN 1860-7314. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16897828> >.

LATIFI, A. et al. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. **Mol Microbiol**, v. 21, n. 6, p. 1137-46, Sep 1996. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8898383> >.

LEE, J. J. ATCC Preservation Methods: Freezing and Freeze-Drying. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 651-651, 1992. ISSN 1550-7408. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1992.tb04871.x> >.

LI, X.; QIN, L. Metagenomics-based drug discovery and marine microbial diversity. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 11, p. 539-543, 2005. ISSN 0167-7799. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16154653> >.

LIM, H. K. et al. Characterization of a forest soil metagenome clone that confers indirubin and indigo production on *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 12, p. 7768-77, Dec 2005. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16332749](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16332749) >.

LITHGOW, J. K. et al. The regulatory locus cinRI in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. **Mol Microbiol**, v. 37, n. 1, p. 81-97, Jul 2000. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10931307> >.

LLOYD, D. H. Alternatives to conventional antimicrobial drugs: a review of future prospects. **Vet Dermatol**, v. 23, n. 4, p. 299-304, e59-60, Aug 2012. ISSN 1365-3164 (Electronic) 0959-4493 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22409347](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22409347) >.

LORENZ, P.; ECK, J. Metagenomics and industrial applications. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 510-516, 2005. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15931168> >.

MACNEIL, I. A. et al. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 301-

308, 2001. ISSN 1464-1801. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11321587> >.

MARTINEZ, A. et al. Genetically modified bacterial strains and novel bacterial artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple expression hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2452-2463, 2004. ISSN 0099-2240. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066844> >.

MCGARVEY, K. M.; QUEITSCH, K.; FIELDS, S. Wide variation in antibiotic resistance proteins identified by functional metagenomic screening of a soil DNA library. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 6, p. 1708-14, Mar 2012. ISSN 1098-5336 (Electronic) 0099-2240 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22247132](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22247132) >.

MCKNIGHT, S. L.; IGLEWSKI, B. H.; PESCI, E. C. The Pseudomonas quinolone signal regulates rhl quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa. **J Bacteriol**, v. 182, n. 10, p. 2702-8, May 2000. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781536> >.

MINCER, T. J. et al. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 5005-5011, 2002. ISSN 0099-2240. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12324350> >.

MOCALI, S.; BENEDETTI, A. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. **Res Microbiol**, v. 161, n. 6, p. 497-505, Jul-Aug 2010. ISSN 1769-7123 (Electronic) 0923-2508 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20452420](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20452420) >.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod**, v. 70, n. 3, p. 461-77, Mar 2007. ISSN 0163-3864 (Print) 0163-3864 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17309302](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17309302) >.

NICAS, T. I.; IGLEWSKI, B. H. The contribution of exoproducts to virulence of Pseudomonas aeruginosa. **Can J Microbiol**, v. 31, n. 4, p. 387-92, Apr 1985. ISSN 0008-4166 (Print) 0008-4166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2988728> >.

OCHSNER, U. A. et al. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in Pseudomonas aeruginosa. **J Bacteriol**, v. 176, n. 7, p. 2044-54, Apr 1994. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8144472> >.

- PASSADOR, L. et al. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. **Science**, v. 260, n. 5111, p. 1127-30, May 21 1993. ISSN 0036-8075 (Print)  
0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8493556> >.
- PEARSON, J. P. et al. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 1, p. 197-201, Jan 4 1994. ISSN 0027-8424 (Print)  
0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8278364> >.
- PEARSON, J. P. et al. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 5, p. 1490-4, Feb 28 1995. ISSN 0027-8424 (Print)  
0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7878006> >.
- PESCI, E. C. et al. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol**, v. 179, n. 10, p. 3127-32, May 1997. ISSN 0021-9193 (Print)  
0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9150205> >.
- PESSI, G.; HAAS, D. Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes hcnABC by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol**, v. 182, n. 24, p. 6940-9, Dec 2000. ISSN 0021-9193 (Print)  
0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11092854> >.
- PHILLIPS, G. J. Green fluorescent protein--a bright idea for the study of bacterial protein localization. **FEMS Microbiol Lett**, v. 204, n. 1, p. 9-18, Oct 16 2001. ISSN 0378-1097 (Print)  
0378-1097 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11682170> >.
- PIEL, J. et al. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 46, p. 16222-16227, 2004. ISSN 0027-8424.  
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520376> >.
- RAPPE, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annu Rev Microbiol**, v. 57, p. 369-94, 2003. ISSN 0066-4227 (Print)  
0066-4227 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14527284](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14527284) >.
- REID, B. G.; FLYNN, G. C. Chromophore formation in green fluorescent protein. **Biochemistry**, v. 36, n. 22, p. 6786-91, Jun 3 1997. ISSN 0006-2960 (Print)  
0006-2960 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9184161> >.
- RICE, S. A. et al. Detection and inhibition of bacterial cell-cell communication. **Methods Mol Biol**, v. 431, p. 55-68, 2008. ISSN 1064-3745 (Print)  
1064-3745 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18287747](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18287747) >.

RIEDEL, K. et al. N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. **Microbiology**, v. 147, n. Pt 12, p. 3249-62, Dec 2001. ISSN 1350-0872 (Print) 1350-0872 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11739757](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11739757) >.

RONDON, M. R. et al. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2541-2547, 2000. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10831436> >.

ROSEMEYER, V. et al. luxI- and luxR-homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. **J Bacteriol**, v. 180, n. 4, p. 815-21, Feb 1998. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9473034> >.

RUBY, E. G. Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis. **Annu Rev Microbiol**, v. 50, p. 591-624, 1996. ISSN 0066-4227 (Print) 0066-4227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8905092> >.

SABREE, Z. L. et al. Metagenomics. In: (Ed.). **Encyclopedia of Microbiology**. Oxford: Academic Press, 2009. p.622-632. ISBN 978-0-12-373944-5.

SAEIDI, N. et al. Engineering microbes to sense and eradicate *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen. **Mol Syst Biol**, v. 7, p. 521, 2011. ISSN 1744-4292 (Electronic) 1744-4292 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21847113> >.

SCHIPPER, C. et al. Metagenome-derived clones encoding two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 1, p. 224-33, Jan 2009. ISSN 1098-5336 (Electronic) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18997026> >.

SCHIRMER, A. et al. Metagenomic Analysis Reveals Diverse Polyketide Synthase Gene Clusters in Microorganisms Associated with the Marine Sponge *Discodermia dissoluta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4840-4849, 2005. ISSN 0099-2240.

SHAW, P. D. et al. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 12, p. 6036-41, Jun 10 1997. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9177164> >.

SHIMOMURA, O. Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 48, n. 31, p. 5590-602, 2009. ISSN 1521-3773 (Electronic) 1433-7851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19579247> >.

SIMON, C.; DANIEL, R. Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 85, n. 2, p. 265-76, Nov 2009. ISSN 1432-0614 (Electronic)

0175-7598 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19760178](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19760178) >.

\_\_\_\_\_. Metagenomic analyses: past and future trends. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 4, p. 1153-61, Feb 2011. ISSN 1098-5336 (Electronic)

0099-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21169428> >.

SIMON, C. et al. Rapid identification of genes encoding DNA polymerases by function-based screening of metagenomic libraries derived from glacial ice. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 9, p. 2964-8, May 2009. ISSN 1098-5336 (Electronic)

0099-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270136> >.

STALEY, J. T.; KONOPKA, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annu Rev Microbiol**, v. 39, p. 321-46, 1985. ISSN 0066-4227 (Print)

0066-4227 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3904603](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3904603) >.

STEIDLE, A. et al. Visualization of N-acylhomoserine lactone-mediated cell-cell communication between bacteria colonizing the tomato rhizosphere. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 12, p. 5761-70, Dec 2001. ISSN 0099-2240 (Print)

0099-2240 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11722933](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11722933) >.

STEINDLER, L.; VENTURI, V. Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. **FEMS Microbiol Lett**, v. 266, n. 1, p. 1-9, Jan 2007. ISSN 0378-1097 (Print)

0378-1097 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17233715](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17233715) >.

TAUPP, M.; MEWIS, K.; HALLAM, S. J. The art and design of functional metagenomic screens. **Curr Opin Biotechnol**, v. 22, n. 3, p. 465-72, Jun 2011. ISSN 1879-0429 (Electronic)

0958-1669 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21440432> >.

TAYLOR, P. L.; WRIGHT, G. D. Novel approaches to discovery of antibacterial agents. **Anim Health Res Rev**, v. 9, n. 2, p. 237-46, Dec 2008. ISSN 1466-2523 (Print)

1466-2523 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19006597](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19006597) >.

TODER, D. S.; GAMBELLO, M. J.; IGLEWSKI, B. H. Pseudomonas aeruginosa LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasR. **Mol Microbiol**, v. 5, n. 8, p. 2003-10, Aug 1991. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1766376> >.

TOMMASSEN, J. et al. Protein secretion in Pseudomonas aeruginosa. **FEMS Microbiol Rev**, v. 9, n. 1, p. 73-90, Sep 1992. ISSN 0168-6445 (Print) 0168-6445 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1389315> >.

TORRES-CORTES, G. et al. Characterization of novel antibiotic resistance genes identified by functional metagenomics on soil samples. **Environ Microbiol**, v. 13, n. 4, p. 1101-14, Apr 2011. ISSN 1462-2920 (Electronic) 1462-2912 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21281423](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21281423) >.

TORSVIK, V.; GOKSÅ, YR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 782-787, 1990. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2317046> >.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, n. 3, p. 782-7, Mar 1990. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2317046> >.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, n. 3, p. 240-5, Jun 2002. ISSN 1369-5274 (Print) 1369-5274 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12057676](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12057676) >.

UCHIYAMA, T. et al. Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. **Nat Biotechnol**, v. 23, n. 1, p. 88-93, Jan 2005. ISSN 1087-0156 (Print) 1087-0156 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15608629](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15608629) >.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 616-622, 2009. ISSN 1879-0429. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850467> >.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Product-induced gene expression, a product-responsive reporter assay used to screen metagenomic libraries for enzyme-encoding genes. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 21, p. 7029-35, Nov 2010. ISSN 1098-5336 (Electronic) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20833789](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20833789) >.

- UCHIYAMA, T.; WATANABE, K. The SIGEX scheme: high throughput screening of environmental metagenomes for the isolation of novel catabolic genes. **Biotechnol Genet Eng Rev**, v. 24, p. 107-16, 2007. ISSN 0264-8725 (Print) 0264-8725 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18059628](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18059628) >.
- VAN DELDEN, C.; IGLEWSKI, B. H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Emerg Infect Dis**, v. 4, n. 4, p. 551-60, Oct-Dec 1998. ISSN 1080-6040 (Print) 1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9866731> >.
- VAN ELSAS, J. D. et al. The metagenomics of disease-suppressive soils - experiences from the METACONTROL project. **Trends Biotechnol**, v. 26, n. 11, p. 591-601, Nov 2008. ISSN 0167-7799 (Print) 0167-7799 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18774191](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18774191) >.
- VENTER, J. C. et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science (New York, N.Y.)**, v. 304, n. 5667, p. 66-74, 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001713> >.
- VISICK, K. L.; MCFALL-NGAI, M. J. An exclusive contract: specificity in the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* partnership. **J Bacteriol**, v. 182, n. 7, p. 1779-87, Apr 2000. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10714980> >.
- WANG, G. Y. et al. Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. **Organic Letters**, v. 2, n. 16, p. 2401-2404, 2000. ISSN 1523-7060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10956506> >.
- WANG, S.; HAZELRIGG, T. Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. **Nature**, v. 369, n. 6479, p. 400-03, Jun 2 1994. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7910952> >.
- WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 21, p. 319-46, 2005. ISSN 1081-0706 (Print) 1081-0706 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16212498](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16212498) >.
- WEXLER, M. et al. A wide host range metagenomic library from a waste water treatment plant yields a novel alcohol/aldehyde dehydrogenase. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 1917-1926, 2005. ISSN 1462-2920. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2005.00854.x/abstract> >.
- WHITELEY, M.; LEE, K. M.; GREENBERG, E. P. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 24, p. 13904-9, Nov 23 1999. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10570171> >.

WILLIAMS, P. et al. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 362, n. 1483, p. 1119-34, Jul 29 2007. ISSN 0962-8436 (Print)  
0962-8436 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17360280](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17360280) >.

WILLIAMSON, L. L. et al. Intracellular screen to identify metagenomic clones that induce or inhibit a quorum-sensing biosensor. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 10, p. 6335-44, Oct 2005. ISSN 0099-2240 (Print)  
0099-2240 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16204555](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16204555) >.

WINSON, M. K. et al. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 20, p. 9427-31, Sep 26 1995. ISSN 0027-8424 (Print)  
0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7568146> >.

XU, M.; XIAO, X.; WANG, F. Isolation and characterization of alkane hydroxylases from a metagenomic library of Pacific deep-sea sediment. **Extremophiles: Life Under Extreme Conditions**, v. 12, n. 2, p. 255-262, 2008. ISSN 1431-0651. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18087672> >.