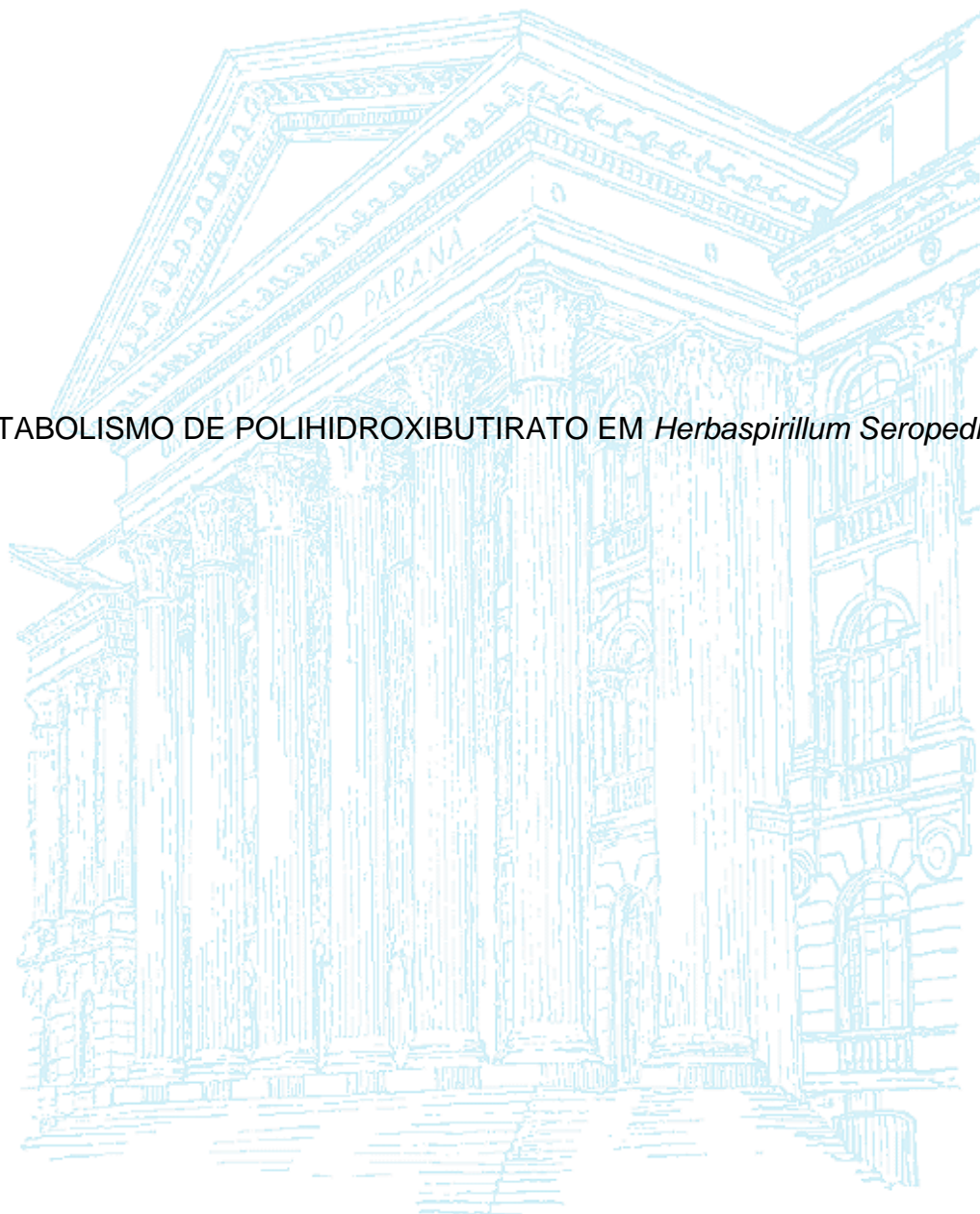


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HENRIQUE LEONARDO RUCHAUD CORRÊA

METABOLISMO DE POLIHIDROXIBUTIRATO EM *Herbaspirillum Seropedicae*



Curitiba  
2014

HENRIQUE LEONARDO RUCHAUD CORRÊA

METABOLISMO DE POLIHIDROXIBUTIRATO EM *Herbaspirillum Seropedicae*

Monografia apresentada à disciplina Monografia I e II como requisito parcial à conclusão do curso de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos

Curitiba  
2014



## **AGRADECIMENTOS**

Muitos foram aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Deixo aqui a minha mais sincera gratidão aos meus pais e irmã. Aos amigos e amigas do curso de Ciências Biológicas com os quais convivi durante o decorrer dessa caminhada. Não poderia deixar de mencionar os companheiros(as) que comigo compartilham o mesmo GRR (2010), sem cuja companhia e amizade ao longo desses quatro anos e meio nada disso seria concebível. Àqueles de fora da área biológica, agradeço especialmente a A. M. S. e L. R., que me auxiliaram a encontrar no amor e na amizade o verdadeiro valor do saber. Por fim, mas não menos importante, agradeço aos professores e colegas do laboratório, sem cujo auxílio, atenção e, principalmente, paciência, minha jornada até aqui não teria sido possível - Marcelo Müller dos Santos, cuja orientação dedicada possibilitou a realização deste trabalho; Leda Satie Chubatsu, por ter sido responsável por me introduzir no mundo científico; Paulo Labiak e Renato Goldenberg pelo incentivo e grande inspiração.

## RESUMO

*Herbaspirillum seropedicae* é um diazotrofo endofítico capaz de produzir e armazenar em grânulos intracelulares um poliéster biodegradável conhecido como polihidroxibutirato (PHB), que funciona como reserva de carbono e de potencial redutor na forma de NADPH. Uma característica importante que vem sendo observada é que uma alta relação C/N no meio parece estimular a síntese de PHB. Em *H. seropedicae*, o metabolismo de nitrogênio é regulado pelo sistema Ntr, composto pela enzima uridililtransferase (GlnD, codificada pelo gene *glnD*), as proteínas transdutoras de sinal da família PII (GlnB e GlnK, codificadas pelos genes *glnB* e *glnK*) a permease de amônia (AmtB, codificada pelo gene *amtB*) e o sistema de dois componentes NtrB-NtrC (codificado pelos genes *ntrB* e *ntrC*). Neste trabalho, determinou-se a porcentagem de produção de PHB por peso seco de bactéria na estirpe selvagem SmR1 e nos mutantes do sistema Ntr em condições de alta (NH<sub>4</sub>Cl 5 mmol/L) e em baixa relação C/N (NH<sub>4</sub>Cl 20 mmol/L). As maiores produções do polímero foram observadas na estirpe *ntrC*, chegando a 30% de PHB por peso seco de bactéria em ambas as condições de cultivo, cerca do dobro da estirpe selvagem, sugerindo que nesse mutante a produção de PHB está desacoplada da concentração de nitrogênio do meio. Sabe-se que sob condições limitantes de nitrogênio, NtrC funciona como regulador transcricional de genes envolvidos na assimilação de nitrogênio. Além disso, em *Pseudomonas putida*, foi demonstrado que NtrC também é capaz de reprimir a transcrição do gene *zwf-1* que transcreve para glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). A atividade de G6PDH é essencial para a regeneração do NADPH intracelular e sua repressão torna as células mais sensíveis ao estresse oxidativo. Para avaliar a resistência de *H. seropedicae* SmR1 e *ntrC* ao estresse oxidativo, mediu-se a densidade óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) das culturas cultivadas na presença de 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl como fonte de nitrogênio e diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a intervalos regulares de tempo. As curvas de crescimento mostraram que o mutante *ntrC* possui maior resistência ao estresse oxidativo quando comparado com SmR1, principalmente na presença de 1 mmol/L e 2 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estes dados podem ser justificados por uma maior disponibilidade de NADPH proveniente da atividade da G6PDH ou da degradação do PHB intracelular produzido em grandes quantidades pelo mutante *ntrC*.

Palavras chave: sistema Ntr, *Herbaspirillum seropedicae*, polihidroxibutirato, NtrC.

## ABSTRACT

*Herbaspirillum seropedicae* is an endophytic diazotrophic bacteria able to produce and store in intracellular granules a biodegradable polyester known as polyhydroxybutyrate (PHB), which works as a carbon and NADPH source. An important characteristic that is being observed is that high C/N ratio in growing media seems to stimulate PHB synthesis. In *H. seropedicae*, nitrogen metabolism is regulated by Ntr system, composed by an uridililtransferase (GlnD, encoded by *glnD* gene), a PII signal transduction proteins (GlnB and GlnK, encoded by *glnB* and *glnK* genes), an ammonium permease (AmtB, encoded by *amtB* gene) and the NtrB-NtrC two component system (encoded by *ntrB* and *ntrC* genes). In this work we determined the percentage of PHB produced by cell dry weight (DCW) in wild strain SmR1 and Ntr system mutants cultivated under high C/N ratio (NH<sub>4</sub>Cl 5 mmol/L) and low C/N ratio (NH<sub>4</sub>Cl 20 mmol/L). The highest amounts of PHB production were observed in *ntrC* strain, reaching 30% of PHB/DCW in both growing conditions, up to two times more than observed the wild strain, suggesting that in *ntrC* strain, PHB production and nitrogen concentration in the media are uncoupled. It is known that under nitrogen limiting conditions, NtrC acts as a regulator of several genes involved in nitrogen assimilation. Besides, in *Pseudomonas putida*, it has been demonstrated that NtrC is also capable of repressing the *zwf-1* gene encoding to glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). G6PDH activity is also essential for regeneration of intracellular NADPH and its repression increases the sensitivity of cells to oxidative stress. To evaluate the resistance of *H. seropedicae* SmR1 and *ntrC* to oxidative stress, we measured the optic density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of cultures grown in the presence of NH<sub>4</sub>Cl 20 mmol/L as nitrogen source and under different concentrations of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The growth curves showed that *ntrC* is significantly more resistant to oxidative stress when compared to SmR1, mainly in the presence of 1 mmol/L and 2 mmol/L of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. These data can be justified by an increase in NADPH availability provided by G6PDH activity or from the degradation of intracellular PHB produced in large quantities by *ntrC* mutant.

Key words: Ntr system, *Herbaspirillum seropedicae*, polyhydroxybutyrate, NtrC.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
1.1	POLIHIDROXIALCANOATOS	10
1.2	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	12
1.3	VIA DE BIOSÍNTESE DE PHB EM BACTÉRIAS	13
1.4	RELAÇÃO ENTRE METABOLISMO NITROGENADO E PRODUÇÃO DE PHB	14
1.5	O SISTEMA Ntr EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
2.1	OBJETIVO GERAL DO PROJETO	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>18</b>
3.1	ESTIRPES BACTERIANAS E VETORES	18
3.2	ANTIBIÓTICOS	19
3.3	MEIOS DE CULTIVO	19
3.4	METANÓLISE PARA QUANTIFICAÇÃO DE PHB	20
3.5	QUANTIFICAÇÃO DE PHB POR CROMATOGRAFIA GASOSA	21
3.6	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS ESTIRPES BACTERIANAS NA PRESENÇA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	21
3.7	CURVA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	22
3.8	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES	22
3.9	PCR (Polymerase Chain Reaction)	22
3.10	REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO	24
3.11	PREPARO DE CÉLULAS TERMOCOMPETENTES	24
3.12	TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS POR CHOQUE TÉRMICO	24
3.13	CONSTRUÇÃO DA ESTIRPE <i>ntrB</i> DE <i>H. seropedicae</i>	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>26</b>
4.1	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE PHB EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	26
4.2	EFEITO DA PRESENÇA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NO CRESCIMENTO DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 E MUTANTE <i>ntrC</i>	32
4.3	CONSTRUÇÃO DO MUTANTE <i>ntrB</i> DE <i>H. seropedicae</i>	36
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>41</b>





## 1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que os plásticos derivados do petróleo são baratos, resistentes à corrosão, leves, duráveis e excelentes isolantes térmicos. Entretanto, podem afetar negativamente as condições climáticas do planeta através do aumento da emissão de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Além disso, esses plásticos não podem ser degradados pela microbiota ambiental por falta de aparato enzimático adequado, levando ao seu crescente acúmulo no meio ambiente (ATLAS e BARTHA, 1997). Por este motivo, muitos países têm procurado desenvolver materiais que os substituam. Tais materiais devem possuir as propriedades singulares dos plásticos convencionais e ainda serem completamente biodegradáveis quando descartados no ambiente (LEE, 1996).

Uma alternativa que pode contribuir para a diminuição dos danos causados pelo uso de plásticos de origem petrolífera é a utilização de poliésteres de origem microbiana tais como os polihidroxialcanoatos (PHAs), entre eles o polihidroxibutirato (PHB). Estes polímeros, que são produzidos em grandes quantidades por algumas bactérias, possuem propriedades termoplásticas que lhes permitem serem moldados ou transformados em filmes para inúmeras aplicações, além de apresentarem vantagens sobre os polímeros de origem petroquímica por serem biodegradáveis e biologicamente renováveis, minimizando impactos ambientais (STEINBUCHER e FUCHTENBUSCH, 1998). Além disso, os PHAs podem ser reciclados ou até mesmo degradados enzimaticamente para aproveitamento do ácido (R)-3-hidroxibutírico que possui alto valor agregado para processos de síntese orgânica, uma vez que é obtido na forma isomericamente pura (TOKIWA & UGWU, 2007).

Apesar das vantagens quanto à preservação do meio ambiente, os plásticos biodegradáveis ainda correspondem a uma parcela muito pequena do mercado internacional, dominado pelos plásticos de origem petroquímica, fazendo com que seja necessário o desenvolvimento de alternativas que possibilitem aperfeiçoar a produção bacteriana de PHA. Uma das estratégias mais utilizadas é a manipulação genética de microrganismos. Entretanto, para que os objetivos desta abordagem

sejam alcançados é preciso antes conhecer em nível molecular os processos de síntese e regulação do polímero na bactéria de interesse.

## 1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS

Os PHAs são biopolímeros não tóxicos, insolúveis em água, sintetizados por diversas bactérias gram-negativas e gram-positivas e com propriedades físicas e químicas semelhantes ao polipropileno (KADOURI *et al.*, 2005). Esses polímeros são acumulados na forma de grânulos em quantidades que podem chegar até 90% do peso seco das células, estando envolvidos nos processos de estocagem de carbono e equivalentes redutores. Os PHAs constituem um excelente composto de armazenamento porque através da polimerização de intermediários solúveis na formação de macromoléculas insolúveis, as células são capazes de manter grandes quantidades desse material a um custo relativamente baixo de manutenção e sem alteração do equilíbrio osmótico (MADISON & HUISMAN, 1999).

A estrutura básica do monômero de PHA é mostrada na Figura 1, onde R representa a cadeia lateral e X representa o comprimento do grupo alquila. Quando o número total de átomos de carbono nessas duas posições é menor ou igual a 5, os polímeros resultantes são classificados como polihidroxicanoatos de cadeia curta (SCL PHA - Short Chain Length PHA). Monômeros com número total de carbonos entre 6 e 14 produzem polímeros classificados como polihidroxicanoatos de cadeia média (MCL PHA - Medium Chain Length PHA) e monômeros com mais de 14 carbonos produzem polímeros classificados como polihidroxicanoatos de cadeia longa (LCL PHA - Long Chain Length PHA). SCL e MCL PHAs possuem características próximas às dos termoplásticos, enquanto que os SCL PHAs possuem propriedades semelhantes aos polímeros termofixos (TIMM e STEINBUCHER, 1990; MADISON & HUISMAN, 1999; LOO & SUDESH, 2007).

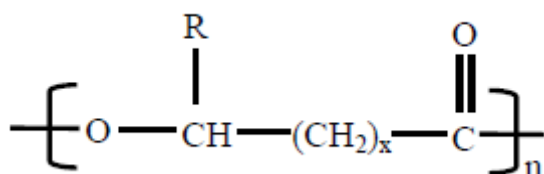


FIGURA 1 - Estrutura geral dos PHAs (LOO & SUDESH, 2007).

São conhecidos mais de 150 diferentes tipos de ácidos polihidroxicarboxílicos capazes de constituir PHAs. A grande diversidade de polímeros possíveis de serem sintetizados está relacionada às diferentes estirpes bacterianas e suas respectivas singularidades metabólicas, aos substratos e suplementos fornecidos e às condições de cultivo. Assim, variações no comprimento, na composição e na habilidade de modificar diferentes componentes da cadeia lateral são a base da diversidade dos PHAs, gerando uma extensa gama de aplicações. Entretanto, poucos PHAs são produzidos em quantidades suficientes para caracterização e aprimoramento de aplicações (LEE, 1996; REHM, 2003; STEINBÜCHEL e EVERSLOH, 2003; GURIEFF e LANT, 2007).

O primeiro PHA a ser descrito e o mais bem caracterizado é o poli-3-hidroxi-butanato (PHB). O PHB é um polímero amplamente sintetizado por um grande número de bactérias gram-negativas e gram-positivas que pode ser produzido a partir de diversas fontes de carbono, entre elas malato, glucose e frutose (LEE *et al.*, 1999; DU *et al.*, 2001). Com relação às suas propriedades físicas, o PHB intracelular existe como um fluido amorfo. Entretanto, logo após a extração da célula com o uso de solventes orgânicos, o PHB se torna irreversivelmente cristalino (DOI, 1995). Estudos biotecnológicos voltados para facilitar o processamento do PHB resultaram na incorporação do ácido 3-hidroxi-valerato (3HV) ao PHB para produzir o copolímero polihidroxi-butanato-co-hidroxi-valerato (P3HB-co-3HV) que possui propriedades mecânicas semelhantes ao polipropileno (MARCHESSAULT *et al.*, 1996; PREUSTING *et al.*, 1990)

Sob condições de cultivo onde há pouca disponibilidade de nitrogênio, o PHB constitui uma alta porcentagem do peso seco das células. Quando esta situação é revertida, a produção de PHB diminui (DAWES & SENIOR, 1973). Essa característica se deve ao fato do PHB se comportar como um polímero de reserva semelhante ao amido e ao glicogênio, de modo que parte do carbono assimilado pela bactéria é estocado sob forma de PHB. Quando o substrato é retirado, a produção do polímero é imediatamente interrompida e a sua degradação é iniciada, fornecendo equivalentes redutores na forma de NADPH e esqueletos carbônicos para a síntese de biomoléculas (DOUDOROFF e STAINER, 1959; GRIEBEL, SMITH & MERRICK, 1968; BYROM, 1987).

## 1.2 *Herbaspirillum seropedicae*

O gênero *Herbaspirillum* compreende atualmente treze espécies identificadas, *H. seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986), *H. rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, 1996), *H. frinsigense* (KIRCHHOF *et al.*, 2001), *H. lusitanum* (VALVERDE *et al.*, 2003), *H. chlorophenolicum*, *H. huttiense subsp. putei*, *H. huttiense subsp. huttiense* (LEIFSON, 1962; DING e YOKOTA, 2004; DOBRITSA *et al.*, 2010), *H. autotrophicum* (DING e YOKOTA, 2004), *H. hiltneri* (ROTHBALLER *et al.*, 2006), *H. frisingense* (KIRCHHOF, 2001); *H. rhizosphaerae*, (JUNG, 2007); *Herbaspirillum* species 3 (BALDANI *et al.*, 1996), *H. aquaticum* (DOBRITSA, *et al.*, 2010), *H. massiliense* (LAGIER *et al.*, 2012) e *H. psychrotolerans* (BAJERSKI *et al.*, 2013).

Este projeto tem como alvo de estudo do vibrióide gram-negativo *Herbaspirillum seropedicae*, isolado primeiramente no estado do Rio de Janeiro à partir de rizosfera e tecidos desinfestados de diversas plantas de importância econômica como cana-de-açúcar, milho, trigo e arroz. A bactéria, cujo diâmetro varia de 0,6 µm a 0,7 µm, comprimento de 1,5 µm a 5 µm e que pode apresentar um a três flagelos nos pólos, é capaz de fixar nitrogênio em uma ampla faixa de pH (5,3 a 8,0) (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992; BALDANI e BALDANI, 2005).

A colonização das plantas ocorre através de rupturas no tecido radicular, ou pontos de emergência das raízes laterais, sobrevivendo nos espaços intercelulares, aerênquima e xilema das raízes, podendo também alcançar caules e folhas (JAMES *et al.*, 2002). Ácidos orgânicos são as principais fontes de carbono, embora glicose, galactose e arabinose sejam utilizadas, enquanto a sacarose não é utilizada como fonte de carbono (BALDANI *et al.*, 1986).

Vários genes envolvidos na fixação de nitrogênio e no metabolismo global de nitrogênio deste organismo foram identificados e caracterizados. Uma grande vantagem dos estudos moleculares de *H. seropedicae* foi alcançada com o sequenciamento genômico desta bactéria, permitindo a caracterização de um grande número de genes e das proteínas por eles codificadas.

Além de seu potencial como fixador de nitrogênio em gramíneas, *H. seropedicae* também é capaz de produzir PHB, estocando-o em grânulos intracelulares (Fig. 2). Estudos prévios também demonstraram que *H. seropedicae* produziu PHB a 36% do peso seco da cultura com glucose a 50 mmol/L como fonte

de carbono e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 20mmol/L como fonte de nitrogênio (CATALÁN *et al.*, 2007).

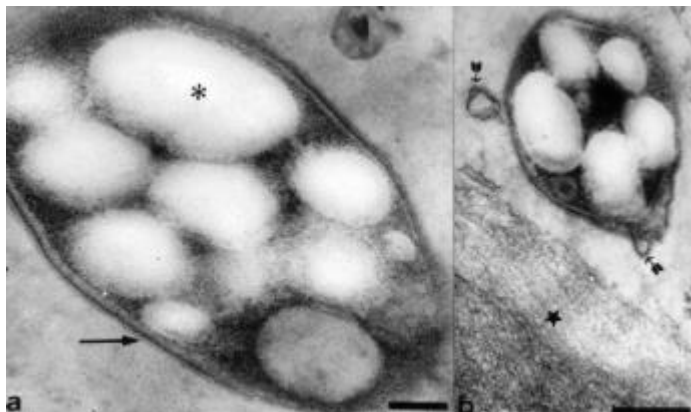


FIGURA 2 - *H. seropedicae* BR11175 colonizando tecido de cana-de-açúcar; A: Grânulos de PHB (\*) e parede celular (->); B: Bactéria próxima à parede celular da planta (estrela) e estruturas da parede celular da bactéria (setas); Barras A,B: 100 nm (SILVA & MIGUENS, 2003).

### 1.3 VIA DE BIOSÍNTESE DE PHB EM BACTÉRIAS

O estudo da produção biotecnológica de PHAs tem enfoque na compreensão a nível molecular das vias bioquímicas envolvidas na biossíntese. Para tal, os genes que se acredita estarem envolvidos na biossíntese desses polímeros estão sendo extensivamente clonados e analisados. Em *Ralstonia eutropha*, observou-se que os três genes responsáveis pela biossíntese de PHB estão organizados no operon *phaCAB*, sendo que *phaA* codifica para uma ceto-tiolase, *phaB* codifica para uma acetoacetil-CoA redutase NADPH-dependente e *phaC* codifica para PHB sintase, (STEINBÜCHEL, *et al.*, 1992; REHM e STEINBÜCHEL, 1999; PÖTTER e STEINBÜCHEL, 2005; PEOPLES e SINSKEY, 1989; SCHUBERT, STEINBÜCHEL e SCHELEGEL, 1988; SLATER, VOIGE e DENNIS, 1988; POHLMANN, FRICKE e REINECKE, 2006).

Em *H. seropedicae*, acredita-se também que a biossíntese de PHB envolve três reações enzimáticas: 1) formação do acetoacetil-CoA a partir de duas moléculas de acetil-CoA pela ação de uma tiolase; 2) redução do acetoacetil-CoA a R-(-)-3-hidróxi-butilil-CoA pela ação da enzima acetoacetil-CoA redutase; 3) polimerização de R-(-)-3-hidróxi-butilil-CoA pela ação da enzima PHA sintase (STEINBÜCHEL & FÜNCHTENBUSCH, 1998), conforme esquema da Figura 3. Em seguida, o polímero

é armazenado em grânulos intracelulares, cuja homeostase envolve genes já clonados e caracterizados, tais como *phaP*, que codifica para uma fasina (proteína mais abundante associada ao grânulo), *phaZ*, que codifica para uma PHA depolimerase (realiza a mobilização do grânulo) e *phbF*, que codifica para uma proteína regulatória (STUBBE & TIAN, 2003).

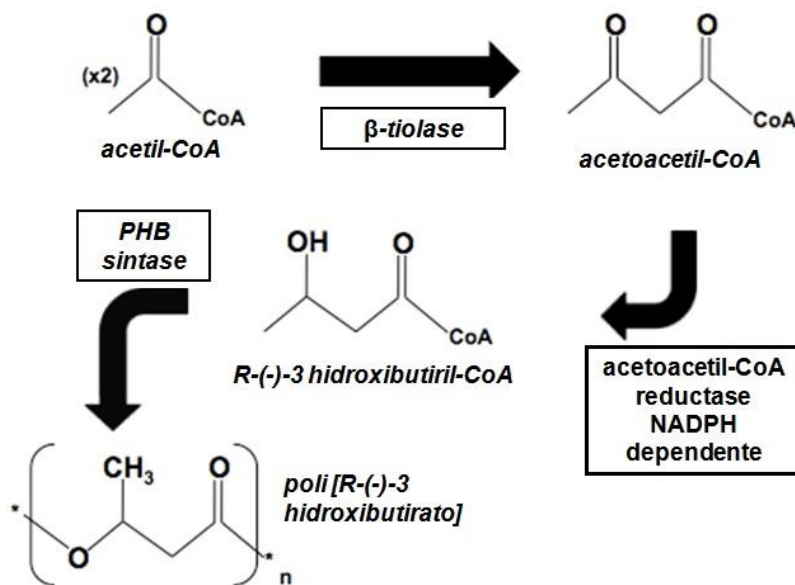


FIGURA 3 - Via biossintética de produção de PHB (STEINBÜCHEL *et al.*, 1992).

#### 1.4 RELAÇÃO ENTRE METABOLISMO NITROGENADO E PRODUÇÃO DE PHB

As taxas de produção e acúmulo de PHB estão relacionadas com a disponibilidade de certos nutrientes no meio de cultivo, tais como carbono e nitrogênio. Estudos anteriores (CATALÁN *et al.*, 2007) demonstraram que uma alta concentração de íons  $\text{NH}_4^+$  (20 mmol/L) praticamente elimina a produção de PHB em *H. seropedicae*, enquanto que, ao final da fase exponencial de crescimento, quando a concentração de  $\text{NH}_4^+$  no meio diminui para cerca de 5 mmol/L, a produção de PHB sofre um aumento. Em *Azospirillum brasiliense* Sp7, foi demonstrado que a taxa respiratória de mutantes *ntrBC* e *ntrC* diminuiu significativamente em comparação com a estirpe selvagem, indicando que os genes *ntrB* e *ntrC* podem estar envolvidos com a regulação de genes do metabolismo respiratório. Também foi demonstrado que esses mutantes são capazes de

acumular PHB durante a fase exponencial e durante a fase estacionária, tanto em altas quanto em baixas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ , evidenciando que o sistema NtrB-NtrC está envolvido com a produção de PHB (SUN *et al.*, 2000). Os genes *ntrB* e *ntrC* codificam para uma histidina quinase e para um regulador transcricional, respectivamente (MERRICK & EDWARDS, 1995). O sistema NtrB-NtrC é um sistema de dois componentes que tem como função o sensoriamento dos níveis de nitrogênio da célula e é parte integrante do sistema de assimilação de nitrogênio (Ntr). Em baixos níveis de nitrogênio, NtrB catalisa a fosforilação de NtrC e conseqüentemente sua ativação. NtrC fosforilada é responsável por ativar a transcrição de vários genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio em bactérias (SUN *et al.*, 2000). No entanto, até o momento nenhum gene envolvido na biossíntese de PHB teve sua regulação diretamente relacionada com o sistema NtrB-NtrC.

### 1.5 O SISTEMA Ntr EM *Herbaspirillum seropedicae*

O sistema Ntr é responsável pela regulação do metabolismo de nitrogênio de acordo com a necessidade da célula. As bactérias em geral têm preferência pelo amônio como fonte de nitrogênio e quando este está presente no meio, é captado por um sistema de transporte específico, ativando e/ou reprimindo várias vias para a utilização de diferentes fontes de nitrogênio (MERRICK & EDWARDS, 1995).

O sistema Ntr em *H. seropedicae*, é composto pela enzima uridililtransferase (GlnD, codificada pelo gene *glnD*), as proteínas transdutoras de sinal da família PII, GlnB e GlnK (codificadas pelos genes *glnB* e *glnK*, respectivamente), a permease de amônia (AmtB, codificada pelo gene *amtB*), glutamina sintetase (GS, codificada pelo gene *glnA*), adenililtransferase (GlnE, codificada pelo gene *glnE*) e o sistema de dois componentes NtrB-NtrC (codificado pelos genes *ntrB* e *ntrC*, respectivamente). O operon *glnB* é monocistrônico e constitutivo (BENELLI *et al.*, 1997). O gene *glnK* é co-transcrito com *amtB*, que codifica para um transportador de amônio. A expressão do operon *glnKamtB* é aumentada em condições limitantes de nitrogênio e é dependente de NtrC (NOINDORF *et al.*, 2006).

As proteínas PII de *H. seropedicae* são modificadas covalentemente e reversivelmente pela proteína GlnD. As proteínas GlnB e GlnK e a enzima GlnD de *H. seropedicae* foram purificadas e caracterizadas *in vitro*. Os estudos mostraram que GlnB e GlnK podem ser uridililadas e desuridililadas *in vitro* por GlnD (BONATTO *et al.*, 2007a,b). Semelhante ao observado para as proteínas PII em *E. coli*, as reações de uridililação de GlnB e GlnK de *H. seropedicae* necessitam dos efetores ATP e 2-oxoglutarato e são inibidas por glutamina (BONATTO *et al.*, 2007b), indicando que o estado de uridililação intracelular das proteínas GlnK e GlnB refletem os níveis intracelulares de carbono, energia e nitrogênio fixado.

De acordo com estas informações foi possível construir um modelo para o sistema Ntr em *H. seropedicae*. Em níveis de fixação de nitrogênio, a amônia proveniente da redução de N<sub>2</sub> é metabolizada em glutamina pela ação da GS presente na forma ativa (não modificada). A concentração intracelular de glutamina é baixa e GlnD uridilila GlnB e GlnK (JIANG *et al.*, 1998; NINFA *et al.*, 2000; BENELLI *et al.*, 2001; BONATTO *et al.*, 2007a,b). GlnB-UMP e GlnK-UMP não podem interagir com NtrB, permitindo que NtrB fosforile NtrC (JIANG *et al.*, 2000. NINFA *et al.*, 1995; PISOZAK & NINFA, 2003). NtrC fosforilada ativa pleiotropicamente operons relacionados à assimilação de nitrogênio fixado (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Quando as células encontram amônio no meio extracelular, estes entram na célula através do canal de amônia AmtB, sendo rapidamente metabolizado através da ação da GS, levando a um aumento do conteúdo intracelular de glutamina (JAVELLE *et al.*, 2004). Este aumento no nível intracelular de glutamina é detectado pela GlnD, que remove o grupo uridilil da GlnB e GlnK (JIANG *et al.*, 1998; NINFA *et al.*, 2000; BENELLI *et al.*, 2001; BONATTO *et al.*, 2007a,b). GlnB e GlnK interagem com NtrB e estimulam a atividade de fosfatase, levando a desfosforilação de NtrC e consequente inibição dos promotores dependentes de NtrC (JIANG *et al.*, 2000; NINGA *et al.*, 1995; PIOSZAK & NINFA, 2003). GlnK desuridililada e glutamina ativam GlnE para adenilar GS, inativando-a (JIANG *et al.*, 2007a,b). GlnB e GlnK desuridililados complexam com AmtB, levando a inibição da captação de amônio pela célula (COUTTS *et al.*, 2002; JAVELLE *et al.*, 2004; CONROY *et al.*, 2007). A presença de diferentes níveis de ATP e 2-oxoglutarato modificam a taxa de uridililação das proteínas PII, indicando que estas proteínas não sinalizam apenas os níveis de nitrogênio, mas são módulos



de integração dos sinais de disponibilidade de energia, carbono e nitrogênio intracelulares.

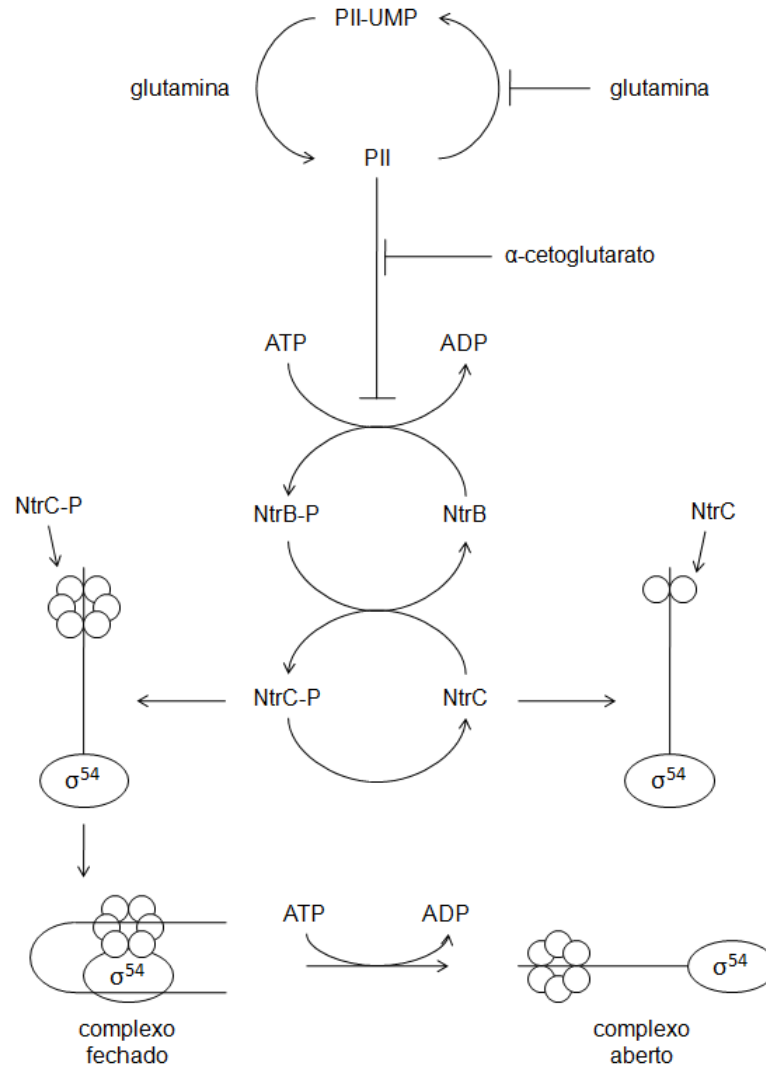


FIGURA 4 - Esquema representativo do sistema Ntr (Adaptado de JIANG *et al.*, 1998).

Considerando a inter-relação entre o metabolismo nitrogenado e o acúmulo de PHA em bactérias, propomos como um dos objetivos deste projeto, determinar a capacidade de produção de PHA de estirpes mutantes do sistema Ntr em *Herbaspirillum seropedicae* frente a estirpe selvagem (SmR1). Em nosso laboratório já foram construídas estirpes mutantes *ntrC*, *glnB*, *glnK*, *glnD* e *amtB* de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 com o intuito de estudar o efeito destas mutações no metabolismo de nitrogênio e na fixação biológica de nitrogênio. Porém, ainda resta avaliar qual o perfil de produção de PHA nesses mutantes, o que segundo a

literatura pode trazer vantagens para o processo, sendo que neste caso seria possível produzir PHA mesmo em baixa relação C/N.

## 2 OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GERAL DO PROJETO

Considerando a inter-relação entre o metabolismo nitrogenado e o acúmulo de PHB em bactérias, o objetivo deste projeto é estudar o papel do sistema Ntr no metabolismo de PHB utilizando estirpes mutantes de *H. seropedicae*.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir mutante *ntrB* de *H. seropedicae* por deleção em fase.
- Realizar curvas de produção de PHB pela estirpe selvagem SmR1 e pelo mutante *ntrB* em alta e baixa concentrações de NH<sub>4</sub>Cl e glutamato.
- Avaliar as respostas da estirpe selvagem SmR1 e do mutante *ntrC* de *H. seropedicae* ao estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 ESTIRPES BACTERIANAS E VETORES

As estirpes bacterianas utilizadas nos experimentos estão descritas a seguir:

Estirpes	Características	Referências
<b><i>H. seropedicae</i></b>		
SmR1	Sm <sup>R</sup> , selvagem	Souza <i>et al.</i> , 2000
<i>ntrC</i> <sup>-</sup>	Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , <i>ntrC</i> <sup>-</sup>	Persuhn <i>et al.</i> , 2000
<i>amtB</i> <sup>-</sup>	Sm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , <i>amtB</i> <sup>-</sup>	Noindorf <i>et al.</i> , 2006
<i>glnB</i> <sup>-</sup>	Sm <sup>R</sup> , <i>glnB</i> <sup>-</sup>	Noindorf <i>et al.</i> , 2006
<i>glnD</i> <sup>-</sup>	Sm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , <i>glnD</i> <sup>-</sup>	Artigo em preparação
<i>glnK</i>	Sm <sup>R</sup> , <i>glnK</i>	Noindorf <i>et al.</i> , 2006
<b><i>E. coli</i></b>		
S17-1	Sm <sup>R</sup> , pro recA	Simon <i>et al.</i> , 1983

TOP10	Sm <sup>R</sup> , ΔlacX74	Invitrogen®
-------	---------------------------	-------------

TABELA 1 - Estirpes bacterianas.

Os vetores utilizados nesse trabalho estão descritos a seguir:

Vetores	Características	Referências
pTZ18R	Amp <sup>R</sup> , lacZ, M13 Fw e Rev, T7	Amersham®
pK18mobsacB	Km <sup>R</sup> , lacZ, sacB, oriT, oriV	ATCC®

TABELA 2 - Vetores.

### 3.2 ANTIBIÓTICOS

As concentrações utilizadas de antibióticos estão listadas a seguir:

Antibióticos	Abreviatura	Concentração final
Tetraciclina	Tc	10 µg/mL
Canamicina	Km	500 µg/mL
Estreptomicina	Sm	80 µg/mL
Ampicilina	Amp	10 µg/mL

TABELA 3 - Antibióticos.

### 3.3 MEIOS DE CULTIVO

As estirpes de *Escherichia coli* foram cultivadas a 37°C sob agitação constante em meio Lysogeny-Broth (LB) e Lysogeny-Broth agar 15g/L (LA). O meio LB possui a seguinte composição.

Compostos	Concentração
Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de Sódio	10 g/L
Triptona	10 g/L

TABELA 4 - Composição do meio LA.

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas a 30°C sob agitação constante em meio NFbHP, utilizando Malato (37 mmol/L) como fonte de carbono. Como fonte de nitrogênio, dependendo do experimento, utilizou-se NH<sub>4</sub>Cl em concentrações que variaram de 5mmol/L a 20mmol/L. A sigla NFbHP refere-se a composição do meio,

onde HP significa alto fosfato. O meio sólido foi obtido através da adição de ágar (15 g/L) ao meio líquido. O meio NFb-malato apresenta a seguinte composição:

<b>Compostos</b>	<b>Concentração</b>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,0 x 10 <sup>-1</sup> g/L
NaCl	1,0 x 10 <sup>-1</sup> g/L
CaCl <sub>2</sub>	2,0 x 10 <sup>-2</sup> g/L
Ácido nitrilo-triacético	5,6 x 10 <sup>-2</sup> g/L
12FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,0 x 10 <sup>-2</sup> g/L
Ácido málico	5,0 g/L
Biotina	1,0 x 10 <sup>-4</sup> g/L
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,0 x 10 <sup>-3</sup> g/L
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2,35 x 10 <sup>-3</sup> g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8 x 10 <sup>-3</sup> g/L
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	8,0 x 10 <sup>-5</sup> g/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,4 x 10 <sup>-4</sup> g/L
pH	6,5

TABELA 5 - Composição do meio NFb-malato.

A mistura de fosfatos foi autoclavada separadamente e adicionada ao meio em um volume de 50 mL/L. A composição da solução de fosfatos é:

<b>Compostos</b>	<b>Concentração</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17,8 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	159,5 g/L

TABELA 6 - Composição da mistura de fosfatos.

### 3.4 METANÓLISE PARA QUANTIFICAÇÃO DE PHB

Foram coletados 10 mL de cultura em tubo tipo Falcon de 15 mL. As amostras foram centrifugadas (5.000 rpm, 15 minutos), sendo o sobrenadante descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de água ultra pura. Em seguida as células foram transferidas para tubo de microcentrifuga de 1,5 mL previamente pesado, e centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet congelado e liofilizado por 16 horas. Os tubos foram pesados para determinação do peso seco da cultura. Posteriormente, transferiu-se o pellet seco para um tubo de borosilicato e adicionou-se 2 mL de uma solução de metanol e

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 15%, 2 mL de clorofórmio e 10 µL de ácido benzóico a 50 mg/mL (padrão interno). A mistura foi incubada a 100°C durante 3,5 horas para promover a esterificação do material. Os tubos foram resfriados e a fase orgânica foi extraída com 1mL de água ultrapura em vortex por 30 s. Após repouso de 30 min para separação das fases, a fase aquosa foi coletada e descartada, sendo que a fase orgânica, que contém os ésteres metílicos do ácido 3-hidroxi-butírico, foi secada com adição de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sólido. A fase orgânica seca foi analisada por cromatografia gasosa.

### 3.5 QUANTIFICAÇÃO DE PHB POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Os ésteres foram quantificados em um cromatógrafo a gás, modelo VARIAN 450-GC (Varian® Inc., Palo Alto, Califórnia, Estados Unidos). Foi utilizada uma coluna capilar CP-Sil-5CB (Varian® Inc.) de 10 m x 0.25 mm, com argônio como gás de arraste em um fluxo de 0,7 mL/min. A temperatura do injetor foi mantida em 250°C, com rampa de temperatura na coluna iniciando em 50°C, subindo até 250°C a 40°C/min. A quantificação foi realizada utilizando uma curva padrão feita com padrão autêntico de PHB bacteriano (Sigma Aldrich®), realizada no mesmo equipamento e nas mesmas condições experimentais.

### 3.6 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS ESTIRPES BACTERIANAS NA PRESENÇA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

As estirpes parental SmR1 de *H. seropedicae ntrC* foram avaliados quanto ao crescimento na presença de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em concentrações de 0,05 mmol/L e 0,1 mmol/L. Para tal, as bactérias foram crescidas em meio NFb-malato até atingirem uma DO<sub>600</sub> equivalente a 1,0. Após a coleta, as culturas sofreram onze diluições seriadas (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-12</sup>) e foram plaqueadas em meio NFbHP-malato sólido contendo 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl, antibiótico próprio e as respectivas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As placas foram incubadas a 30°C e fotografadas após 48 horas de crescimento.

### 3.7 CURVA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES BACTERIANAS NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

As estirpes SmR1 e *ntnC* de *H. seropedicae* foram inoculadas em meio NFb contendo 37 mmol/L de malato como fonte de carbono e 20 mmol/L ou 5 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl como fonte de nitrogênio e crescidas até atingirem DO<sub>600</sub> igual a 0,5. Nesse instante foram adicionadas diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (0,1 mmol/L, 0,5 mmol/L, 1 mmol/L e 2 mmol/L), exceto ao grupo controle. A DO<sub>600</sub> foi medida a cada 20 minutos durante 12 horas de crescimento. O experimento foi realizado em triplicata.

### 3.8 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão listados a seguir:

Primers	Sequência (5'-3')	Referências
Fw_UP_ntnB (BamHI)	<b>GGATCCCAACCCCTACCTGTGCTTCTC</b> <b>AGATCTCTTAGGTCGTCTCTACGGAGT</b>	Este trabalho
Rev_UP_ntnB (BglII)	CTTCATGGCGGTAGTCGG	Este trabalho
Fw_DOWN_ntnB (BglII)	TAGAGACGACCTAAG <b>AGATCTTT</b> CAGA	Este trabalho
Rev_DOWN_ntnB (XbaI)	<b>TCTAGAGATCAGCTCGACCGCCTTGTC</b>	Este trabalho
M13 Universal Foward	TGTAAAACGACGGCCAGT	MESSING, 1983
M13 Universal Reverse	CAGGAAACAGCTATGACC	MESSING, 1983

TABELA 7 - Lista de primers.

### 3.9 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Para as reações de PCR foram realizadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®).

Para a amplificação dos fragmentos Up\_ntrB e Down\_ntrB, foi utilizado um volume final de 20 µL para os seguintes componentes: 4 µl tampão Phusion HF5X; 1 µl DNA genômico de *H. seropedicae*; 1 µL primer Fw\_UP\_ntrB ou Rev\_UP\_ntrB; 1 µl primer Rev\_UP\_ntrB ou Rev\_DOWN\_ntrB; 0,8 µl dNTP 5 mmol/L; 0,2 µl Phusion DNA polimerase. As condições estão listadas a seguir:

Temperatura	Tempo	Repetições
98°C	1,5 minutos	1X
98°C	30 segundos	30X
55°C	30 segundos	30X
72°C	30 segundos	30X
72°C	10 minutos	1X

TABELA 8 - Condições de amplificação dos fragmentos Up\_ntrB e Down\_ntrB.

Para a fusão dos fragmentos Up\_ntrB e Down\_ntrB, foi utilizado um volume final de 20 µL para os seguintes componentes: 4 µl tampão Phusion HF5X; 1 µl Up\_ntrB; 1 µl Down\_ntrB; 0,8 µl dNTP 5 mmol/L; 0,2 µl Phusion DNA polimerase. Antes da adição dos primers as amostras tiveram suas regiões complementares seladas nas seguintes condições:

Temperatura	Tempo	Repetições
98°C	2 minutos	1X
98°C	30 segundos	30X
55°C	30 segundos	30X
72°C	1 minuto	30X

TABELA 9 - Condições de fusão dos fragmentos Up\_ntrB e Down\_ntrB.

Em seguida, foi adicionado 1 µL de primer Fw\_UP\_ntrB e 1 µl do primer Rev\_DOWN\_ntrB, dando prosseguimento à reação de amplificação nas seguintes condições:

Temperatura	Tempo	Repetições
98°C	30 segundos	1X
98°C	30 segundos	30X
55°C	30 segundos	30X
72°C	1 minuto	30X
72°C	4 minutos	1X

TABELA 10 - Condições de amplificação da fusão Up\_ntrB com Down\_ntrB.

### 3.10 REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO

As reações de sequenciamento das construções pTZ18R $\Delta$ nrB para confirmação do inserto foram realizadas com o kit BigDye V1.0 (DNA Sequencing Kit, BigDye Terminator Cycle Sequencing, Applied Biosystems®) nas seguintes proporções: 0,5  $\mu$ l de BigDye 1.0; 3,5  $\mu$ l de Save Money (200 mM Tris-HCl pH9,0 + 5 mM MgCl<sub>2</sub>); 2,0  $\mu$ l primer F/R 1.6 pmol/ $\mu$ L/ e 1 $\mu$ l de DNA, para um volume final de 10  $\mu$ L. As condições utilizadas estão listadas a seguir:

Temperatura	Tempo	Repetições
96°C	2 minutos	-
96°C	30 segundos	25X
55°C	30 segundos	25X
60°C	1 minuto	25X

TABELA 11 - Condições do termociclador.

### 3.11 PREPARO DE CÉLULAS TERMOCOMPETENTES

Para o preparo de células de *E. coli* TOP10 e S17-1 termocompetentes, as culturas foram crescidas em meio LB durante 4 horas a 37°C sob agitação constante. Em seguida, alíquotas de 1 mL foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas (13400 rpm, 75 segundos). O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 100  $\mu$ l de solução TSS ("Transformation and Storage Solution" - LB contendo 10% PEG 6000, 50 mM MgCl<sub>2</sub> e 5% DMSO).

### 3.12 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS POR CHOQUE TÉRMICO

Para a transformação de células bacterianas, as amostras de DNA foram adicionadas à suspensão de células termocompetentes previamente preparadas. Após a incubação por 30 minutos em banho de gelo, a mistura foi submetida a uma temperatura de 42°C por 30 segundos e novamente incubada em gelo por 2



minutos. As células foram então recuperadas pela adição de 900 µL de meio LB e incubação por uma hora em estufa a 37°C. Em seguida, alíquotas de 200 µL da suspensão foram semeadas em meio LA contendo antibióticos adequados e 30 µg/mL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) para a seleção de clones (SAMBROOK *et al.* 1989).

### 3.13 CONSTRUÇÃO DA ESTIRPE *ntrB* DE *H. seropedicae*

Para a construção da estirpe  $\Delta ntrB$  de *H. seropedicae* foi utilizada a técnica de deleção *in frame* conforme descrito por (NOINDORF, *et al.*, 2011) utilizando a sequência do gene *ntrB* depositada no GenBank (acesso CP002039). As sequências flangeadoras do gene *ntrB* foram identificadas *in silico* e fragmentos de aproximadamente 500 pares de base de cada extremidade dos genes foram obtidos por reações de PCR. Estes fragmentos foram ligados entre si por overlap PCR mantendo a mesma fase de leitura, gerando um produto de deleção identificado como  $\Delta ntrB$ . O produto de deleção foi ligado no plasmídeo pK18*mobsacB* (SCHAFER, *et al.*, 1994). O pK18*mobsacB* contém genes de resistência a canamicina e não possui uma origem de replicação reconhecida em *H. seropedicae*, portanto as colônias de *H. seropedicae* que se tornaram resistentes a este antibiótico obrigatoriamente sofreram uma etapa de recombinação inserindo o plasmídeo ao seu genoma. Além disso, o pK18*mobsacB* contém o gene *sacB* de *Bacillus subtilis* que expressa uma levansucrase, uma enzima que catalisa a hidrólise de sacarose e a produção de levananas, polímeros de frutose de alto peso molecular (PELICIC *et al.*, 1996). Em bactérias gram-negativas a produção de levananas leva a lise celular. Portanto, ocorrendo simples recombinação as colônias de *H. seropedicae* se tornaram sensíveis a sacarose a 5% (m/v) devido a expressão do gene *sacB*. As colônias que apresentaram sensibilidade a sacarose foram cultivadas durante 16 h na ausência de antibióticos e após o cultivo foram plaqueadas em meio NFb-Malato na presença de sacarose 5% (m/v). As colônias que cresceram na presença de sacarose são aquelas que sofreram a dupla recombinação e, portanto perderam a sequência do vetor. Estas colônias foram analisadas quanto a resistência à canamicina e aquelas que não eram resistentes à

canamicina foram analisadas por PCR para verificar a ocorrência da deleção do gene de interesse.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE PHB EM *Herbaspirillum seropedicae*

Em bactérias, uma alta relação carbono-nitrogênio (C/N) no meio de cultura afeta positivamente a biossíntese de PHB (CATALÁN *et al.*, 2007). Em *H. seropedicae* SmR1, foi avaliada a produção de PHB em baixas relações C/N, em meio NFb contendo 37 mmol/L de malato e 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl, e em altas relações C/N, em meio NFb contendo 37 mmol/L de malato e 5 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl ou 5 mmol/L de glutamato, em diferentes intervalos de tempo. As culturas foram centrifugadas, o precipitado de células congelado e liofilizado para determinação da porcentagem de PHB na estirpe selvagem SmR1 (Fig. 5) e nos mutantes do sistema Ntr, *ntrC*<sup>-</sup> (Fig. 6), *glnB*<sup>-</sup> (Fig. 7), *glnK* (Fig. 8), *glnD*<sup>-</sup> (Fig. 9) e *amtB*<sup>-</sup> (Fig. 10).

A estirpe selvagem SmR1 foi capaz de acumular cerca de 17% de PHB por peso seco de bactéria quando cultivada em baixa relação C/N (20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl). Como esperado, em alta relação C/N (5 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl e 5 mmol/L de glutamato) a produção aumentou para 25% e 30% de PHB/peso seco de bactéria, respectivamente.

Na maioria das bactérias produtoras de PHA, apenas uma pequena quantidade do polímero é acumulada durante a fase exponencial de crescimento. A limitação de nutrientes é necessária para o início da biossíntese e a alta concentração de nitrogênio fixado (na forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, por exemplo) é geralmente considerada um fator crítico que desacopla as taxas de crescimento das taxas de produção de PHB. Entretanto, algumas bactérias como *Azotobacter vinelandii* UWD, *Alcaligenes latus* e *Pseudomonas putida* KT244 são capazes de acumular PHAs durante a fase exponencial com baixa C/N (~6,5), já outras bactérias como *Azospirillum brasilense* não acumulam PHB se a concentração de amônio no meio for alta em relação ao carbono disponível (SUN *et al.*, 2000). A elucidação dos fatores que controlam tal mecanismo tem grande potencial para aperfeiçoar o processo de produção industrial de PHAs.

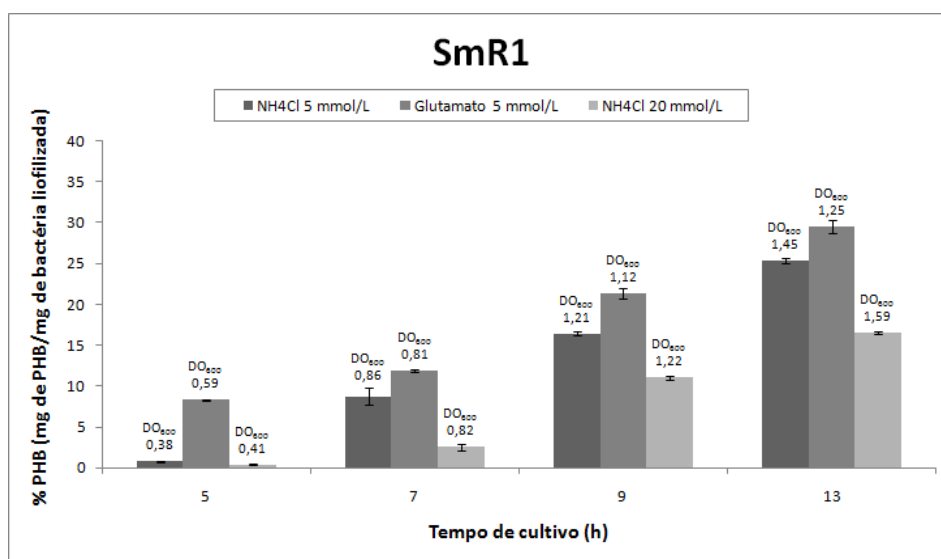


FIGURA 5 - Produção de PHB de *H. seropedicae* SmR1 em 5 mmol/L de glutamato e 5 mmol/L e 20 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . No topo de cada coluna encontram-se os valores de  $\text{D.O.}_{600}$  medidos no momento da coleta das amostras.

A proteína NtrC catalisa a isomerização de complexos fechados entre a RNA polimerase e a região promotora em complexos abertos transcricionalmente produtivos, através de uma reação dependente da hidrólise de um nucleosídeo trifosfato (ATP ou GTP) (ROMBEL, *et al.*, 1999). NtrC só é capaz de se ligar ao DNA na forma fosforilada, promovendo a ativação de *amtB*, que codifica para o transportador de amônio, *glnA*, que transcreve para glutamina sintetase (GS), permeases de aminoácidos, enzimas catabólicas, entre diversos outros genes envolvidos na assimilação de nitrogênio (WYMAN *et al.*, 1997; MERRICK & EDWARDS, 1995; ZIMMER *et al.*, 2000). O controle da atividade de NtrC é mediado por NtrB, que atua como doador do grupo fosfato para NtrC em condições limitantes de nitrogênio (KERN *et al.*, 1999). Entretanto, NtrB tem sua atividade fosforilase/fosfatase controlada pela proteína PII GlnB e por seu estado de uridililação (PAWLOWSKI *et al.*, 2003).

Interessantemente, observou-se que o mutante do gene *ntrC* foi capaz de acumular cerca de 30% de PHB/peso de bactéria seca, tanto em baixa quanto em alta relação C/N (Fig. 6), mostrando que neste mutante a concentração de  $\text{NH}_4^+$  do meio e a produção de PHB estão desacopladas. Esse é um forte indício da influência do gene *ntrC* sobre a regulação do metabolismo de PHB, ou que a ausência de NtrC tenha criado indiretamente um ambiente mais propício para a biossíntese de PHB.

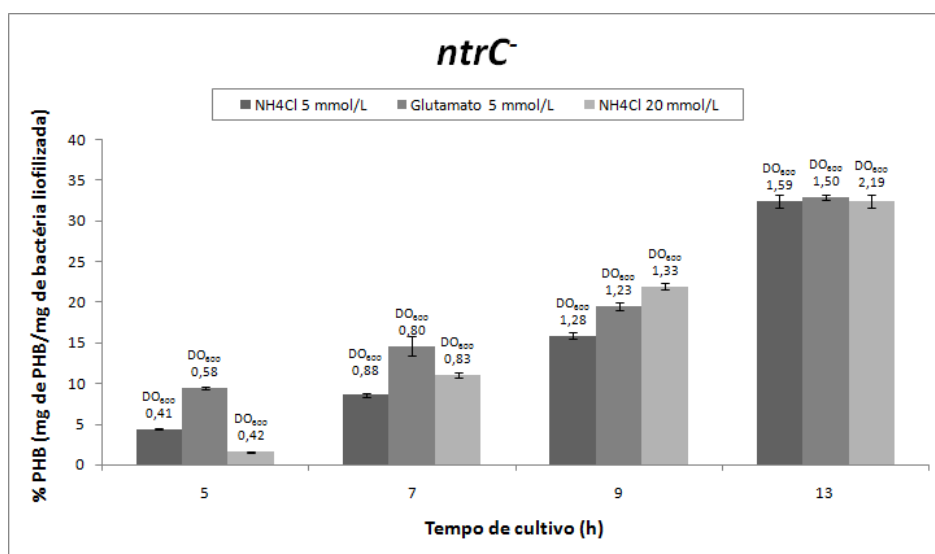


FIGURA 6 - Produção de PHB no mutante *ntrC*<sup>-</sup> de *H. seropedicae* em 5 mmol/L de glutamato e 5 mmol/L e 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl. No topo de cada coluna encontram-se os valores de D.O.<sub>600</sub> medidos no momento da coleta das amostras.

A família das proteínas PII compreende homotrímeros que desempenham funções importantes no metabolismo das bactérias, atuando como transdutores de sinal. Em *H. seropedicae*, a enzima GlnD é capaz de detectar o nível intracelular de nitrogênio, sinalizado pela concentração de glutamina, e transmitir a informação para GlnB e GlnK através de reações de uridililação (ADLER *et al.*, 1975; ATKINSON & NINFA, 1999). Em baixas concentrações de glutamina, GlnD possui atividade uridililtransferase e promove a transferência de um grupo UMP para GlnB ou GlnK, enquanto que em altas concentrações de glutamina, GlnD promove a remoção dos grupos UMP associados às proteínas PII (JIANG *et al.*, 1998b).

As proteínas GlnB e GlnK são responsáveis pelo sensoriamento dos níveis de nitrogênio, energia e carbono da célula, ligando-se aos efetores glutamina, 2-oxoglutarato, ATP e ADP. Neste organismo, o gene *glnB* é monocistrônico constitutivo e o gene *glnK* é co-transcrito juntamente com *amtB* e *nlnA*, que codificam respectivamente para um transportador de membrana e uma proteína de função desconhecida associada à membrana. A expressão do operon *nlnA-glnK-amtB* é dependente de NtrC e é aumentada cerca de 20 vezes em condições limitantes de nitrogênio (BENELLI *et al.*, 1997, NOINDORF *et al.*, 2006, NOINDORF *et al.*, 2011).

No mutante *glnB<sup>-</sup>*, a produção de PHB foi cerca de 8% de PHB/peso seco de bactéria em baixa relação C/N e cerca de 19% de PHB/peso seco de bactéria em alta relação C/N. Neste caso, a mutação parece afetar negativamente a biossíntese do polímero quando comparado com a estirpe selvagem (Fig. 7). De acordo com o modelo proposto para o funcionamento do sistema Ntr (Tópico 2.5), é esperado que na ausência de GlnB, NtrB encontre-se na sua forma fosforilada e promova a ativação de NtrC. Isso sugere que o estado de fosforilação de NtrC pode estar envolvido no metabolismo de PHB.

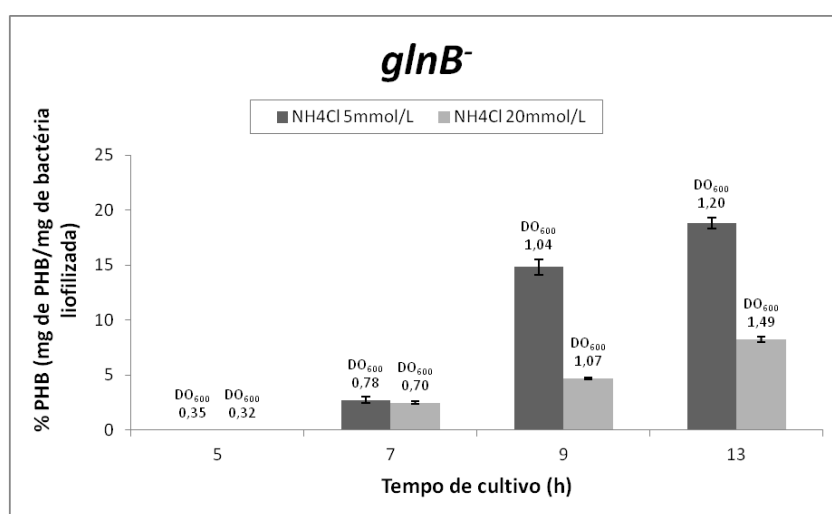


FIGURA 7 - Produção de PHB no mutante *glnB<sup>-</sup>* de *H. seropedicae* em 5 mmol/L e 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl. No topo de cada coluna encontram-se os valores de D.O.<sub>600</sub> medidos no momento da coleta das amostras.

Na estirpe mutante *glnK*, a produção de PHB foi cerca de 16% de PHB/peso seco da bactéria em baixa relação C/N e cerca de 25% de PHB/peso seco da bactéria em alta relação C/N (Fig. 8). Estes níveis de produção são semelhantes aos encontrados para a estirpe selvagem SmR1 e, embora menores concentrações de NH<sub>4</sub>Cl também suscitem um ligeiro aumento na produção de PHB, *glnK* parece não desempenhar um papel significativo sobre a síntese de PHB.

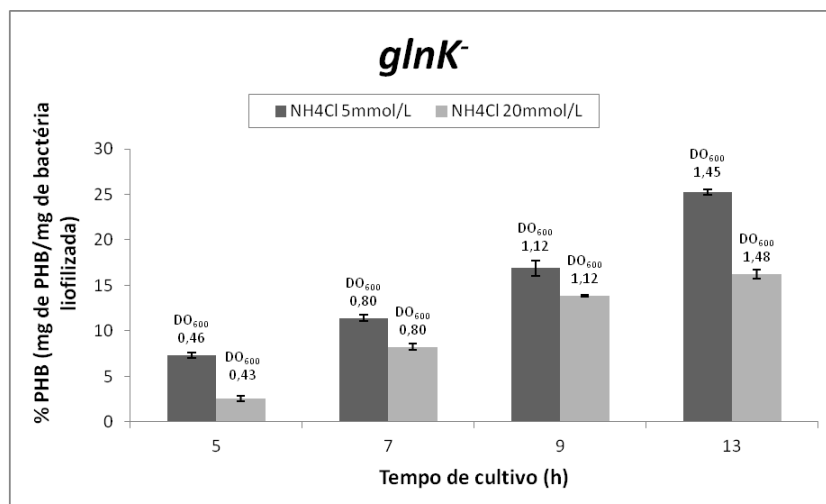


FIGURA 8 - Produção de PHB no mutante *glnK*<sup>-</sup> de *H. seropedicae* em 5 mmol/L e 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl. No topo de cada coluna encontram-se os valores de D.O.<sub>600</sub> medidos no momento da coleta das amostras.

O mutante *glnD*<sup>-</sup> foi capaz de produzir em torno de 17% de PHB/peso seco de bactéria em baixa relação C/N e cerca de 25% de PHB/peso seco de bactéria em alta relação C/N (Fig. 9), as mesmas quantidades de PHB obtidas para a estirpe selvagem SmR1, sugerindo que o gene *glnD* também parece não desempenhar um papel significativo sobre a síntese de PHB.

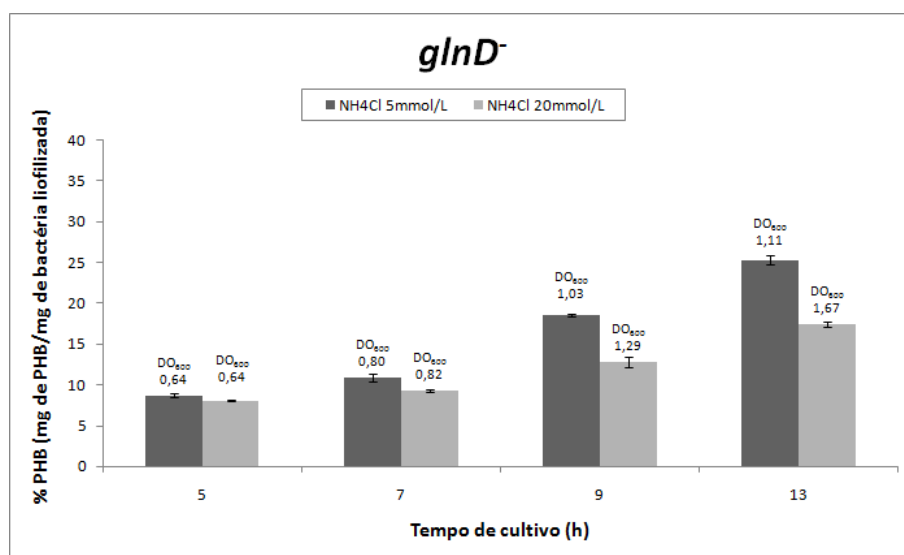


FIGURA 9 - Produção de PHB no mutante *glnD*<sup>-</sup> de *H. seropedicae* em 5 mmol/L e 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl. No topo de cada coluna encontram-se os valores de D.O.<sub>600</sub> medidos no momento da coleta das amostras.

O gene *amtB* transcreve para um transportador de amônio e é expresso em baixas concentrações de nitrogênio no meio, quando a captação deste é necessária. Em altas concentrações de nitrogênio, as proteínas PII GlnB e GlnK encontram-se

desuridililadas e interagem com AmtB, inibindo sua atividade transportadora (COUTTS *et al.*, 2002; JAVELLE *et al.*, 2004; CONROY *et al.*, 2007).

Aparentemente, a presença do operon *glnKamtB* em diversas espécies de bactérias possui múltiplos propósitos. Em primeiro lugar, permite que a célula assimile amônio sob condições limitantes de nitrogênio (SOUPENE *et al.*, 2002). Em segundo lugar, devido à habilidade de AmtB se ligar a GlnB e GlnK, pode também desempenhar a função regulatória na assimilação de nitrogênio através do sequestro de proteínas PII (COUTTS *et al.*, 2002). Além disso, se a concentração de amônia é capaz de regular a capacidade de AmtB de antagonizar GlnB e GlnK, AmtB também constituiria um elemento de sensoriamento adicional do sistema Ntr, como proposto por BLAUWKAMP e colaboradores (2003).

Em relação à produção de PHB, o mutante *amtB*<sup>-</sup> foi capaz de produzir em torno de 8% de PHB/peso seco da bactéria em baixa relação C/N e cerca de 14% de PHB/peso seco da bactéria em alta relação C/N (Fig. 10). Quando comparamos com a estirpe selvagem SmR1, nossos dados sugerem que a ausência do gene *amtB* possivelmente exerça um efeito negativo sobre a síntese de PHB. A relação de *amtB* com a síntese do polímero ainda não está clara, mas acredita-se que a possibilidade que AmtB module a atividade de PII, como sugerido na literatura (BLAUWKAMP *et al.*, 2003) possa interferir na síntese de PHB. Entretanto, serão necessários novos experimentos para compreender melhor a relação de AmtB com a síntese de PHB.

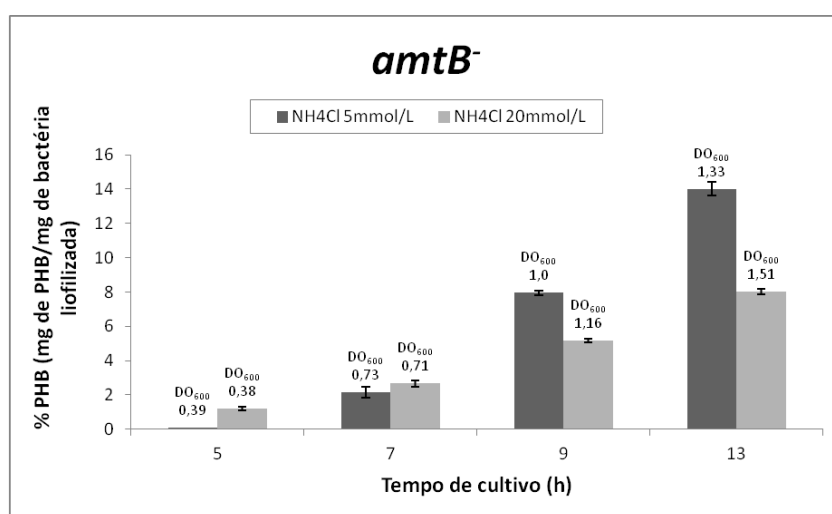


FIGURA 10 - Produção de PHB no mutante *amtB*<sup>-</sup> de *H. seropedicae* em 5 mmol/L e 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl. No topo de cada coluna encontram-se os valores de D.O.<sub>600</sub> medidos no momento da coleta das amostras.

## 4.2 EFEITO DA PRESENÇA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NO CRESCIMENTO DE *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 E MUTANTE *ntrC*<sup>-</sup>

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são geradas durante o metabolismo aeróbico ou pela exposição de um organismo a poluentes exógenos, podendo danificar diversas macromoléculas intracelulares como proteínas, lipídeos e DNA (STADTMAN, 1992; CABISCOL *et al.*, 2000; IMLAY, 2003). Muitas bactérias utilizam o gene *zwf-1*, que codifica a glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), como um fator de resposta ao estresse oxidativo. Esta enzima promove a oxidação de glucose-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona pela redução de NADP<sup>+</sup> a NADPH. A presença de NADPH intracelular protege a célula contra estresse oxidativo ao manter a glutatona em seu estado reduzido (Fig. 11). Esse efeito pode ser atribuído à atividade de G6PDH, essencial para a regeneração do *pool* intracelular de NADPH (LUNDBERG *et al.*, 1999; MEHTA *et al.*, 2000; POMPOSIELLO, 2001; KIM *et al.*, 2008; DADDAOUA *et al.*, 2009).

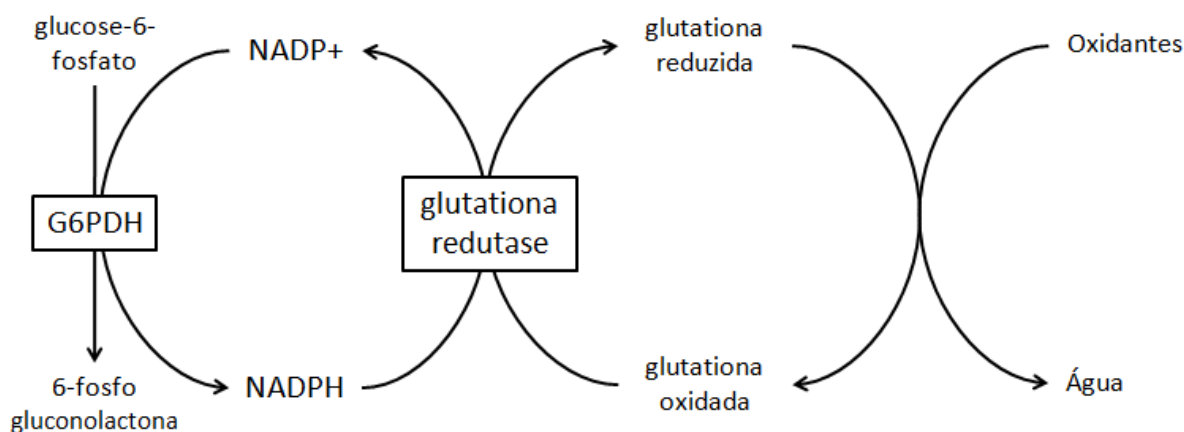


FIGURA 11 - Ciclo de regeneração da glutatona redutase via produção de NADPH pela G6PDH (Adaptado de SCHRURMAN, *et al.*, 2009).

Em condições limitantes de nitrogênio, NtrC funciona como um regulador transcricional de genes envolvidos com a assimilação de nitrogênio, permitindo que amônio entre na célula (NINFA *et al.*, 2000; ZIMMER *et al.*, 2000). Além disso, o gene *zwf-1*, juntamente com outros componentes do metabolismo glicolítico, é reprimido por NtrC sob condições limitantes de nitrogênio, conforme observado em *Pseudomonas putida* (HERVÁS, *et al.*, 2008).



Para verificar se *ntrC* poderia produzir mais NADPH que SmR1, ambas estirpes foram testadas quanto a capacidade de crescer na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Quando as bactérias foram crescidas em meio sólido sob uma concentração de 0,05 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observou-se que o mutante *ntrC* apresentou 8,8×10<sup>8</sup> UFC/mL de cultura enquanto a estirpe selvagem SmR1 6,0×10<sup>8</sup> UFC/mL, indicando um leve efeito da mutação no gene *ntrC* (uma diferença de cerca de 1,5 vezes). Entretanto, ao dobrarmos a quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio de cultivo, o mutante *ntrC* apresentou 1,1×10<sup>7</sup> UFC/mL de cultura, enquanto que SmR1 apresentou 2,0×10<sup>5</sup> UFC/mL, uma diferença de 55 vezes (Fig. 12).

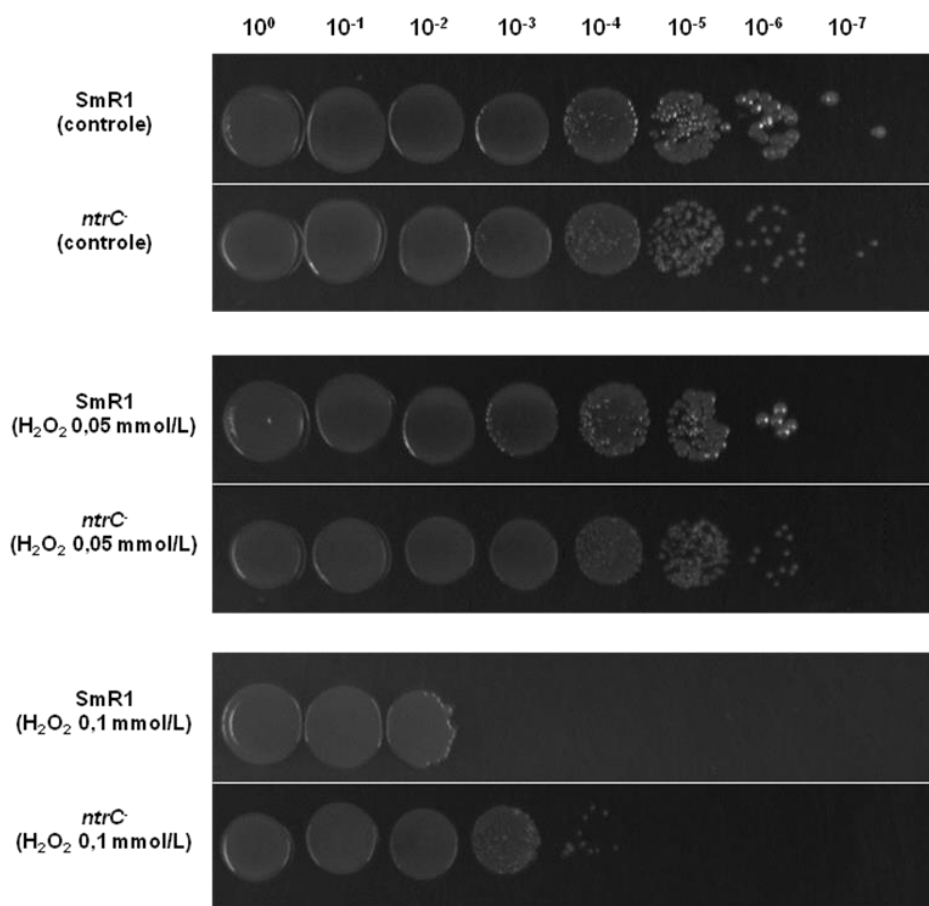


FIGURA 12 - Efeito da presença de peróxido de hidrogênio no crescimento de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC*. O número de colônias foi determinado e expresso como UFC/mL. SmR1 wt (controle): 2,7×10<sup>9</sup>; *ntrC* (controle): 2,4×10<sup>9</sup>; SmR1 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,05 mmol/L): 6,0×10<sup>8</sup>; *ntrC* (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,05 mmol/L): 8,8×10<sup>8</sup>; SmR1 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1 mmol/L): 2×10<sup>5</sup>; *ntrC* (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1 mmol/L): 1,1×10<sup>7</sup>.

Além do cultivo em meio sólido, também foram construídas curvas de crescimento com base na DO<sub>600</sub> para SmR1 e *ntrC*, submetidas a crescentes

concentrações de  $H_2O_2$ . Em SmR1 (Fig. 13), verificou-se que logo após a adição de  $H_2O_2$ , a  $DO_{600}$  da maioria das culturas caiu de 0,5 para 0,4 sugerindo morte celular ou um período longo de adaptação para poder aliviar o efeito do agente oxidante. As culturas crescidas na presença de 0,1 mmol/L de  $H_2O_2$  foram capazes de se recuperar rapidamente. Entretanto, as culturas crescidas na presença de 0,5 mmol/L, 1 mmol/L e 2 mmol/L de  $H_2O_2$  apresentaram maiores dificuldades de crescimento, evidenciadas por inclinações menos acentuadas das curvas em relação ao grupo controle. Observou-se um prejuízo no crescimento proporcional às concentrações de  $H_2O_2$  adicionada nas culturas.

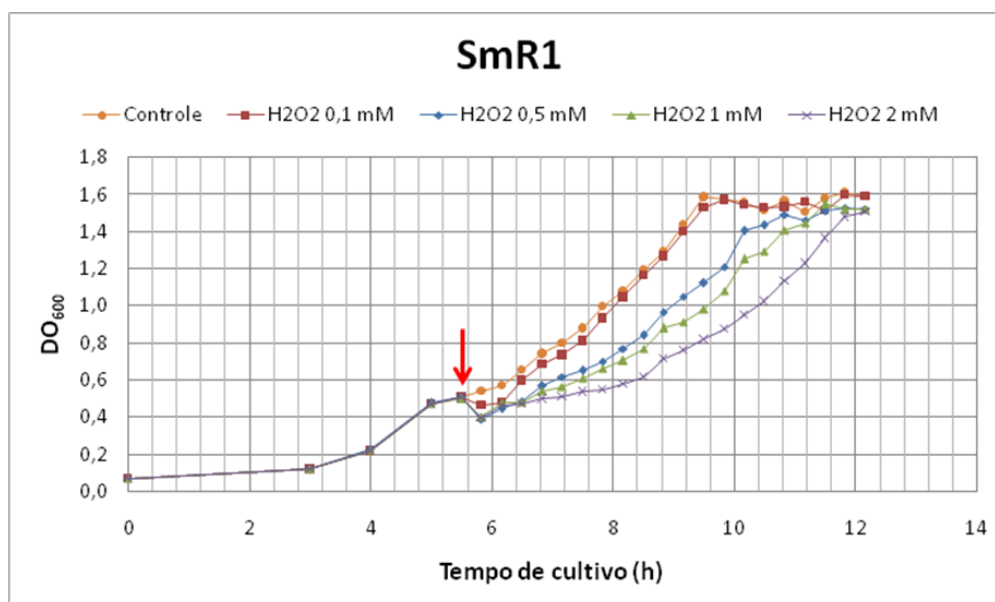


FIGURA 13 - Curva de crescimento da estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae* sob diferentes concentrações de  $H_2O_2$ . A seta vermelha indica o momento em que  $H_2O_2$  foi adicionado à cultura ( $DO_{600} = 0,5$ ).

Em *ntrC* (Fig. 14), verificou-se que após a adição de  $H_2O_2$  não houve variação significativa da  $DO_{600}$ . Além disso, a inclinação das curvas foi mínima quando comparada com o grupo controle. Interessantemente, as culturas crescidas na presença de 0,5 mmol/L, 1 mmol/L e 2 mmol/L de  $H_2O_2$  foram afetadas de forma semelhante independentemente das concentrações de  $H_2O_2$  adicionadas nas culturas, sugerindo que esta estirpe apresenta maior resistência ao  $H_2O_2$ .

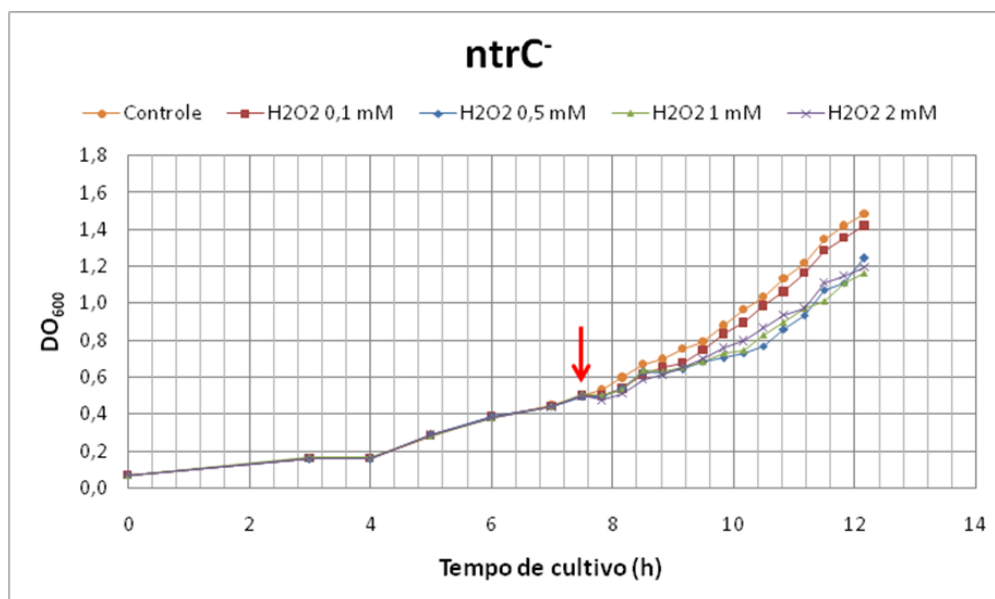


FIGURA 14 - Curva de crescimento do mutante *ntrC* de *H. seropedicae* sob diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A seta vermelha indica o momento em que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionado à cultura (DO<sub>600</sub> = 0,5).

Ao comparar as curvas de crescimento das estirpes testadas, observa-se que *ntrC* é significativamente mais resistente que SmR1 ao estresse oxidativo provocado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esses resultados estão de acordo com o que foi verificado anteriormente em mutantes *ntrC* de *Pseudomonas putida* (YEOM *et al.*, 2010). A explicação para esse efeito provavelmente está relacionada com a produção constitutiva de NADPH pela G6PDH, uma vez que o NADPH é utilizado por diversas enzimas envolvidas com o controle do estresse oxidativo, tais como glutatona redutase, tioredoxina redutase e ferredoxina redutase (HERVÁS *et al.*, 2008; GIRÒ *et al.*, 2006).

Além disso, sabe-se que a síntese de PHB é promovida por dois fatores: (1) alta concentração de carbono intracelular na forma de acetil-CoA e (2) alta concentração de NADPH, que é utilizado pela enzima PhbB para a síntese de 3-hidroxiacetil-CoA (MADISON e HUSIMAN, 1999). Neste trabalho observou-se que o mutante *ntrC* produziu cerca do dobro de PHB produzido por SmR1. Como a concentração de carbono disponível para as duas culturas foi exatamente a mesma (37 mmol/L) acredita-se que o aumento na produção esteja relacionado com um aumento na produção de NADPH, que também poderia ser explicada pela expressão constitutiva de G6PDH.

#### 4.3 CONSTRUÇÃO DO MUTANTE *ntrB* de *H. seropedicae*

A construção do mutante  $\Delta ntrB$  de *H. seropedicae* tem por objetivo verificar se os fenótipos observados para o mutante *ntrC* devem-se apenas a ausência de NtrC, ou se o estado de fosforilação de NtrC também poderia estar envolvido. Essa hipótese foi levantada após observarmos que o mutante *glnB* apresenta uma redução no acúmulo de PHB frente a estripe selvagem SmR1.

Para a construção do mutante  $\Delta ntrB$ , as sequências flanqueadoras do gene *ntrB* foram identificadas *in silico* (acesso GenBank CP002039) e fragmentos de aproximadamente 500 pares de base de cada extremidade do gene, denominados Up\_*ntrB* e Down\_*ntrB*, foram obtidos por reações de PCR utilizando os pares de primers Fw\_UP\_*ntrB*/Rev\_UP\_*ntrB* e Fw\_DOWN\_*ntrB*/Rev\_DOWN\_*ntrB* e o DNA genômico de *H. seropedicae* SmR1 como molde (Fig. 17A). Estes fragmentos foram ligados entre si através de uma PCR de fusão utilizando o par de primers Fw\_UP\_*ntrB*/Rev\_DOWN\_*ntrB*, gerando um produto de 1040 pares de base, identificado como  $\Delta ntrB$  (Fig. 15 e 17B).

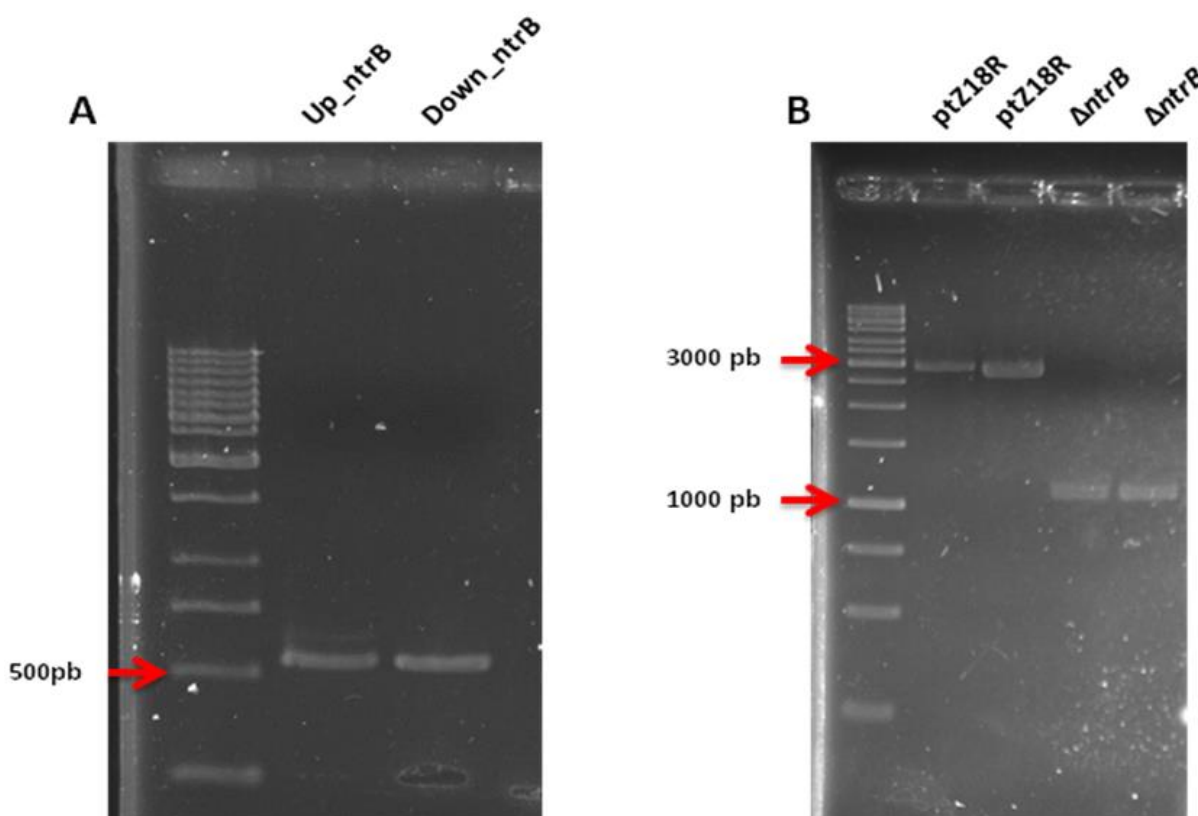


Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose. A) Fragmentos Up\_ntrB (532 pb) e Down\_ntrB (531 pb), obtidos por PCR. B) fragmento  $\Delta ntrB$  (1040 pb), obtido pela fusão de Up\_ntrB com Down\_ntrB e vetor pTZ18R (2860 pb) que foi utilizado para sequenciamento do fragmento  $\Delta ntrB$ .

O fragmento  $\Delta ntrB$  foi ligado ao vetor pTZ18R e transformado em *E. coli* TOP10. Os possíveis transformantes foram recuperados com êxito e tiveram o DNA plasmidial extraído. Entretanto, houve diversas tentativas mal sucedidas para confirmar a ligação do inserto por restrição utilizando as enzimas BamHI e XbaI. Sendo assim, decidiu-se pelo sequenciamento de bases do inserto para verificar sua origem. Os resultados mostraram que o inserto se tratava do produto  $\Delta ntrB$ , entretanto quatro bases do sítio BamHI haviam sido omitidas durante a síntese do primer Fw\_UP\_ntrB, conforme mostrado na figura 16.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1424 bits(771)	0.0	817/837(98%)	11/837(1%)	Plus/Minus
Query 309	GAAAAACTTTGTGTGGCGGAGATTTTCCCGGG-CCAGTGCTTTTTCGA-GCACCCAGCGTA	366		
Sbjct 833	GAAATACTTTGAGTGGTGAGTTTTTCCCGGGACCAGTGATATTTAGAAGCACCCAG-GTA	775		
Query 367	-TCGATTCGTCGTCGTCACCAATCCAGATTGGTTTCATAAATCACGCTTCTCCTGCGTGG	425		
Sbjct 774	TTCGATTGTGTGTGTCGTCACCAATCCAGATTGGTTTCATAAATCACGCTTCTCCTGCGTGG	715		
Query 426	TCITIG-CTGTIGATGCTCCCGGAGCCAGGCCGCTTCIGGCGCCCTGCCCCGAGCCCCCT	484		
Sbjct 714	TCITGGCTGTTGATGCTCCCGGAGCCAGGCCGCTTCIGGCGCCCTGCCCCGAGCCCCCT	655		
Query 485	TGGATGACGGGATGCTTCTCCGTCATGTCGGCTTTGGCGCGCCGCTGCGGCCATGCTCAC	544		
Sbjct 654	TGGATGACGGGATGCTTCTCCGTCATGTCGGCTTTGGCGCGCCGCTGCGGCCATGCTCAC	595		
Query 545	GGCAGCGGTATAAGTATTCTGAAAGATCTCTTAGTCGTCCTACGGAGTCTTCATGGCG	604		
Sbjct 594	GGCAGCGGTATAAGTATTCTGAAAGATCTCTTAGTCGTCCTACGGAGTCTTCATGGCG	535		
Query 605	GTAGTCGGGGAGCCCTGGATTCAIATCGTGGAGCAGAGTCGTTTCGTCGGGAACACTAGCA	664		
Sbjct 534	GTAGTCGGGGAGCCCTGGATTCAIATCGTGGAGCAGAGTCGTTTCGTCGGGAACACTAGCA	475		
Query 665	AGTTCGGGGCGCGCTCCCATGAGGATGCAAGGAATGCACACAACCTCAGGGGACTTGCCCG	724		
Sbjct 474	AGTTCGGGGCGCGCTCCCATGAGGATGCAAGGAATGCACACAACCTCAGGGGACTTGCCCG	415		
Query 725	CGCGCATaaaaaaaaGGGGAAGCAAGCTTCCCTTTTTTGTCCGGATGCGGATTCGATTACA	784		
Sbjct 414	CGCGCATAAAAAAAAAGGGAAGCAAGCTTCCCTTTTTTGTCCGGATGCGGATTCGATTACA	355		
Query 785	GCGAGTAGTACATGTCGAATTCGATCGGCTGCGTGGTCAIGCGAAGCGCTGGACTTCCT	844		
Sbjct 354	GCGAGTAGTACATGTCGAATTCGATCGGCTGCGTGGTCAIGCGAAGCGCTGGACTTCCT	295		
Query 845	GCACTTCAGATCGATGATAGGCATCGATCATGCTGTCGGTGAACACGCCGCCACGGGTCA	904		
Sbjct 294	GCACTTCAGATCGATGATAGGCATCGATCATGCTGTCGGTGAACACGCCGCCACGGGTCA	235		
Query 905	GGAACTCGGGTCCTTTGTCAGGTGTTCAGCGCTTCGTCAGCGAGGAGCACACGGTTCG	964		
Sbjct 234	GGAACTCGGGTCCTTTGTCAGGTGTTCAGCGCTTCGTCAGCGAGGAGCACACGGTTCG	175		
Query 965	GGATCAGCTTGTCTTCTTCCGGCGGCAGGTGGTACAGTTCCTTGGTCCGAGCTTCGCCCG	1024		
Sbjct 174	GGATCAGCTTGTCTTCTTCCGGCGGCAGGTGGTACAGTTCCTTGGTCCGAGCTTCGCCCG	115		
Query 1025	GGTGGATCTTGTCTGACGCGCATCCAGACCGGCATCAGCAGGGCCGAGAAGCACAGGT	1084		
Sbjct 114	GGTGGATCTTGTCTGACGCGCATCCAGACCGGCATCAGCAGGGCCGAGAAGCACAGGT	55		
Query 1085	AGGGGTGGGATCCGGGTACCGAGCTCGAATTCCTATAG-TGAGTCGTATTAAATT	1140		
Sbjct 54	AGGGGTGGG-----GGGTACCGAGCTCGAATTCCTATAGGTGAGTCGTAT-AAATT	3		

Figura 16 - Alinhamento entre a sequência esperada (Query), com destaque para o sítio BamHI (GGATCC), e a sequência resultante do sequenciamento (Sbjct), onde observa-se a ausência das bases referentes ao sítio de restrição, utilizando a ferramenta BLAST.

Desta forma, optou-se pela utilização das enzimas XbaI e EcoRI a fim de compensar a perda do sítio BamHI, resultando num fragmento de 748pb, também denominado  $\Delta ntrB$  (Fig. 17C). O novo fragmento foi então inserido no vetor pK18mobSacB e confirmado por restrição com as enzimas EcoRI e XbaI (Fig. 18). O próximo passo será a conjugação da construção pK18mobsacB $\Delta ntrB$  em *H. seropedicae* SmR1 para seleção dos recombinantes.

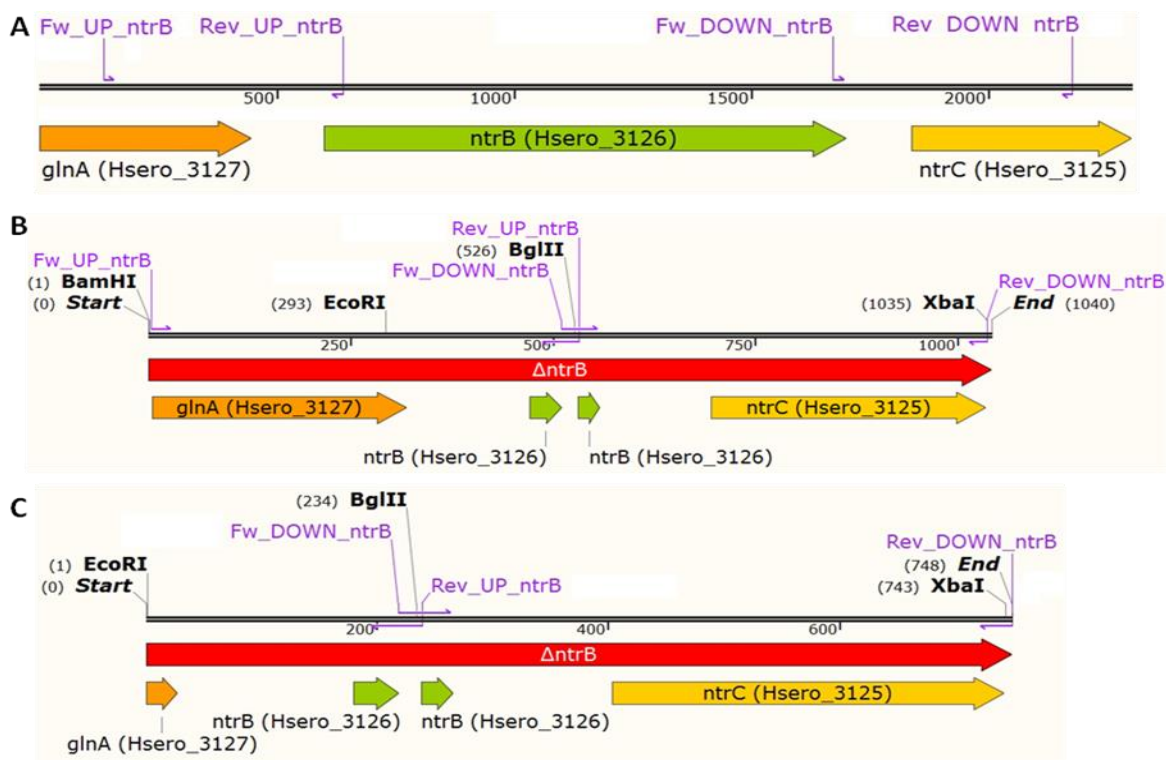


Figura 17 - A: Região do genoma mostrando o gene ntrB e os sítios de anelamento dos primers utilizados na amplificação das sequências flanqueadoras Up\_ntrB e Down\_ntrB; B: Fragmento  $\Delta ntrB$  (1040 pb) esperado para a fusão de Up\_ntrB com Down\_ntrB; C: Fragmento  $\Delta ntrB$  (748 pb) resultante de restrição com EcoRI e XbaI.

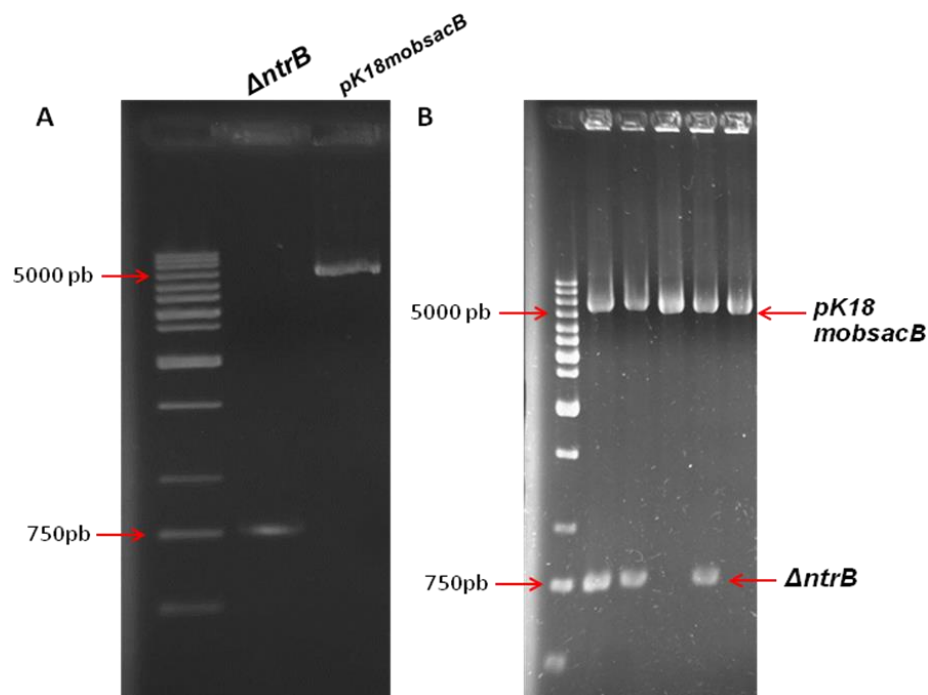


Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose. A: Fragmento  $\Delta ntrB$  (748 pb) e vetor *pK18mobSacB* (5660 pb); B: Confirmação das ligações por restrição utilizando as enzimas *XbaI* e *EcoRI*.

## 5 CONCLUSÕES

1. Os produtos dos genes do sistema Ntr, *ntrC*, *amtB* e *glnB*, estão envolvidos direta ou indiretamente no controle da síntese de PHB em *H. seropedicae*. Já a ausência do gene *glnK* não mostrou efeito na produção de PHB.
2. A concentração de 5 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no meio de cultura levou ao aumento na quantidade de PHB produzida por *H. seropedicae* SmR1 e *glnK* quando malato a 37 mmol/L foi usado como única fonte de carbono.
3. O mutante *ntrC*<sup>-</sup> foi capaz de produzir as maiores quantidades de PHB observadas neste trabalho, tanto em 20 mmol/L quanto em 5 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , indicando que neste mutante a produção de PHB está desacoplada da relação C/N.
4. O mutante *ntrC*<sup>-</sup> é mais resistente ao estresse oxidativo do que a estirpe selvagem SmR1, tanto em 0,05 mmol/L e 0,1 mmol/L de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , quando cultivado em meio sólido quanto em 0,5 mmol/L, 1 mmol/L e 2 mmol/L quando cultivado em meio

líquido. Tal fato pode ser um indício da alta produção de NADPH via enzimas reprimidas por NtrC.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, S.P., PURICH, D., STADTMAN, E.R. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Properties of the PII regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylyl-removing enzyme, **J. Biol. Chem.** v. 250, p. 6264–6272, 1975.

ATKINSON, M.R., NINFA, A.J. Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*, **Mol. Microbiol.** v. 32, p. 301–313, 1999.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications.** 3 ed. Oxford: Benjamin Cummings, 1997, 640 p.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a new root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology.** v.36, p.86-93, 1986.

BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Trends Biotechnology** v. 5, p. 246–250, 1987.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis.** v. 13, p. 65-73, 1992.

BALDANI, J.I.; BANDANI, V.L. History on the biologicam nitrogen fixation research in gramineaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Annual Brazilian Academy of Sciences.** v. 77, p. 549-579, 2005.

BENELLI, E. M., SOUZA, E. M., FUNAYAMA, S., RIGO, L. U., & PEDROSA, F.O. Evidence for two possible glnB-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, v 179, p. 4623-4626, 1997.

BENELLI, E. M.; BUCK, M.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O. Uridylylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.**, v. 47, p. 309-314, 2001.

BLAUWKAMP, T. A., NINFA, A. J. Antagonism of PII signalling by the AmtB protein of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**. v. 48(4), p 1017-1028, 2003.

BONATTO, A.C.; COUTO, G.H.; SOUZA, E.M.; ARAÚJO, L.M.; PEDROSA, F.O.; NOINDORF, L.; BENELLI, E.M. Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. **Prot. Expr. Purif.** v. 55, p. 293-299, 2007.

BONATTO, A. C.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F.O.; COUTO, G.H.; ARAÚJO, L.M.; BENELLI, E.M. In vitro uridylylation and deuridylylation of PII proteins from *Herbaspirillum seropedicae* by the GlnD protein. In: XXXVIa Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (2007: Salvador). **Resumos**. Salvador, 2007.

CABISCOL, E., J. TAMARIT, J. ROS. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **Int. Microbiol.** v. 3, p. 3-8, 2000.

CATALÁN, A. I.; FERREIRA, F.; GILL, P. R.; BATISTA, S. Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the lacZlacY genes. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 1352-1357, 2007.

CONROY, M. J.; DURAND, A.; LUPO, D.; LI, X. -D.; BULLOUGH, P.A.; WINKLER, F.K.; MERRICK, M. The crystal structure of *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** v. 104, 1213-1218, 2007.

COUTTS, G.; THOMAS, G.; BLAKEY, D.; MERRICK, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **EMBO J.** v. 21, p. 536-545, 2002.

DADDAOUA, A., T. KRELL, J.L. RAMOS. Regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas*: the phosphorylative branch and entnerdoudoroff enzymes are regulated by a repressor containing a sugar isomerase domain. **J. Biol. Chem.** v. 284, p. 21360-21368, 2009.

DAWES, E. A.; SENIOR, P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Advances in Microbial Physiology.** v. 14, p. 135-266, 1973.

DING, L.; YOKOTA, A. Prosals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putest* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of (*Pseudomonas*) *huttensis*, (*Pseudomonas*) *lanceolata*, (*Aquaspirillum*) *deltatum* and (*Aquaspirillum*) *autotrophicum* *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2223-2230, 2004.

DOUDOROFF, M.; STAINER, R.Y. Role of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria. **Nature.** v. 183, p. 1440-1442, 1959.

DOI, Y. Microbial synthesis, physical properties, and biodegradability of polyhydroxyalkanoates. **Macromol. Symp.** v. 98, p. 585-599, 1995.

DU, G. C.; CHEN, J.; YU, J.; LUN, S. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*. **Biochemical Engineering Journal**, 8, p. 103-110, 2001.

GIRÒ, M., N. CARRILO, A.R. KRAPP. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and ferredoxin-NADP(H) reductase contribute to damage repair during soxRS response of *Escherichia coli*. **Microbiology.** v. 152, p. 1119-1128, 2006.

GRIEBEL, R.; SMITH, Z.; MERRICK, J. M. Metabolism of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. I. Purification, Composition, and Properties of Native Poly-P-hydroxybutyrate Granules from *Bacillus megaterium*. **Biochemistry**. v. 7, p. 3676-3681, 1968.

GURIEFF, N.; LANT, P. Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production. **Bioresource Technology**. V 98, p. 3393–3403, 2007.

HERVÁS, A.B., I. CANOSA, R. LITTLE, R. DIXON, E. SANTERO. NtrC-dependent regulatory network for nitrogen assimilation in *Pseudomonas putida*. **J. Bacteriol.** v. 191, p. 6123-6135, 2009.

IMLAY, J.A. Pathways of oxidative damage. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 57, p. 395-418, 2003.

LUNDBERG, B., R.E. WOLF, M. DINAUER, Y. Xu, and F. Fang. 1999. Glucose 6-phosphate dehydrogenase is required for *Salmonella typhimurium* virulence and resistance to reactive oxygen and nitrogen intermediates. **Infect. Immun.** v. 6, p. 5371-5375, 1999.

JAMES, E. K., P. GYANESHWAR, P. N. MATHAN, W. L. BARRAQUIO, P. M. REDDY, P. P. IANNETTA, F. L. OLIVARES; J. K. LADHA. 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interact.** v. 15, p. 894–906, 2002.

JAVELLE, A.; EMMANUELE, S.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Ammonium Sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 8530-8538, 2004.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. Reconstitution of the signal-transduction bicyclic cascade responsible for the regulation of Ntr gene transcription in *Escherichia coli*. **Biochemistry**. v. 37, p. 12795-12801, 1998a.

JIANG, P.; PELISKA, J.A.; NINFA, A.J. Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. **Biochemistry**, v. 37, p. 12782-12794, 1998b.

JIANG, P.; ATKINSON, M.R.; SRISAWAT, C.; SUN, Q.; NINFA, A. J. Functional dissection of the dimerization and enzymatic activities of *Escherichia coli* nitrogen regulator II and their regulation by the PII protein. **Biochemistry**. v. 39, p. 13433-13449, 2000.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y.; CASTRO-SOWINSKI, S., Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Critical Reviews in Microbiology**. v.31, p.55-67, 2005.

KERN, D.; VOLKMAN, B.F.; LUGINBÜHL, P.; NOHAILE, M.J.; KUSTU, S.; WEMMER, D.E. Structure of a transiently phosphorylated switch in bacterial signal transduction. **Nature**, v.402, p.894-898, 1999.

KIM, J., C.O. JEON, W. PARK. Dual regulation of zwf-1 by both 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate and oxidative stress in *Pseudomonas putida*. **Microbiology**. v. 154, p. 3905-3916, 2008.

KIRCHHOF, G.; ECKET, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. L.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum fristngense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 157-168, 2001.

LEE, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 49, p. 1-14, 1996.

LEE, S.Y.; CHOI, J.; WONG, H.H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: minireview. **International Journal of Biological Macromolecules**, 25, p. 31-36, 1999.

LOO, C., SUDESH K. Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. **Malaysian Polymer Journal**. v. 2 (2). p. 31-57, 2007.

MADISON, L. L. e HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v 63, p. 21-53, 1999.

MARCHESSAULT, R. H. Tender morsels for bacteria: recent developments in microbial polyesters. **Trends Polym. Sci**. v. 4, p. 163–168, 1996.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen Control in Bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 604-622, 1995.

MESSING, J. New M13 vectors for cloning. **Methods in Enzymology**, v. 101, p. 20-78, 1983.

MEHTA A, MASON P.J., VULLIAMY T.J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Baillière's Clin*. **Hematol**. v. 13(1), p. 21-38, 2000.

NINFA, A. J.; ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; FENG, J.; NINFA, E.G. Control of nitrogen assimilation by the NRI-NRII two-component system of enteric bacteria. In: J. A. Hoch, & T. J., Silhaby (Eds.) Two-component signal transduction. **American Society for Microbiology**, p. 67-68, 1995.

NINFA, A. J.; JIANG, P.; ATKINSON, M.R. PELISKA, J. A. Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Curr.Top.Cell Regul**. v. 36, p. 31-75, 2000.

NOINDORF, L.; REGO, F.G.M.; BAURA, V.A.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; RIGO, L.U.; SOUZA, E. M. STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Characterization of the *orf1glnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Archives in Microbiology**. v, 185, p. 55-62, 2006.

NOINDORF, L.; BONATTO, A.C.; MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O.;

STEFFENS, M.B.R.; CHUBATSU, L.S. Role of PII proteins in nitrogen fixation control of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. **BMC Microbiol.**, v. 11(8), 2011.

PAWLOWSKI, A., RIEDEL, K.-U., KLIPP, W., DREISKEMPER, P., GROß, S., BIERHOFF, H., DREPPER, T. & MASEPOHL, B. Yeast two-hybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **J Bacteriol.** v. 185(17), p. 5240-5247, 2003.

PEOPLES, O. P.; SINSKEY, A. J. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding bketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. **Journal of Biological Chemistry.** v. 264, p. 15293-15297, 1989.

PERSUHN, D. C.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. 2000. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiology Letters.** 192: 217-221.

PIOSZAK, A. A.; NINFA, A. J. Genetic and biochemical analysis of phosphatase activity of *Escherichia coli* NRII (NtrB) and its regulation by the PII signal transduction protein. **J Bacteriol.** v. 185, p. 1299-1315, 2003.

POHLMANN, A.; FRICKE, W. F.; REINECKE, F.; et al. Genome sequence of the bioplastic- producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. **Nature Biotechnology.** v. 24, p. 1257-1262, 2006.

POMPOSIELLO, P.J., B. DEMPLE. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. **Trends Biotechnol.** v. 19, p. 109-114, 2001.

PÖTTER, M.; STEINBÜCHEL. A. Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated

Proteins: Impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation. **Biomacromolecules**. v. 6, p. 552-560, 2005.

PREUSTING, H., A. NIJENHUIS, and B. WITHOLT. Physical characteristics of poly(3-hydroxyalkanoates) and poly(3-hydroxyalkenoates) produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on aliphatic hydrocarbons. **Macromolecules**. v. 23, p. 4220–4224, 1990.

REHM, B. H. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochemistry Journal**. v 376, p. 15-33, 2003.

REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 25(1-3), p. 3-19, 1999.

ROMBEL, I; PETERS-WENDISCH, P; MESECAR, A; THORGEIRSSON, T; SHIN, Y; KUTSU, S. MgATP binding and hydrolysis determinants of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. **J. Bacteriol**. v. 181(15), p. 4628-2638, 1999.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum htlnert* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology**, Reading, v. 56, p. 1341-1348, 2006.

SENIOR, P.J; DAWES, E.A. The regulation of poly-β-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Biochemical Journal**. v. 134, p. 225–238, 1973.

SCHRUURMAN, M., WAARDENBURG, D. van., COSTA, J., NIEMARKT, H., LEROY, P. Severe hemolysis and methemoglobinemia following fava beans ingestion in glucose-6-phosphatase dehydrogenase deficiency - case report and literature review. **Eur J Pediatr**. v. 168, p. 779-782, 2009.



SCHUBERT, A.; STEINBÜCHEL, A.; SCHELEGEL, H. G. Cloning of *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v. 170, p. 5837-5847, 1988.

Fernández-González, C., Gil, J. A., Mateos, L. M., Schwarzer, A., Schäfer, A., Kalinowski, J., Pühler, A., and Martín, J.F. (1996) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 146, 554-558

SIMON R., PRIEFER U., Pühler A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Biotechnoloty**. p. 784-791, 1983.

SILVA, G. L., MIGUENS, F. C., OLIVARES, F. L. *Herbaspirillum seropedicae* and sugarcane endophytic interaction investigated by using high pressure freezing electron microscopy. **Brazilian Journal of Bacteriology**. v. 34, p. 69-71, 2003.

SLATER, S. C.; VOIGE, W. H.; DENNIS, D. E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. **Journal of Bacteriology**. v. 170, p. 4431-4436, 1988.

SOUPENE, E., LEE, H., KUTSU, S. Ammonium/methylammonium transport (Amt) proteins facilitate diffusion of NH<sub>3</sub> bidirectionally. **Proc Natl Acad Sci**. v. 99, p. 3926–3931, 2002.

STADTMAN, E.R. Protein oxidation and aging. **Science**. v. 257, p. 1220-1224, 1992.

STEINBÜNCHEL, A.; FÜNCHTENBUSCH, B.; Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends in Biotechnology**. v. 16, p.419-427, 1998.

STEINBÜCHEL, A.; EVERSLOH, L.T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**. v 16, p. 81-96, 2003.

STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H. G. Excretion of pyruvate by mutants of *Alcaligenes eutrophus*, which are impaired in the accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) (PHB), under conditions permitting synthesis of PHB. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 31, p. 168–175, 1989.

STUBBE, J.; TIAN, J. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase. **Natural Product Reports**. v. 20, p. 445–457, 2003.

SUN, J.; van DOMMELEN, A.; van IMPE, J.; VANDERLEYDEN, J. The *ntrB* and *ntrC* Genes Are Involved in the Regulation of Poly-3-Hydroxybutyrate Biosynthesis by Ammonia in *Azospirillum brasiliense* Sp7. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p. 133-117, 2000.

TIMM, A.; STEINBÜCHEL, A. Formation of Polyesters Consisting of Medium-Chain-Length 3-Hydroxyalkanoic Acids from Gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and Other Fluorescent *Pseudomonads*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 56, p. 3360-3367, 1990.

TOKIWA, Y.; UGWU, C.U. Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomer. **Journal of Biotechnology**. v. 132, p. 264-272, 2007.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J. *Herbaspirillum lusttanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1979-1983, 2003.

WYMAN, C.; ROMBEL, I.; NORTH, A.K.; BUSTAMANTE, C.; KUSTU, S. Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. **Science**, v.275, p.1658-1661, 1997.

YEOM, S., YEOM, J., PARK, W. NtrC-Sensed Nitrogen Availability Is Important for Oxidative Stress Defense in *Pseudomonas putida* KT2440. **Journal of Microbiology**. v. 48, p. 153-159, 2010.

ZIMMER, D.P., E. SOUPENE, H.L. LEE, V.F. WENDISCH, A.B. KHODURSKY, B.J. PETER, R.A. BENDER, S. KUTSU. Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 97, p. 14674-14679, 2000.