



Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP

Disciplina 5920883 - Bioprospecção para Processos Biotecnológicos



## Metagenômica Funcional: do acesso aos genes a aplicações biotecnológicas

Leonardo Martins Santana, PhD Student  
Bsc. Biotechnology

Ribeirão Preto, 17 de setembro de 2019

# Apresentação

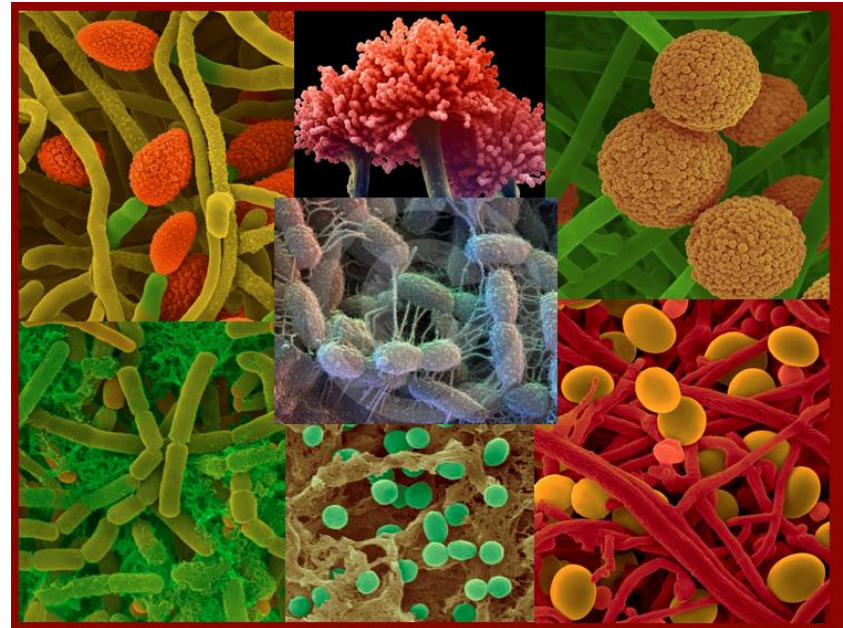
1. Cultivo de micro-organismos
2. Micro-organismos não cultiváveis e seu potencial
3. Metagenômica – a divisão por funcionalidade e estruturalismo
4. Ferramentas para metagenômica funcional
5. Aplicações biotecnológicas utilizando metagenômica funcional
6. Exercício

# Cultivo de micro-organismos

Micro-organismos estudados – cultivo

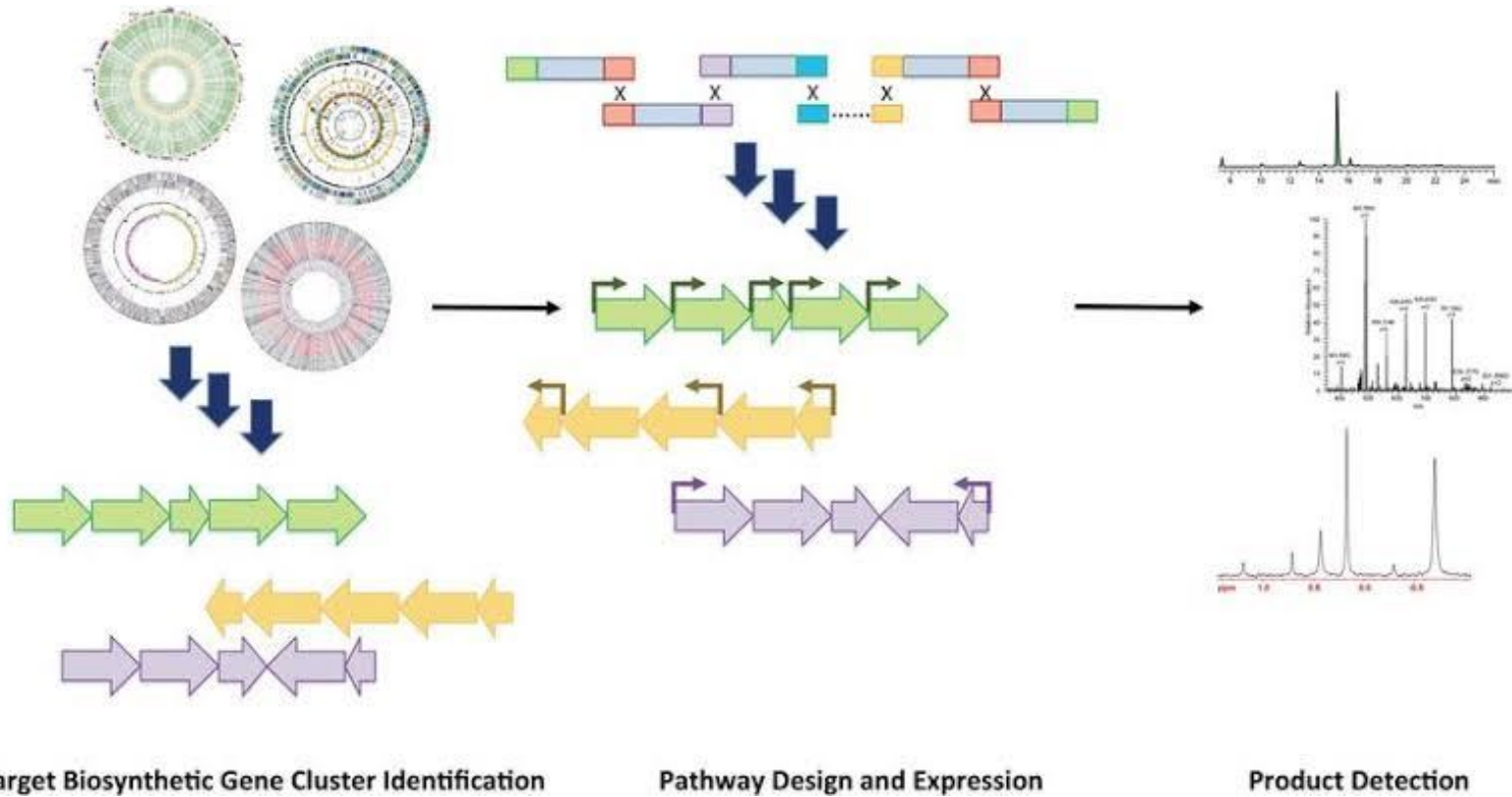
↳ Meio de cultura, temperatura de crescimento, biossegurança

Importantes fontes de partes biológicas – Biotecnologia



# Cultivo de micro-organismos

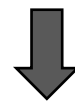
O potencial biotecnológico das espécies está no genoma



Expressão Heteróloga



Processo Biotecnológico



Escalonamento Industrial

# Micro-organismos não cultiváveis

A representatividade de uma amostra em cultivo realmente reflete a população de micro-organismos dessa amostra?



Amostras de solo



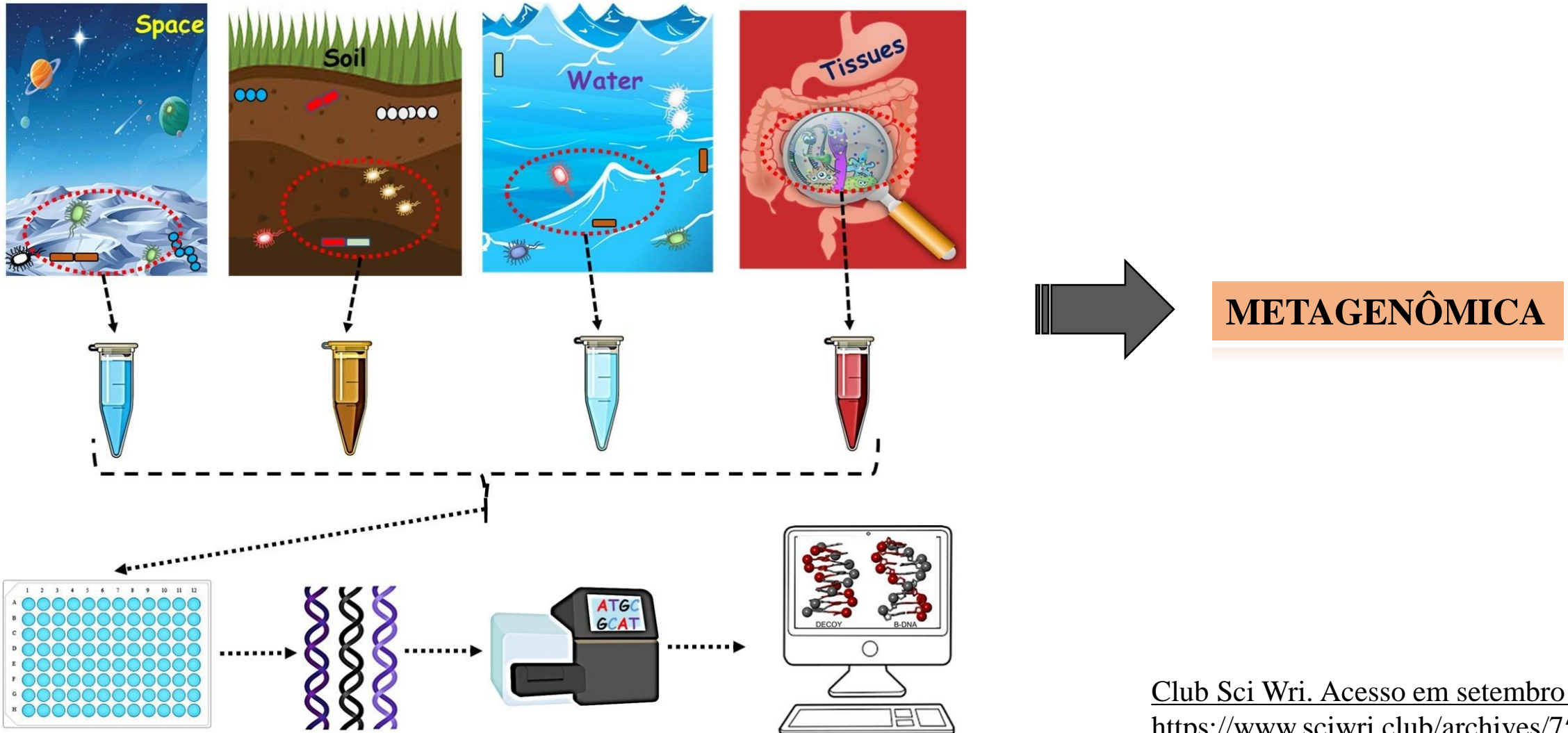
Cultivo viável em placa



Os métodos convencionais de cultivo permitem o crescimento de **menos de 3%** das espécies de bactérias e archeas presentes nas amostras

# Micro-organismos não cultiváveis

Como acessar todo o potencial genético de micro-organismos não-cultiváveis?



## **Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products**

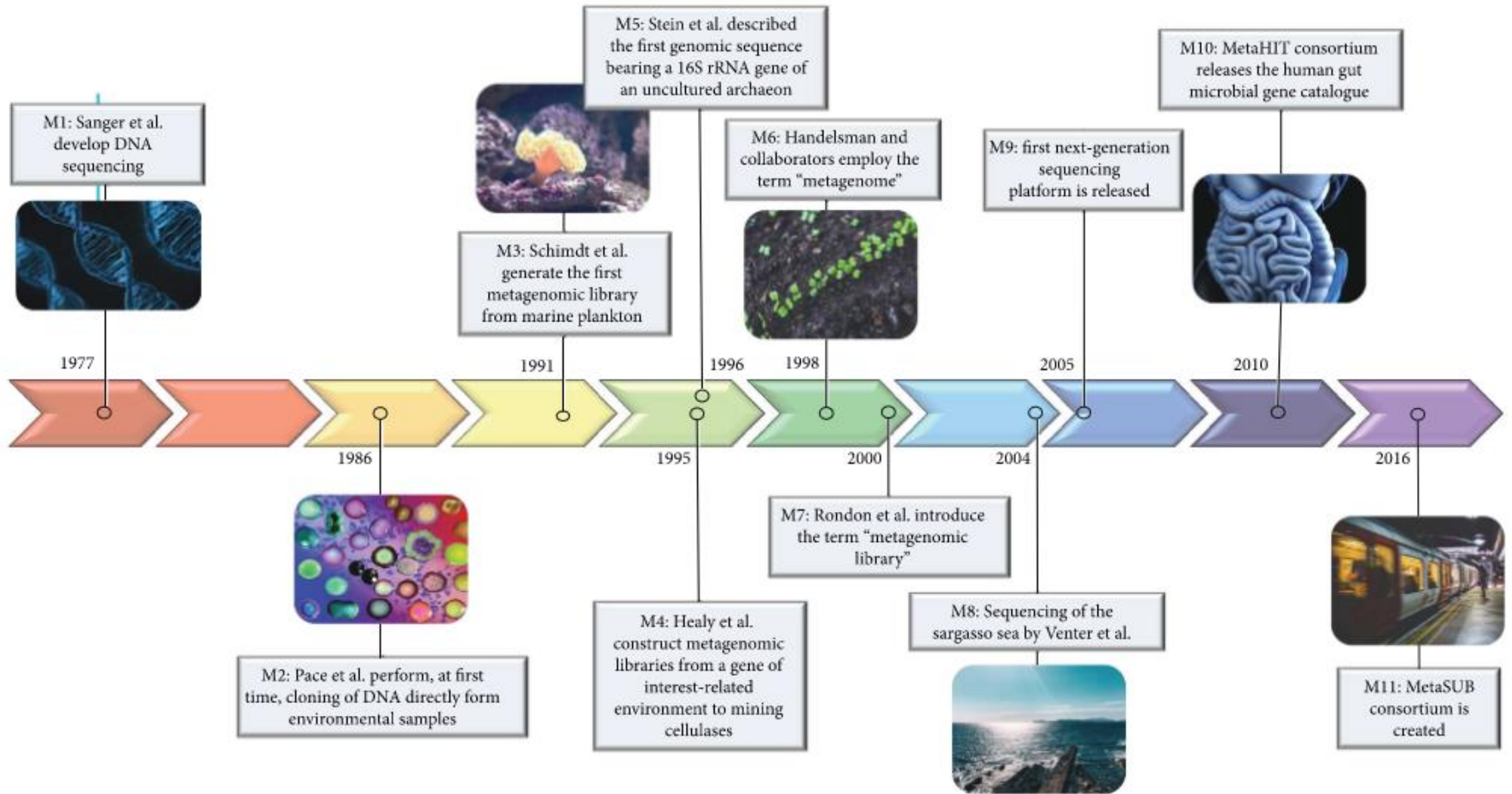
Jo Handelsman<sup>1</sup>, Michelle R Rondon<sup>1</sup>, Sean F Brady<sup>2</sup>, Jon Clardy<sup>2</sup> and Robert M Goodman<sup>1</sup>



“The **mining for novel** chemical compounds from uncultured microorganisms, which comprises more than 99% of the microbial diversity”

**Aplicações genômicas em micro-organismos não cultiváveis, bem como a caracterização da distribuição do perfil genético e funcionalidade das partes biológicas deste nicho**

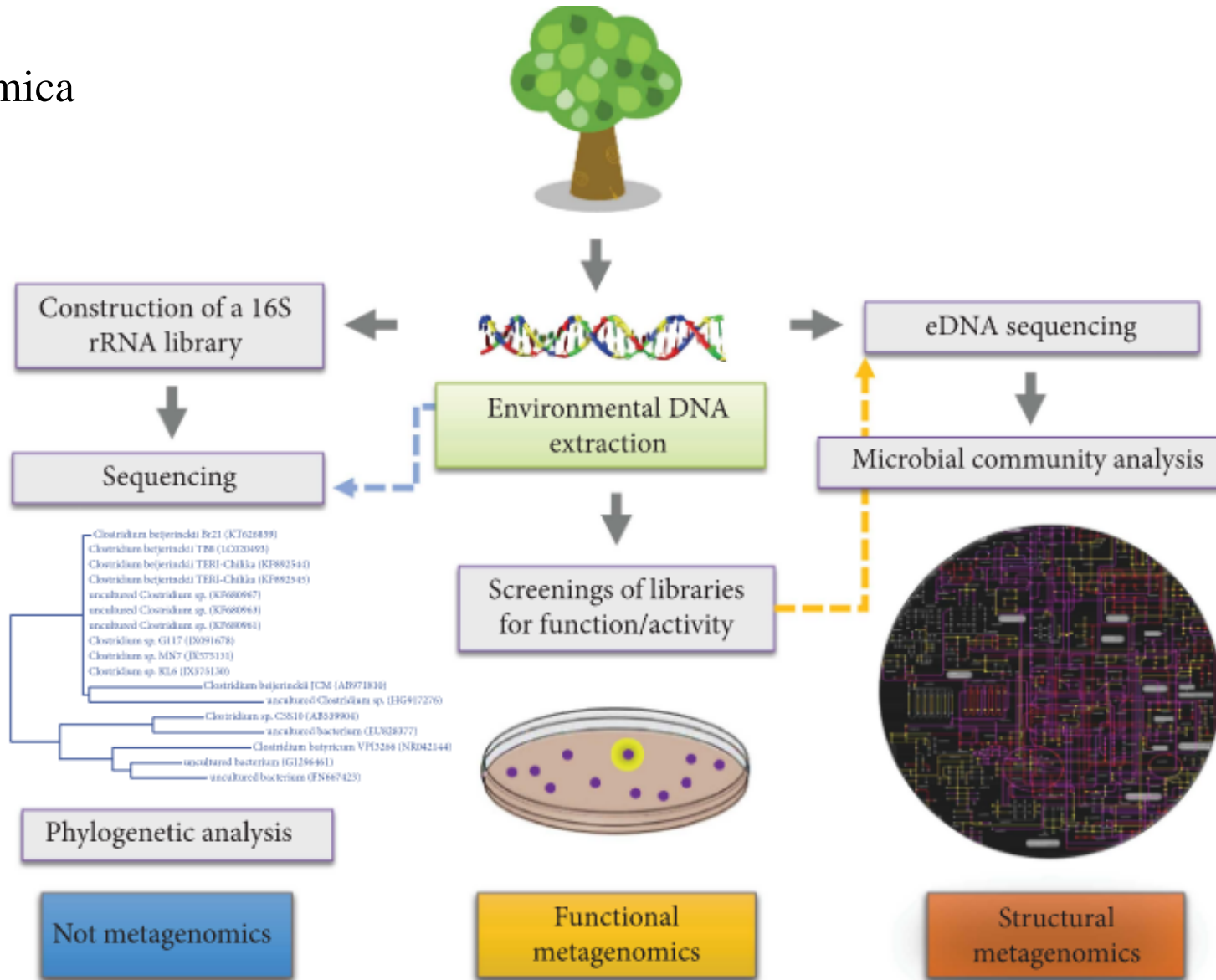
# METAGENÔMICA



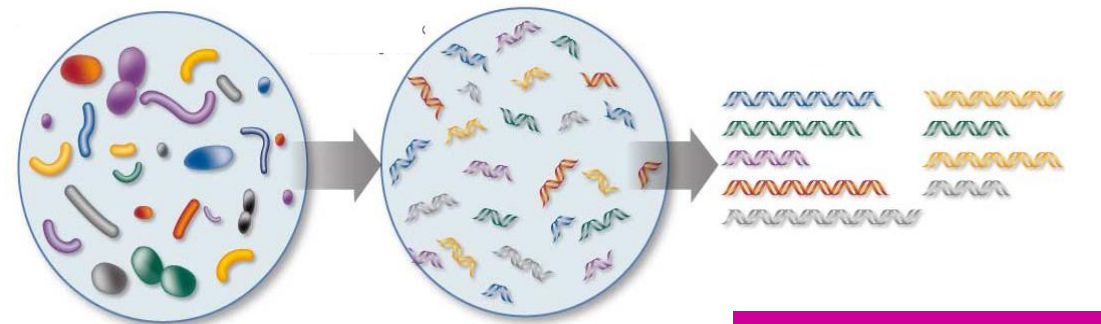
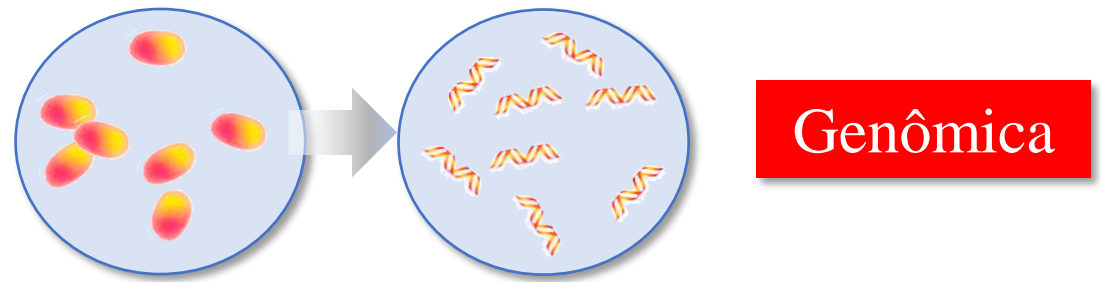
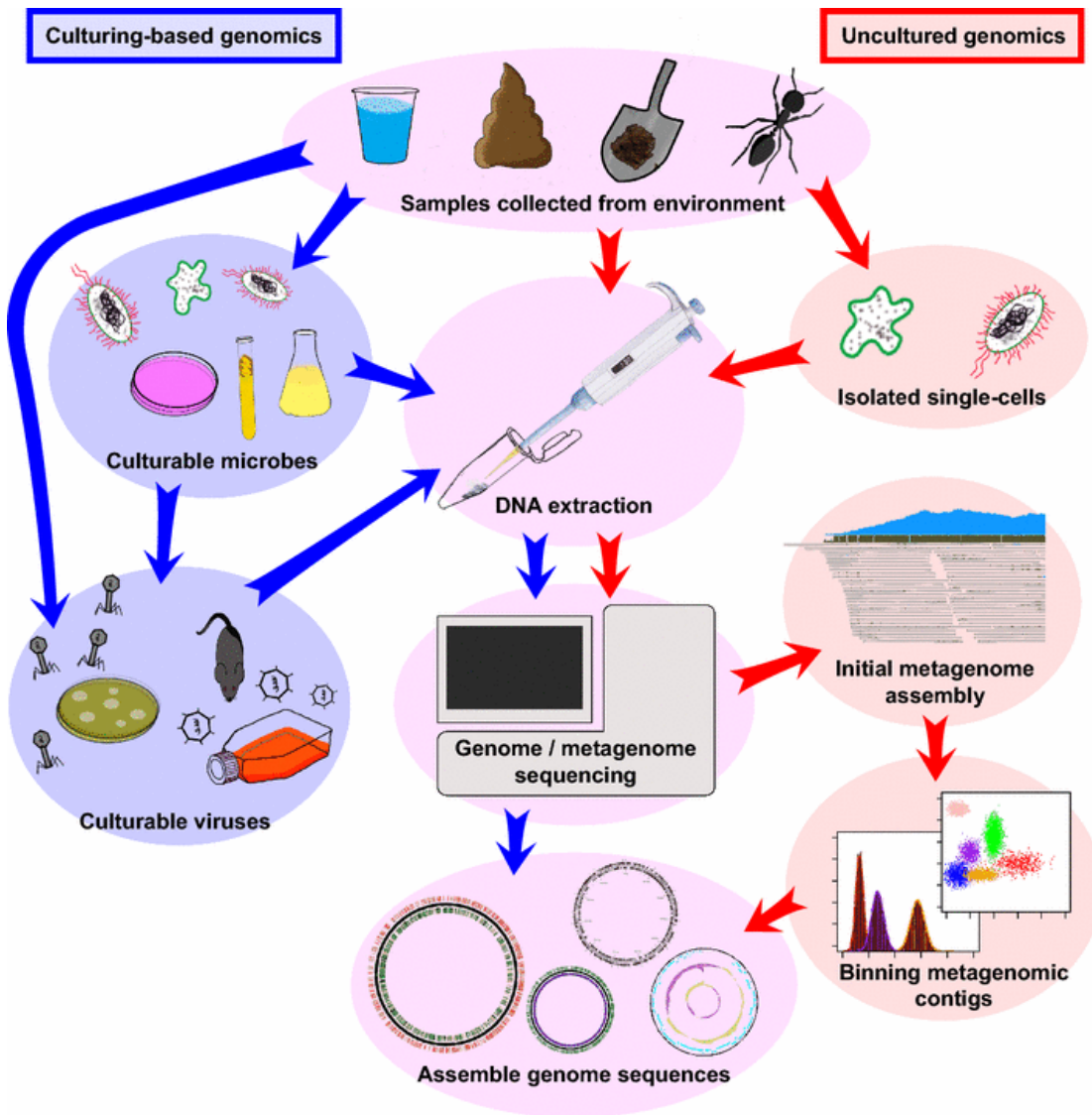


# METAGENÔMICA ESTRUTURAL E FUNCIONAL

## Divisão da Metagenômica



# Cultivo de micro-organismos



Guazzaroni. Non published data. Only for didactical purposes.

# Metagenômica Estrutural

RESEARCH

REPORT

PROTEIN STRUCTURE

## Protein structure determination using metagenome sequence data

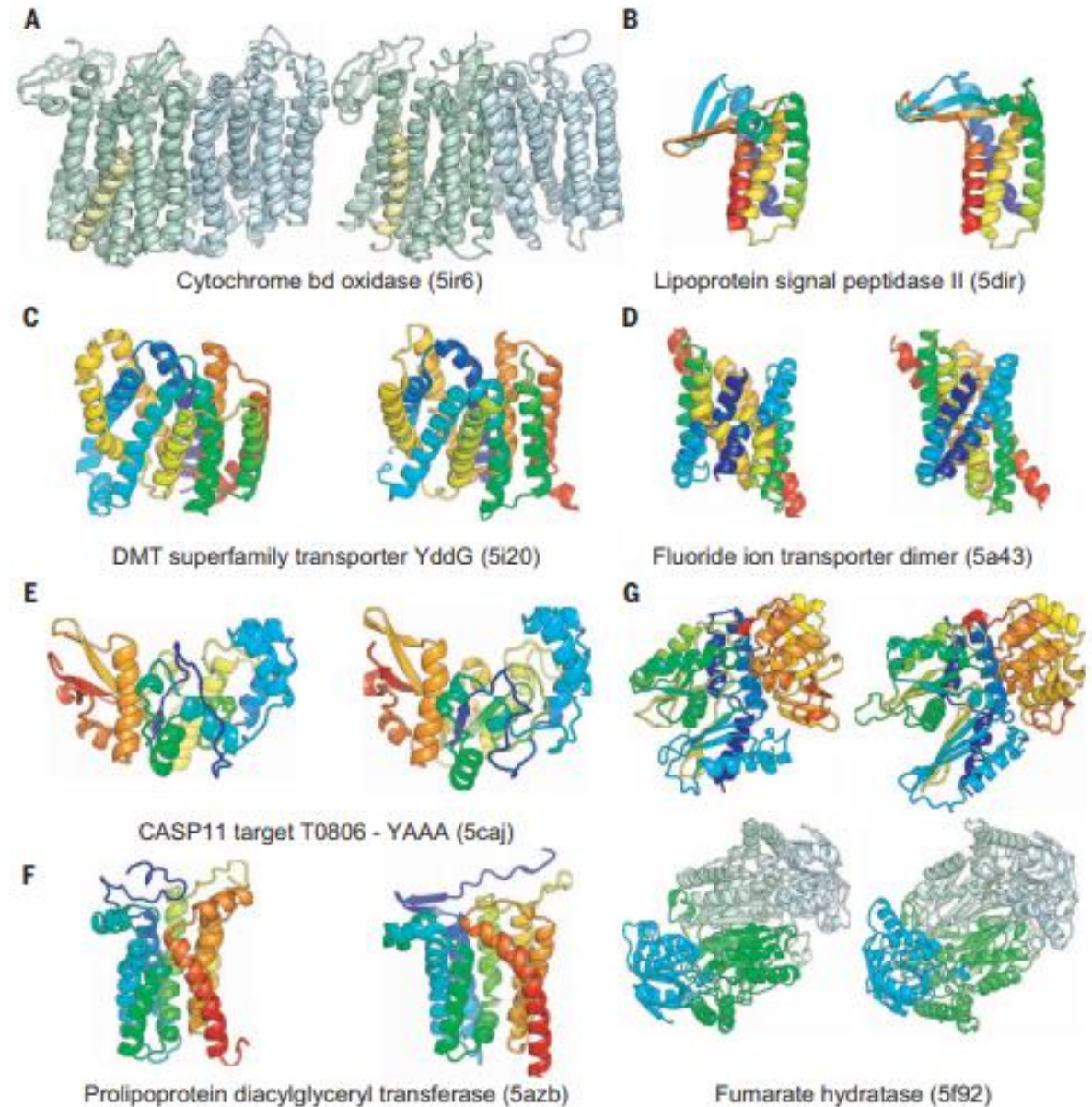
Sergey Ovchinnikov,<sup>1,2,3</sup> Hahnbeom Park,<sup>1,2</sup> Neha Varghese,<sup>4</sup> Po-Ssu Huang,<sup>1,2</sup> Georgios A. Pavlopoulos,<sup>4</sup> David E. Kim,<sup>1,5</sup> Hetunandan Kamisetty,<sup>6</sup> Nikos C. Kyrpides,<sup>4,7</sup> David Baker<sup>1,2,5\*</sup>

Quem são os membros desta comunidade?

Reconstituição das características estruturais



Metagenômica Estrutural



Acessa **funcionalidades** através do genoma de micro-organismos não cultiváveis



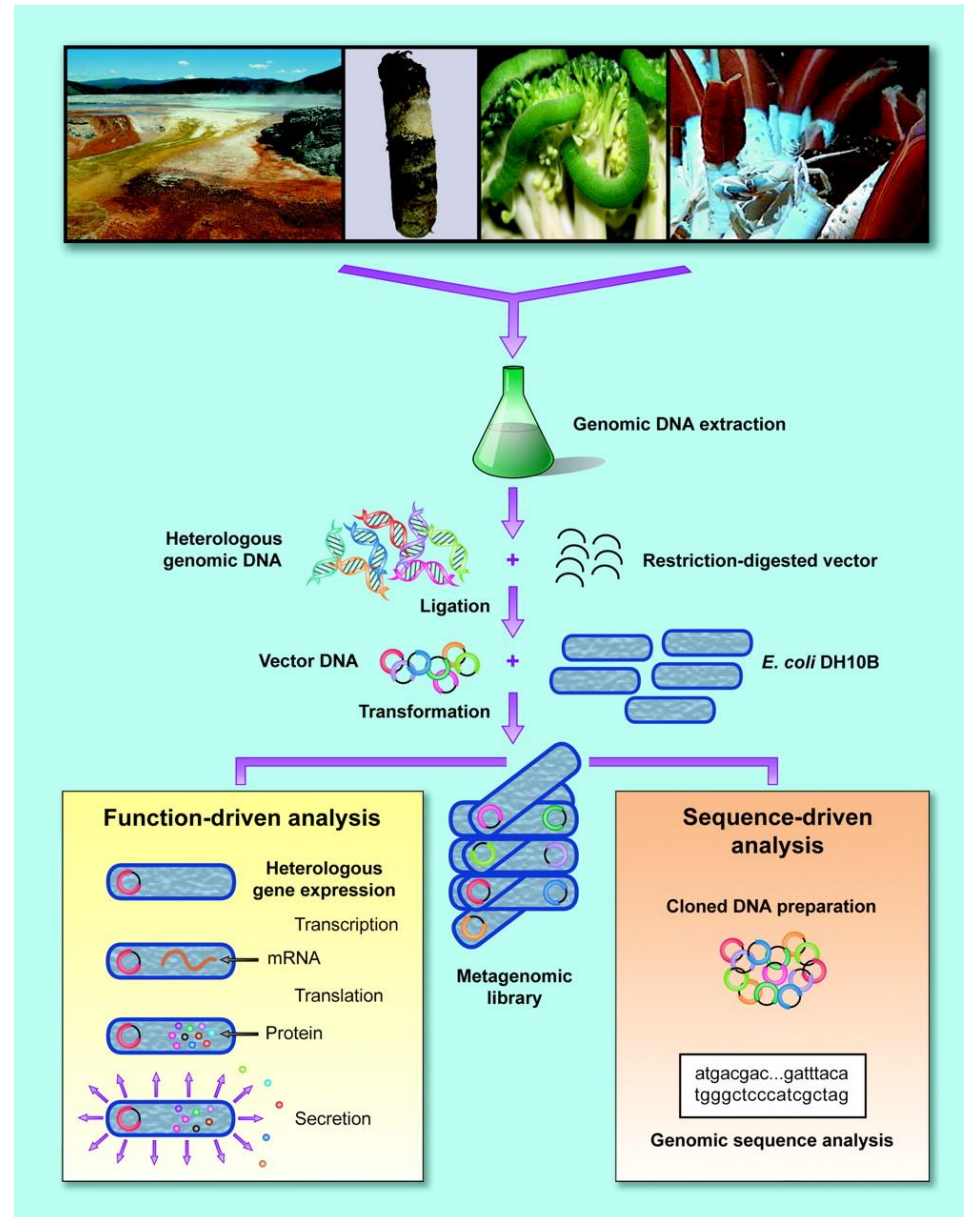
Busca por novos compostos/genes/proteínas de interesse



- 1 Identificação do material genético de interesse
- 2 Recuperação e clonagem
- 3 *Screening* com base em funcionalidade

# Metagenômica Funcional

Em resumo...



# Metagenômica Funcional

A predição do nicho é um fator determinante para a identificação de genes de interesse

Rio Tinto – Acidez



Baixas Temperaturas



Hidrocarbonetos



Biomassa Vegetal



# Metagenômica Funcional

## 1 Busca do material genético de interesse



Escolha da Amostra



Solo



Rios contaminados



TGI



Hospitais

1

## Extração de DNA das amostras



[Home](#) [Articles](#) [Topics](#) [For Authors](#) [About the Journal](#)

Research Article | Applied and Environmental Science

## Impact of Sample Type and DNA Isolation Procedure on Genomic Inference of Microbiome Composition

Berith E. Knudsen, Lasse Bergmark, Patrick Munk, Oksana Lukjancenko, Anders Priemé, Frank M. Aarestrup, Sünje J. Pamp  
Janet K. Jansson, Editor

## Método de extração de DNA



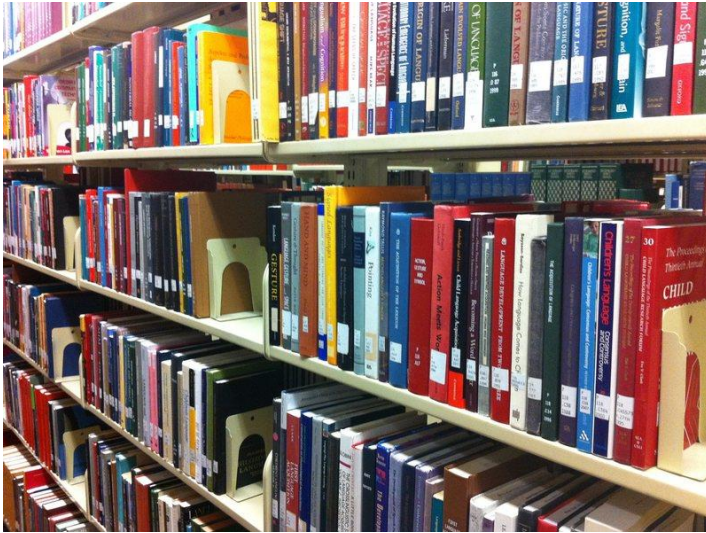
- ✓ Adaptação ao tipo de amostra
- ✓ Evitar contaminantes de extração
- ✓ Pureza do DNA ao final do processo



# Metagenômica Funcional

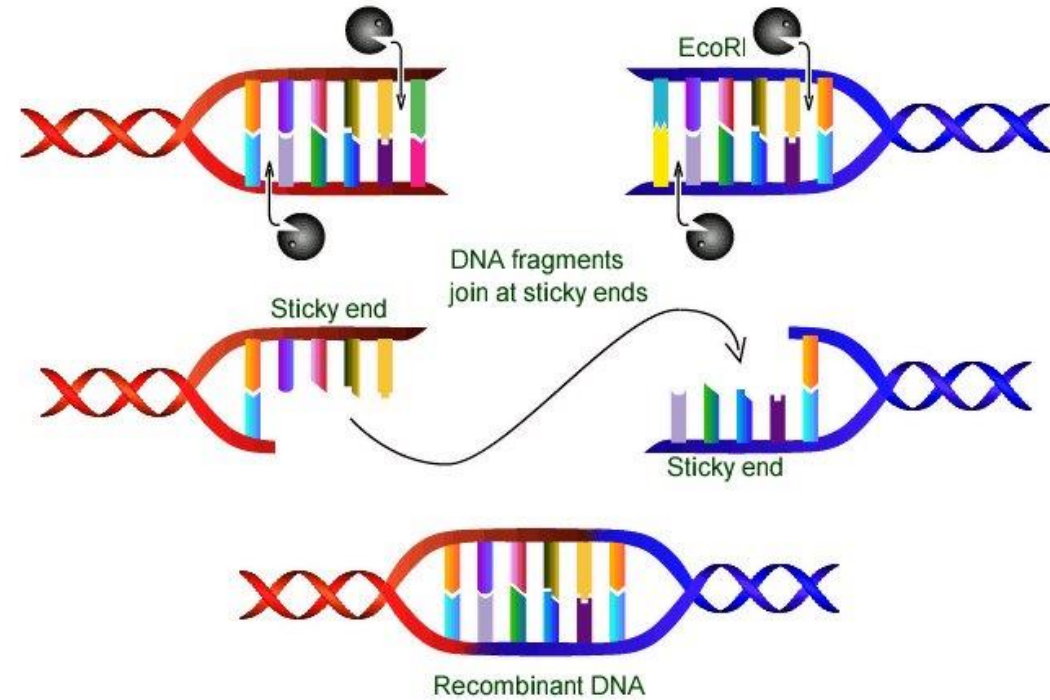
## 2 Identificação do material genético de interesse

### Bibliotecas Metagenômicas



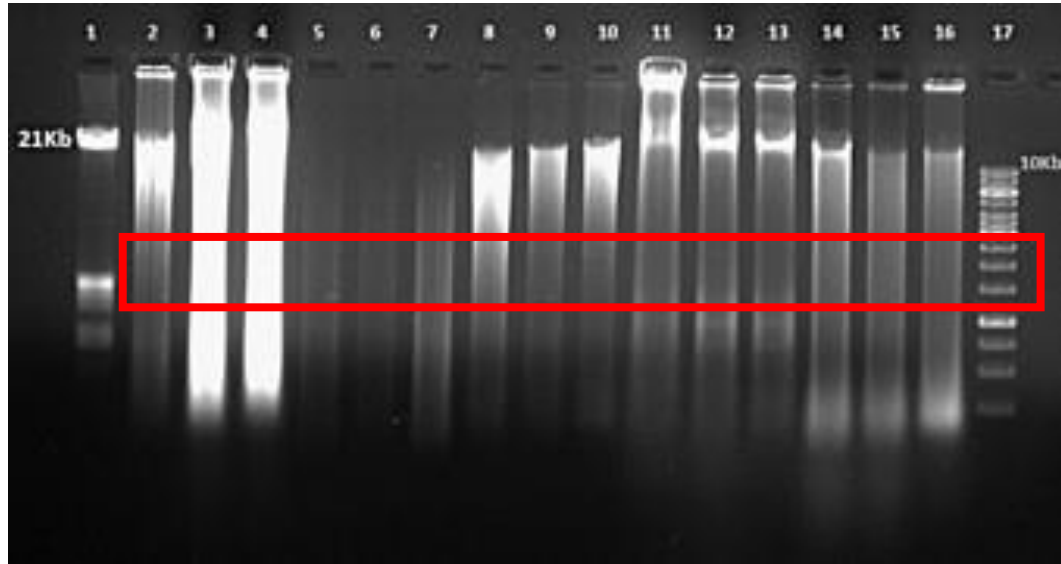
Material genético de interesse  
(DNA purificado)

### Restriction Enzyme



# Metagenômica Funcional

## 2 Seleção dos fragmentos após digestão



Separação física

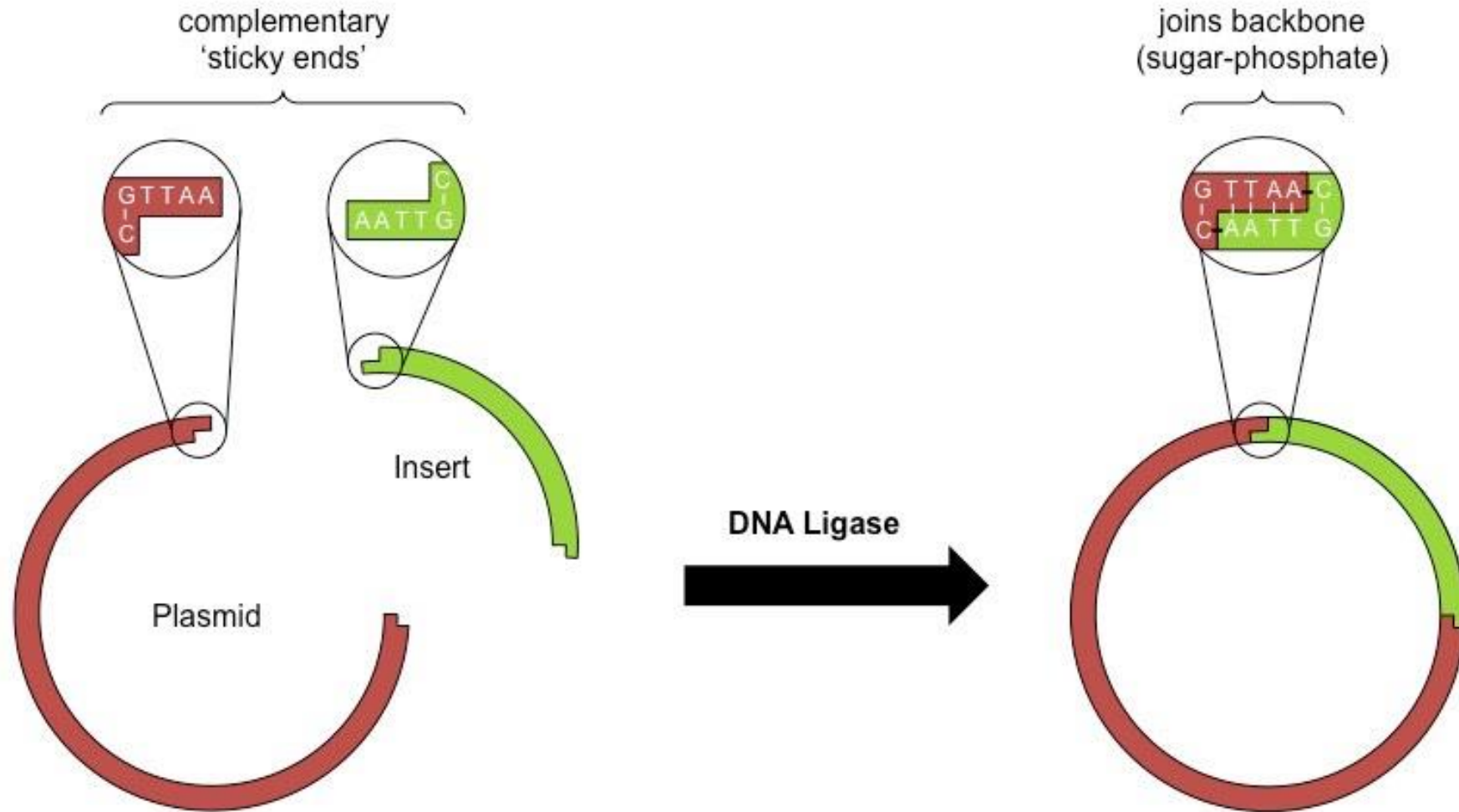
Gel de agarose

Seleção baseada em uma faixa de tamanho (pb) dos fragmentos

A seleção dos fragmentos deve ser sucedida de purificação para ligação ao vetor de escolha

# Metagenômica Funcional

## 2 Ligação em vetor de escolha



## 2 Ligação em vetor de escolha

Como selecionar o vetor ideal para cada abordagem?

### Para fragmentos pequenos

plasmídeos (2-5 kb)  
 $\lambda$  phage vectors (8 Kb)

- ✓ *Screening* de genes únicos ou pequenos operons
- ✓ Vetores de expressão (promotores fortes/RBS)

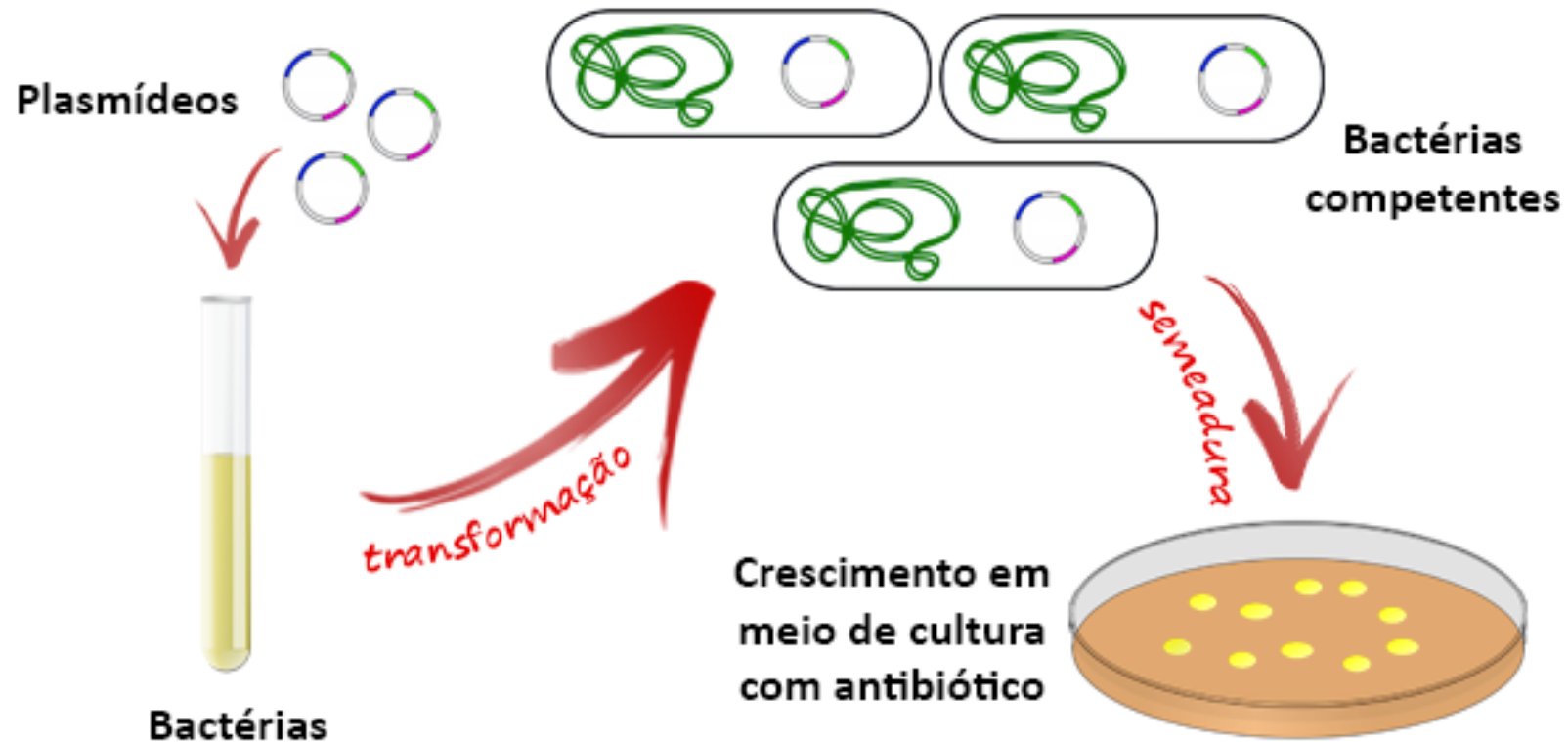
### Para fragmentos grandes

cosmídeos (23 kb)  
fosmídeos (40 Kb)  
pBACs (200 Kb)

- ✓ Recuperação estável do grandes sequências de DNA
- ✓ Ideal para a busca de vias metabólicas

# Metagenômica Funcional

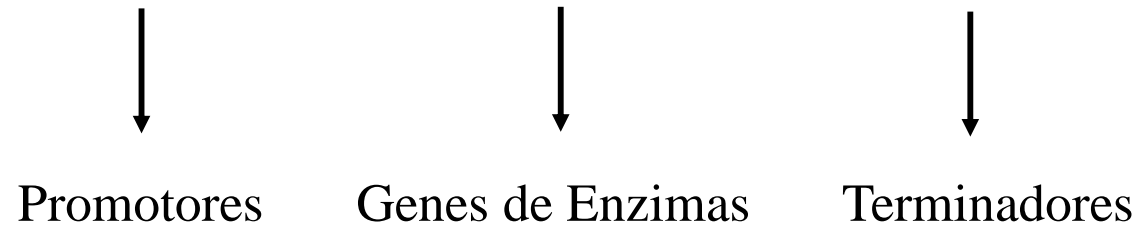
## 2 Transformação e recuperação de DNA



Por que esta etapa é tão importante na construção de bibliotecas?

## 3 Screening

É a triagem para verificação da presença de fragmentos metagenômicos de interesse



Diferentes métodos de triagem podem ser aplicados dependendo do DNA metagenômico de interesse

Promotores – ensaios utilizando genes *reporter* (GFP)

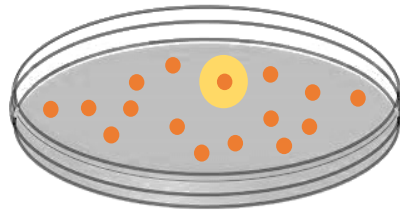
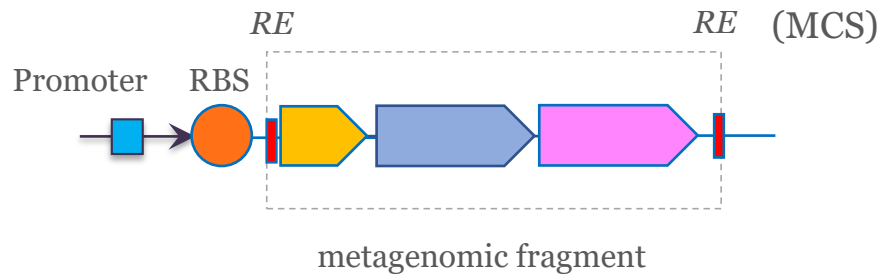
Genes de Enzimas - Atividade enzimática

Terminadores - ensaios utilizando genes *reporter* (GFP)

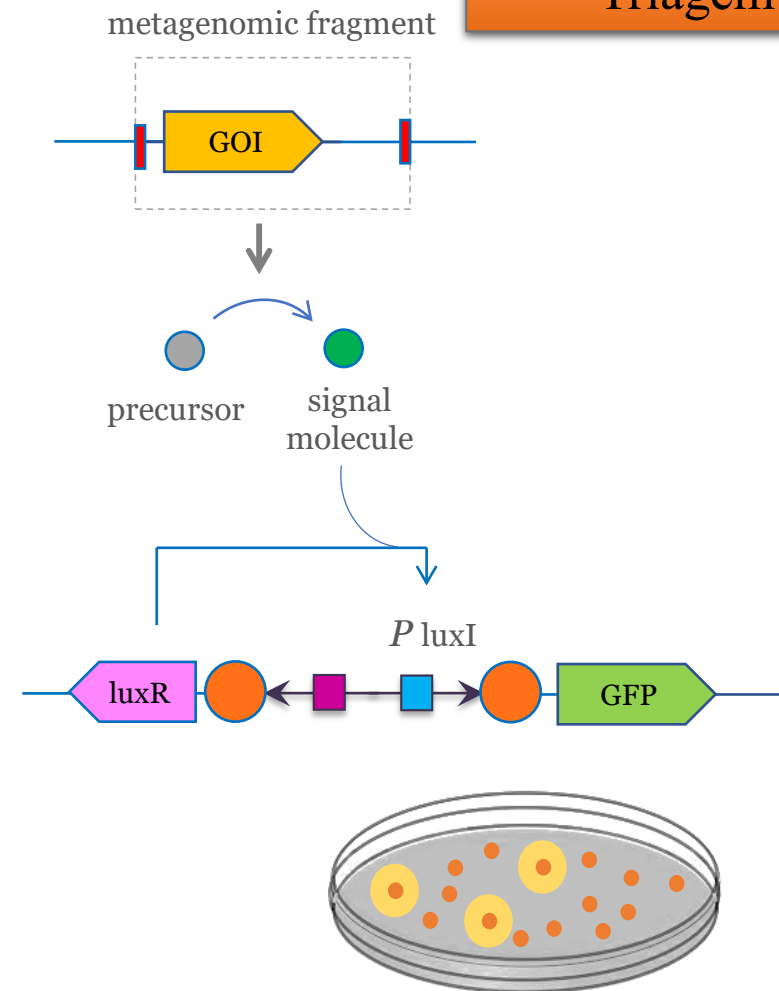
# Metagenômica Funcional

## 3 Screening

### Triagem por fenótipo

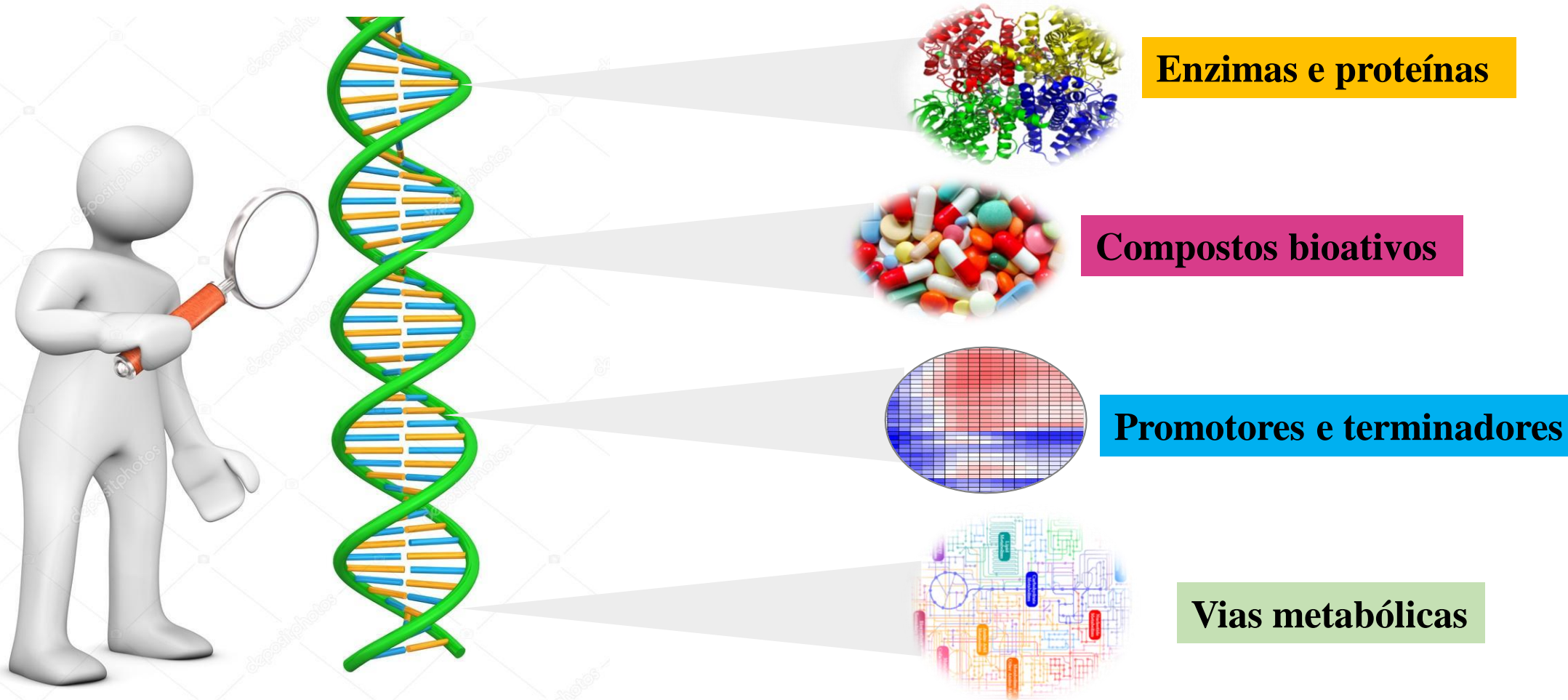


### Triagem por sensing



# Metagenômica Funcional

O que se pode buscar através da metagenômica funcional?

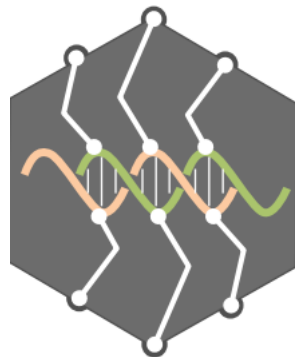




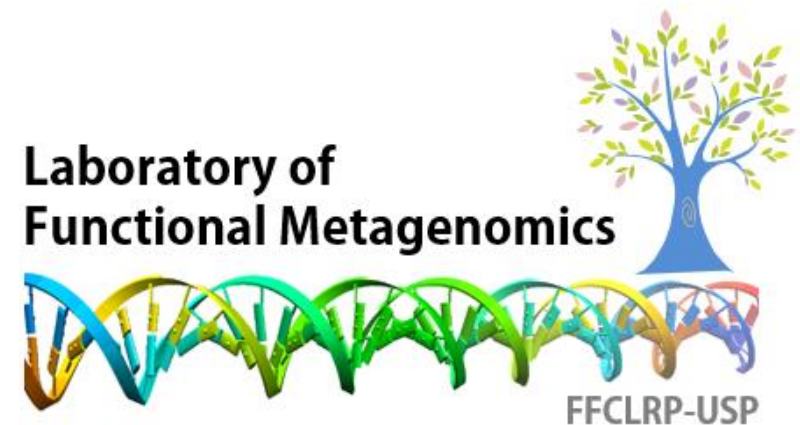


## Mining Novel Constitutive Promoter Elements in Soil Metagenomic Libraries in *Escherichia coli*

Cauã A. Westmann<sup>1</sup>, Luana de Fátima Alves<sup>2,3</sup>, Rafael Silva-Rocha<sup>1</sup> and Maria-Eugenia Guazzaroni<sup>2\*</sup>



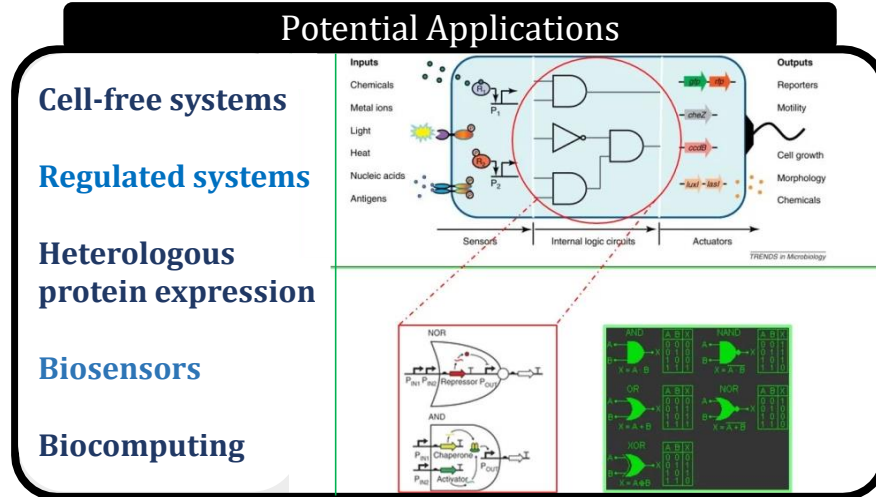
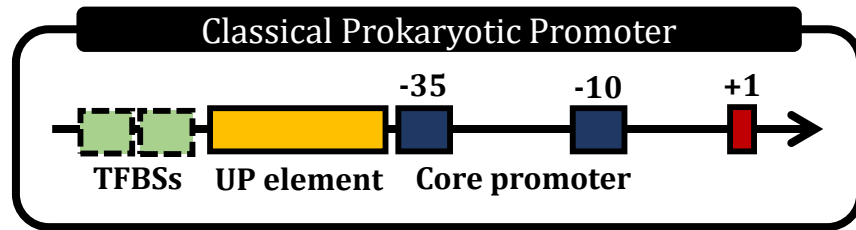
Systems and Synthetic  
Biology Lab  
FMRP-USP



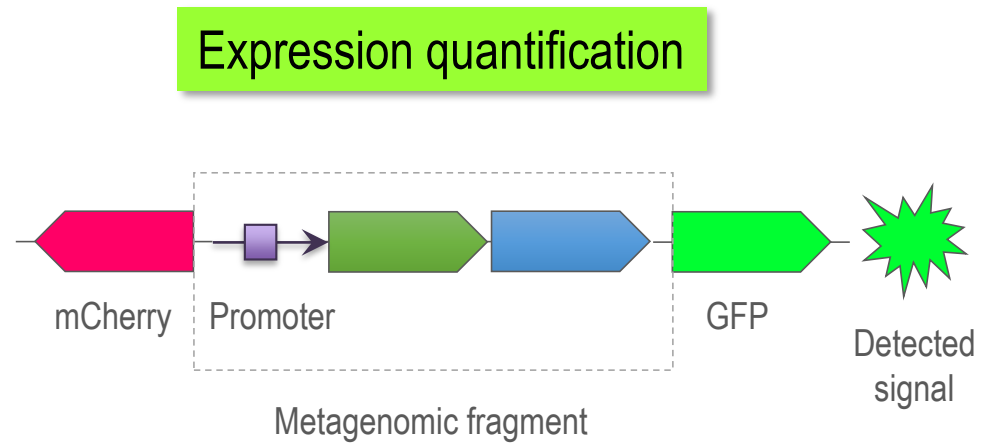
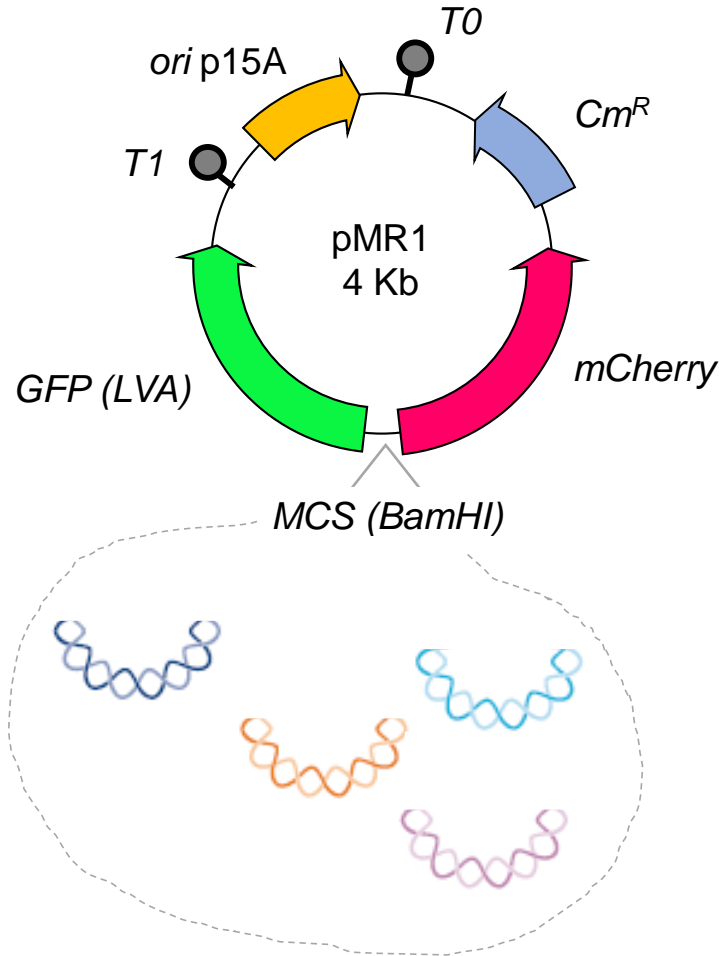
Laboratory of  
Functional Metagenomics

FFCLRP-USP

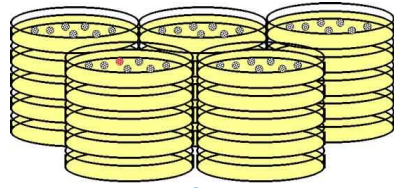
# Exemplos de metagenômica funcional aplicada



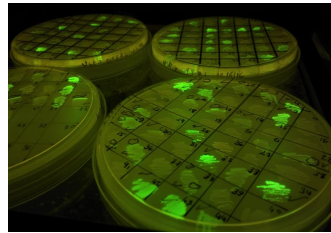
# Exemplos de metagenômica funcional aplicada



# Exemplos de metagenômica funcional aplicada



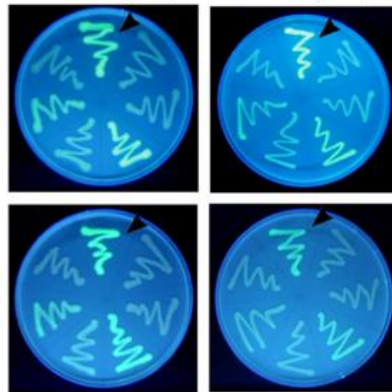
Screening of 190.000 clones



1200 clones expressing reporters

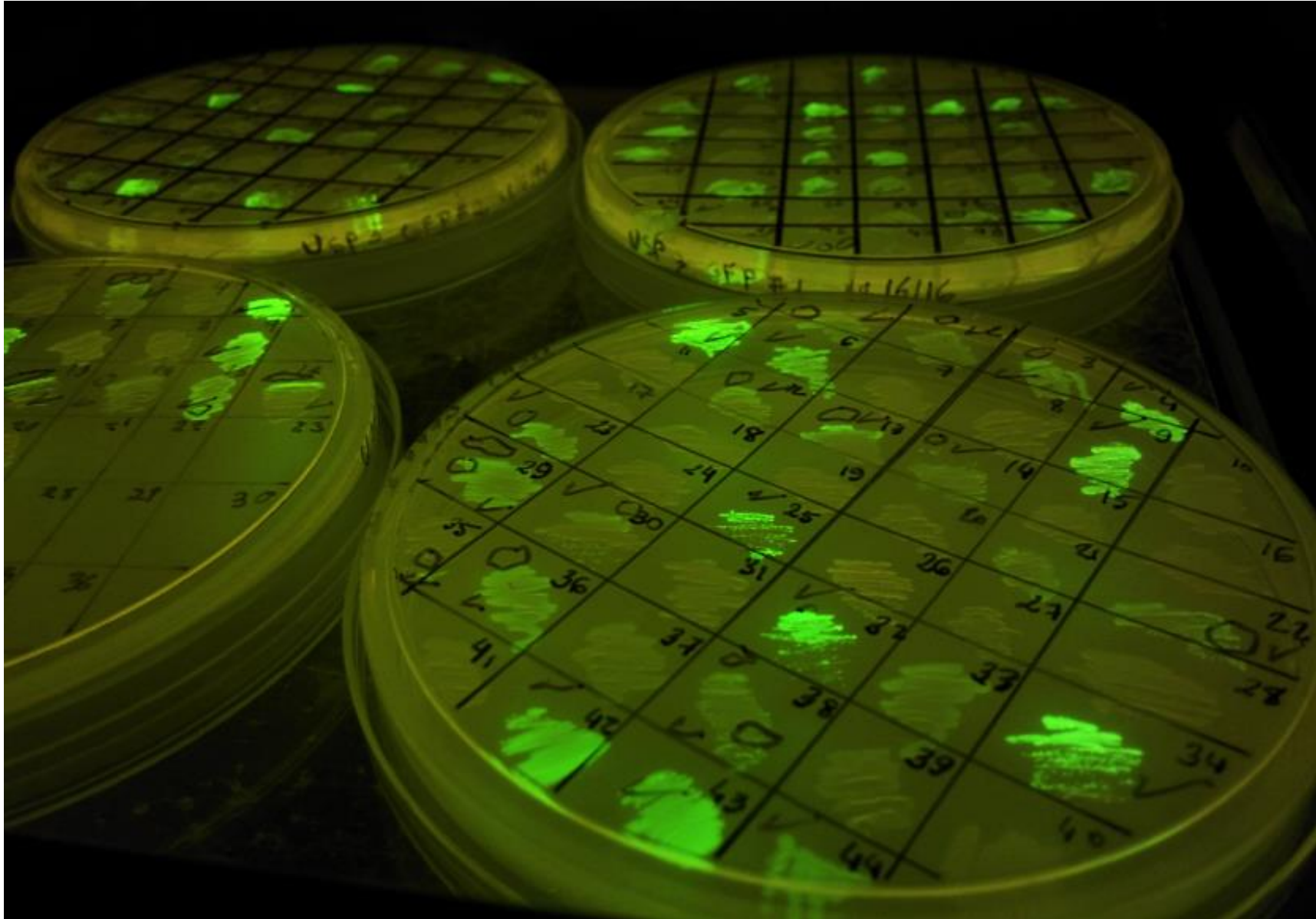


Isolation of clones

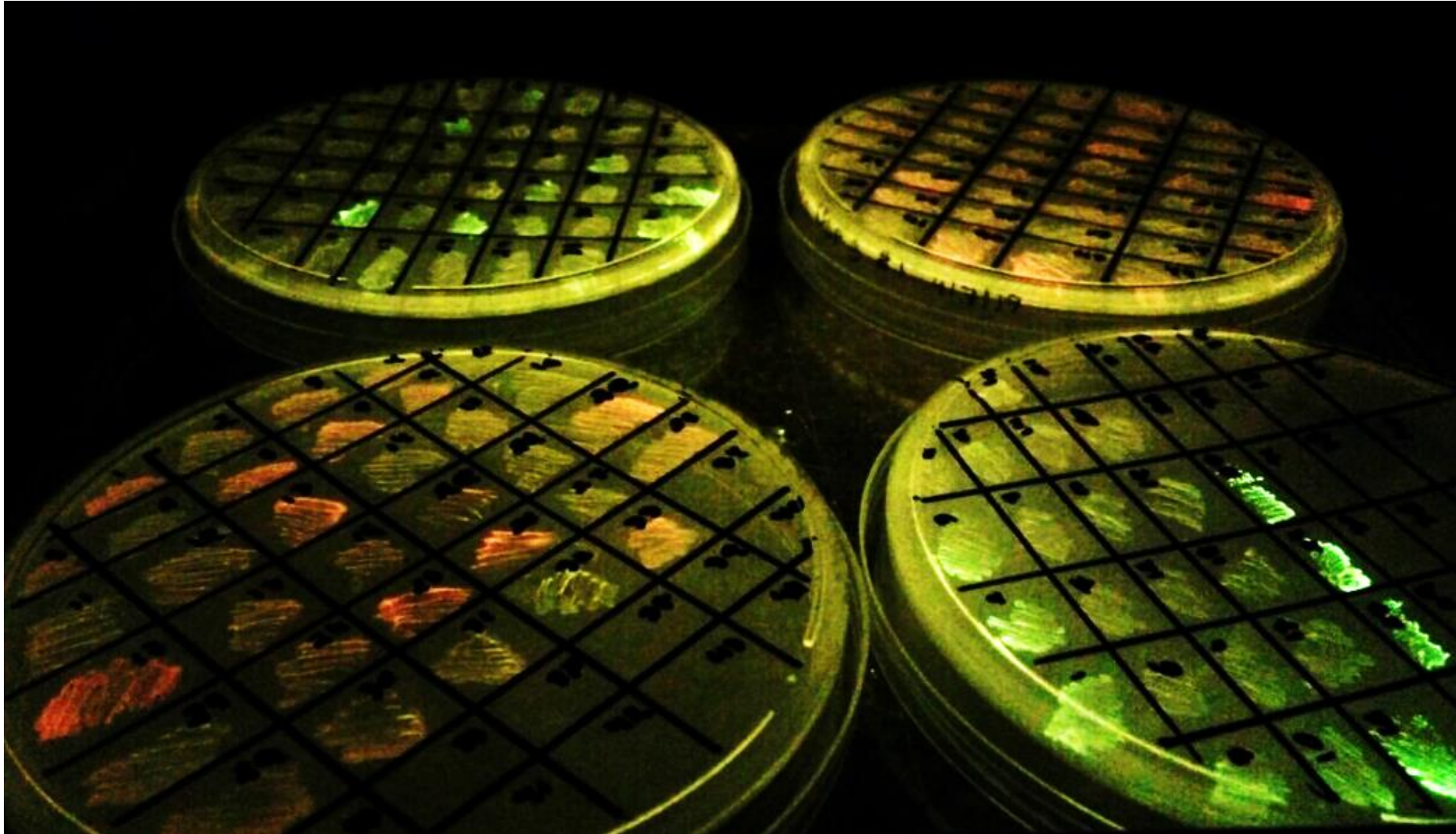


VictorX3 analysis of 260 clones

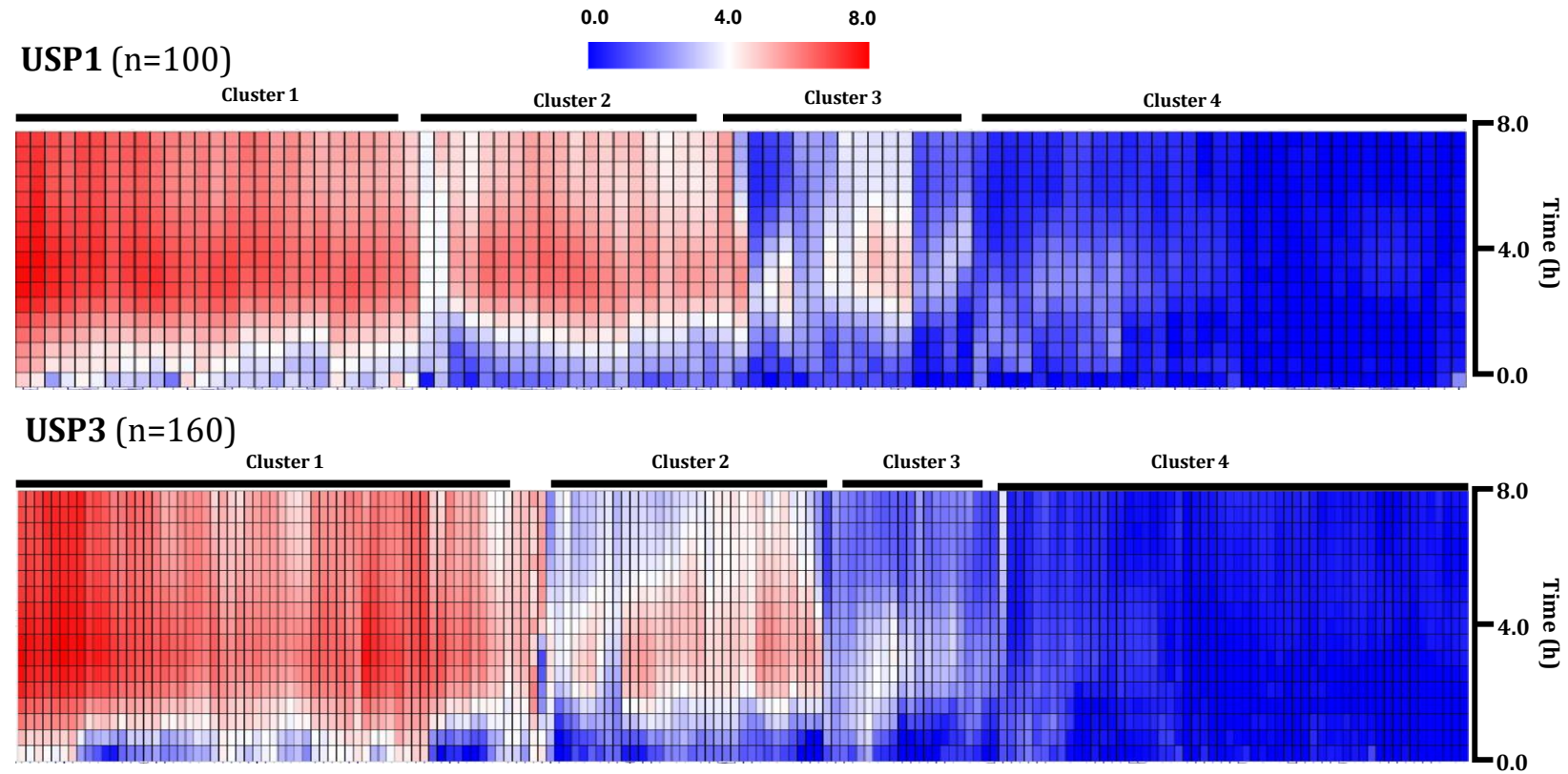
# Exemplos de metagenômica funcional aplicada



# Exemplos de metagenômica funcional aplicada



# Exemplos de metagenômica funcional aplicada



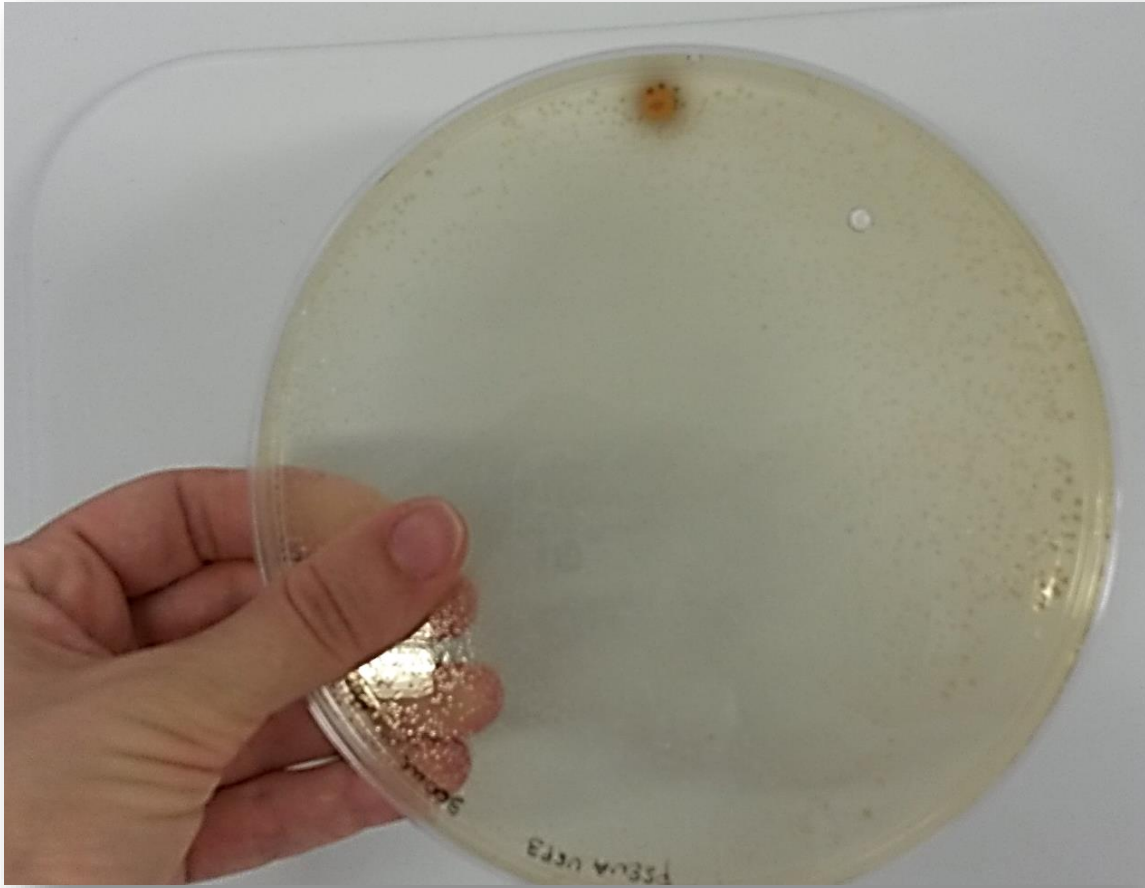


## **Novel Ethanol- and 5-Hydroxymethyl Furfural-Stimulated $\beta$ -Glucosidase Retrieved From a Brazilian Secondary Atlantic Forest Soil Metagenome**

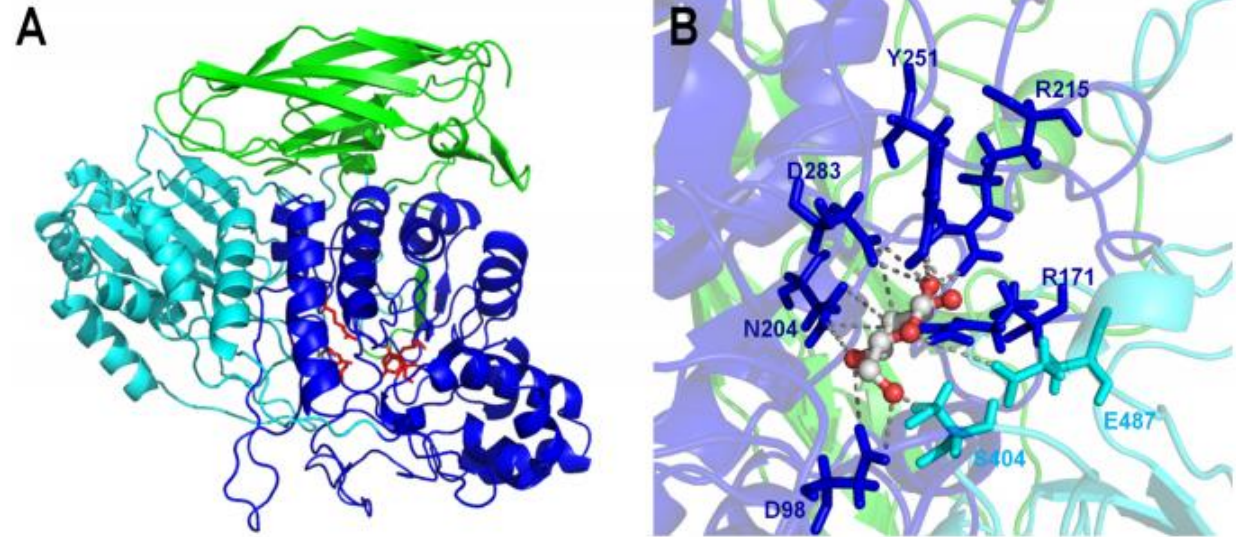
*Luana de Fátima Alves<sup>1</sup>, Luana Parras Meleiro<sup>2</sup>, Roberto N. Silva<sup>1</sup>, Cauã Antunes Westmann<sup>3</sup> and Maria-Eugenia Guazzaroni<sup>4\*</sup>*



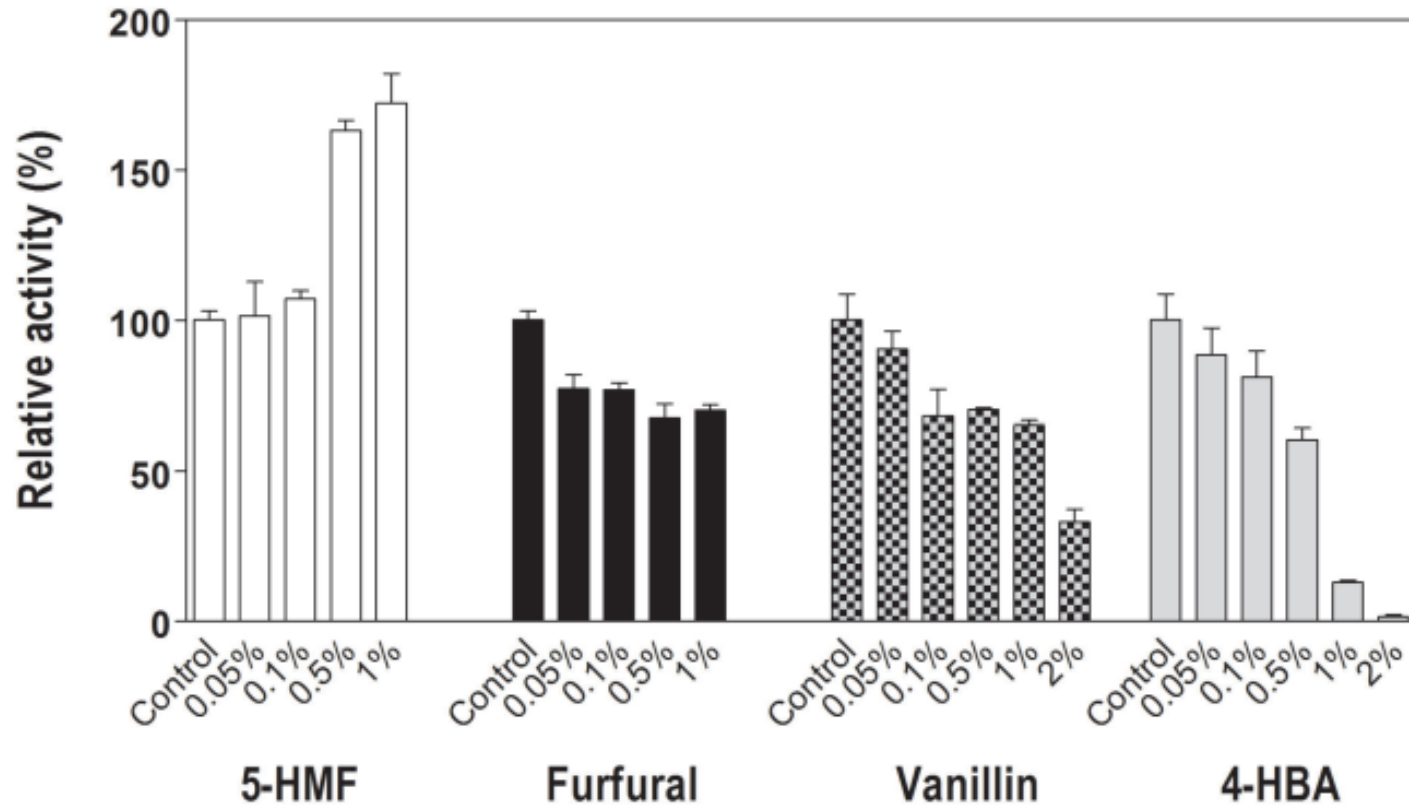
# Exemplos de metagenômica funcional aplicada



*Screening* na presença de esculina



# Exemplos de metagenômica funcional aplicada



Enzima tolerante ao 5-HMF

Processos industriais

Potencial da Metagenômica

# CONCLUSÕES

1. O estudo do material genético de micro-organismos que não podem ser cultivados em laboratório é um recurso de extrema relevância para prospecção de genes de interesse biotecnológico;
2. A metagenômica é análoga à Genômica, porém a diferença entre elas reside na abrangência de sequências a serem caracterizadas em relação à totalidade microbiana de uma amostra;
3. A metagenômica funcional possibilita a busca de partes biológicas (enzimas, promotores, terminadores) para novas aplicações industriais;
4. A busca pelo material genético de interesse deve sempre estar delineada com base no possível sítio de extração (ex.: enzimas e pH ácido);
5. O tipo de método de extração de DNA, a qualidade de amostra, o vetor a ser empregado e o sistema de *screening* são fundamentais para uma seleção precisa e robusta.

**Obrigado!**

Leonardo Santana

Biochemistry PhD Student

[leonardosantana@usp.br](mailto:leonardosantana@usp.br)

**EXERCÍCIO**  
**AULA: 24/09/2019**

## **Atividade avaliativa**

Leitura crítica e desenvolvimento criativo de uma inovação descrita em um artigo científico

1. Apresentação da ideia central do artigo
2. Metodologia empregada (vantagens e desvantagens)
3. Principais resultados obtidos
4. Criação de um “produto” biotecnológico baseado nos resultados obtidos (usar a criatividade e senso crítico-científico)

**Apresentação - máximo 15 minutos**

## Expanding the Toolbox of Broad Host-Range Transcriptional Terminators for Proteobacteria through Metagenomics

Vanesa Amarelle,<sup>†,§,#</sup> Ananda Sanches-Medeiros,<sup>‡,#</sup> Rafael Silva-Rocha,<sup>‡</sup>   
and María-Eugenia Guazzaroni<sup>\*,§</sup> 

<sup>†</sup>Department of Microbial Biochemistry and Genomics, Biological Research Institute Clemente Estable, 11600 Montevideo, Uruguay

<sup>‡</sup>FMRP, University of São Paulo, 14049-901 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

<sup>§</sup>FFCLRP, University of São Paulo, 14049-901 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

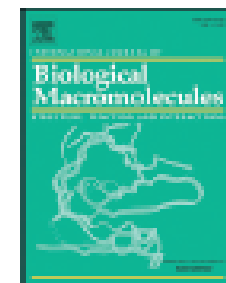


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>



### Biochemical characterization and application of a new lipase and its cognate foldase obtained from a metagenomic library derived from fat-contaminated soil

Janaina Marques Almeida <sup>a</sup>, Viviane Paula Martini <sup>b</sup>, Jorge Iulek <sup>c</sup>, Robson Carlos Alnoch <sup>a</sup>,  
Vivian Rotuno Moure <sup>a</sup>, Marcelo Müller-Santos <sup>a</sup>, Emanuel Maltempi Souza <sup>a</sup>,  
David Alexander Mitchell <sup>a</sup>, Nadia Krieger <sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Cx. P. 19046, Centro Politécnico, Curitiba 81531-980, Paraná, Brazil

<sup>b</sup> Instituto Federal do Paraná, Campus Irati, Irati 84500-000, Paraná, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, Ponta Grossa 84030-900, Paraná, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Cx. P. 19032, Centro Politécnico, Curitiba 81531-980, Paraná, Brazil





# PAPER 3



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

## Environment International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/envint](http://www.elsevier.com/locate/envint)



### Functional metagenomics reveals a novel carbapenem-hydrolyzing mobile beta-lactamase from Indian river sediments contaminated with antibiotic production waste



Nachiket P. Marathe<sup>a,b,1</sup>, Anders Janzon<sup>b,1</sup>, Stathis D. Kotsakis<sup>a,b</sup>, Carl-Fredrik Flach<sup>a,b</sup>,  
Mohammad Razavi<sup>a,b</sup>, Fanny Berglund<sup>a,c</sup>, Erik Kristiansson<sup>a,c</sup>, D. G. Joakim Larsson<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Centre for Antibiotic Resistance Research (CARe) at University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden

<sup>b</sup> Department of Infectious Diseases, Institute of Biomedicine, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, SE-413 46 Gothenburg, Sweden

<sup>c</sup> Department of Mathematical Sciences, Chalmers University of Technology and University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

**Biochemical and structural  
characterization of a novel  
halotolerant cellulase from soil  
metagenome**

Received: 16 June 2016

Accepted: 25 November 2016

Published: 23 December 2016

Roma Garg<sup>\*</sup>, Ritika Srivastava<sup>\*</sup>, Vijaya Brahma<sup>†</sup>, Lata Verma, Subramanian Karthikeyan & Girish Sahni