



Cristina Isabel da Silva Martins

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E SÍNTESE DE GLUCOSILGLICERATO EM *STREPTACIDIPHILUS JIANGXIENSIS* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE STRESS

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, realizada sob orientação científica do Doutor Nuno Miguel da Silva Empadinhas e co-orientação da Doutora Gabriela Jorge da Silva, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Cristina Isabel da Silva Martins

Avaliação do potencial antimicrobiano e síntese de
glucosilglicerato em *Streptacidiphilus jiangxiensis*
sob diferentes condições de stress

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica,
realizada sob orientação científica do Doutor Nuno Miguel da Silva Empadinhas e co-orientação da Doutora Gabriela Jorge da Silva,
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Imagem de capa:

Ilustração de escultura em bronze representando o filo Actinobacteria. Autoria: *Sharon Bladholm Fine Art*, Chicago, Illinois, EUA, <http://www.sharonbladholm.com/soilcreatures.html>.

Cover image:

Illustration of a bronze sculpture representative of the Actinobacteria phylum. Authors: *Sharon Bladholm Fine Art*, Chicago, Illinois, USA, <http://www.sharonbladholm.com/soilcreatures.html>.

Agradecimentos

Ao Doutor Nuno Empadinhas por me ter aceite no grupo Micobacteriologia Molecular do CNC (projeto UID/NEU/04539/2013) e orientado o meu trabalho, encontrando-se sempre disponível no esclarecimento de dúvidas e partilha de conhecimentos importantes e relevantes à elaboração do trabalho.

À Professora Doutora Gabriela Silva por assumir a responsabilidade pela tese na FFUC, permitindo acesso absoluto ao seu laboratório e pelos estímulos, indicações e partilha de saberes ao longo de todo o trabalho.

À Ana Maranha por todos os ensinamentos e preciosas indicações na elaboração de todo o trabalho. À Mafalda pela paciência e por todas as folhas dispensadas nos esquemas (e ainda foram algumas) de forma a fazer-me compreender e auxiliar nas minhas dúvidas, mas principalmente pela amizade que desenvolvemos neste percurso. À Susana pelas mensagens de incentivo e constante disponibilidade em me ajudar.

À minha colega e amiga Ana Monteiro que estivemos juntas nesta aventura e em outras ao longo destes 5 anos e a todos os restantes elementos de laboratório, Rita, Daniela, Adele e Diogo pelo companheirismo e espírito de entreatajuda.

Aos meus pais e irmão por todo o apoio e dedicação absolutos ao longo de todo este percurso académico.

À minha colega de casa e amiga Anabela Rodrigues (que muitas foram as vezes que foi confundida como minha irmã) pelo seu apoio que foi essencial nesta minha estadia em Coimbra.

A um grande amigo, Maike Calvão pelo apoio e paciência, tendo sempre as palavras certas de incentivo para não desistir... não esquecendo o empréstimo forçado do computador que consegui que não se avariase!!!

A todos os que contribuíram de forma direta ou indireta para que a realização deste trabalho se tornasse possível.

A todos, o meu muito obrigado!

ÍNDICE

Resumo	7
Abstract	9
Lista de abreviaturas	11
Capítulo 1 – Introdução	12
1.1. Antibióticos.....	13
1.1.1. Resistência a antibióticos.....	14
1.1.2. Descoberta de antibióticos e metabolitos úteis em bactérias ambientais	16
1.2. A ordem <i>Actinomycetales</i>	17
1.2.1. A família <i>Streptomycetaceae</i>	18
1.2.1.1. <i>Streptacidiphilus jiangxiensis</i>	18
1.3. Acumulação de solutos compatíveis	18
1.4. Biossíntese de glucosilglicerato (GG)	20
1.5. Glucosil-3-fosfoglicerato sintase (GpgS) e síntese de GG	20
1.6. Objetivos.....	22
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	23
Secção 1: Estudo <i>in vitro</i> do potencial antimicrobiano de <i>Streptacidiphilus jiangxiensis</i>	24
2.1. Curvas de crescimento de <i>S. jiangxiensis</i>	24
2.2. Seleção dos microrganismos.....	25
2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de <i>S. jiangxiensis</i>	26
2.3.1. Método de difusão em disco.....	26
2.4. Estudos de competição de <i>S. jiangxiensis</i>	26
2.4.1. Método de co-cultura em placa	27
2.4.2. Método de repicagem em placa	28

Secção II: Identificação e caracterização bioquímica da glucosil-3-fosfoglicerato sintase (GpgS) de <i>Streptacidiphilus jiangxiensis</i>	29
2.1. Condições de crescimento bacteriano e extração do DNA.....	29
2.2. Identificação do gene para a glucosil-3-fosfoglicerato sintase (GpgS) de <i>S. jiangxiensis</i>	29
2.3. Amplificação, clonagem e expressão funcional do GpgS.....	29
2.3.1. Amplificação por PCR.....	29
2.3.2. Clonagem e Transformação em <i>Escherichia coli</i> BL21 Star.....	30
2.3.3. Expressão do gene <i>gpgS</i>	31
2.4. Purificação da GpgS recombinante.....	31
2.5. Ensaio enzimáticos e especificidade de substrato	32
2.6. Caracterização bioquímica e cinética da GpgS recombinante.....	32
2.7. Extração e identificação de solutos orgânicos em <i>S. jiangxiensis</i>	34
Capítulo 3 – Resultados	36
Secção I: Avaliação de propriedades antimicrobianas de extratos e estudos de competição de <i>S. jiangxiensis in vitro</i>	37
3.1. Curvas de crescimento de <i>S. jiangxiensis</i> sob diferentes condições de stress	37
3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de <i>S. jiangxiensis</i>	39
3.2.1. Método de difusão em disco.....	39
3.3. Estudos de competição de <i>S. jiangxiensis</i>	39
3.3.1. Método de co-cultura em placa	39
i) Método I	39
ii) Método II	41
3.3.2. Método de repicagem em placa	42
Secção II: Identificação e caracterização bioquímica da glucosil-3-fosfoglicerato sintase (GpgS) de <i>Streptacidiphilus jiangxiensis</i>	43
3.1. Expressão e purificação da GpgS recombinante de <i>S. jiangxiensis</i>	43
3.2. Especificidade de substratos da GpgS.....	45
3.3. Caracterização bioquímica da GpgS.....	47

3.3.1. Perfis de temperatura e pH	48
3.3.2. Dependência de iões mono e divalentes	49
3.3.3. Concentração de substratos.....	51
3.3.4. Parâmetros cinéticos da atividade da GpgS.....	53
3.4. Extração e identificação de solutos orgânicos em <i>S. jiangxiensis</i>	54
Capítulo 4 – Discussão.....	57
Capítulo 5 – Conclusão.....	64
Bibliografia.....	65
Anexos I – Protocolos e Soluções.....	73
Anexos II – Esquemas	81

Resumo

Os antibióticos tiveram uma enorme relevância na modernização da medicina, sendo hoje difícil imaginar a prática da medicina sem eles. Contudo, a resistência a estes compostos antimicrobianos tornou-se um problema de saúde pública que ameaça o controlo das doenças infecciosas bacterianas.

A descoberta sistemática de antibióticos deveu-se a estudos de análise da atividade antimicrobiana de culturas de organismos de solos, tais como fungos (p. ex. do género *Penicillium*) e bactérias (p. ex. do género *Streptomyces*), importantes produtores de antibióticos (Arias & Murray, 2015; Ikeda et al., 1999). Sendo os antibióticos “armas” químicas utilizadas por microrganismos para a sua defesa, estes metabolitos secundários são muitas vezes produzidos em condições específicas de stress (Rutledge & Challis, 2015). A produção de certos metabolitos como o soluto orgânico glucosilglicerato (GG) está também relacionado com determinadas condições de stress, nomeadamente limitação de azoto ou stress osmótico, sendo que, nas micobactérias, este metabolito seja o precursor essencial de um lipopolissacárido de metilglucose implicado na resposta a stress térmico (Kaur et al., 2009). Nestas condições a via biossintética de GG, liderada pela enzima responsável pelo primeiro passo de síntese deste metabolito (GpgS), pode também estar ativa.

Algumas actinobactérias contêm no seu genoma um operão raro que inclui genes com homologia com outros envolvidos na biossíntese de antibióticos. Um dos objetivos deste trabalho visa uma avaliação preliminar de potenciais propriedades antimicrobianas de *Streptacidiphilus jiangxiensis* isolado de solo (Huang et al., 2004), através de estudos experimentais de competição inter-específica (co-culturas bactéria-bactéria e bactéria-fungo) em condições definidas e exposição de bactérias tipo selecionadas a extratos de *S. jiangxiensis*. Um segundo objectivo deste trabalho é a caracterização da atividade da glucosil-3-fosfoglicerato sintase (GpgS) de *S. jiangxiensis*, uma enzima envolvida na síntese de GG cuja função em alguns microrganismos está associada à resposta a diferentes tipos de stress (Empadinhas & Da Costa, 2011).

Neste trabalho foi clonado o gene que codifica a GpgS de *S. jiangxiensis* e a enzima recombinante responsável pela produção de GPG, o metabolito intermediário do soluto GG, foi produzida, purificada e as suas propriedades determinadas, permitindo concluir que é uma GpgS típica de actinobactérias. Nas condições de stress testadas não foi detetada a acumulação de GG por *S. jiangxiensis*. Os ensaios para avaliação do potencial antimicrobiano de *S.*

jiangxiensis nas condições testadas não confirmaram a hipótese, possivelmente devido ao número insuficiente de parâmetros de crescimentos selecionados e condições de stress testadas.

A elucidação da fisiologia e metabolismo de microrganismos pouco explorados como *Streptacidiphilus jiangxiensis*, especialmente das vias de produção de metabolitos secundários de interesse biomédico, pode contribuir para o combate a doenças infecciosas, de relevância acrescida num momento em que a Humanidade enfrenta um aumento significativo de fenómenos de resistência aos antibióticos disponíveis.

Palavras-chave: *Streptacidiphilus jiangxiensis*, antibióticos, stress, metabolitos secundários, glucosil-3-fosfoglicerato sintase (GpgS), glucosilglicerato (GG).

Abstract

Antibiotics had an important impact in the modernization of medicine and it is difficult to imagine medicine without them. However, resistance to these antimicrobial compounds has become a global health hazard endangering the control of bacterial infectious diseases.

Systematic analytical studies of the antimicrobial activity of soil organisms allowed the discovery of antibiotics produced by fungi (p. ex. the genus *Penicillium*) and bacteria (such as *Streptomyces* genus), which are important antibiotic producers (Arias & Murray, 2015; Ikeda et al. 1999). *In vivo*, antibiotics are chemicals used as a defense mechanisms and these metabolites are often produced in specific stress conditions (Rutledge & Challis, 2015). The production of certain secondary metabolites, such as the organic solute glucosylglycerate (GG), is also related to stress conditions, in particular nitrogen limitation or osmotic stress, in mycobacteria this metabolite is also the primer for a lipopolysaccharide methylglucose which has been linked to thermal stress endurance (Alarico et al., 2014). In these conditions the enzyme responsible for the first step of this metabolite synthesis (GpgS) should also be active.

Some actinobacteria contain in their genome a rare operon that includes homologs to genes involved in antibiotic biosynthesis. This work aims at a preliminary assessment of the potential antimicrobial properties of *Streptacidiphilus jiangxiensis* isolated from soil (Huang et al., 2004), by conducting inter-specific competition studies (bacteria-bacteria and bacteria-fungi), by generating co-cultures under defined conditions and exposing selected bacteria to *S. jiangxiensis* extracts. One other objective of this study is to characterize the activity of glycosyl-3-phosphoglycerate synthase (GpgS) of *S. jiangxiensis*, an enzyme involved in stress resistance pathways in some organisms (Empadinhas & Da Costa, 2011).

In this work, we cloned the gene codifying for GpgS of *S. jiangxiensis*, the recombinant enzyme responsible for the production of GPG, the intermediate metabolite in GG's synthetic route. The enzyme was produced, purified and its properties determined leading to the conclusion that it is a typical actinobacterial GpgS. However, under the tested stress conditions *S. jiangxiensis* does not accumulate GG. Under the tested conditions, the evaluation assays of the *S. jiangxiensis* antimicrobial properties did not confirm the hypothesis posed above, possibly due to the insufficient number of growth parameters and stress conditions analyzed.

Elucidating the physiology and metabolism of underexplored microorganisms such as *Streptacidiphilus jiangxiensis*, especially the production pathways of secondary metabolites of biomedical interest, may contribute to combating relevant infectious diseases especially now that humanity is facing a rising surge in the menacing phenomena of antibiotic resistance.

Keywords: *Streptacidiphilus jiangxiensis*, antibiotics, secondary metabolites, glucosyl-3-phosphoglycerate synthase (GpgS), glucosylglycerate (GG).

Lista de abreviaturas

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

BTP - bis-tris propano

CDC - centros de controlo e prevenção de doenças

D.O. - densidade ótica

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

FPLC - cromatografia líquida rápida de proteínas

GG - glucosilglicerato

GPG – glucosil-3-fosfoglicerato

GpgP - glucosil-3-fosfoglicerato fosfatase

GpgS - glucosil-3-fosfoglicerato sintase

HIV - vírus da imunodeficiência humana

MG - manosilglicerato

MGLP - lipopolissacárido de metilglucose

NADH - nicotinamida adenina- β dinucleótido

RMN - ressonância magnética nuclear

OMS - organização mundial de saúde

PCR - reação de polimerização em cadeia

PEP - fosfoenolpiruvato

3-PGA - ácido 3-fosfoglicérico ou 3-fosfoglicerato

SDS-PAGE - electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio

SIDA - síndrome de imunodeficiência adquirida

TLC - cromatografia em camada fina

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1.1. Antibióticos

Durante séculos, doenças infecciosas como a peste bubônica e a tuberculose dizimaram populações sem que a medicina possuísse armas para as combater. Os primeiros avanços no combate a estas doenças surgiram no século XIX com a identificação dos seus agentes etiológicos e o seu modo de transmissão. Posteriormente, a descoberta e introdução de compostos antibacterianos no início do século XX revolucionou a medicina e trouxe uma nova perspectiva terapêutica (Arias & Murray, 2015; Fleitas & Franco, 2016).

Um dos maiores marcos no tratamento de infecções bacterianas foi alcançado com a descoberta da penicilina em 1928 pelo médico e bacteriologista Alexander Fleming. A penicilina é um composto natural produzido por um fungo (género *Penicillium*), que foi isolado após o médico britânico ter descoberto que o crescimento bacteriano numa placa de petri era inibido por este fungo. Uma outra personalidade, Paul Ehrlich, considerado o fundador da antibioterapia devido à sua crença no conceito de “*therapia sterilisans magna*” (“terapia esterilizadora magna” ou “magic bullet” como hoje é conhecido), um composto que tivesse como alvo apenas micróbios patogénicos e não o seu hospedeiro. A sua abordagem metodológica na descoberta de um fármaco contra sífilis marcou o início da era moderna dos antibióticos. Estas descobertas e a introdução com sucesso da penicilina no início da década de 40, após anos de investigação e tentativas de produção em larga escala, influenciaram uma nova frente de pesquisas de antibióticos, muitos dos quais derivados de fungos e actinobactérias (Zhu et al., 2014; Tenover 2006).

Os antibióticos são, então, compostos naturais ou sintéticos com a capacidade de inibir ou destruir os processos vitais das bactérias, sem exibirem efeitos tóxicos consideráveis para o Homem e animal. Podem ser classificados como bactericidas, quando originam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento bacteriano (Guimarães et al., 2010; Keskar & Jugade, 2015).

Atualmente, os antibióticos encontram-se entre os medicamentos mais relevantes para a medicina moderna que permitem combater bactérias patogénicas e, conseqüentemente, procedimentos tão triviais como uma apendicectomia. No entanto, a velocidade alarmante a que se têm desenvolvido mecanismos de resistência constitui uma das principais ameaças à saúde pública do século XXI (Arias & Murray, 2015; Martinez, 2009).

Durante a era dourada da introdução de antibióticos (1940-1980) pensou-se que a luta contra as bactérias patogénicas estava ganha. No entanto, o aumento da taxa de resistência aos antibióticos disponíveis e a diminuição na introdução de novos antibióticos no mercado

tornam as doenças infecciosas uma ameaça crescente. Doenças como a tuberculose, têm impacto mundial e têm provocado números consideráveis de morbidade e mortalidade humana ao longo de séculos (Larson, 2007; Tenover, 2006). Embora a comunidade científica esteja empenhada na erradicação desta e de outras doenças, dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstram que este objetivo ainda está longe de ser alcançado (Fallis, 2013).

1.1.1. Resistência a antibióticos

Atualmente, as doenças infecciosas são a segunda maior causa de morte no Mundo e a terceira em países desenvolvidos, sendo que o aumento da resistência a compostos antimicrobianos é uma ameaça ao tratamento e prevenção das infecções causadas por bactérias, parasitas e fungos (Ventola, 2015). Os Centros para o Controle e Prevenção de Doenças nos Estados Unidos da América (“Centers for Disease Control and Prevention”, CDC) estimam que no ano passado 23.000 mortes nos EUA tenham sido causa direta de resistências a compostos antimicrobianos. Muitas infecções que foram, num passado recente, consideradas de fácil tratamento, como por exemplo infecções urinárias, são hoje difíceis de tratar devido à crescente resistência bacteriana aos antibióticos. Doenças como a tuberculose que nos anos 1980 se pensava estar à beira da erradicação ressurgem perigosamente na forma de estirpes resistentes a múltiplos antibióticos, estimulada pela interação com um sistema imunitário debilitado por fatores como SIDA ou diabetes (Von Nussbaum et al., 2006; Zumla et al. 2013).

Os microrganismos encontram-se entre os seres vivos mais diversos e adaptáveis do planeta. Enquanto a descoberta humana dos antibióticos remonta ao séc. XX, estes são armas naturais utilizadas por bactérias e fungos há mais de 2 mil milhões de anos, o que levou a que se desenvolvessem mecanismos de defesa contra estes compostos, isto é, mecanismos de resistência (Spellberg et al., 2013). Assim, a resistência a antibióticos é um processo natural que dificulta o uso terapêutico dos antibióticos.

A penicilina foi descoberta em 1928 e introduzida para uso terapêutico generalizado em 1942/43. No entanto, em 1929 já tinham sido identificados organismos naturalmente resistentes a este antibiótico (Fleming, 1929) e em 1942 surgem os primeiros casos de *Staphylococcus* sp. resistentes (Rammelkamp & Maxon, 1942; Ventola, 2015). Desde então, a influência humana no processo de utilização de antibióticos afetou bastante a taxa de emergência de resistência a estes compostos (Davies & Davies, 2010).

O desenvolvimento da resistência antimicrobiana compreende mecanismos que são divididos em duas categorias principais: a resistência intrínseca que é desenvolvida por mecanismos dos próprios microrganismos que inibem a eficácia dos agentes antimicrobianos, e a resistência adquirida que corresponde a uma constante e recente evolução dos microrganismos resultante de mutações que lhes concedem novas aptidões de forma a suportar os efeitos dos antibióticos (Martinez, 2009; Sandoval-Motta & Aldana, 2016).

A resistência adquirida é um problema sensível e que mais preocupa a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma vez que é um fenómeno complexo e multifatorial que ocorre no contexto da comunidade microbiana motivado por diversos fatores, destacando-se o uso exagerado e incorreto de compostos antimicrobianos e desinfetantes na agricultura, na veterinária e, especialmente, na medicina humana (Fleitas et al., 2016; Linhares et al., 2015). Como tal, torna-se fundamental compreender os mecanismos genéticos e bioquímicos envolvidos no desenvolvimento dessa resistência, de modo a tentar evitar que ela possa surgir.

A OMS considera o aumento da resistência a antibióticos um dos maiores desafios contemporâneos para a saúde pública e em 2013-2014 organizou um programa de vigilância à resistência microbiana. Concluíram que é urgente adotar medidas de controlo e prevenção da disseminação de microrganismos resistentes, através da implementação de normas para a utilização racional do consumo de antibióticos, para conter o crescente consumo, muitas vezes injustificado, destes fármacos. Denotam também a necessidade de reduzir a incidência de infeções através do melhoramento e cumprimento de medidas de controlo de infeção, bem como, encorajando a administração e o desenvolvimento de vacinas (Guimarães et al., 2010). O plano de ação passa também por um aumento da sensibilização da comunidade civil, médica e veterinária para o problema e a criação de programas de vigilância mais alargada.

Uma vez que a resistência é um fenómeno natural evolutivo dos microrganismos, este problema poderá ser circunscrito, mas não eliminado. Como tal serão sempre necessários novos antibióticos e novas estratégias de combate a infeções.

1.1.2. Descoberta de antibióticos e metabolitos úteis em bactérias ambientais

A problemática da resistência antimicrobiana torna-se, assim, um desafio importante, sendo essencial uma procura contínua de novos antibióticos

Historicamente, os compostos naturais têm sido privilegiados como fonte de compostos antimicrobianos. No entanto, antibióticos derivados de produtos naturais são produtos quimicamente complexos, cuja purificação e caracterização são processos demorados e com grandes custos associados e a prática foi gradualmente abandonada a favor dos mais promissores produtos sintéticos (Brown & Wright, 2016). Com o avançar da química orgânica no final do século XIX começaram a ser geradas estruturas sintéticas, tantas quanto possível, com o objetivo de se obterem compostos bioativos. Nos anos 60 surge o “rational drug design”, processo em que uma molécula inibidora é desenhada especialmente direcionada a um alvo (Brown & Wright, 2016). Apesar dos esforços alcançados na produção de compostos sintéticos bioativos nos últimos anos, a crise da resistência antimicrobiana conjugada com a crise da introdução de novos antibióticos está a encorajar um regresso à investigação em derivados de produtos naturais, e a atenção tem-se centrado especialmente em ambientes naturais ainda pouco explorados, particularmente aqueles que apresentam condições ambientais extremas, como temperatura, pH, humidade e/ou luminosidade, sendo considerados fontes promissoras de novos antibióticos e outros compostos bioativos (Becerril-Espinosa et al., 2013; Clardy & Walsh, 2004; Claverías et al., 2015).

Ao longo da história dos antibióticos, muitos são os exemplos de organismos que têm contribuído para a descoberta de novos antibióticos, nomeadamente, microrganismos endofíticos (bactérias e fungos), organismos não patogénicos que vivem no interior de plantas, que em troca de proteção e alimento, produzem metabolitos bioativos de forma a proteger a planta de potenciais herbívoros e patogénicos, demonstrando-se este grupo de microrganismos relevantes e com enorme potencial na produção de metabolitos com diferentes estruturas e funções biológicas (Gunatilaka, 2006).

Tentativas de isolamento de compostos bioativos centram-se não só nos organismos produtores em si, mas em formas de potenciar a produção de compostos antimicrobianos por parte destes microrganismos. Muitos metabolitos especializados encontram-se associados a “clusters” de genes biossintéticos que não são expressos em condições laboratoriais normais, sendo que a introdução de alterações nas condições de crescimento é uma das formas mais utilizadas para promover ou induzir uma modificação na expressão dos genes envolvidos na

produção destes metabolitos (Rutledge & Challis, 2015). Estas alterações incluem modificar variáveis como temperatura de crescimento, pH do meio ou adicionar uma espécie competidora. A análise de genomas microbianos combinada com estes métodos potenciadores de expressão de “clusters” biossintéticos especializados já levaram ao isolamento de novos compostos antimicrobianos como quinolonas, aspernidinas ou clostioamidas (Rutledge & Challis, 2015).

Apesar da comunidade científica explorar esta diversidade microbiana, atualmente o filo *Actinobacteria*, e em particular os actinomicetos da ordem *Actinomycetales*, revelaram-se o grupo mais proeminente de microrganismos produtores de metabolitos secundários, nomeadamente de agentes antimicrobianos e antitumorais, sendo estas bactérias responsáveis por duas das quatro novas classes de antibióticos descobertos nos últimos anos (Claverías et al., 2015).

1.2. A ordem *Actinomycetales*

O filo *Actinobacteria* representa uma das maiores unidades taxonómicas no interior do domínio *Bacteria* e possui um enorme impacto a nível da medicina e indústria (Barka et al., 2016; Doroghazi & Metcalf, 2013).

As actinobactérias são microrganismos plantónicos ou filamentosos Gram-positivos, com alto conteúdo genómico em guanina e citosina (mais de 55%) na composição do seu DNA. Para grande parte destas bactérias (mais de 30%), o seu habitat natural é o solo (como os membros do género *Streptomyces*), distribuindo-se as restantes pelos vários ecossistemas terrestres e aquáticos (marinhos e de água doce) (Barka et al., 2016; Doroghazi & Metcalf, 2013; Ventura et al., 2007). A este grupo de microrganismos pertencem também bactérias patogénicas, como *Mycobacterium tuberculosis* responsável pela tuberculose ou *Corynebacterium diphtheriae* que causa difteria (Barka et al., 2016; Doroghazi & Metcalf, 2013).

As bactérias do género *Streptomyces* caracterizam-se por serem produtores de antibióticos por excelência, tendo sido isolados a partir delas, aproximadamente, dois terços dos antibióticos conhecidos. Constituem também uma fonte promissora de outros metabolitos secundários com potencial aplicação ao nível da indústria farmacêutica (Dhanasekaran et al., 2011; Doroghazi & Metcalf, 2013; Zhu et al., 2014).

1.2.1. A família *Streptomycetaceae*

A família *Streptomycetaceae*, pertencente à ordem *Actinomycetales* e classe *Actinobacteria*, foi descrita por Waksman e Henrici em 1943 e, até hoje, inclui mais de 650 espécies (Glaeser & Kämpfer, 2016). Apresentando morfologia e características celulares diversas, os membros desta família encontram-se adaptados a diferentes habitats e a uma vasta gama de condições ambientais. É constituída por três gêneros: *Kitasatospora*, *Streptomyces* e *Streptacidiphilus* que formam um ramo monofilético estável baseado nas análises de sequência do gene 16S rRNA (Glaeser & Kämpfer, 2016; Kim et al., 2003).

1.2.1.1. *Streptacidiphilus jiangxiensis*

O gênero *Streptacidiphilus* foi adicionado à família *Streptomycetaceae* em 2003 e abrange actinomicetos acidófilos isolados de habitats ácidos, nomeadamente de solos (Glaeser & Kämpfer, 2016; Huang et al., 2004).

Os membros do gênero *Streptacidiphilus* são caracterizados como actinobactérias Gram-positivas aeróbicas, acidófilas (crescimento ótimo próximo de pH 4,5) com metabolismo quimio-organotrófico, apresentando um crescimento filamentososo de hifas com um micélio extensivamente ramificado sobre o substrato e um micélio aéreo que se diferencia em longas cadeias de esporos de superfície lisa (Cho et al., 2008; Huang et al., 2004). Estas actinobactérias são consideradas como potenciais fontes de compostos antifúngicos e antibacterianos, revelando-se essenciais na decomposição da biomassa fúngica nos solos, sendo cada vez mais relevante compreender e esclarecer a biologia destes organismos, novas enzimas e interpretar novas vias metabólicas que possam, conseqüentemente, tornar-se fundamentais na luta contra as doenças infecciosas.

1.3. Acumulação de solutos compatíveis

A maioria dos microrganismos encontra no seu habitat diversos parâmetros físicos e químicos adversos que os obriga a desenvolver vários mecanismos de adaptação, de forma a mobilizar os recursos disponíveis mais apropriados para a sua sobrevivência (Empadinhas et al., 2007; Roeßler & Müller, 2001).

A indisponibilidade de nutrientes, as constantes oscilações de temperatura e pH, bem como de concentração de sal que ocorrem nos solos devido a fenómenos naturais, como a precipitação e a evaporação, são fatores que provocam mudanças drásticas na pressão osmótica ambiental e contra as quais os seres procariotas desenvolveram estratégias, de modo a neutralizar diferenças de stress osmótico que, conseqüentemente, poderiam levar à perda de pressão de turgescência, desidratação e morte celular (Ameur et al., 2011; Empadinhas & Da Costa, 2008; Roeßler & Müller, 2001). Uma das estratégias a que os procariotas recorrem para equilibrar a osmolaridade externa é a acumulação de iões inorgânicos ao nível do citoplasma, nomeadamente de K^+ e Cl^- , tal como se verifica em algumas espécies de arqueias como as *Halobacteria* e as bactérias *Haloanaerobiales* (*Bacteria*) (Ameur et al., 2011; Empadinhas & Da Costa, 2008; Roeßler & Müller, 2001). No entanto, a estratégia mais utilizada pela vasta maioria dos procariotas em resposta ao stress osmótico, é a acumulação ou síntese de solutos compatíveis, sendo estes definidos como moléculas orgânicas de baixo peso molecular, muito solúveis e compatíveis com o metabolismo da célula (Empadinhas & Da Costa, 2011; Lamosa et al., 1998; Roeßler & Müller, 2001). Estes compostos não só podem ser acumulados em altas concentrações sem que ocorra inibição das funções enzimáticas na célula, como apresentam uma enorme versatilidade na estabilização das proteínas sob condições adversas de stress induzidas por temperaturas altas, dessecação, frio, entre outros (Empadinhas & Da Costa, 2011; Faria et al., 2008; Roeßler & Müller, 2001).

Uma grande diversidade de vias metabólicas para a produção de solutos compatíveis já foi identificada, existindo mesmo mais do que uma via para a produção do mesmo soluto. Várias proteínas envolvidas nas vias de produção de solutos compatíveis foram caracterizadas bioquímica e estruturalmente pela sua capacidade de produção de solutos orgânicos compatíveis contra o stress osmótico ou precursores de macromoléculas, como é o exemplo da trealose e do glucosilglicerato (GG), moléculas que em micobactérias são também utilizadas como precursores de compostos imunogénicos da parede micobacteriana ou de um lipopolissacárido envolvido na regulação de síntese de ácidos gordos, respetivamente (Ameur et al., 2011; Empadinhas & Da Costa, 2008, Empadinhas & Da Costa, 2011; Mendes et al., 2012). Assim, torna-se fundamental estudar a função destes compostos em microrganismos ainda pouco explorados e com potencial relevância biomédica, como *Streptacidiphilus jiangxiensis*, analisando o seu papel biológico em resposta a condições de stress e o envolvimento em potenciais novas vias metabólicas.

1.4. Biossíntese de glucosilglicerato (GG)

O glucosilglicerato (GG) é uma molécula versátil existindo como soluto livre tanto em bactérias como em arqueias, que é acumulado em adaptação dos organismos a situações impostas por stress osmótico e outras de limitações nutricionais específicas (Alarico et al., 2014; Empadinhas et al., 2008; Empadinhas & Da Costa, 2011; Kumar et al., 2014).

O glucosilglicerato (GG) foi inicialmente identificado em *Mycobacterium phlei* no terminal redutor de um lipopolissacárido metilado proposto como regulador da síntese de ácidos gordos e denominado MGLP (“methylglucose lipopolysaccharide”) (Saier, 1968). Mais tarde, foi identificado na forma livre em extratos de *Mycobacterium smegmatis*, sendo proposto como o precursor para a biossíntese de MGLP (Kamisango et al., 1987). Apesar do seu papel como soluto compatível ter sido inicialmente difícil de esclarecer, a primeira pista surgiu com o isolamento de GG na forma livre numa cianobactéria do género *Synechococcus* crescida em condições de limitação severa de azoto (Klähn et al., 2010). Após estudos em vários organismos concluiu-se que o GG tem um papel na osmorregulação em condições específicas, nomeadamente em ambientes ricos em sal e pobres em azoto (Empadinhas & Da Costa, 2011). Foi também demonstrado que *M. smegmatis* e *M. hassiacum* acumulam GG em condições limitantes de azoto, mas isosmóticas (Alarico et al., 2014). Em actinobactérias, o GG aparenta ter múltiplas funções: (i) atua como precursor de moléculas mais complexas, como é o caso de MGLP em micobactérias e algumas bactérias do género *Nocardia*, onde GG também parece ser o principal constituinte do terminal polar de um glicolípido; e (ii) acumula como resposta a condições limitantes de azoto, ou no caso particular de duas espécies do género *Streptomyces*, nomeadamente *S. caelestis* e *S. lincolnensis*, em resposta a alterações de osmoregularidade (Empadinhas & Da Costa, 2011) (Anexo II, Esquema A).

Devido à diversidade funcional do GG em actinobactérias, o seu envolvimento nas diversas vias metabólicas em que intervém constitui matéria para futura investigação (Alarico et al., 2014).

1.5. Glucosil-3-fosfoglicerato sintase (GpgS) e síntese de GG

Os genes para a enzima glucosil-3-fosfoglicerato sintase (GpgS) encontram-se espalhados pelos genomas procarióticos e existem exemplos de diversas GpgSs tanto de bactérias como arqueias já caracterizadas (Fig. 1) (Costa et al., 2006; Costa et al., 2007; Cunha et al., 2013; Fernandes et al., 2010; Klähn et al., 2010). No entanto, apesar de similaridade de

1.6. Objetivos

A crescente resistência a compostos antimicrobianos associada à reduzida introdução de novos antibióticos no mercado é um problema de saúde pública que ameaça os avanços da medicina moderna. Se a atual tendência não for contrariada, num futuro próximo as conquistas médicas como transplantes e tratamentos de quimioterapia, que debilitam o sistema imunitário, deixarão de ser possíveis e simples infecções voltarão a ser potenciais sentenças de morte. Este cenário demonstra a necessidade urgente no desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos.

Os microrganismos para competirem no seu habitat natural produzem metabolitos secundários com potencial para serem utilizados como antifúngicos, antivirais, antitumorais, e, especialmente, antibióticos. As bactérias do solo são consideradas especialmente dotadas na produção destes metabolitos e ao longo da história dos antibióticos estas bactérias têm sido alvo de especial atenção na busca por estes metabolitos. Outros metabolitos produzidos por microrganismos em certas condições de stress, que por vezes estão também associadas à produção de antibióticos, são os solutos compatíveis, moléculas de baixo peso molecular cuja acumulação não interfere com o metabolismo celular e que permite a adaptação a ambientes adversos, nomeadamente através da estabilização de proteínas.

Os objetivos deste trabalho são: 1) estudo do potencial antimicrobiano de uma actinobactéria acidófila do solo recentemente descrita (*Streptacidiphilus jiangxiensis*), através de processos de detecção de actividade antimicrobiana e indução por condições de stress e competição com outros microrganismos; 2) análise da potencial acumulação de glucosilglicerato (GG), um soluto orgânico importante em actinobactérias expostas a condições de stress, e caracterização da enzima envolvida no primeiro passo da sua via de biossíntese.

CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

SECÇÃO I: ESTUDO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *STREPTACIDIPHILUS JIANGXIENSIS*

2.1. Curvas de crescimento de *S. jiangxiensis*

S. jiangxiensis foi crescido sob diferentes condições de stress (pH, temperatura e salinidade) em comparação com as condições ótimas de crescimento (pH a 5,5 a 28°C). A bactéria foi plaqueada em meio IPS2 com agar (Anexo I, Secção I) e incubada a 28 °C durante 48 h.

Após o período de crescimento, *S. jiangxiensis* foi inoculado no seu meio de cultura (IPS2) em diferentes condições de temperatura, pH e salinidade (Tabela I) de tal modo que, a densidade ótica (D.O.) inicial fosse de 0,1.

Para o cálculo das taxas de crescimento cada curva de crescimento foi definida como o logaritmo da densidade ótica em função do tempo, utilizando-se o declive das rectas correspondentes à fase exponencial de cada uma das condições de crescimento para obter o valor da taxa de crescimento (Zwietering et al., 1990).

Tabela I – Diferentes condições utilizadas para as curvas de crescimentos do *S. jiangxiensis*.

Condição 1	28°C, pH 5,5
Condição 2	28°C, pH 4,5
Condição 3	28°C, pH 8,0
Condição 4	28°C, 3% NaCl
Condição 5	37°C, pH 5,5

A avaliação do crescimento de *S. jiangxiensis* nas diferentes condições foi realizada de 3 em 3 horas, aproximadamente, a partir do início da incubação, através da determinação da sua densidade ótica (D.O.), medida num espectrofotómetro a comprimento de onda de 610nm, ao longo do tempo.

Após atingir a D.O. correspondente ao início da fase estacionária (acima de 1,0, quando possível, ou após 48 h quando as condições de crescimento não permitiam atingir D.O.

elevadas) recolheu-se 20 mL do crescimento e centrifugou-se a 4000 rpm durante 15 min, para separar as células do seu meio de crescimento. Em cada condição, 1 mL do meio de crescimento foi recolhido para posterior avaliação do seu potencial antimicrobiano. As frações celulares foram suspensas em 1 mL de H₂O, lisadas por sonicação e centrifugadas a 13000 rpm durante 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante (extrato solúvel) foi recolhido e utilizado nos estudos para avaliação do potencial antimicrobiano (Tabela 2). Todos estes procedimentos foram efetuados numa câmara de fluxo laminar para garantir as condições de esterilidade da cultura. Aquando da leitura das D.O., as amostras foram retiradas o mais rapidamente possível, de forma a não afetar o ritmo normal de crescimento.

Tabela 2 – Extratos solúveis utilizados na avaliação do potencial antimicrobiano de *S. jiangxiensis* e densidades óticas atingidas em diferentes condições de crescimento.

Extratos solúveis	Condição	D.O.
1	28°C, pH 5,5	5,28
2	28°C, pH 4,5	4,23
3	28°C, pH 8,0	3,22
4	28°C, 3% NaCl	0,37
5	37°C, pH 5,5	2,57

2.2. Seleção dos microrganismos

O potencial antimicrobiano de *S. jiangxiensis* foi avaliado contra quatro bactérias de origem clínica, dois fungos e duas micobactérias. Foram selecionadas estirpes bacterianas de origem clínica da American Type Collection Culture suscetíveis aos antibióticos, nomeadamente *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922 como representativas de bactérias Gram-negativas, e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 como representativas de bactérias Gram-positivas. Todas as estirpes foram crescidas através da técnica de espalhamento, plaqueando-se separadamente cada uma em agar Trypticase de soja (TSA) (Anexo I, Secção I) e incubadas a 37°C durante 18-24 h. *Mycobacterium marinum* e *Mycobacterium smegmatis* foram plaqueados em meio Luria Bertani (LB) (Anexo I, Secção I) e incubadas a 28°C, durante 48 h e a 37°C, durante 24h, respetivamente. Em relação aos fungos em teste, selecionou-se uma estirpe de *Candida albicans* de origem clínica, e um fungo filamentoso *Penicillium* spp., ambos plaqueados em meio Mueller-

Hinton (MH) (Anexo I, Secção I), incubando-se *Candida albicans* a 30°C durante 18-24 h e o *Penicillium* spp. durante 2-3 dias à temperatura ambiente.

2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *S. jiangxiensis*

2.3.1. Método de difusão em disco

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *S. jiangxiensis* foi aplicado o método de difusão em disco, de acordo com Hoelzer et al. (2011) com algumas modificações.

Neste método foram apenas testadas as estirpes de *E. coli* e *S. aureus*. O inóculo foi preparado em soro fisiológico estéril, utilizando com referência de densidade bacteriana a escala de 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) por comparação visual. O inóculo foi plaqueado por espalhamento uniforme com zaragatoa em placas de agar Mueller-Hinton (BioMérieux, Portugal), ou seja, por todo o agar (Anexo I, Secção I). Posteriormente, com o auxílio de uma pinça, distribuíram-se os discos de papel de filtro estéreis (Oxoid) sobre a superfície do agar inoculado e, sobre estes, foram aplicados 10 µL dos extratos solúveis obtidos do meio de cultura e dos extratos solúveis, obtidos pela recolha de células nos vários pontos dos crescimentos de *S. jiangxiensis* (secção I, ponto 2.1). As placas foram incubadas a 37°C durante 18-24 h. Decorrido o período de incubação, procedeu-se à leitura das placas pela medição do diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano (Anexo II, Esquema B).

2.4. Estudos de competição de *S. jiangxiensis*

Os estudos de competição de *S. jiangxiensis* *in vitro* contra as bactérias e os fungos em estudo foram realizados através de dois métodos distintos de co-cultura e um método de repicagem em placa, como descrito anteriormente em Dhanasekaran (2011), com algumas alterações.

2.4.1. Método de co-cultura em placa

i) Método I

Para este método foram testados os isolados das quatro culturas bacterianas de origem clínica, sendo estas plaqueadas por espalhamento uniforme com zaragatoa em placas de agar Mueller-Hinton, tendo por base o mesmo processo descrito anteriormente. Posteriormente, com o auxílio de uma ansa, recolheu-se uma porção de células de *S. jiangxiensis* (incubadas 48h antes, a 28°C em meio IPS2 com agar, Anexo I, Secção I) e aplicou-se sobre a superfície do agar inoculado com as bactérias. As placas foram incubadas a 30°C durante 18-24 h simultaneamente com *S. jiangxiensis* inoculado em meio MH como controlo e, decorrido esse tempo, procedeu-se à análise das placas.

Foram ainda testados os fungos *Candida albicans* e *Penicillium* spp. e as micobactérias *Mycobacterium marinum* e *Mycobacterium smegmatis*. Relativamente aos fungos, estes foram aplicados em estrias no caso da *Candida albicans*, e em pequenos pontos para *Penicillium* spp. sobre agar (IPS2, Anexo I, Secção I) inoculado previamente com *S. jiangxiensis*, utilizando com referência as escalas de 0,5 e 4 de McFarland (menor e maior densidade bacteriana). As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 18-24h, bem como *S. jiangxiensis* inoculado no seu próprio meio como controlo. No caso de *Mycobacterium marinum* e *Mycobacterium smegmatis*, o processo foi em muito semelhante ao dos fungos, em que utilizando com referência a escala de 0,5 de McFarland, semeou-se o *S. jiangxiensis* em dois meios (LB e IPS2, Anexo I, Secção I) e sobre este, em pequenas estrias, aplicou-se *M. marinum* ou *M. smegmatis* e incubaram-se as placas a 30°C durante 24h-48 h, assim como as três bactérias nos dois meios como controlo (Anexo II, Esquema C).

ii) Método II

A atividade antimicrobiana de *S. jiangxiensis* foi avaliada contra os isolados das quatro culturas bacterianas clínicas tendo por base o método “Dual culture” em meio IPS2 com agar (Anexo I, Secção I).

Com o auxílio de uma ansa, recolheu-se uma porção de células de *S. jiangxiensis* (incubadas 48 h antes, a 28°C em meio IPS2 com agar, Anexo I, Secção I) e aplicou-se sobre a superfície do agar em pequenos pontos (idênticos a discos de diâmetro de 5 mm), nas extremidades da placa. As bactérias em estudo foram plaqueadas a partir da periferia da placa

em frente aos pequenos pontos de *S. jiangxiensis*, sem tocar uma na outra. Por outro lado, as bactérias em estudo foram aplicadas na superfície do agar em pequenos pontos, sendo *S. jiangxiensis* semeado entre eles.

O registo da inibição do crescimento bacteriano foi obtido após 18-24 h de incubação a 30°C, em comparação com as bactérias simultaneamente inoculadas em meio IPS2 apenas como controlo do seu crescimento (Anexo II, Esquema D).

2.4.2. Método de repicagem em placa

A atividade antimicrobiana de *S. jiangxiensis* contra isolados das quatro culturas bacterianas clínicas e as duas espécies de micobactérias foi avaliada tendo por base os conceitos do método “Agar streak” em meio IPS2 com agar (Anexo I, Secção I) e no caso das micobactérias também em meio LB sólido (Anexo I, Secção I), procedendo-se a diferentes formas de estria.

Em duas placas foram plaqueadas em linha reta as bactérias em estudo sobre *S. jiangxiensis* incubado 48 h antes, a 28°C em meio IPS2 com agar (Anexo I, Secção I). Numa outra placa, *S. jiangxiensis* foi plaqueado a partir do centro em linha reta e, em ângulo reto a este, foram plaqueadas as bactérias, sem tocar umas nas outras. Para além disso numa outra placa plaquearam-se em linhas retas as quatro bactérias e, perpendicularmente a estas, plaqueou-se *S. jiangxiensis*. As placas foram incubadas a 30°C, durante 18-24 h, simultaneamente com as todas as bactérias inoculadas em meio IPS2 apenas como controlo do seu crescimento e, decorrido esse tempo, procedeu-se à análise das placas. Relativamente a *M. marinum* e *M. smegmatis*, o processo foi em todo semelhante, à exceção do tempo de incubação que decorreu durante 24-48 h (Anexo II, Esquema E).

SECÇÃO II: IDENTIFICAÇÃO, CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA GLUCOSIL-3-FOSFOGLICERATO SINTASE (GpgS) DE *STREPTACIDIPHILUS JIANGXIENSIS*

2.1. Condições de crescimento bacteriano e extração do DNA

Streptacidiphilus jiangxiensis DSM 45096 foi obtido a partir de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Alemanha) e cultivado em meio IPS2 com agar (DSMZ 987), ajustado o pH a 5,5 a 28°C durante 48 h (Anexo I, Secção I). O DNA genómico foi isolado utilizando o kit SmartHelix DNAid Mycobacteria (Sekvenator, Eslovénia).

2.2. Identificação do gene para a glucosil-3-fosfoglicerato sintase (GpgS) de *S. jiangxiensis*

O gene glucosil-3-fosfoglicerato sintase (*gpgS*) foi identificado no genoma de *S. jiangxiensis* através de análise bioinformática, recorrendo-se à ferramenta BLAST da base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para a sua identificação utilizou-se a sequência de aminoácidos da GpgS de *Mycobacterium smegmatis* caracterizada anteriormente (Empadinhas et al., 2008).

2.3. Amplificação, clonagem e expressão funcional do GpgS

2.3.1. Amplificação por PCR

O gene *gpgS* foi amplificado a partir do genoma de *S. jiangxiensis*, utilizando o primer forward 5' - TATCTAC**ATATG**CTGGACCAGGTCGAGGA - 3' com local de restrição *NdeI* (negrito) e o primer reverse 5' – TATA**AAGCTT**GGGATGCGGGCAAACCTCC - 3' com o local de restrição *HindIII* (negrito). O codão stop foi removido no primer reverse, possibilitando a tradução de uma cauda de seis histidinas no C-terminal da enzima a partir do

vetor de expressão pET30a (Novagen) e para facilitar a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade.

Na amplificação por PCR utilizou-se o kit Supreme NYZTaq DNA polimerase (NZYtech), tendo por base as instruções do fabricante e com as seguintes condições: fase de pré-incubação a 95°C durante 2 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 45 s, ligação dos primers à sequência complementar a 52°C de 45 s e extensão a 72°C durante 1 min. Para finalizar, uma etapa de extensão final a 72°C durante 10 min.

O produto final da amplificação por PCR foi visualizado através de um eletroforese em gel de agarose 1% (Anexo I, Secção 3) e purificado através da utilização do Kit JETQUICK Gel Extraction Spin (Genomed), de acordo com as instruções do fabricante.

2.3.2. Clonagem e Transformação em *Escherichia coli* BL21 Star

O gene amplificado e o vetor de clonagem/expressão pET30a (Novagen) foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII* (Takara) a 37°C durante 1 h e 30 min e os fragmentos digeridos foram analisados por electroforese em gel de agarose 1% e purificados como descrito em cima. O vetor linearizado foi desfosforilado com fosfatase alcalina (New England Biolabs) e purificado com o Kit JETQUICK Gel Extraction Spin (Genomed). De seguida, procedeu-se à ligação dos fragmentos digeridos à temperatura ambiente durante 20 min, utilizando a T4 DNA Express Link™ ligase (Invitrogen)

Os plasmídeos recombinantes foram transformados em células competentes de *E. coli* BL21 Star (Anexo I, Secção 2) da seguinte forma: adicionou-se 10 µL de mistura da ligação a 100 µL de células competentes e incubou-se em gelo durante 20 min, seguindo-se um choque térmico a 42°C durante 45 s. De seguida, foram adicionados 500 µL de meio LB (Anexo I, Secção 1) às células e incubou-se a 37°C durante 1 h. Por fim, alíquotas de 250 µL das células transformadas foram plaqueadas em meio LB com agar contendo canamicina (30 µg/mL) e incubou-se a 37°C durante 16 h, aproximadamente.

As colónias resistentes, contendo o plasmídeo com o gene de interesse, foram selecionadas e incubadas durante a noite em 7,5 mL de meio LB com canamicina (30 µg/mL) numa incubadora com agitador (140 rpm) a 37°C. Para a extração do plasmídeo utilizou-se o Kit ZR Plasmid Miniprep™-Classic (Zymo Research), com base nas instruções do fabricante. De forma a confirmar os clones positivos, os plasmídeos extraídos foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII* (Takara) e posteriormente analisados por eletroforese em

gel de agarose 1%. Os plasmídeos recombinantes foram sequenciados para confirmar a identidade dos inserts (GATC Biotech).

2.3.3. Expressão do gene *gpgS*

As células de *E. coli* BL21 Star contendo o plasmídeo recombinante cresceram em 1 L de meio LB com canamicina (30 µg/mL) numa incubadora com agitador a 130 rpm e a 37°C. Após ter atingido a fase exponencial de crescimento ($D.O_{610nm} = 0,8$), a expressão do gene foi induzida com 0,5 mM IPTG e a temperatura foi reduzida para 28°C. Decorridas 18 h após a indução, as células foram recolhidas através de centrifugação (9000 rpm, 10 min, 4°C) e suspendidas em tampão A (Anexo I, Secção 5). Por fim, adicionou-se 5 mM MgCl₂ e 2 µg/µL DNase I às células e estas foram lisadas por sonicação e centrifugadas (15000 rpm, 15 min, 4°C) para remover os detritos celulares.

2.4. Purificação da GpgS recombinante

A GpgS recombinante com uma cauda de histidinas foi purificada num sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC) com uma coluna com resina carregada com níquel (HisTrap™ 5 mL, GE Healthcare) e equilibrada em tampão A (Anexo I, Secção 5). Antes de injetar na coluna, o extrato de proteína foi filtrado através de um filtro de celulose de 0,2 µm para remover material não solubilizado. A eluição da proteína foi realizada através de passos com crescentes concentrações de imidazol (25 mM, 75 mM, 200 mM, 350 mM e 500 mM) (tampão B, Anexo I, Secção 6).

Durante cada passo de eluição recolheram-se frações de 2 mL e a pureza da proteína em cada fração foi analisada por SDS-PAGE (Anexo I, Secção 4). As frações mais puras foram diluídas 10 vezes com tampão 20 mM bis-tris propano (BTP) a pH 7.5 e concentradas por ultrafiltração em centricons cut-off 10 kDa (Amicon) no mesmo tampão contendo 50 mM NaCl.

2.5. Ensaio enzimáticos e especificidade de substrato

A atividade da enzima recombinante e a especificidade do substrato foram determinadas em reações de 50 μL com 1 μg enzima pura e testou-se como possíveis substratos aceitadores: 3-fosfoglicerato (3-PGA), D-glicerato e fosfoenolpiruvato (PEP), e com possíveis dadores: UDP-glucose e GDP-manose, de modo a verificar se a enzima produziria glucosil-fosfoglicerato e/ou manosil-fosfoglicerato, como descrito para enzimas homólogas (Empadinhas et al., 2003; Empadinhas et al., 2008).

As condições padrão de reação foram: 50 mM BTP a pH 8 com 20 mM MgCl_2 , 5 mM de substrato dador e 3 mM de substrato aceitador a 37°C durante 2 h e utilizando sempre controlos negativos sem enzima nas mesmas condições. Foram também testados controlos utilizando cada substrato isoladamente. O resultado de cada reação foi analisado por cromatografia de camada fina (TLC) (gel de sílica 60, Merck), utilizando um sistema de solventes composto por ácido acético/etil acetato/água/amónia 25% (6:6:2:1, v/v) e revelando com o corante ácido sulfúrico/ α -naftol (Anexo I, Secção 7) a 120°C durante, aproximadamente 5 min (Jacin, H, Mishkin, 1965).

2.6. Caracterização bioquímica e cinética da GpgS recombinante

Os perfis de temperatura e pH, a dependência de cationes, a análise da concentração ótima de substratos e parâmetros cinéticos foram determinados por um método de quantificação descontínua. Para todas as condições, as reações (25 μL) foram incubadas durante 0, 2, 4, 6 e 8 min, transferidas para gelo e inativadas imediatamente pela adição de 2,6 μL de 5N HCl e posterior neutralização com 2,4 μL de 5N NaOH. As reações foram realizadas em duplicado e com controlos negativos de acordo com as condições pretendidas.

A quantidade de UDP libertado foi quantificada por método espectrofotométrico indireto, adaptado a partir de Mendes et al., 2010, em que a libertação de UDP resulta na oxidação de uma concentração equimolar de NADH a NAD (Fig. 2).

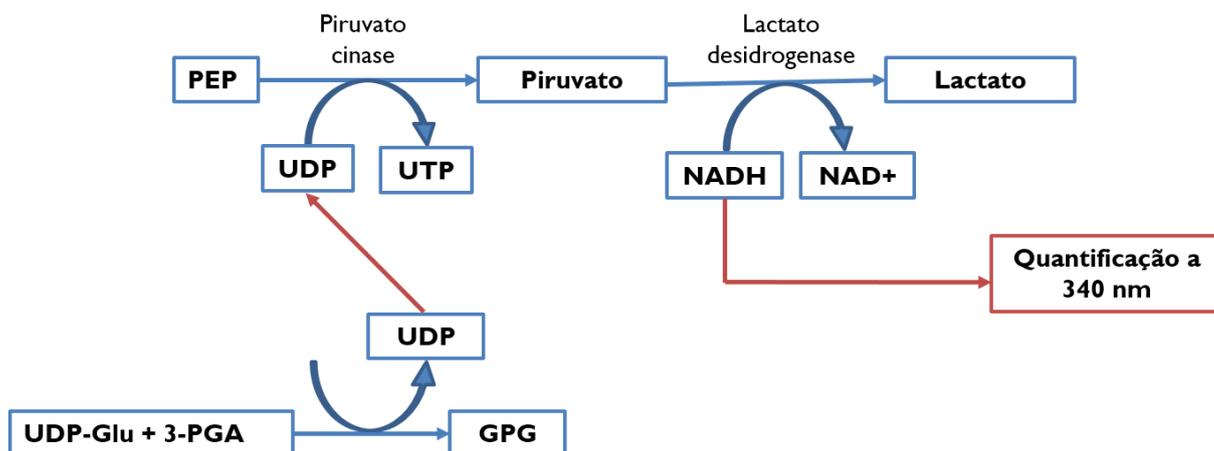


Figura 2 – Descrição geral do método de quantificação de UDP pela oxidação de NADH.

Este método indireto assenta na quantificação do consumo de nicotinamida adenina- β dinucleótido (NADH) a comprimento de onda de 340 nm a 30°C durante 21 min, após incubação com 70 μ L de uma mistura de 50 mM BTP pH 7,5 com 2,5 mM $MgCl_2$ e KCl, 1 U de piruvato cinase e lactato desidrogenase, 0,8 mM NADH e 2 mM PEP (todos de Sigma-Aldrich), perfazendo um volume final de 100 μ L.

O perfil de temperatura da GpgS recombinante de *S. jiangxiensis* foi determinado entre 25°C e 55°C e o perfil de pH foi determinado em 50 mM BTP (6,5 – 9,5 pH) em reações com 50 mM BTP pH 8.0 (ou tampão apropriado) e 20 mM $MgCl_2$ 5 mM UDP-glucose e 3 mM 3-PGA e incubadas a 37°C (ou temperatura apropriada), sendo a atividade enzimática quantificada pelo método anteriormente descrito.

Em relação ao efeito de catiões na atividade da GpgS recombinante, este foi analisado por adição de diferentes concentrações de cloreto de Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Li^+ , K^+ ou Na^+ ou sais de sulfato de Zn^{2+} ou Ni^{2+} . Paralelamente, preparou-se um controlo negativo sem catiões e um controlo na presença de 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), sendo todas as reações preparadas com 50 mM BTP pH 8 com 5 mM UDP-glucose e 3 mM 3-PGA e incubadas a 37°C durante 15 min. O resultado foi visualizado por TLC como descrito anteriormente.

Como se verificou que a presença de magnésio aumentava a atividade da GpgS recombinante, o efeito deste catião foi testado a diferentes concentrações (5, 10, 15, 20, 30, 60, 80 ou 100 mM) e analisado pelo método indireto de quantificação do UDP acima descrito.

De seguida, avaliou-se a influência das concentrações de UDP-glucose e 3-PGA na atividade da enzima, mantendo-se constante a concentração de um dos substratos (10 mM) e variando a concentração do outro. Para 3-PGA testaram-se concentrações de 4 mM, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM e 12 mM, enquanto que para UDP-glucose testaram-se 5 mM, 7,5 mM, 10 mM, 15 mM e 20 mM. Estas reações foram realizadas em triplicado, num volume de 12,5 μL , contendo 0,5 μg de GpgS pura, 50 mM BTP pH 8 e 20 mM MgCl_2 , e a atividade da enzima foi quantificada pelo método previamente descrito.

Encontradas as condições ótimas de atividade da enzima realizaram-se reações de 12,5 μL com 0,5 μg de GpgS e, variando a concentração de UDP-glucose entre 5-15 mM e 3-PGA até 1-6 mM, quantificou-se a atividade enzimática pela libertação de UDP (método referido anteriormente). Estas reações foram realizadas em triplicado e com os respetivos controlos negativos. Os valores de K_m e V_{\max} foram determinados através do Software GraphPad Prism (versão 5.00, San Diego, Califórnia, EUA, <http://www.graphpad.com>), utilizando a equação de Michaelis-Menten (regressão não linear).

2.7. Extração e identificação de solutos orgânicos em *S. jiangxiensis*

Para a extração e identificação de solutos orgânicos de *S. jiangxiensis*, recolheram-se células nas fases exponencial e estacionária de crescimentos a 28°C e pH 5,5 (condição ótima de crescimento) e a 35°C e pH 5,5, sendo todo o processo efetuado como descrito na secção 2.1.

As amostras (250 mL) recolhidas nas diferentes fases de crescimento pretendidas, foram centrifugadas a 4000 rpm, durante 15 min, descartando-se o sobrenadante e preservando o pellet. De seguida, ressuspenderam-se as células em 5 mL de tampão 20 mM Tris pH 8 e com o auxílio de um sonicador foram lisadas durante 30 s, em gelo (5x). Com uma ansa, adicionou-se lizozima e incubaram-se as amostras a 37°C durante uma hora em agitação. Após o tempo de incubação, adicionou-se 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de DNase I às células e foram sujeitas novamente a sonicação (1 min por cada mL com intervalos de descanso de 10 s), e centrifugadas (15000 rpm, 20 min, 4°C), descartando-se os detritos celulares

À fração solúvel das amostras celulares adicionou-se $\frac{1}{2}$ volume de clorofórmio, de forma a remover os lípidos e a fase aquosa contendo os solutos orgânicos solúveis foi recolhida e liofilizada. Por fim, hidrataram-se os solutos liofilizados com 1 mL de H_2O ultrapura e visualizaram-se por TLC utilizando três sistemas de solventes diferentes (ácido acético/etil

acetato/água/amónia 25% (6:6:2:1, v/v); clorofórmio/metanol/ amónia 25% (6:10:5, v/v); e clorofórmio/metanol/ ácido acético/água (50:30:8:4, v/v)) e com compostos padrão apropriados.

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS

SECÇÃO I: AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DE EXTRATOS E ESTUDOS DE COMPETIÇÃO DE *S. JIANGXIENSIS IN VITRO*

3.1. Curvas de crescimento de *S. jiangxiensis* sob diferentes condições de stress

A curva de crescimento de *Streptacidiphilus jiangxiensis* na figura 3 representa a condição ótima de crescimento para este organismo (pH 5.5, 28°C) tal como previsto pelas recomendações da DSMZ (<https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-45096.html>) e descrito anteriormente (Huang et al., 2004), apresentando uma taxa de crescimento de 0,37. Esta foi tomada como a condição padrão de crescimento e utilizada como base de comparação para os restantes crescimentos realizados em diferentes condições de stress.

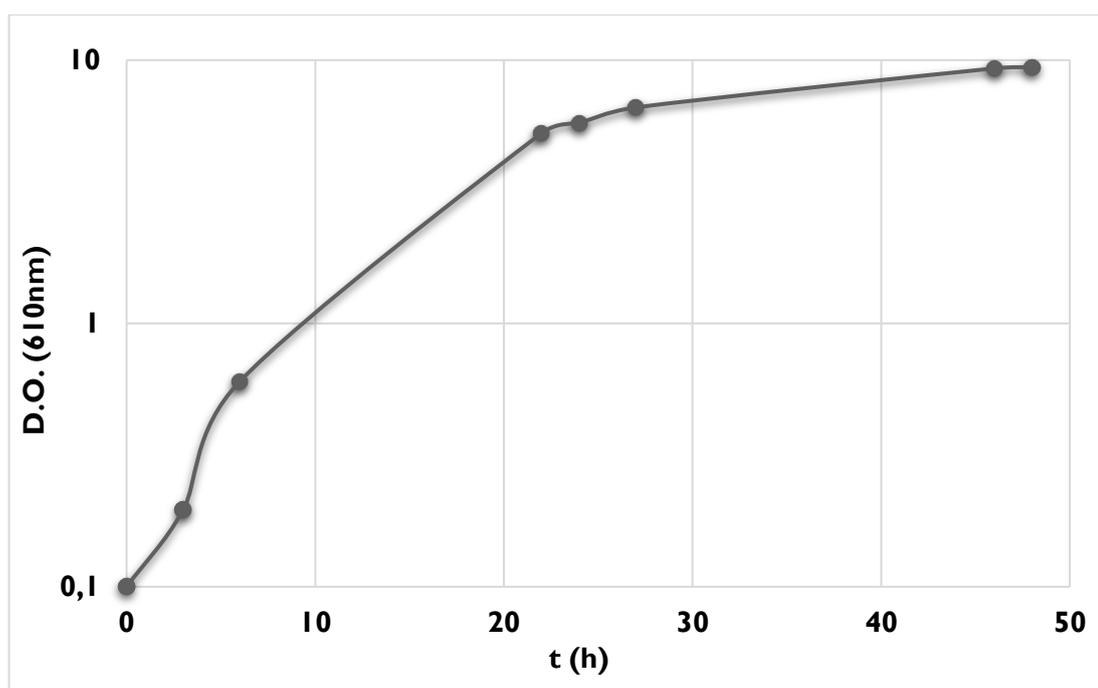


Figura 3 – Curva de crescimento de *Streptacidiphilus jiangxiensis* a 28°C, pH 5.5.

Foram testadas diferentes condições de pH, temperatura e salinidade de forma a avaliar o seu impacto no crescimento de *S. jiangxiensis*. Para as diferentes condições de crescimento testadas determinou-se a variação do número de células por unidade de tempo, taxa de crescimento (Tabela 2).

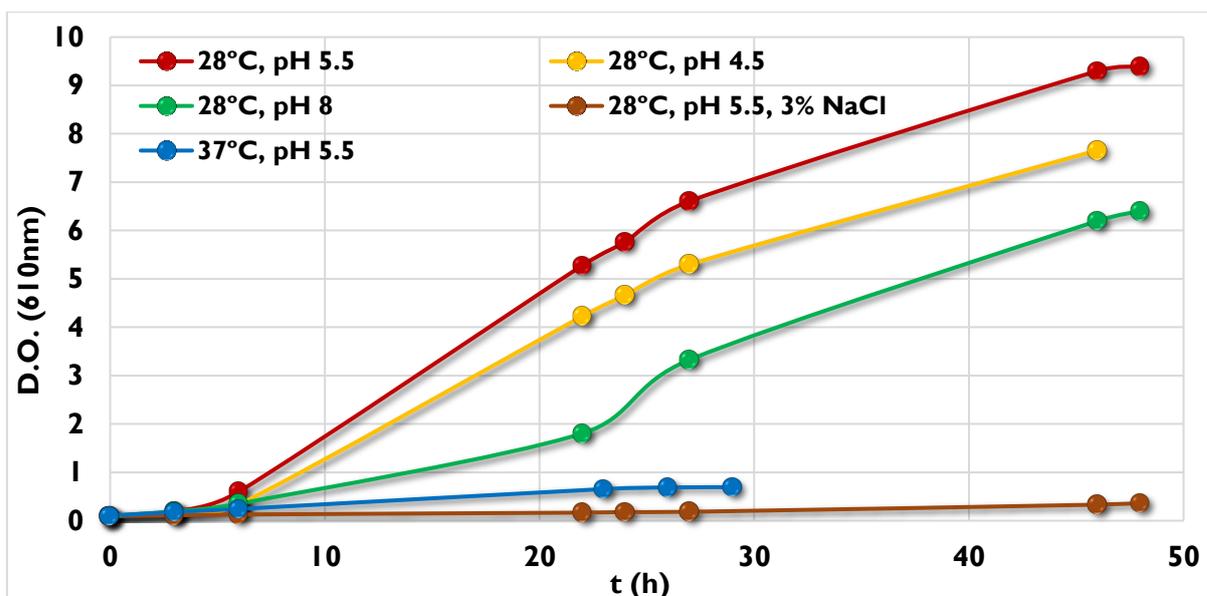


Figura 4 – Curvas de crescimento de *Streptacidiphilus jiangxiensis* sob diferentes condições de stress.

As condições que induziram um ambiente de maior stress e em que se observaram maior impacto na taxa de crescimento foram adição de 3% de NaCl ao meio (taxa de crescimento de 0,027) ou aumento da temperatura para 37°C (taxa de crescimento de 0,057). A variação de pH (Fig. 4) do meio de crescimento (4.5 e 8) não produziu um decréscimo tão significativo, ainda que a taxa de crescimento tenha sido reduzida para menos de metade da que foi medida em condições ótimas (tabela 3).

Tabela 3 – Diferentes condições utilizadas para as curvas de crescimentos de *S. jiangxiensis* e respectivas taxas de crescimento.

Bactéria	Condições		Taxa de crescimento
<i>Streptacidiphilus jiangxiensis</i>	Condição 1	28°C, pH 5,5	0,370
	Condição 2	28°C, pH 4,5	0,170
	Condição 3	28°C, pH 8,0	0,110
	Condição 4	28°C, 3% NaCl	0,027
	Condição 5	37°C, pH 5,5	0,057

3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *S. jiangxiensis*

3.2.1. Método de difusão em disco

Pela técnica de difusão em disco foram apenas testadas as estirpes bacterianas de *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213. Os resultados obtidos com os extratos de *S. jiangxiensis* nas diferentes condições de crescimento descritas anteriormente (Materiais e Métodos, secção 2.1) não produziram halos de inibição de crescimento, sugerindo ausência de atividade antimicrobiana sobre as bactérias testadas nestas condições (Fig. 5).

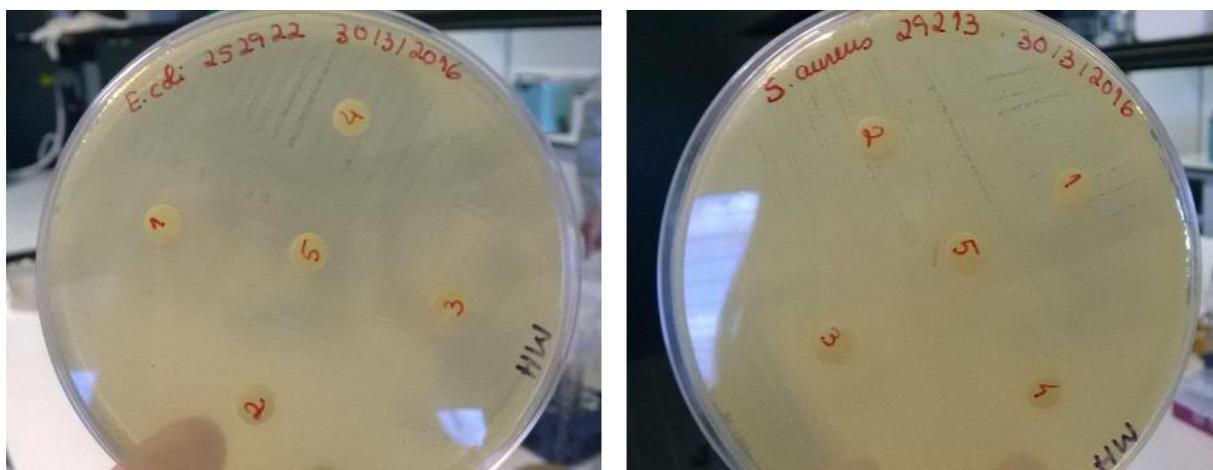


Figura 5 – Método de difusão em disco: extratos de *S. jiangxiensis* sobre culturas bacterianas de *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213. Os números indicam os extractos solúveis obtidos nas diferentes condições (tabela 2, Materiais e Métodos).

3.3. Estudos de competição de *S. jiangxiensis*

3.3.1. Método de co-cultura em placa

i) Método I

Utilizando o método da co-cultura além das quatro estirpes clínicas, foram também testados os fungos *Candida albicans* e *Penicillium* spp., bem como, as micobactérias *M. marinum* e *M. smegmatis*, como descrito na secção 2.1 de Materiais e Métodos. Os resultados do presente método demonstram que não se observou atividade antimicrobiana de *S. jiangxiensis* na presença dos microrganismos em teste, tal como exemplificado nas figuras 6-8 (Fig. 6, 7 e 8).

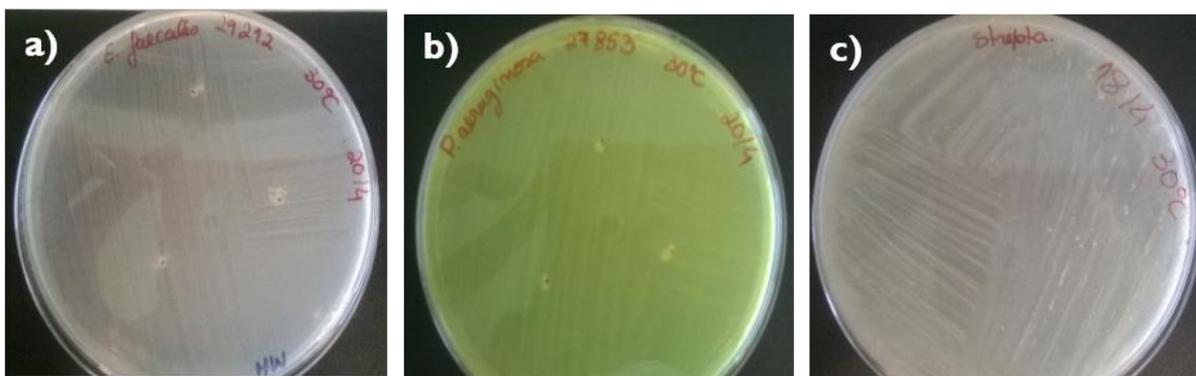


Figura 6 – Método I: co-cultura em placa. **a) e b):** repicagem de células de *S. jiangxiensis* sobre *E. faecalis* ATCC 29212 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, respetivamente. **c)** *S. jiangxiensis* em meio MH como controlo.

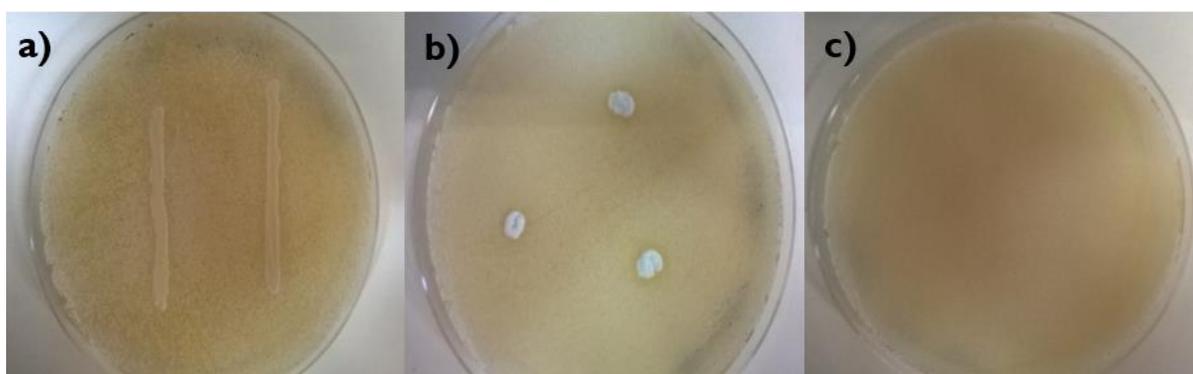


Figura 7 – Método I: co-cultura em placa. **a) e b):** estrias de células e pequenos pontos de *Candida albicans* e *Penicillium spp.* sobre *S. jiangxiensis*, respetivamente. **c)** *S. jiangxiensis* em meio IPS2 como controlo (escala de 4 de McFarland como referência).

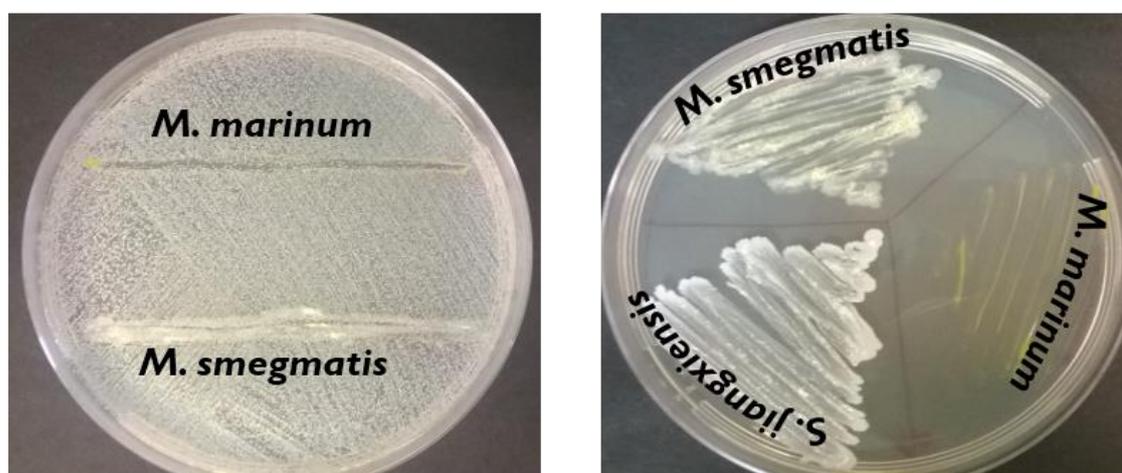


Figura 8 – Método I: co-cultura em placa. Células de *M. marinum* e *M. smegmatis* sobre *S. jiangxiensis*. Painel da direita *M. marinum*, *M. smegmatis* e *S. jiangxiensis* em meio LB meio como controlo.

ii) Método II

A atividade antimicrobiana de *S. jiangxiensis* foi testada tendo por base o método “Dual culture”, contra os isolados das quatro culturas bacterianas, verificando-se ausência de atividade antimicrobiana (Fig. 9).

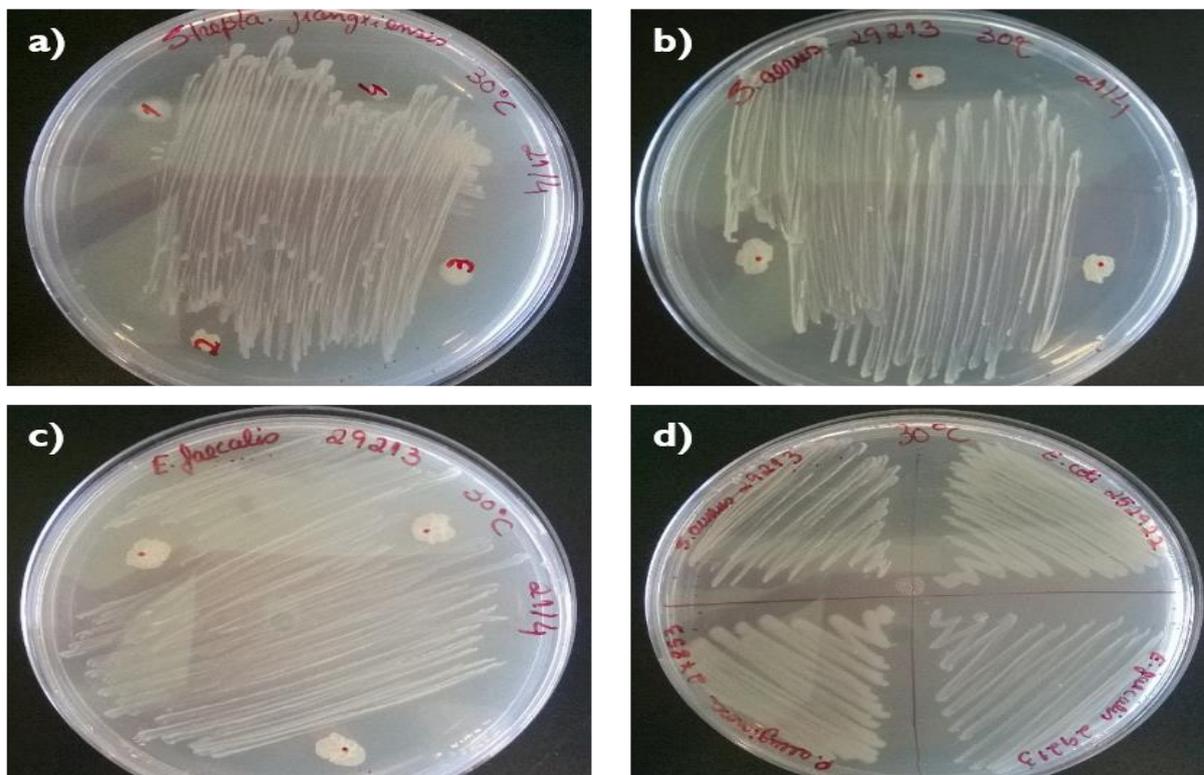


Figura 9 – Método II: co-cultura em placa. **a)** *S. jiangxiensis* contra as quatro bactérias (1- *E. coli* ATCC 25922; 2- *S. aureus* ATCC 29213; 3- *P. aeruginosa* ATCC 27853; 4- *E. faecalis* ATCC 29212; **b e c)** *S. jiangxiensis* (pequenos pontos) contra *S. aureus* e *E. faecalis*, respectivamente; **d)** As quatro bactérias clínicas inoculadas em meio IPS2 como controle.

Uma vez que os métodos anteriormente descritos sugerem ausência de atividade antimicrobiana de *S. jiangxiensis* na presença dos microrganismos em teste, procedeu-se ao método de repicagem em placa que proporcionou um maior contacto entre os microrganismos em teste.

3.3.2. Método de repicagem em placa

A atividade antimicrobiana de *S. jiangxiensis* contra os isolados das quatro estirpes bacterianas clínicas e as duas espécies de micobactérias foi avaliada tendo por base os conceitos do método “Agar streak”, não se observando qualquer inibição do crescimento, como mostrado na figura 10.

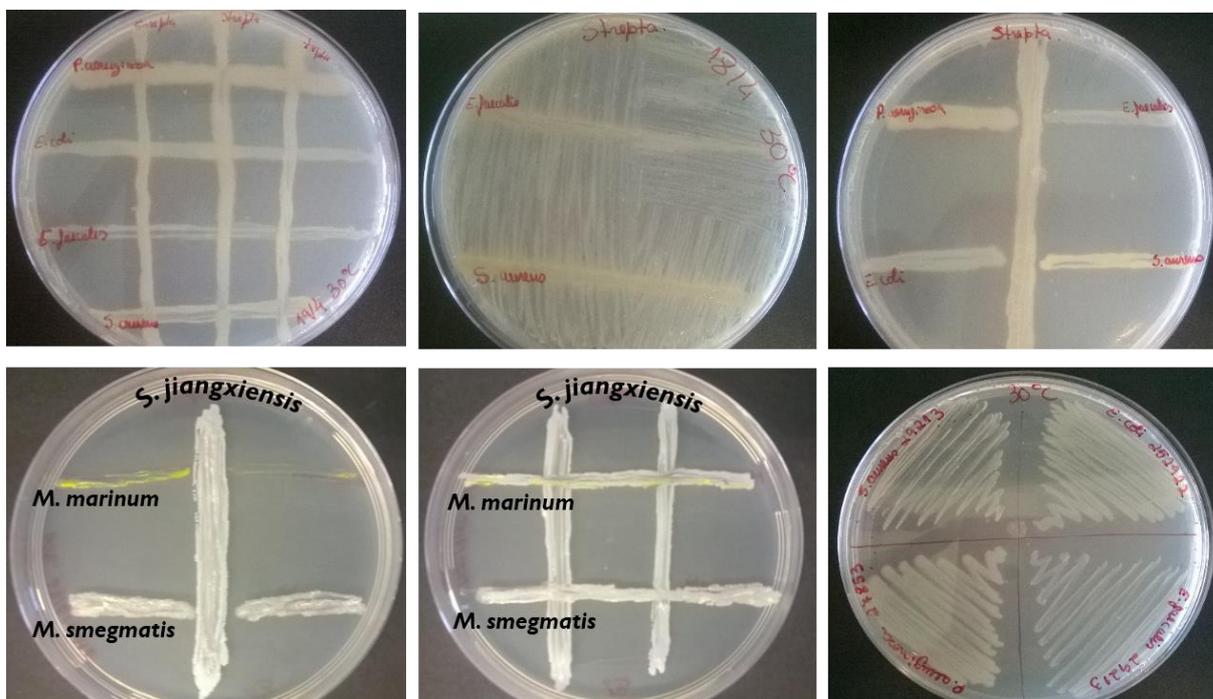


Figura 10 – Método de repicagem em placa para *S. jiangxiensis* contra os isolados das quatro culturas bacterianas clínicas e as duas espécies de micobactérias.

SECÇÃO II: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA GLUCOSIL-3-FOSFOGLICERATO SINTASE (GPGS) DE *STREPTACIDIPHILUS JIANGXIENSIS*

3.1. Expressão e purificação da GpgS recombinante de *S. jiangxiensis*

O gene *gpgS* de *S. jiangxiensis* contendo 987 pb foi clonado e expresso em *E. coli* no vetor de expressão pET30a, obtendo-se uma proteína recombinante de 37,1 kDa que inclui uma cauda artificial de 6 histinas no C-terminal. Esta proteína foi purificada até à homogeneidade num único passo de cromatografia, utilizando uma coluna de Ni-Sepharose (Fig. 11).

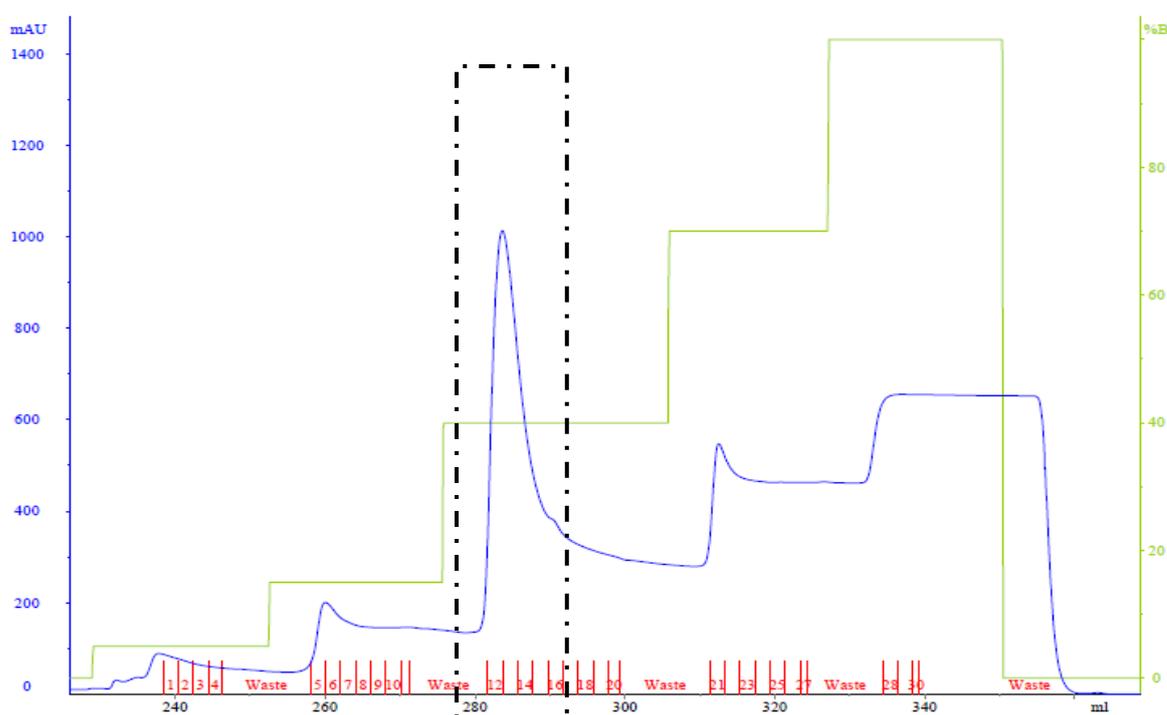


Figura 11 – FPLC: cromatograma obtido na purificação da GpgS recombinante numa coluna de Ni-Sepharose. A área tracejada representa a eluição da proteína recombinante com 200 mM de tampão de eluição e a vermelho encontram-se a diferentes frações recolhidas. Linha azul – absorção de UV; Linha verde – concentração do tampão de eluição (25 mM, 75 mM, 200 mM, 350 mM e 500 mM).

Posteriormente, as frações recolhidas correspondentes ao passo de eluição com 200 mM de imidazol (zona tracejada do cromatograma anterior) foram analisadas por SDS-PAGE (Fig. 12).

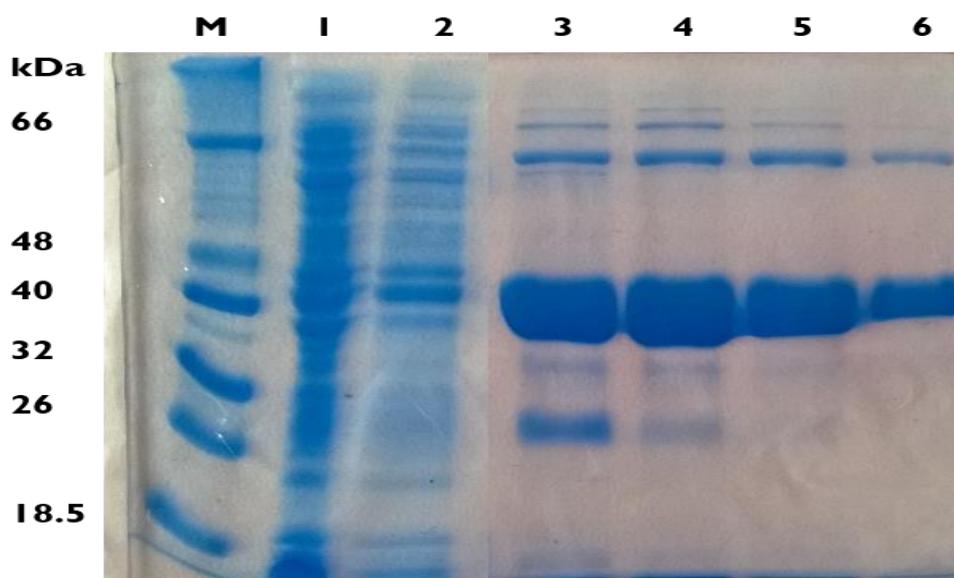


Figura 12 – SDS-PAGE das frações recolhidas durante a purificação da GpgS recombinante de *S. jiangxiensis*. **Linha M** – marcador de pesos moleculares; **Linhas 1 e 2** – extrato celular total após a sonicação e fração solúvel injectada na coluna, respetivamente; **Linhas 3 a 6** – frações 12, 13, 14 e 15 (cromatograma) recolhidas durante a eluição (Fig. 9).

As frações mais puras (13, 14 e 15) foram concentradas por ultracentrifugação num filtro Amicon com *cutoff* 10 kDa (Merck Millipore). Após a concentração das frações visualizadas na figura 12, procedeu-se novamente a uma eletroforese em gel (SDS-PAGE) de forma a verificar o grau de pureza da proteína recombinante, concluindo-se que a GpgS recombinante se encontrava pura para posterior caracterização, contendo apenas um contaminante de peso molecular mais elevado na preparação (Fig. 13).

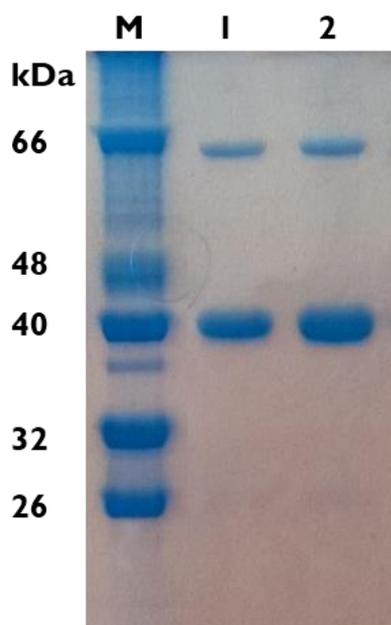


Figura 13 – SDS-PAGE das frações da figura 10 após concentração. **Linha M** – marcador de pesos moleculares; **Linhas 1 e 2** – 4 μg e 6 μg da GpgS recombinante de *S. jiangxiensis* purificada e concentrada.

3.2. Especificidade de substratos da GpgS

Entre os vários substratos testados, verificou-se que a GpgS de *S. jiangxiensis* produz glucosilfosfoglicerato (GPG) apenas utilizando 3-fosfoglicerato (3-PGA) como substrato aceitador e UDP-glucose como grupo dador (Fig. 14). Para além disso, verificou-se também por TLC que MgCl_2 estimulava a atividade da enzima (Fig. 14).

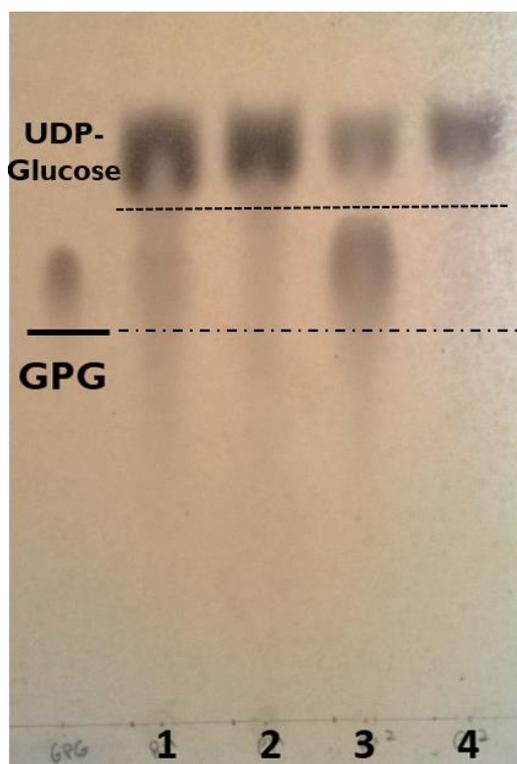


Figura 14 – Análise por TLC dos produtos de reação obtidos com a GpgS recombinante de *S. jiangxiensis* com e sem $MgCl_2$. **Linhas 1 e 2** – Reação e respetivo controlo sem enzima, contendo 50mM BTP a pH 8.0, 5 mM UDP-glucose, 3 mM 3-PGA, 1 μ g enzima recombinante (sem $MgCl_2$), 37°C, 2 h misturas de reação sem $MgCl_2$, com e sem GpgS, respetivamente. **Linhas 3 e 4** – Reação e respetivo controlo sem enzima, contendo 50 mM BTP a pH 8.0, 5 mM UDP-glucose, 3 mM 3-PGA, 20 mM $MgCl_2$, 1 μ g enzima, 37°C, 2 h.

Uma vez que a análise qualitativa da reação representada na figura 14 demonstra uma melhoria significativa na atividade da GpgS após adição do catião divalente, os restantes substratos também foram testados na presença deste catião. No entanto, para nenhum destes possíveis substratos testados se verificou atividade por parte da GpgS (Fig. 15).

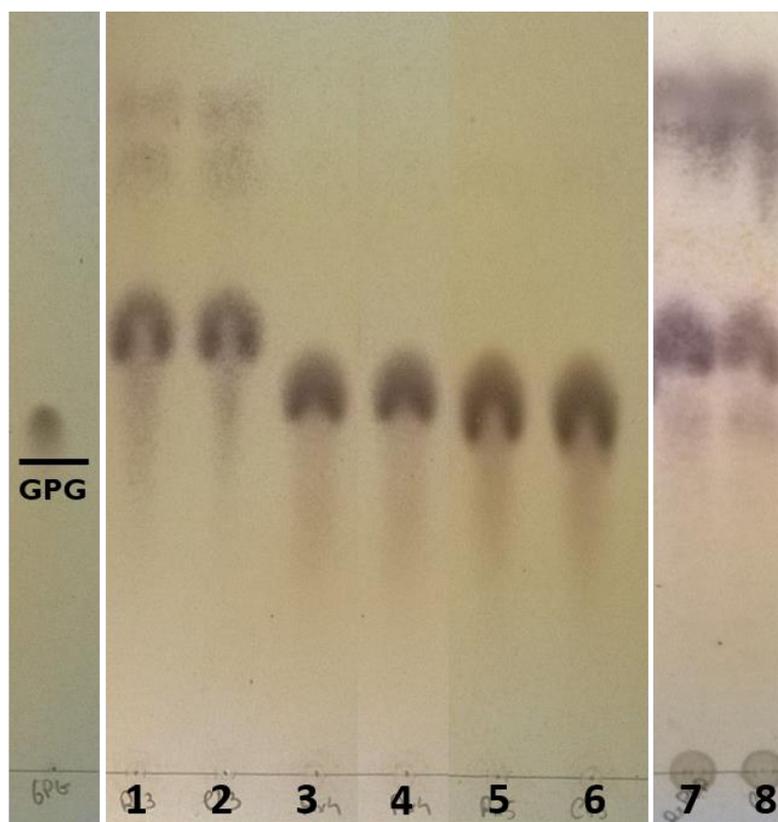


Figura 15 – Análise por TLC dos produtos de reação obtidos com GpgS recombinante de *S. jiangxiensis*. **Linhas 1 e 2** – Reação e respetivo controlo sem enzima, contendo 50 mM BTP a pH 8.0, 5 mM UDP-glucose, 3 mM D-glicerato, 20 mM MgCl₂, 1 ug enzima recombinante, 37°C, 2 h; **Linhas 3 e 4** – Reação e respetivo controlo sem enzima, contendo 50 mM BTP pH 8.0, 5 mM GDP-manose, 3 mM D-glicerato, 20 mM MgCl₂, 1 ug enzima recombinante, 37°C, 2 h; **Linhas 5 e 6** – Reação e respetivo controlo sem enzima, contendo 50 mM BTP pH 8.0, 5 mM GDP-manose, 3 mM 3-PGA, 20 mM MgCl₂, 1 ug enzima recombinante, 37°C; **Linhas 7 e 8** – Reação e respetivo controlo sem enzima, contendo 50 mM BTP a pH 8.0, 5 mM UDP-glucose, 3 mM PEP, 20 mM MgCl₂, 1ug enzima recombinante.

3.3. Caracterização bioquímica da GpgS

A atividade enzimática da GpgS recombinante de *S. jiangxiensis* foi quantificada indiretamente com base na quantidade de UDP libertado por utilização do substrato UDP-glucose, estando esta quantificação acoplada à oxidação de NADH na presença de fosfoenolpiruvato (PEP), piruvato cinase e lactato desidrogenase, como descrito na secção 2.6 de Materiais e Métodos, sendo que os ensaios foram otimizados e realizados na presença de um excesso destes reagentes.

3.3.1. Perfis de temperatura e pH

A GpgS apresenta atividade máxima entre os 40 e 45°C, verificando-se uma perda gradual de atividade à medida que a temperatura se afasta destes valores (Fig. 16). A 55°C, a enzima ainda apresentava mais de 50% da atividade máxima, enquanto que para a temperatura mais baixa testada, 30°C, a atividade era quase indetetável.

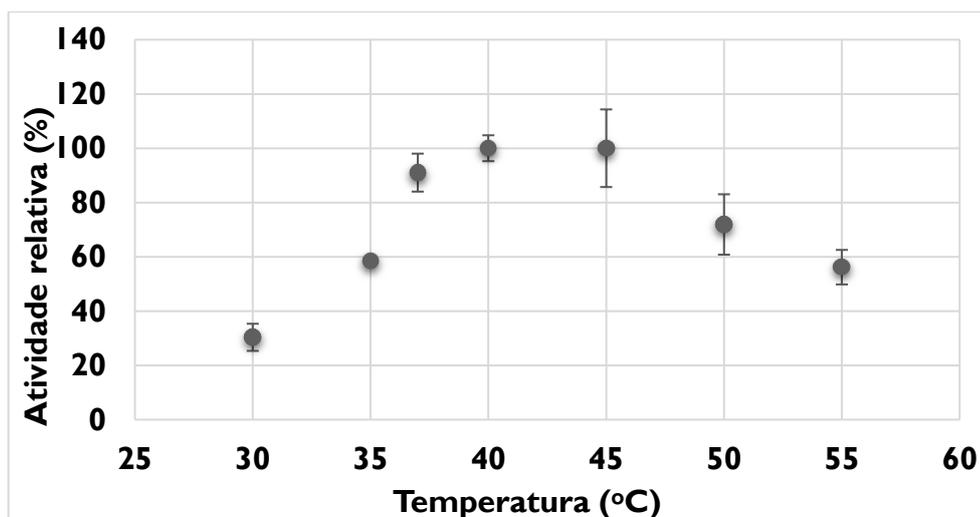


Figura 16 – Perfil de temperatura para a atividade da GpgS recombinante de *S. jiangxiensis*. Determinado em 50 mM BTP a pH 8,0, na presença de 5 mM UDP-glucose, 3 mM 3-PGA, 20 mM MgCl₂, incubado 15 minutos, 30-55°C.

O pH ótimo para a atividade máxima da GpgS recombinante é 8, verificando-se mais de 70% da atividade máxima entre pH 7,5 e 8,5 (Fig. 17) mas um decréscimo bastante acentuado (<40% atividade) entre pH 6,5 e 7,0, assim como, entre pH 9,0 e 9,5.

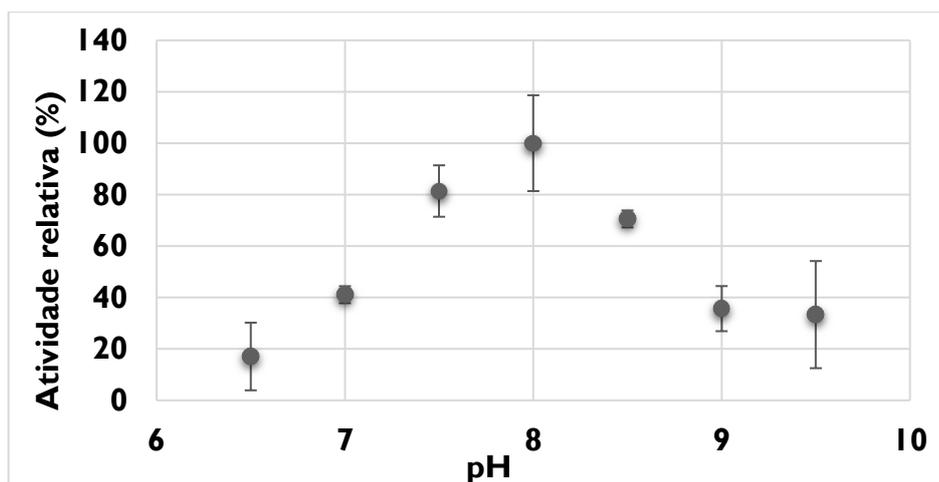


Figura 17 – Perfil de de pH para a atividade da GpgS recombinante. Determinado em 50 mM BTP a pH 6,5-9,5 na presença de 5mM UDP-glucose, 3 mM 3-PGA, 20 mM MgCl₂, incubado 15 minutos a 37°C.

3.3.2. Dependência de iões mono e divalentes

De entre todos os sais testados, o cloreto de magnésio foi o melhor activador para a atividade da GpgS recombinante, verificando-se reduzida ou ausência de atividade para os restantes catiões, bem como na presença de EDTA (Fig. 18 e 19).

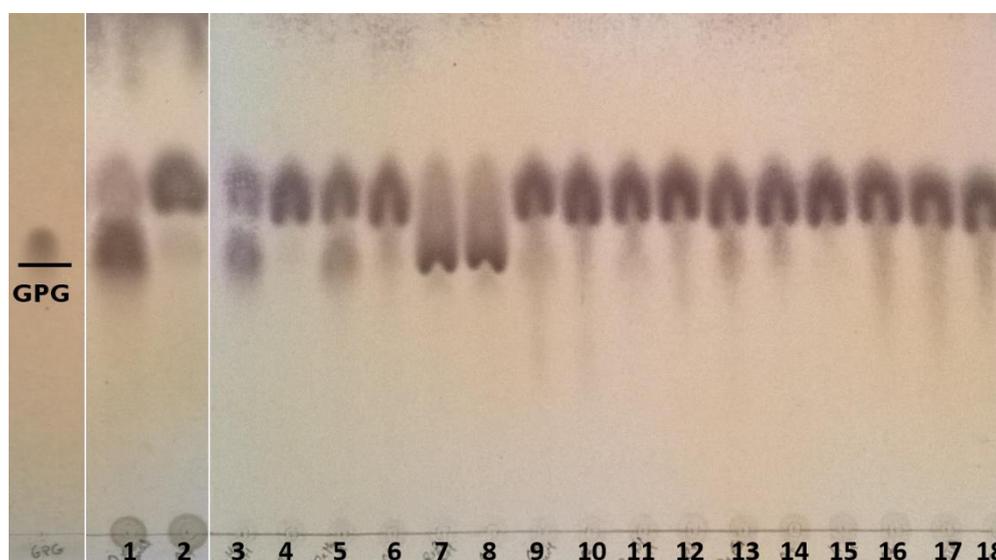


Figura 18 – Análise por TLC do efeito de diversos iões na atividade da GpgS recombinante de *S. jiangxiensis*. Reacções contendo 50 mM BTP a pH 8,0, 5 mM UDP-glucose, 3 mM 3-PGA, 10 mM ião em estudo, 1 µg enzima recombinante, incubadas 15 min a 37°C. **Linhas 1 e 2** – Reacção controlo positivo contendo 20 mM Mg²⁺ e controlo negativo sem enzima **Linhas 3 e 4** – reacção e controlo sem enzima para o ião divalente Mg²⁺. **Linhas 5 e 6** – reacção e controlo sem enzima para o ião divalente Mn²⁺. **Linhas 7 e 8** – reacção e controlo sem enzima para o ião divalente Zn²⁺ **Linhas 9 e 10** – reacção e controlo sem enzima para o ião divalente Co²⁺. **Linhas 11 e 12** – reacção e controlo sem enzima para o ião divalente Ni²⁺. **Linhas 13 e 14** – reacção e controlo sem enzima para o ião divalente Ca²⁺ **Linhas 15 e 16** – reacção e controlo sem enzima para o ião monovalente Li⁺. **Linhas 17 e 18** – reacção e controlo sem enzima com EDTA.

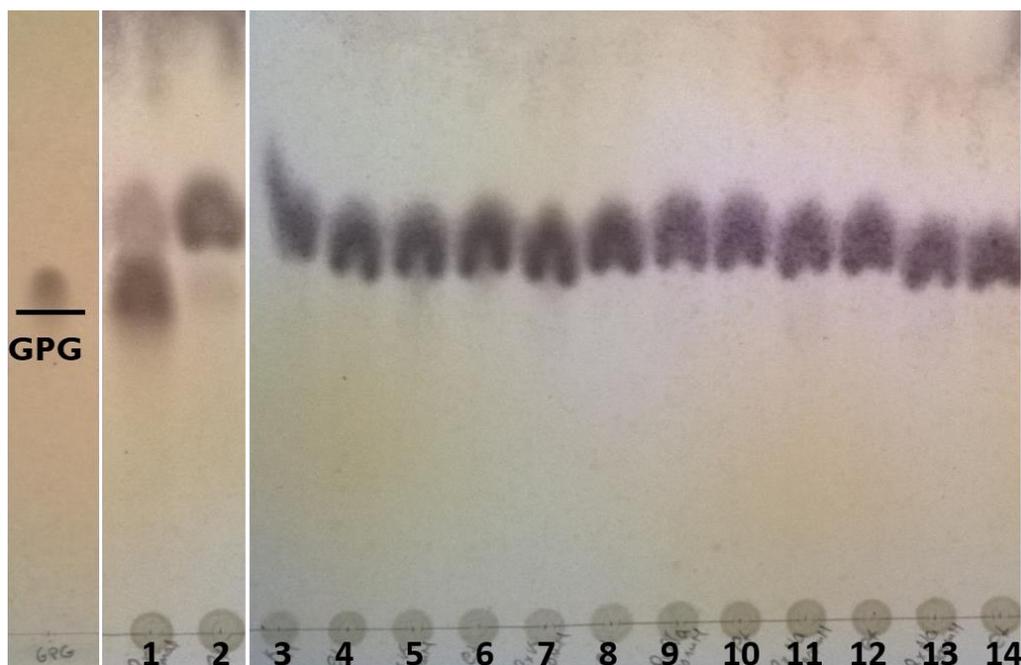


Figura 19 – Análise por TLC do efeito de diferentes iões na atividade da GpgS recombinante de *S. jiangxiensis*. Reacções contendo 50 mM BTP pH 8.0, 5mM UDP-glucose, 3 mM 3-PGA, e o ião em estudo, com adição de 1ug enzima recombinante, incubadas 15 min a 37°C. **Linhas 1 e 2** – Reacção controlo positivo contendo 20 mM Mg^{2+} e controlo negativo sem enzima. **Linhas 3 e 4** – reacção e controlo sem enzima para o ião K^+ (5 mM KCl). **Linhas 5 e 6** – reacção e controlo sem enzima para o ião K^+ (20 mM KCl). **Linhas 7 e 8** – reacção e controlo sem enzima para o ião K^+ (100 mM KCl). **Linhas 9 e 10** – reacção e controlo sem enzima para o ião Na^+ (20 mM NaCl). **Linhas 11 e 12** – reacção e controlo sem enzima para o ião Na^+ (100 mM NaCl). **Linhas 13 e 14** – reacção e controlo sem enzima para o ião Na^+ (300 mM NaCl).

Uma vez demonstrada a dependência de magnésio para a atividade da enzima, o efeito deste catião foi testado a diferentes concentrações, verificando-se atividade máxima da GpgS recombinante para 20 mM deste catião. Como controlo da dependência absoluta deste catião na atividade enzimática, utilizou-se o agente quelante EDTA (Fig. 19) verificando-se que a atividade da enzima é de facto dependente de catiões divalentes sendo que no caso específico da GpgS recombinante de *S. jiangxiensis*, entre os catiões testados, apenas Mg^{2+} e Mn^{2+} , ainda que com efeito menor, funcionam como ativadores (Fig. 20).

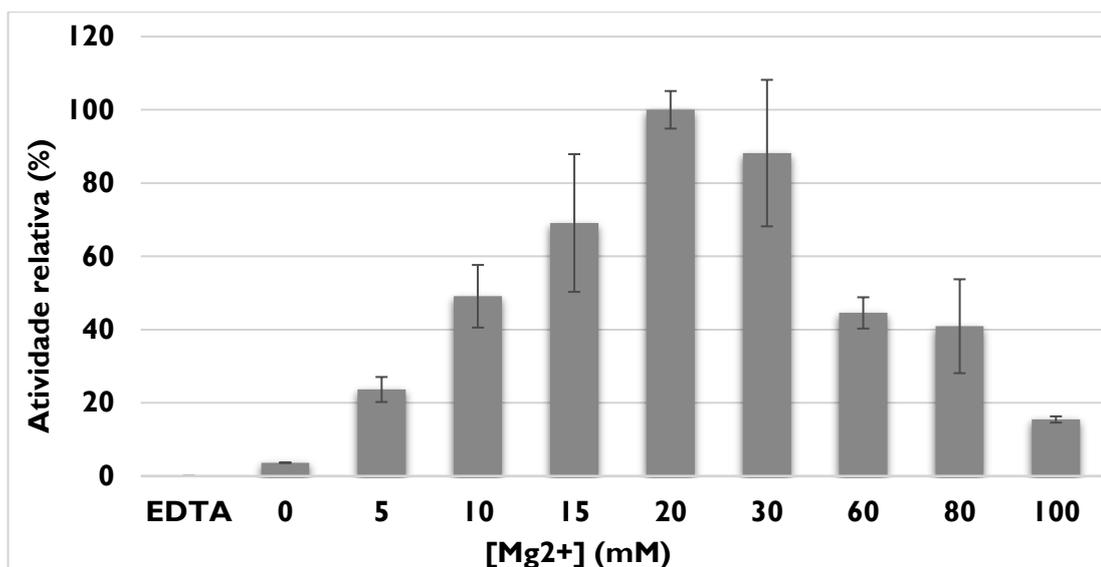


Figura 20 – Atividade da GpgS na presença de diferentes concentrações de Mg²⁺ e com EDTA como controlo.

3.3.3. Concentração de substratos

A atividade enzimática da GpgS recombinante de *S. jiangxiensis* foi máxima para concentrações de 5 mM de 3-PGA (Fig. 21) e 10 mM de UDP-glucose (Fig. 22), verificando-se uma ligeira inibição por substrato acima destas concentrações, para ambos os substratos, mas mais pronunciada para 3-PGA acima de 10 mM (<50%atividade).

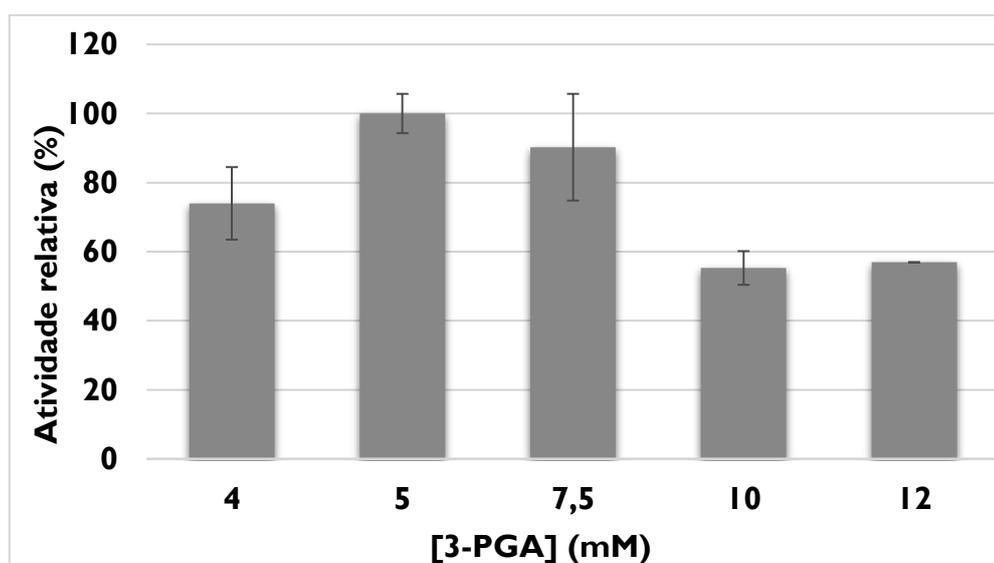


Figura 21 – Concentrações ótimas de 3-PGA para a atividade da GpgS recombinante.

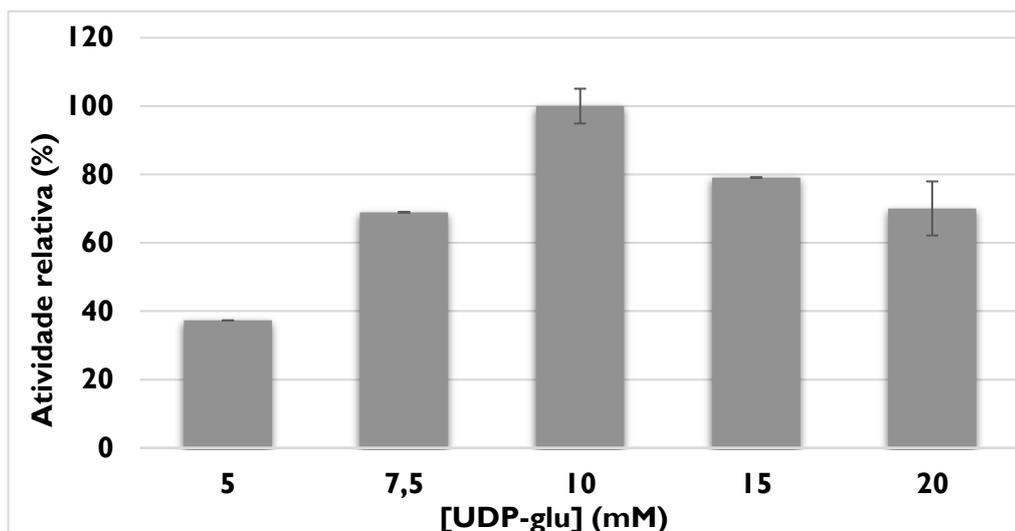


Figura 22 – Concentrações ótimas de UDP-glucose para a atividade da GpgS recombinante.

Testou-se também uma possível inibição por produto, no entanto, às concentrações testadas, entre 1 e 7,5 mM não se verificou inibição por GPG (Fig. 23).

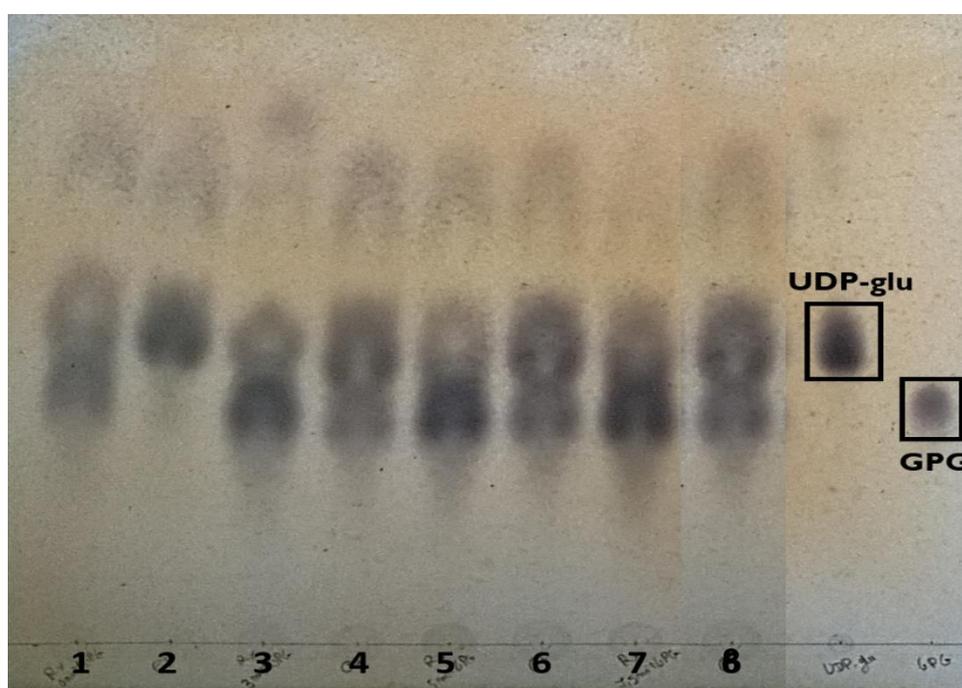


Figura 23 – Teste de inibição pelo produto na actividade da enzima GpgS recombinante de *S. jianxigensis*. Reacções contendo 50 mM BTP a pH 8,0, 5 mM UDP-glucose, 3 mM 3-PGA, 20 mM MgCl₂ e diferentes concentrações de GPG, com adição de 1 µg enzima recombinante, incubadas 15 min a 37°C. **Linhas 1 e 2** – reação e controlo sem enzima com 0 mM GPG. **Linhas 3 e 4** – reação e controlo sem enzima com 3 mM GPG. **Linhas 5 e 6** – reação e controlo sem enzima com 5 mM GPG. **Linhas 7 e 8** – reação e controlo sem enzima com 7,5 mM GPG.

3.3.4. Parâmetros cinéticos da atividade da GpgS

A GpgS recombinante de *S. jiangxiensis* exibiu uma cinética de Michaelis-Menten a 37°C com UDP-glucose até 2,5-15 mM (Fig. 24) e com 3-PGA até 1,5-6 mM (Fig. 25). Os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) são indicados na Tabela 4.

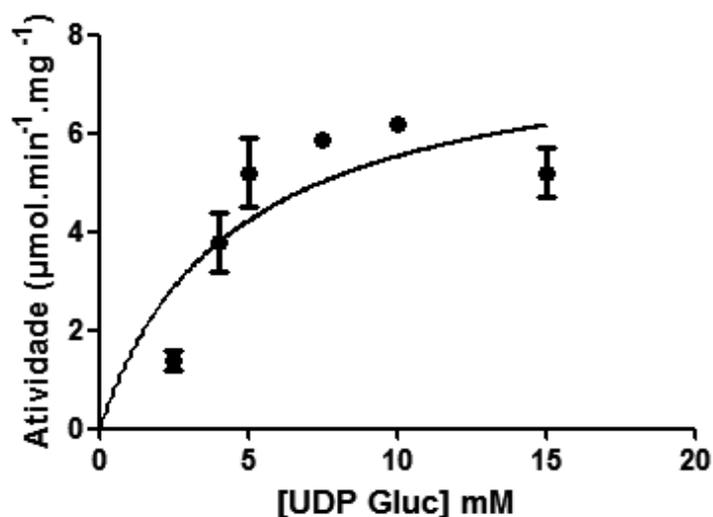


Figura 24 – Efeito da concentração de UDP-glucose na atividade da GpgS, com concentração constante de 5 mM (substrato em excesso) de 3-PGA e na presença de 20 mM de MgCl₂.

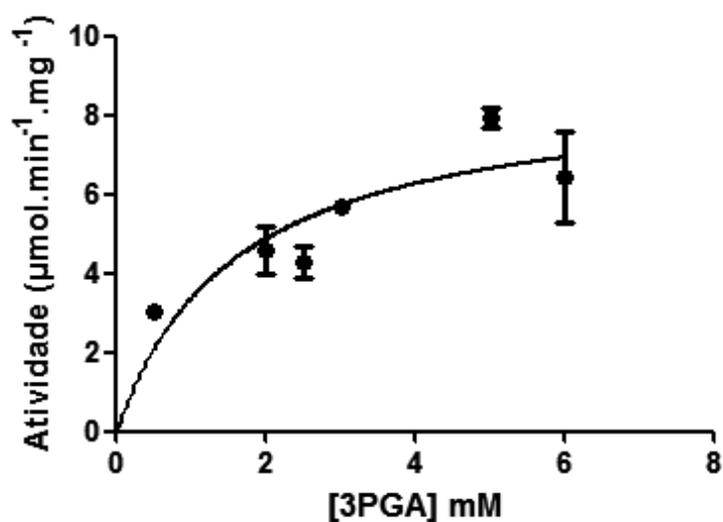


Figura 25 – Efeito da concentração de 3-PGA na atividade da GpgS, com concentração constante de 10 mM (substrato em excesso) de UDP-glucose e na presença de 20 mM de MgCl₂.

Tabela 4 – Parâmetros cinéticos da GpgS recombinante de *Streptacidiphilus jiangxiensis*.

GpgS	Substrato	Substrato A	K_m (A) (mM)	V_{max} (A) ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$)	K_{cat} (A) (s ⁻¹)
<i>Streptacidiphilus jiangxiensis</i>	3-PGA 5 mM	UDP-glucose	4,43 \pm 2,62	7,98 \pm 1,84	0,10 \pm 0,01
	UDP-glucose 10 mM	3-PGA	1,58 \pm 0,82	8,76 \pm 1,51	0,13 \pm 0,02

3.4. Extração e identificação de solutos orgânicos em *S. jiangxiensis*

Streptacidiphilus jiangxiensis foi crescido em duas condições distintas de temperatura procedeu-se à identificação dos solutos orgânicos recolhidos em fases de crescimento distintas (como descrito na secção 2.7 de Materiais e Métodos) por TLC (Fig. 26 e 27). Por análise comparativa de TLCs eluídas em diferentes sistemas de solventes podemos concluir que este organismo não acumula GG nas condições testadas. Podemos ainda concluir que acumula um produto com um padrão de migração semelhante a glucose, quando crescido a 35°C, apenas na sua fase exponencial e, de todos os produtos visíveis na TLC apenas conseguimos identificar o padrão de migração do açúcar trealose (Fig. 27). No entanto, sem uma análise mais detalhada destes produtos, nomeadamente por espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) não é possível confirmar inequivocamente a sua identidade.

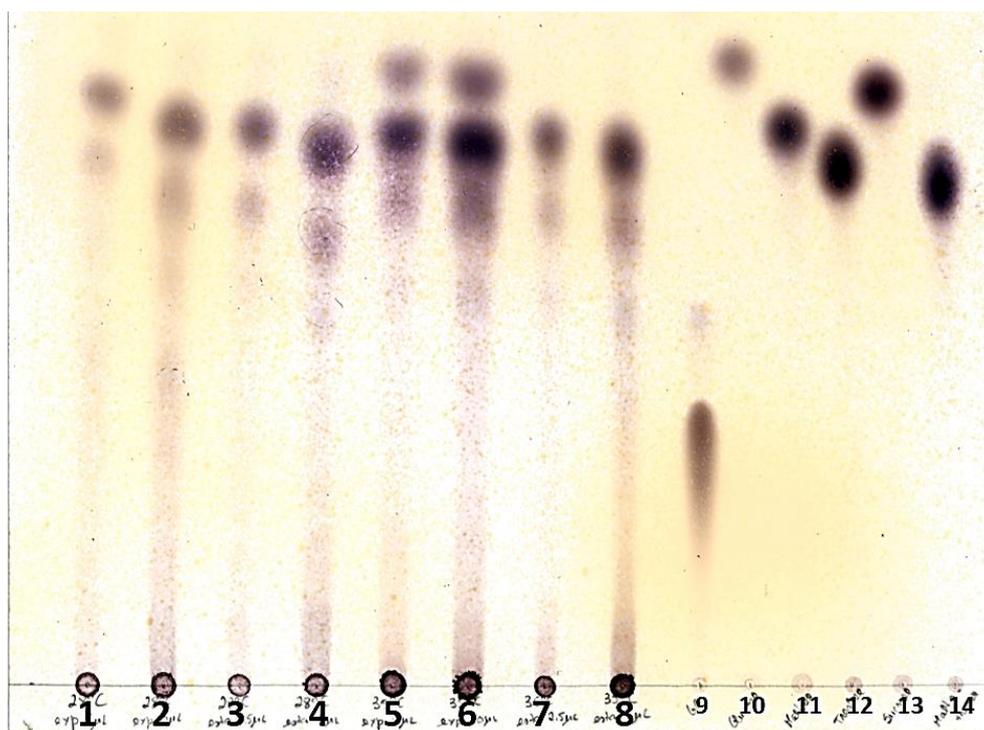


Figura 26 – Identificação de solutos orgânicos acumulados por *S. jiangxiensis* nas diferentes condições e fases de crescimento. TLC eluída em clorofórmio/metanol/ácido acético/água (30:50:8:4, v/v). **Linha 1** – 28°C fase exponencial (5 µL). **Linha 2** – 28°C fase exponencial (10 µL). **Linha 3** – 28°C fase estacionária (2,5 µL). **Linha 4** – 28°C fase estacionária (5 µL). **Linha 5** – 35°C fase exponencial (5 µL). **Linha 6** – 35°C fase exponencial (10 µL). **Linha 7** – 35°C fase estacionária (2,5 µL). **Linha 8** – 35°C fase estacionária (5 µL). **Linhas 9-14** – Padrões: GG, Glucose, Maltose, Trealose, Sucrose, Maltotriose.

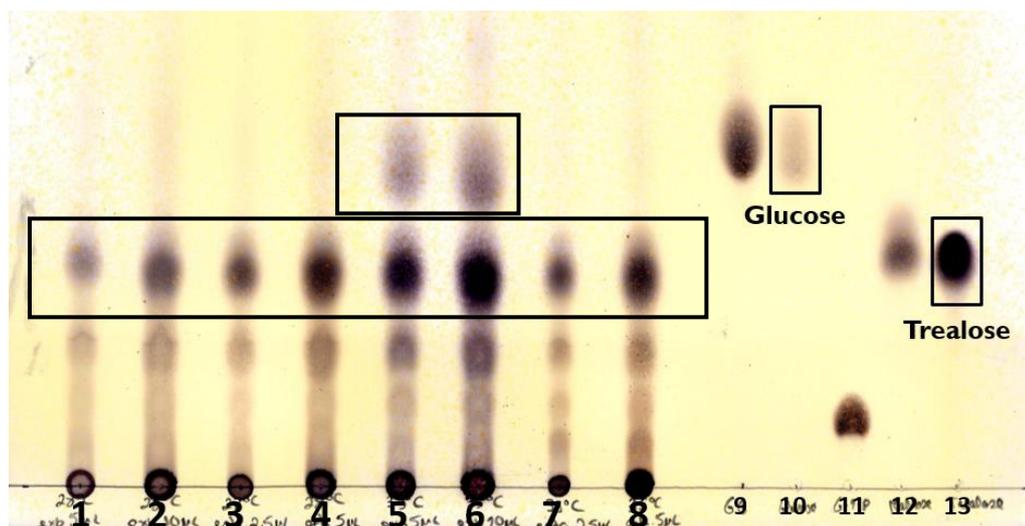


Figura 27 – Identificação de solutos orgânicos. Identificação de solutos orgânicos acumulados por *S. jiangxiensis* nas diferentes condições e fases de crescimento. TLC eluída em ácido acético/etil acetato/água/amônia 25% (6:6:2:1, v/v) **Linha 1** – 28°C fase exponencial (5 µL). **Linha 2** – 28°C fase exponencial (10 µL). **Linha 3** – 28°C fase estacionária (2,5 µL). **Linha 4** – 28°C fase estacionária (5 µL). **Linha 5** – 35°C fase exponencial (5 µL). **Linha 6** – 35°C fase exponencial (10 µL). **Faixas 7** – 35°C fase estacionária (2,5 µL). **Linha 8** – 35°C fase estacionária (5 µL). **Linhas 9-13** – Padrões: GG, Glucose, Glucose-1-fosfato, Maltose, Trealose.

CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO

A ocorrência de doenças infecciosas impulsionou o aumento gradual do surgimento de resistências bacterianas a agentes antimicrobianos, criando a necessidade da descoberta e desenvolvimentos de novos fármacos (Valgas et al., 2007).

A maior parte dos agentes antimicrobianos produzidos tem origem no isolamento e rastreamento de actinomicetes (Kumar et al., 2010). Este grupo de microrganismos encontra-se amplamente distribuído na natureza, sendo particularmente rico em organismos do solo, dos quais se destacam o género *Streptomyces*, um dos grandes produtores de antibióticos por excelência (Bentley et al., 2002; Bibb, 2005). A produção de metabolitos secundários é também relevante para estes organismos como forma de competição, seja esta intra ou interespecífica (Procópio et al., 2012).

Devido à importância do género *Streptomyces* na luta contra doenças infecciosas é interessante compreender a biologia de microrganismos relacionados, especialmente pertencentes a géneros ainda pouco explorados, como é o caso do género *Streptacidiphilus* que pertence à mesma família, *Streptomycetaceae* (Bentley et al., 2002). Dados preliminares de um trabalho anterior (Nunes-Costa, Tese de Mestrado, 2015) indicam a presença de um operão raro para a potencial produção de um antibiótico no genoma de *S. jiangxiensis*. Estes dados impulsionaram a escolha desta bactéria como organismo de estudo para o presente trabalho.

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana são realizados preliminarmente como “screening” e são fundamentais na medida em que permitem avaliar a susceptibilidade de microrganismos a agentes antimicrobianos (Jorgensen & Ferraro, 2009).

O estudo *in vitro* do potencial antimicrobiano de *S. jiangxiensis* foi avaliado contra quatro bactérias padrão origem clínica susceptíveis aos antibióticos: *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 29213, dois fungos: *Candida albicans* e *Penicillium* spp. e duas micobactérias *M. marinum* e *M. smegmatis*. Estas bactérias e fungos foram escolhidos ou pela sua importância clínica ou como organismo modelo. No caso particular das micobactérias foram também escolhidas, porque estudos em *Streptomyces* mostraram que a introdução de um organismo rico em ácidos micólicos no meio potencia a produção de metabolitos secundários (Asamizu et al., 2015). O aparecimento de actividade inibitória contra este conjunto de organismos indicaria que os metabolitos secundários produzidos, uma vez isolados, seriam potenciais candidatos para desenvolvimento de compostos com valor antimicrobiano. A validação de resultados seria possível através da comparação dos diferentes métodos utilizados.

Foram testados vários métodos de otimização de condições de expressão de metabolitos secundários. Estes métodos consistiram na indução de stress no organismo a testar, modificando parâmetros de crescimento ou introduzindo uma espécie competidora, de forma a provocar a ativação de mecanismos de defesa, como expressão de genes envolvidos na síntese de metabolitos secundários.

No entanto, os resultados dos vários testes de suscetibilidade ensaiados demonstraram ausência de atividade antimicrobiana de *S. jiangxiensis* contra os diferentes isolados bacterianos e fúngicos em teste (nomeadamente o aumento da densidade celular de *S. jiangxiensis*).

A otimização das condições de cultura é de extrema importância para a produção de metabolitos com potencial antibiótico, e esta ausência de atividade antimicrobiana por parte do *S. jiangxiensis* poderá ser devida ao facto de não terem sido identificadas condições que promovam a produção de metabolitos secundários... Estudos anteriores apontam para a necessidade de testar um elevado número de condições até encontrar uma condição ideal de expressão. Os autores destes estudos necessitaram de testar 40 a 45 condições diferentes de crescimento de forma a isolarem dois novos metabolitos secundários (Scherlach & Hertweck, 2006, Scherlach et al., 2010). Com este tipo de abordagem pretendem-se afinar três dos mais importantes parâmetros de crescimento: a composição do meio de cultura, o pH e a temperatura de crescimento (Ripa et al., 2009).

Apesar das células microbianas terem a capacidade de manter o pH intracelular constante mesmo na presença de grandes variações de pH extracelular, o pH do meio ambiente influencia o metabolismo celular e o pH do meio de cultura é um parâmetro fundamental na biossíntese de metabolitos secundários, podendo potenciar ou silenciar sua síntese (Wang et al., 2011). As variações no pH exercem um efeito significativo na atividade de diferentes enzimas que catalisam as reações metabólicas e influenciam fenómenos fisiológicos complexos, nomeadamente, a permeabilidade da membrana e a morfologia celular (Bundale et al., 2015). Generalizando, o pH ótimo para a produção de antibióticos em culturas de *Streptomyces* encontra-se muito próximo do neutro, como é o caso de *Streptomyces albidoflavus* (Bundale et al., 2015; Oskay, 2011). Contudo, existem espécies como *Streptomyces rimosus* e *Streptomyces padanus* PMS-702 cujo pH ótimo de produção de antibióticos é de 6 e 5,5, respectivamente (Oskay, 2011). Estes valores são, então, muito semelhantes ao pH ótimo do *S. jiangxiensis* (pH 5.5), daí a hipótese desta espécie poder ser capaz de produzir antibióticos a pH ácido. No entanto, isso não se verificou e os pHs testados poderão não ter sido suficientes para identificar o pH ótimo de produção de metabolitos secundários em *Streptacidiphilus*.

A temperatura de incubação também é um fator ambiental que tem efeito sobre o crescimento, assim como, na produção de metabolitos secundários com atividade antimicrobiana (Bundale et al., 2015). As temperaturas até hoje estudadas apresentam uma gama diversificada para diferentes espécies do mesmo género, desde 24°C para *Streptomyces lydicus*, 28°C para *Streptomyces erumpens* e *Streptomyces antimycoticus*, 30°C para *Streptomyces violatus* e 35°C para *Streptomyces albidoflavus* (Bundale et al., 2015; Oskay, 2011). Desta forma, e existindo esta gama de temperaturas tão variada para a biossíntese de metabolitos secundários dentro do género *Streptomyces*, as temperaturas testadas neste trabalho focado em *Streptacidiphilus jiangxiensis* provavelmente não foram variadas o suficiente para identificar uma temperatura ótima à qual pudesse ter sido detetada produção de metabolitos secundários.

No caso dos testes de competição, a optimização de parâmetros foi dificultada pelas diferentes temperaturas ótimas dos organismos em estudo, tendo sido sempre privilegiada a temperatura ótima de crescimento de *Streptacidiphilus jiangxiensis*. No entanto, esta mudança de temperatura pode ter contribuído para um decréscimo no potencial antagónico das espécies utilizadas e, por sua vez, na sua capacidade de induzir produção de metabolitos secundários na espécie de interesse.

Neste trabalho foi também estudada a acumulação de glucosilglicerato (GG) em *S. jiangxiensis*, por ser um soluto orgânico que se encontra frequentemente associado a condições de stress, nomeadamente nutricional ou osmótico, e que em micobactérias está provavelmente associado a stress térmico através da produção de um polissacárido metilado intracelular que regula a produção de ácidos gordos. Foi assim caracterizada a enzima responsável pelo primeiro passo da via biossintética para GG, GpgS, em *S. jiangxiensis*. No entanto, não foi detetada acumulação de GG nem estava no âmbito deste trabalho confirmar a existência de MGLP nesta bactéria. Assim, fica por determinar se GG é de facto produzido por *S. jiangxiensis* ou se o seu precursor GPG é alternativamente utilizado em vias metabólicas desconhecidas, sem ser desfosforilado a GG.

As enzimas GpgS utilizam NDP-glucose (NDP-G) e 3-fosfoglicerato (3-PGA) como precursores para sintetizar o intermediário glucosil-3-fosfoglicerato que é, posteriormente, desfosforilado a GG. Todas as enzimas GpgS caracterizadas até à data são extremamente específicas em relação ao substrato aceitador que utilizam, 3-PGA (Costa et al., 2007; Klähn et al., 2010; Costa et al., 2006; Cunha et al., 2013; Empadinhas et al., 2011; Fernandes et al., 2010). Com exceção das GpgS micobacterianas, que têm a particularidade de utilizarem D-glicerato na presença de ADP-glucose com muito baixa eficiência (Empadinhas et al., 2008) e

à semelhança das restantes GpgSs, a enzima de *S. jiangxiensis* é também extremamente específica utilizando apenas 3-PGA.

As GpgS apresentam também alta especificidade em relação aos dadores de glucose utilizados, ainda que a preferência possa variar de organismo para organismo. Mais uma vez, excepcionalmente, as enzimas micobacterianas apresentam uma grande diversidade na utilização destes substratos, apresentando com decrescente eficiência UDP-glucose, ADP-glucose, e GDP-glucose (Empadinhas et al., 2008), uma flexibilidade apenas ultrapassada pela GpgS de *Persephonella marina* que é também capaz de utilizar TDP-glucose (Empadinhas et al., 2007). Em linha com a especificidade para o dador de glucose apresentada por GpgSs, a enzima de *S. jiangxiensis* apresenta atividade apenas na presença de UDP-glucose. No entanto, é de realçar que o substrato GDP-glucose é um dos substratos mais comumente utilizados por estas enzimas e cuja atividade não foi testada.

É também importante referir que a enzima parece ser específica para a síntese de GPG, não apresentando especificidade dupla para substrato como demonstrado para a MpgS de *R. xylanophilus* que é capaz de sintetizar *in vitro* MPG ou GPG, dependendo dos substratos utilizados (Empadinhas & Da Costa, 2011). Neste caso, foi testado o dador de manose, GDP-manose, sem sucesso.

Uma particularidade das enzimas GpgS é o facto de serem dependentes de catiões divalentes para apresentarem a sua actividade ótima, uma característica também confirmada para a GpgS em estudo. Estas enzimas são preferencialmente ativadas por Mn^{2+} e Co^{2+} , enquanto as enzimas de micobactérias e a MpgS de *R. xylanophilus* preferem Mg^{2+} , à semelhança da enzima de *S. jiangxiensis* alvo deste estudo, que utiliza preferencialmente Mg^{2+} embora também seja ativada por Mn^{2+} .

Apesar de ser uma enzima recombinante de um organismo acidófilo do solo, a GpgS estudada apresenta um perfil de pH e de temperatura muito semelhante ao das GpgS micobacterianas, sendo o pH ótimo para a sua actividade de 8.0.

Todos os dados acima discutidos indicam-nos que, de facto, as GpgS actinobacterianas são diferentes das restantes e que mesmo dentro deste grupo, as GpgS micobacterianas incluem-se num grupo ainda mais restrito talvez devido a que nestes organismos o GG possa ter funções diversas e essenciais (Empadinhas & Da Costa, 2011; Mendes et al., 2012). A GpgS caracterizada neste estudo partilha algumas características funcionais com GpgS de actinobactérias e possui sequência de aminoácidos com identidade significativa formando um grupo filogenético coerente com as GpgSs desse grupo (Fig. 28).

Estudos adicionais serão necessários para corroborar esta conclusão, nomeadamente estudos mais exaustivos de acumulação de solutos em condições de limitação de azoto e a caracterização da enzima responsável pelo segundo passo da via de biossíntese de GG e estudos de PCR em tempo real/microarrays para compreender a possível ativação *in vivo* da expressão destas duas enzimas.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO

O aumento de doenças infecciosas e consequente resistência bacteriana requer o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. O trabalho apresentado nesta tese representa uma contribuição para o conhecimento do metabolismo de bactérias do género *Streptacidiphilus* e para a compreensão da adaptação desses organismos quando submetidos a condições de stress, que podem potenciar a produção de metabolitos antimicrobianos.

A hipótese proposta de que *Streptacidiphilus jiangxiensis* poderia apresentar propriedades antimicrobianas e possível produção de antibiótico não foi confirmada, o que nos leva a concluir que, apesar de terem sido detetados genes potencialmente envolvidos numa via de síntese dum antibiótico macrólido no seu genoma, a bactéria pode não o produzir, ou que as condições de crescimento testadas poderão não ser as indicadas para a produção desta classe de compostos. Foi ainda investigada a possível acumulação de GG, um metabolito associado a condições de stress, mas a não acumulação deste soluto orgânico por *Streptacidiphilus jiangxiensis* nas condições testadas pode indicar que embora possua uma GpgS funcional, o organismo pode não expressar o gene correspondente nas condições testadas, ou que GG não é acumulado na forma livre ou ainda que outras condições de crescimento ou stress poderão ser necessárias para desencadear a expressão dos genes que levam à síntese ou eventualmente acumulação detetável de GG.

Este trabalho exploratório representa um passo preliminar na investigação da fisiologia e metabolismo de microrganismos de grupos filogenéticos com relevância biomédica, mas ainda pouco investigados, designadamente *Streptacidiphilus jiangxiensis*. No entanto, são necessários novos estudos de produção de metabolitos secundários e de acumulação de solutos orgânicos recorrendo a mais diversas condições de stress que possam potenciar a expressão dos genes envolvidos nas vias correspondentes e com o objetivo maior de contribuir para o esforço necessário no combate a doenças infecciosas e ao fenómeno crescente de resistência a antibióticos.

BIBLIOGRAFIA

ALARICO, Susana et al. - *Mycobacterium hassiacum* recovers from nitrogen starvation with up-regulation of a novel glucosylglycerate hydrolase and depletion of the accumulated glucosylglycerate. *Scientific Reports*, 4, (2014) 6766.

AMEUR, Hanane; GHOUL, Mostefa; SELVIN, Joseph - The osmoprotective effect of some organic solutes on *Streptomyces* sp. mado2 and *Nocardiopsis* sp. mado3 growth. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, (2011) 543–553.

ARIAS, Cesar A.; MURRAY, Barbara E. - A New antibiotic and the evolution of resistance. *N Engl J Med.*, 372(12), (2015) 1168–1170.

ASAMIZU, Shumpei et al. - Killing of mycolic acid-containing bacteria aborted induction of antibiotic production by *Streptomyces* in combined-culture. *PLoS ONE*, 10(11), (2015) 1–17.

BARKA, Essaid Ait et al. - Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80, (2016) 1–43.

BECERRIL-ESPINOSA, A. et al. - Marine actinobacteria from the gulf of california: diversity, abundance and secondary metabolite biosynthetic potential. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103(4), (2013) 809–819.

BENTLEY, S.D. et al. - Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417, (2002) 141–147.

BIBB, Mervyn J. - Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 8(2), (2005) 208–215.

BROWN, Eric D; WRIGHT, Gerard D. - Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*, 529, (2016) 336–343.

BUNDALE, Sunita et al. - Optimization of culture conditions for production of bioactive metabolites by *Streptomyces* spp. isolated from soil. *Advances in Microbiology*, 5(5), (2015) 441–451.

CHO, Sung-Heun et al. - *Streptacidiphilus anmyonensis* sp. nov., *Streptacidiphilus rugosus* sp. nov. and *Streptacidiphilus melanogenes* sp. nov., acidophilic actinobacteria isolated from pinus soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, (2008) 1566–1570.

CLARDY, Jon; WALSH, Christopher. - Lessons from natural molecules. *Nature*, 432, (2004) 829–837.

CLAVERÍAS, Fernanda P. et al. - Culturable diversity and antimicrobial activity of

actinobacteria from marine sediments in valparaíso bay, chile. *Frontiers in Microbiology*, 6, (2015) 1–11.

COSTA, Joana et al. - Characterization of the biosynthetic pathway of glucosylglycerate in the archaeon *Methanococoides burtonii*. *Journal of Bacteriology*, 188(3), (2006) 1022-1030.

COSTA, Joana; EMPADINHAS, Nuno; DA COSTA, Milton S. – Glucosylglycerate biosynthesis in the deepest lineage of the *Bacteria*: characterization of the thermophilic proteins GpgS and GpgP from *Persephonella marina*. *Journal of Bacteriology*, 189(5), (2007) 1648-1654.

CUNHA, Sofia et al. - Mannosylglucosylglycerate biosynthesis in the deep-branching phylum *Planctomycetes*: characterization of the uncommon enzymes from *Rhodopirellula baltica*. *Scientific Reports*, 3 (2013).

DAVIES, Julian; DAVIES, Dorothy - Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), (2010) 417–433.

DHANASEKARAN, D.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A. - Applications of actinobacterial fungicides in agriculture and medicine. *Fungicides for Plant and Animal Diseases*, (2011).

DOROGHAZI, Jame R.; METCALF, William W. - Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. *BMC Genomics*, 14, (2013) 611.

EMPADINHAS, Nuno et al. - The bacterium *Thermus thermophilus*, like hyperthermophilic archaea, uses a two-step pathway for the synthesis of mannosylglycerate. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), (2003) 3272–3279.

EMPADINHAS, Nuno et al. - Organic solutes in *Rubrobacter xylanophilus*: the first example of di-myo-inositol-phosphate in a thermophile. *Extremophiles*, 11(5), (2007) 667–673.

EMPADINHAS, Nuno et al. - Identification of the mycobacterial glucosyl-3-phosphoglycerate synthase. *FEMS Microbiology Letters*, 280, (2008) 195–202.

EMPADINHAS, Nuno; DA COSTA, Milton S. - Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *International Microbiology*, 11, (2008) 151–161.

EMPADINHAS, Nuno; DA COSTA, Milton S. - Diversity, biological roles and biosynthetic pathways for sugar-glycerate containing compatible solutes in bacteria and archaea. *Environmental Microbiology*, 13(8), (2011) 2056–2077.

FALLIS, A. - Antimicrobial resistance: global report on surveillance. *Journal of Chemical*

Information and Modeling, 53, (2013), 257.

FARIA, Tiago Q. et al. - Design of new enzyme stabilizers inspired by glycosides of hyperthermophilic microorganisms. *Carbohydrate Research*, 343(18), (2008) 3025–3033.

FERNANDES, Chantal et al. - Two alternative pathways for the synthesis of the rare compatible solute mannosylglucosylglycerate in *Petrotoga mobilis*. *Journal of Bacteriology*, 192(6), (2010) 1624-1633.

FLEITAS, Osmel; AGBALE, Caleb M.; FRANCO, Octavio L. - Bacterial resistance to antimicrobial peptides: an evolving phenomenon. *Frontiers in Bioscience*, 21, (2016) 1013–1038.

FLEITAS, Osmel; FRANCO, Octavio L. - Induced bacterial cross-resistance toward host antimicrobial peptides: a worrying phenomenon. *Frontiers in Microbiology*, 7, (2016) 1–5.

FLEMING, Alexander - On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Bulletin of the World Health Organization*, 10(3), (1929) 226-236.

GEST, Petra et al. - Preliminary crystallographic analysis of GpgS, a key glucosyltransferase involved in methylglucose lipopolysaccharide biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 64(12), (2008) 1121–1124.

GLAESER, Stefanie P.; KÄMPFER, Peter - Streptomycetaceae: phylogeny, ecology and pathogenicity. *eLS*, (2016) 1–12.

GRIFFIN, Jennifer E. et al. - Cholesterol catabolism by *Mycobacterium tuberculosis* requires transcriptional and metabolic adaptations. *Chemistry Biology*, 19(2), (2012) 218–227.

GUIMARÃES, Denise O.; MOMESSO, Luciano da S.; PUPO, Mônica T. - Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33, (2010) 667–679.

GUNATILAKA, A. A. Leslie. - Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J Nat Prod*, 69(3), (2006) 509–526.

HOELZER, Karin et al. - Agar disk diffusion and automated microbroth dilution produce similar antimicrobial susceptibility testing results for *Salmonella* serotypes newport, typhimurium, and 4,5,12:i-, but differ in economic cost. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(12), (2011) 1281–1288.

HUANG, Ying et al. - *Streptacidiphilus jiangxiensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from acidic rhizosphere soil in china. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(2), (2004) 159–165.

IKEDA, Haruo et al. - Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(17), (1999) 9509–9514.

JACIN, H; MISHKIN, A. R. - Separation of carbohydrates an borate-impregnated silica gel g plates thin-layer. *Geology*, 18, (1965) 747–752.

JORGENSEN, James H.; FERRARO, Mary Jane - Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), (2009) 1749–1755.

KAMISANGO, Kei-echi; DELL, Anne; BALLOU, Clinton E. - Biosynthesis of the mycobacterial 0-methylglucose lipopolysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(10), (1987) 4580–4586.

KAUR, Devinder et al. - Initiation of methylglucose lipopolysaccharide biosynthesis in mycobacteria. *PLoS ONE*, 4(5), (2009) 1–7.

KESKAR, Mrudul R.; JUGADE, Ravin M. - Spectrophotometric investigations of macrolide antibiotics : a brief review. *Analytical Chemistry Insights*, 10, (2015) 29–37.

KIM, Seung Bum et al. - *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family *Streptomycetaceae* (Waksman and Henrici (1943)AL) emend. Rainey et al. 1997. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83(2), (2003) 107–116.

KLÄHN, Stephan et al. - Glucosylglycerate: a secondary compatible solute common to marine cyanobacteria from nitrogen-poor environments. *Environmental Microbiology*, 12(1), (2010) 83-94

KUMAR, Garima; GUAN, Siqi; FRANTOM, Patrick A. - Biochemical characterization of the retaining glycosyltransferase glucosyl-3-phosphoglycerate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 564, (2014) 120–127.

KUMAR, Narendra et al. - Isolation and screening of soil *Actinomycetes* as source of antibiotics active against bacteria. *International Journal of Microbiology Research*, 2(2), (2010) 12–16.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro - MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*,

33(7), (2016) 1870-1874.

LAMOS, Pedro et al. - Effects of temperature , salinity , and medium composition on compatible solute accumulation by *Thermococcus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), (1998) 3591–3598.

LARSON, Elaine - Community factors in the development of antibiotic resistance. *Annual Review of Public Health*, 28, (2007) 435–447.

LINHARES, Inês et al. - Incidence and diversity of antimicrobial multidrug resistance profiles of uropathogenic bacteria. *BioMed Research International*, (2015).

MARTINEZ, Jose L. - The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *The Royal Society*, 276, (2009) 2521–2530.

MENDES, Vitor et al. - Biosynthesis of mycobacterial methylglucose lipopolysaccharides. *Natural Product Reports*, 29(8), (2012) 834–844.

MENDES, Vitor et al. - Biochemical characterization of the maltokinase from *Mycobacterium bovis* BCG. *BMC Biochemistry*, 11, (2010) 21.

NUNES-COSTA, Daniela - Molecular and biochemical characterization of a rare glucokinase with a cryptic function in environmental mycobacteria; sob a orientação de Nuno Empadinhas. Coimbra: Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2015. Dissertação de Mestrado.

OSKAY, Mustafa - Effects of some Environmental Conditions on Biomass and Antimicrobial Metabolite Production by *Streptomyces* sp., KGG32. *International Journal of Agriculture Biololy*, 13(3), (2011) 317–324.

PEREIRA, Pedro José Barbosa et al. - *Mycobacterium tuberculosis* glucosyl-3-phosphoglycerate synthase: structure of a key enzyme in methylglucose lipopolysaccharide biosynthesis. *PLoS ONE*, 3(11) (2008).

PROCÓPIO, Rudi Emerson de Lima et al. - Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), (2012) 466–471.

RAMMELKAMP, Charles H.; MAXON, Thelma - Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Experimental Biology and Medicine*, 51(3), (1942) 386–389.

RIPA, F. A. et al. - Optimal conditions for antimicrobial metabolites production from a new *Streptomyces* sp. rupa-08pr isolated from bangladeshi soil. *Mycobiology*, 37(3), (2009) 211–214.

ROEBLER, Markus; MÜLLER, Volker - Osmoadaptation in bacteria and archaea:

common principles and differences. *Environmental Microbiology*, 3(12), (2001) 743–754.

RUTLEDGE, Peter J.; CHALLIS, Gregory L. - Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), (2015) 509–523.

SANDOVAL-MOTTA, Santiago; ALDANA, Maximino - Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 8(3), (2016) 253–267.

SCHERLACH, Kirstin; HERTWECK, Christian - Discovery of aspoquinolones A-D, prenylated quinoline-2-one alkaloids from *Aspergillus nidulans*, motivated by genome mining. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4, (2006) 3517–3520.

SCHERLACH, Kirstin et al. - Aspernidine A and B, prenylated isoindolinone alkaloids from the model fungus *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Antibiotics*, 63, (2010) 375–377.

SPELLBERG, Brad et al. - The future of antibiotics and resistance. *The New England Journal of Medicine*, 368(4), (2013) 297–299.

TENOVER, Fred C. - Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*, 34(5) (2006) 3-10.

TRAUT, T. W. - The limits for life define the limits for enzymes, (2008) 29–49.

URRESTI, Saioa et al. - Mechanistic insights into the retaining glucosyl-3-phosphoglycerate synthase from mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 287(29), (2012) 24649–24661.

VALGAS, Cleidson et al. - Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, (2007) 369–380.

VENTOLA, C. Lee - The antibiotic resistance crisis: part I: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 40(4), (2015) 277–283.

VENTURA, Marco et al. - Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), (2007) 495–548.

VON NUSSBAUM, Franz et al. - Antibacterial natural products in medicinal chemistry - Exodus or revival?, *Angewandte Chemie - International Edition*, 45(31), (2006) 5072–5129.

WANG, Yonghong et al. - Manipulation of pH shift to enhance the growth and antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, (2011).

ZHU, Hua; SANDIFORD, Stephanie K.; VAN WEZEL, Gilles P. - Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), (2014) 371–386.

ZUMLA, Alimuddin; NAHID, Payam; COLE, Stewart T. - Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(5), (2013) 388–404.

ZWIETERING, M. H. et al. - Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microb*, 56(6), (1990) 1875–1881.

**ANEXOS I -
PROTÓCOLOS E
SOLUÇÕES**

I) Meios de crescimento

▪ IPS2 (DSMZ 987)

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Extracto de Levedura	4 g	0,4%
Extracto de Malte	10 g	1%
Dextrose	4 g	0,4%
Agar (para meio sólido)	20 g	2%

Ajustar o pH do meio a 5,5 e esterilizar por autoclave a 120°C e à pressão de 1 atm, durante 20 minutos.

▪ Meio Luria-Bertani (LB)

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Triptona	10 g	1%
Extracto de Levedura	5 g	0,5%
NaCl	5 g	0,5%
Agar (para meio sólido)	20 g	2,0%

O meio foi esterilizado por autoclave a 120°C e à pressão de 1 atm, durante 20 minutos.

▪ Trypticase Soy Agar (TSA)

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Peptona de caseína	15 g	1,5%
Peptona de soja	5 g	0,5%
Cloreto de sódio	5 g	0,5%
Agar (para meio sólido)	15 g	1,5%

Ajustar o pH do meio a 7,3 e esterilizar por autoclave a 121°C e à pressão de 1 atm, durante 15 minutos.

- **Mueller-Hinton Agar (MH)**

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Peptona	17,5 g	1,75%
Sólidos de infusão de carne	2 g	0,2%
Amido	1,5 g	0,15%
Agar (para meio sólido)	17 g	1,7%

Ajustar o pH do meio a 7,3 e esterilizar por autoclave a 121°C e à pressão de 1 atm, durante 15 minutos.

2) Células Competentes

- **Solução RFI**

Reagente	Quantidade por 250 mL	Concentração Final
CH₃CO₂K	0,74 g	30 mM
CaCl₂	0,28 g	10 mM
MnCl₂	1,58 g	50 mM
Glicerol	37,5 mL	15%

A solução deve ser feita adicionando os reagentes pela ordem em que se encontram na tabela e o pH ajustado a 5,8 com ácido acético de forma a evitar a precipitação. A solução foi esterilizada por filtração.

- **Solução RF2**

Reagente	Quantidade por 50 mL	Concentração Final
MOPS	0,10 g	10 mM
CaCl₂	0,42 g	75 mM
Glicerol	7,5 mL	15%

Ajustar o pH a 6,8-7 de forma a evitar a precipitação da solução, sendo posteriormente esterilizada por filtração.

- **Preparação de células competentes**

Inicialmente, crescer as células de *E. coli* (estirpes BL21 ou DH5 α) em meio LB, a 37°C e 150 rpm, até $DO_{610nm} = 0,3-0,4$. Posteriormente, por centrifugação (durante 15 minutos a 3000 rpm, 4°C), em tubos estéreis, recolher 10 mL de células. Ressuspender gentilmente as células em 8 mL de solução RF1 e incubar em gelo durante 15 min. Centrifugar novamente as células durante 15 minutos a 3000 rpm, 4°C e ressuspender gentilmente as células em 2 mL de solução RF2 e incubar em gelo durante 15 minutos. Por fim, preparar 100 μ L de células e armazenar a -80°C.

3) Electroforese em Gel de Agarose 1%

- **Tampão TAE 50x**

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração final
Tris base	242 g	2 M
Ácido acético	57,1 ml	2 M
0,5 M EDTA pH 8	100 ml	0,05 M

Dissolver a Tris base na solução aquosa de EDTA, aquecendo a solução se for necessário para misturar os dois reagentes. Posteriormente, adicionar o ácido acético e ajustar o pH a 8 com NaOH a 0,05 M. Perfazer o volume final de 1L com água destilada.

- **Gel de Agarose 1%**

Reagente	Quantidade por 100 mL	Concentração Final
Agarose	1 g	1%
Tampão TAE 1x	100 mL	1x
RedSafe™ 20000x (Intron Biotechnology)	5 µL	1x

Adicionar a agarose ao tampão TAE 1x e aquecer a mistura. Após a agarose dissolver, deixar arrefecer a mistura à temperatura ambiente até cerca de 40-50°C e adicionar a solução de coloração DNA RedSafe™. Depois de o gel polimerizar, aplicar as amostras com loading buffer (Takara) e o marcador de pesos moleculares de DNA (NZYDNA Ladder III, NZYTech) e correr no tampão TAE 1x a 90 V sensivelmente durante 40 minutos.

4) Electroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio (SDS-PAGE)

- **Gel Resolving (12%)**

Reagente	Quantidade	Concentração Final
Acrilamida/bis-Acrilamida, solução 29:1 (40%) (NZYTech)	1,125 mL	12%
H₂O	1,63 mL	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	0,937 mL	0,4 M
Dodecilsulfato de Sódio (SDS) 10% (m/v)	37,5 µL	0,1%
Persulfato de amónio (APS) 10% (m/v)	37,5 µL	0,1%
TEMED	5µL	ND*

* Não determinada

O gel deve ser feito adicionando os reagentes pela ordem em que se encontram na tabela, sendo o APS e o TEMED os últimos, uma vez que são estes que permitem a polimerização do gel.

▪ **Gel Stacking (4%)**

Reagente	Quantidade	Concentração Final
Acrilamida/bis-Acrilamida, solução 29:1 (40%) (NZYTech)	0,119 mL	4 %
H₂O	0,806 mL	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	0,313 mL	0,1 M
Dodecilsulfato de Sódio (SDS) 10% (m/v)	12,5 µL	0,1%
Persulfato de amônio (APS) 10% (m/v)	12,5 µL	0,1%
TEMED	2,5 µL	ND*

* Não determinada

O gel deve ser feito adicionando os reagentes pela ordem em que se encontram na tabela, sendo o APS e o TEMED os últimos, uma vez que são estes que permitem a polimerização do gel.

▪ **Tampão de Corrida 10x, pH 8,3**

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Tris base	30,3 g	250 mM
Glicina	144g	1,92 M
SDS	10 g	1%

Iniciar a preparação do gel de poli-acrilamida com a montagem da cassette de vidro com 1,0 mm de espessura. Depois, verter a solução de gel resolving para o interior da cassette de vidro, sendo posteriormente coberto com isopropanol e esperar aproximadamente 30 minutos que o gel polimerize. De seguida, eliminar o isopropanol, verter a solução do gel stacking e inserir o pente. Aguardar que o gel polimerize. Depois de o gel polimerizar, retirar o pente e aplicar as amostras com loading buffer (5x SDS-PAGE Sample Loading Buffer, NYZTech) e o marcador de pesos moleculares de proteínas (NZYTech) e correr o gel no tampão de corrida 10x a 200 V durante sensivelmente 50 minutos.

▪ **Solução de Coloração**

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Coomassie R-250	1 g	0,1%
Ácido acético glacial	100 mL	10% (v)
Metanol	400 mL	40% (v)

Adicionar o ácido acético glacial a 500 mL de água ultra-pura, seguida do metanol e do corante Coomassie. Agitar a mistura de forma a homogeneizá-la e filtrar para remoção de partículas.

▪ **Solução de Descoloração**

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Metanol	250 mL	25% (v)
Ácido acético glacial	75 mL	7,5% (v)

Adicionar o ácido acético glacial a 675 mL de água ultra-pura e, de seguida, o metanol.

5) Tampão A (Tampão de Ligação)

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Na₂HPO₄·2H₂O	1,78 g	10 mM
NaH₂PO₄·2H₂O	1,56 g	10 mM
NaCl	29,22 g	0,5 M
Imidazol	1,36 g	20 mM

Ajustar o pH da solução para 7,4 e esterilizar por filtração.

6) Tampão B (Tampão de Eluição)

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Na₂HPO₄·2H₂O	1,78 g	10 mM
NaH₂PO₄·2H₂O	1,56 g	10 mM
NaCl	29,22 g	0,5 M
Imidazol	34 g	500 mM

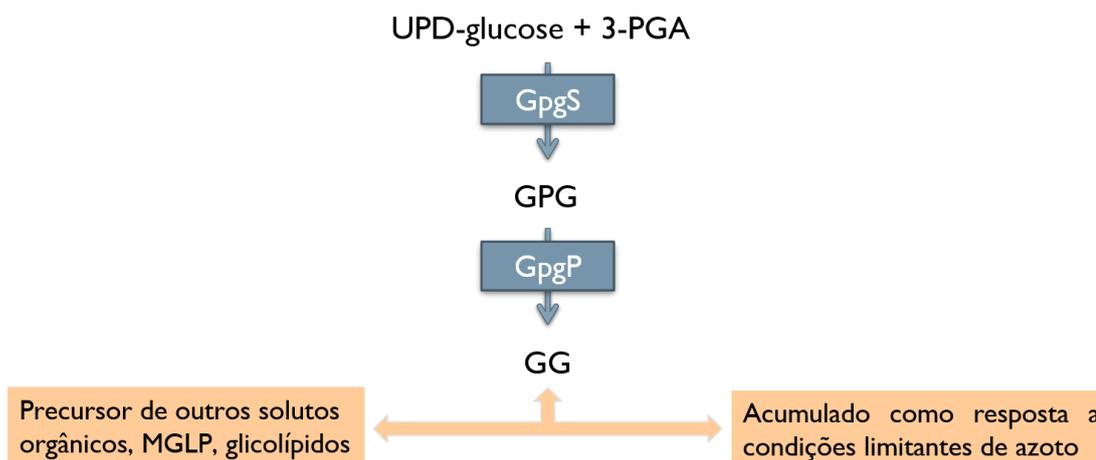
Ajustar o pH da solução para 7,4 e esterilizar por filtração.

7) Solução de ácido sulfúrico/ α -naftol

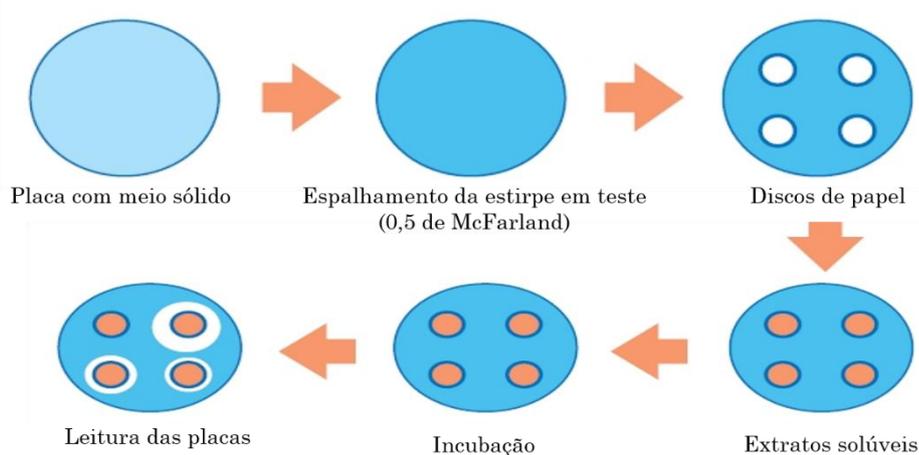
Reagente	Quantidade
Solução α-naftol a 15% em etanol	10,5 mL
Ácido sulfúrico concentrado	6,5 mL
Etanol absoluto	40,5 mL
H₂O	4,0 mL

ANEXOS II - ESQUEMAS

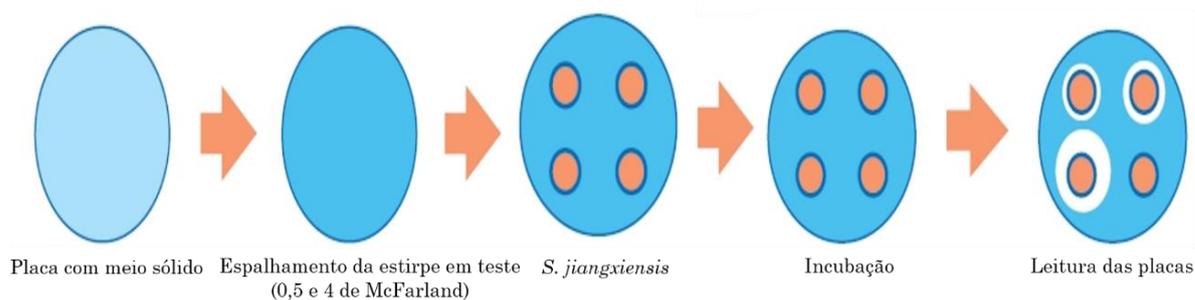
- (A) Representação esquemática da via de síntese do soluto orgânico GG e suas funções, descritas em organismos da classe Actinobactéria. Por ação da enzima GpgS catalisa a síntese do intermediário fosforilado GPG que é subsequentemente desfosforilado pela enzima GpgP originando GG. GpgS (glucosil-3-fosfoglicerato sintase); GPG (glucosil-3-fosfoglicerato); GpgP (glucosil-3-fosfoglicerato fosfatase); GG (glucosilglicerato).



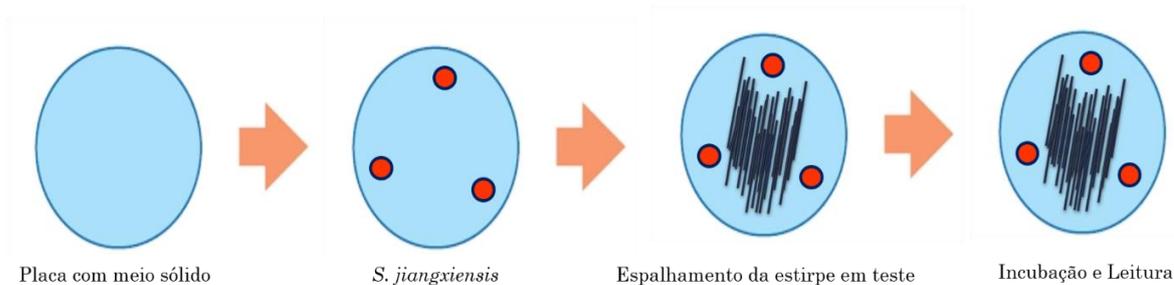
- (B) Esquema exemplificativo do método de difusão em disco para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *S. jiangxiensis*.



(C) Esquema exemplificativo do método de co-cultura em placa: método I para estudos de competição de *S. jiangxiensis*



(D) Esquema exemplificativo do método de co-cultura em placa: método II para estudos de competição de *S. jiangxiensis*.



(E) Esquema exemplificativo do método de repicagem em placa para estudos de competição de *S. jiangxiensis*.

