

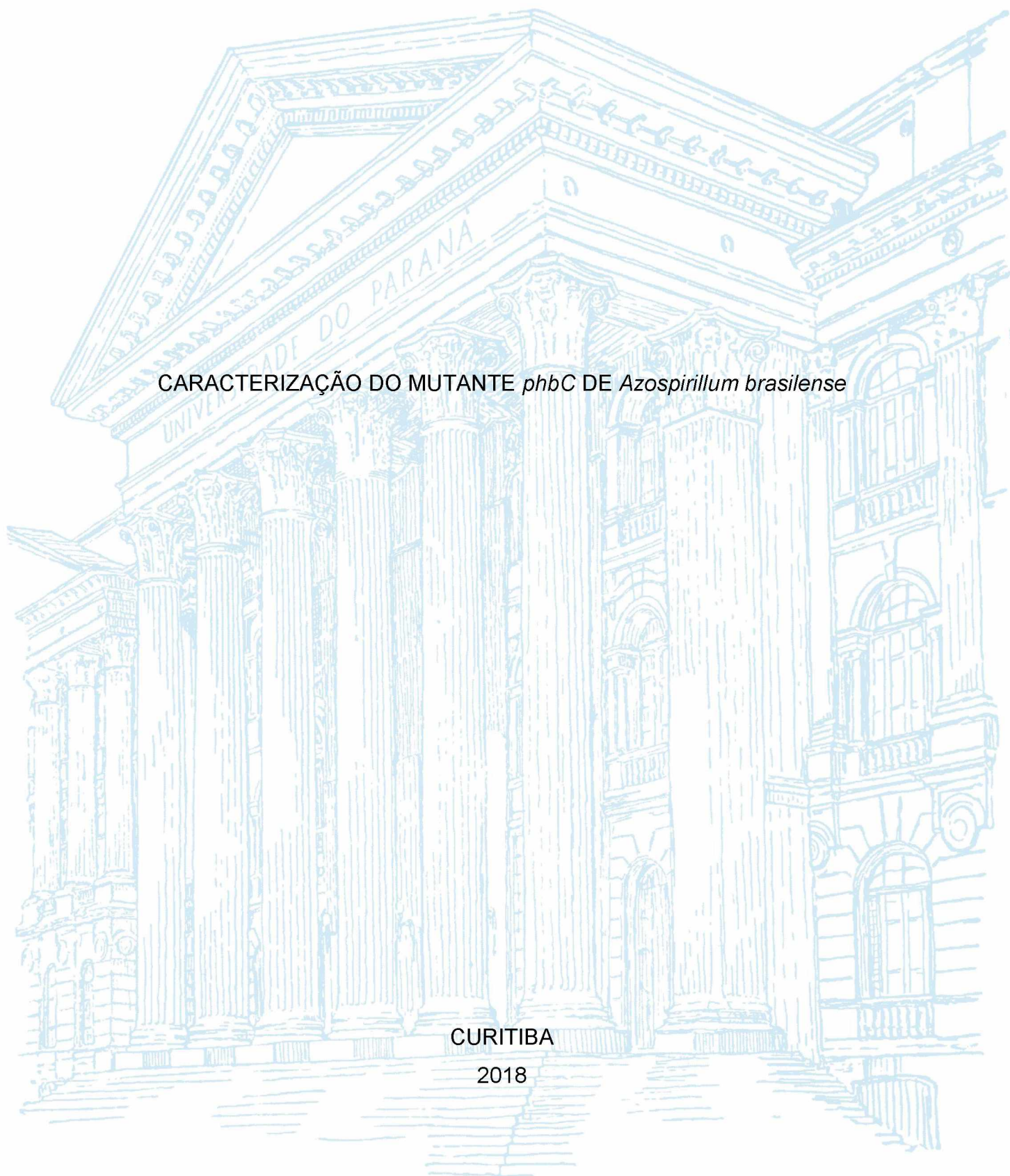
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA MONTES LUZ

CARACTERIZAÇÃO DO MUTANTE *phbC* DE *Azospirillum brasilense*

CURITIBA

2018



BRUNA MONTES LUZ

CARACTERIZAÇÃO DO MUTANTE *phbC* de *Azospirillum brasilense*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Profa. Dra. Leda Satie Chubatsu
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Luz, Bruna Montes
Caracterização do mutante phbC de *Azospirillum brasiliense*. / Bruna
Montes Luz. – Curitiba, 2018.
89 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Leda Satie Chubatsu
Co-orientador: Marcelo Müller dos Santos
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Poliesteres. 2. Azospirillum. I. Título. II. Chubatsu, Leda Satie. III.
Santos, Marcelo Müller dos. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 589.9

TERMO DE APROVAÇÃO

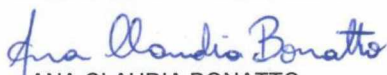
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **BRUNA MONTES LUZ**, intitulada: **CARACTERIZAÇÃO DO MUTANTE PHBC DE AZOSPIRILLUM BRASILENSE**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

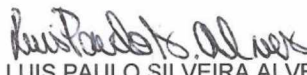
Curitiba, 29 de Novembro de 2018.



LEDA SATIE CHUBATSU
Presidente da Banca Examinadora



ANA CLAUDIA BONATTO
Avaliador Externo (UFPR)



LUIS PAULO SILVEIRA ALVES
Avaliador Interno Pós-Doc (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Dra. Leda Chubatsu, por ter se comprometido a me orientar e ter se feito 100% disponível nesses dois anos. Sua orientação enriqueceu e expandiu todo o pouco conhecimento que eu tinha, e esse tempo na Bioquímica foi uma lição de humildade para mim. Obrigada pelos ensinamentos e pelos momentos de descontração no cafézinho.

Agradeço também meu co-orientador, Dr. Marcelo Müller, por ter sido inspiração para eu entrar nessa linha de pesquisa, por me ajudar quando tive dificuldades e por compartilhar seu conhecimento na área.

Aos meus pais, Paulo e Mardja, por terem sempre me incentivado a dar o meu melhor e me encorajarem a seguir a carreira que amo. Por serem minha inspiração e exemplo de ética e trabalho duro.

Ao meu marido, Alexandre, que foi extremamente compreensivo quando tive que trabalhar por longas horas e estive ausente. Por torcer por mim e por ouvir sobre coisas sobre as quais não entende com paciência. Sua companhia faz meus dias melhores. Nossa casa é sempre onde eu estiver contigo e com a Lana. Amo vocês.

Aos meus amigos, principalmente à Paloma Gerlach Ribas e Guilherme Burgel, por estarem sempre ao meu lado mesmo com um pouco mais de distância que se formou após o fim da graduação. Por me protegerem e estarem do meu lado quando nem sempre todos estiveram. Por nossa amizade não ter mudado mesmo sem nos vermos com frequência.

Aos meus colegas do Núcleo de Fixação de Nitrogênio, principalmente aqueles que contribuíram para que eu conseguisse terminar todos os experimentos e conseguir concluir o mestrado com sucesso. Nadhine, Luis Paulo, Edileusa, Adrian, Alex, Edson e Anelis – muito obrigada por terem me guiado em experimentos nos quais eu não tinha experiência e por doar um pouco do seu tempo para me ajudar. Obrigada também àqueles colegas que compartilharam conversas e momentos engraçados no laboratório – principalmente à Carol e André.

Ao técnicos do laboratório Valter, Dona Rose e Bruna – a ajuda que vocês nos fornecem é essencial para que o nosso trabalho dê certo. Agradeço por todo o apoio e por estarem sempre disponíveis quando precisei de ajuda.

Às agências de fomento à pesquisa por fazerem a pesquisa no Brasil possível.

RESUMO

O polihidroxibutirato (PHB) é um poliéster sintetizado por diversas espécies de micro-organismos. Acredita-se que sua síntese e acúmulo façam parte de uma estratégia de estocagem de carbono e energia para as células bacterianas. Além disso, a presença de PHB tem sido correlacionada a maior capacidade bacteriana em resistir a diferentes estresses, incluindo limitação de nutrientes e exposição à irradiação UV e peróxido de hidrogênio. O objetivo do presente trabalho foi determinar alterações decorrentes da deficiência na síntese de PHB na bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*. Neste estudo foi utilizada uma estirpe mutante contendo uma inserção no gene que codifica para a enzima PHB sintase (mutante *phbC*). Foram observadas diferenças no crescimento da estirpe mutante *phbC* em cultivo em baixas concentrações de amônio e em glutamato quando comparadas à estirpe selvagem FP2. A partir de uma complementação plasmidial do gene *phbC* a produção de PHB no mutante *phbC* foi retomada e a aparência das colônias tornou-se igual àquela da estirpe selvagem. Entretanto, a estirpe complementada apresentou uma menor taxa de crescimento provavelmente decorrente da maior síntese de PHB. Foi observado que a estirpe mutante *phbC* apresentou atividade de nitrogenase e regulação pós-traducional da glutamina sintetase semelhante à estirpe selvagem. Genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio e na fixação de nitrogênio não tiveram alterações na sua expressão, mas aqueles envolvidos no metabolismo de PHB parecem ser menos expressos no mutante *phbC*. Nossos resultados indicam que a deficiência na produção de PHB em *A. brasilense* interfere de forma diferente no metabolismo quando comparado a outras bactérias produtoras de PHB.

Palavras-chave: Polihidroxibutirato. *Azospirillum brasilense*. PHB sintase.

ABSTRACT

Polyhydroxybutyrate (PHB) is a polyester polymer synthesized by several species of microorganisms. This polymer is accumulated as intracellular insoluble granules and acts as a carbon and energy sink in bacterial cells. In addition, PHB has been correlated with increased bacterial capacity to withstand different stresses, including nutrient limitation and exposure to UV irradiation and hydrogen peroxide. The objective of the present work was to determine alterations caused by the deficiency in PHB synthesis in the diazotrophic bacterium *Azospirillum brasilense*. In this study, a mutant strain (*phbC* mutant) containing an insertion in the gene coding for the PHB synthase enzyme was used. Differences in growth of the *phbC* mutant strain in culture were observed at low concentrations of ammonium and glutamate when compared to wild type strain FP2. Plasmid complementation of the *phbC* gene lead to production of PHB in the *phbC* mutant, and colonies of the complemented cells were similar to the wild type strain. However, the complemented strain showed a lower growth rate probably due to the higher synthesis of PHB. Results showed that the *phbC* mutant strain had nitrogenase activity and post-translational regulation of glutamine synthetase similar to those of the wild type strain. Genes involved in nitrogen metabolism and nitrogen fixation had no changes in their expression; however, genes involved in PHB metabolism appeared to have lower expression in the *phbC* mutant. Our results indicate that the deficiency in PHB production in *A. brasilense* interferes differently in the cell metabolism when compared to other PHB producing bacteria.

Keywords: Polyhydroxybutyrate. *Azospirillum brasilense*. PHB synthase.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA DO CICLO DE FORMAÇÃO E DISSOCIAÇÃO DO COMPLEXO DA NITROGENASE.....	16
FIGURA 2 – MODELO PARA REGULAÇÃO DAS PROTEÍNAS DraG e DraT PELAS PROTEÍNAS P _{II} , GlnZ e GlnB.....	18
FIGURA 3 – REAÇÕES ENZIMÁTICAS ESSENCIAIS NO ANABOLISMO E CATABOLISMO DE POLIHIDROXIBUTIRATO EM <i>Ralstonia eutropha</i>	22
FIGURA 4 – REGIÃO DO GENOMA DE <i>A. brasilense</i> AMPLIFICADA PELOS PRIMERS <i>phbC</i> F E <i>phbC</i> R.....	47
FIGURA 5 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>phbC</i> DE <i>A. brasilense</i> FP2 E MUTANTE <i>phbC</i>	48
FIGURA 6 – PLASMÍDEO pBL01 DIGERIDO POR <i>SacI</i> E <i>XbaI</i> E AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>phbC</i> A PARTIR DO DNA PLASMIDIAL.....	49
FIGURA 7 – PLASMÍDEO pBL02 DIGERIDO POR <i>SacI</i> E <i>XbaI</i> E AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>phbC</i> A PARTIR DO DNA PLASMIDIAL.....	50
FIGURA 8 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>phbC</i> DE TRANSCONJUGANTES SELECIONADOS DE <i>A. brasilense</i> MUTANTE <i>phbC</i>	50
FIGURA 9 – PLACAS DE CULTIVO DE <i>A. brasilense</i> ESTIRPES FP2, MUTANTE <i>phbC</i> E MUTANTE <i>phbC</i> COMPLEMENTADO COM O PLASMÍDEO pBL02.....	53
FIGURA 10 – PERFIL DE MODIFICAÇÃO DA GLUTAMINA SINTETASE APÓS CHOQUE DE AMÔNIO EM <i>A. brasilense</i> ESTIRPES FP2 E mutante <i>phbC</i>	59
FIGURA 11 – RNA TOTAL EXTRAÍDO DE AMOSTRAS DE <i>A. brasilense</i> FP2 E MUTANTE <i>phbC</i> ANTES E APÓS CHOQUE DE AMÔNIO.....	61
FIGURA 12 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>recA</i> A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES DE <i>A. brasilense</i> FP2 E MUTANTE <i>phbC</i>	62
FIGURA 13 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>recA</i> UTILIZANDO AMOSTRAS DE RNA TOTAL EXTRAÍDO DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE <i>phbC</i> DE <i>A. brasilense</i>	62
FIGURA 14 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>nifH</i> PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE <i>phbC</i> DE <i>A. brasilense</i>	64

FIGURA 15 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>glnA</i> A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE <i>phbC</i> DE <i>A. brasilense</i> ..	65
FIGURA 16 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>glnB</i> A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE <i>phbC</i> DE <i>A. brasilense</i> ..	67
FIGURA 17 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>glnZ</i> A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE <i>phbC</i> DE <i>A. brasilense</i> ..	68
FIGURA 18 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>amtB</i> A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE <i>phbC</i> DE <i>A. brasilense</i> ..	69
FIGURA 19 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE PHB NO PLASMÍDEO ABSP7_p3 DE <i>A. brasilense</i>	70
FIGURA 20 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>phaA</i> A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE <i>phbC</i> DE <i>A. brasilense</i> ..	72
FIGURA 21 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>phaB</i> A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE <i>phbC</i> DE <i>A. brasilense</i> ..	72
FIGURA 22 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>sucA</i> A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE <i>phbC</i> DE <i>A. brasilense</i> ..	75
FIGURA 23 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>gdhA</i> A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE <i>phbC</i> DE <i>A. brasilense</i> ..	76
FIGURA 24 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>gltK</i> A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE <i>phbC</i> DE <i>A. brasilense</i>	77

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – ESTIRPES DE BACTÉRIAS UTILIZADAS NO PRESENTE TRABALHO	30
QUADRO 2 – PLASMÍDEOS UTILIZADOS NO PRESENTE TRABALHO	30
QUADRO 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO LURIA-BERTANI (LB).....	31
QUADRO 4 – COMPOSIÇÃO DO MEIO NFb LACTATO	31
QUADRO 5 – ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS PARA CULTIVO CELULAR E AS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES FINAIS EMPREGADAS	32
QUADRO 6 – COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS PARA TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNA DO GEL DE POLIACRILAMIDA PARA MEMBRANA DE PVDF.....	35
QUADRO 7 – REAGENTES UTILIZADOS NAS REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES	37
QUADRO 8 – NOMES E SEQUÊNCIAS DE TODOS OS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS EM REAÇÕES DE PCR.....	38
QUADRO 9 – DESCRIÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE PHB EM <i>A. brasilense</i> Sp7, QUANDO COMPARADOS COM AQUELES DE <i>R. eutropha</i> H16	70

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – DETERMINAÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR CITOMETRIA DE FLUXO EM <i>A. brasilense phbC</i> E FP2.....	43
GRÁFICO 2 – AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES <i>A. brasilense</i> FP2 E <i>A. brasilense</i> MUTANTE <i>phbC</i> EM PRESENÇA DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO	46
GRÁFICO 3 – DETERMINAÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR CITOMETRIA DE FLUXO EM <i>A. brasilense phbC</i> , FP2 e <i>phbC</i> COMPLEMENTADA COM pBL02.....	51
GRÁFICO 4 – AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DAS DIFERENTES ESTIRPES DE <i>A. brasilense</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NH ₄ Cl	55
GRÁFICO 5 – AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DO MUTANTE <i>phbC</i> COMPLEMENTADO COM pBL02 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NH ₄ Cl.....	56
GRÁFICO 6 – ATIVIDADE NITROGENASE DAS ESTIRPES <i>A. brasilense</i> FP2 E <i>A. brasilense</i> MUTANTE <i>phbC</i>	58

LISTA DE SIGLAS

2-OG	–	2-oxoglutarato
ADP	–	adenosina difosfato
AMP	–	adenosina monofosfato
Amp	–	ampicilina
ATase	–	adenililtransferase
ATP	–	adenosina trifosfato
D.O. ₆₀₀	–	densidade óptica a 600 nm
EPS	–	exopolissacarídeos
GOGAT	–	glutamato sintase
GS	–	glutamina sintetase
K _m	–	canamicina
LB	–	Luria-Bertani
NAD ⁺	–	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	–	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	–	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
Nal	–	ácido nalidíxico
pb	–	pares de base
PCR	–	reação em cadeia da polimerase
PHA	–	polihidroxiálcanoato
PHB	–	polihidroxiabutirato
pO ₂	–	pressão de oxigênio
rpm	–	rotações por minuto
SDS-PAGE	–	eletroforese de proteína sob condições desnaturantes
Sm	–	estreptomicina
Tc	–	tetraciclina
UV	–	ultravioleta
X-gal	–	5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	O GÊNERO <i>Azospirillum</i>	15
2.2	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	15
2.3	TRANSPORTE E ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIO	18
2.4	REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE NITROGÊNIO	20
2.5	POLIHIDROXIALCANOATOS	20
2.6	O PAPEL DO POLIHIDROXIBUTIRATO EM <i>Azospirillum brasilense</i>	22
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVOS GERAIS	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	ESTIRPES E PLASMÍDEOS UTILIZADOS	30
4.2	CULTIVO CELULAR	30
4.3	QUANTIFICAÇÃO DE PHB POR CITOMETRIA DE FLUXO	32
4.4	CURVAS DE CRESCIMENTO BACTERIANO	32
4.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE NITROGENASE	33
4.6	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA	33
4.7	DETERMINAÇÃO DA ADENILILAÇÃO DA GLUTAMINA SINTETASE (GS)	34
4.7.1	Coleta das amostras	34
4.7.2	Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)	34
4.7.3	Transferência de proteína para membrana em sistema semisseco	34
4.7.4	Marcação de proteína com anticorpos	35
4.8	EXTRAÇÃO DE RNA	36
4.9	SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)	37
4.10	AMPLIFICAÇÃO DE DNA ATRAVÉS DE PCR	37
4.11	ELETROFORESE DE DNA	39
4.12	PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	39
4.13	DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	40
4.14	REAÇÕES DE LIGAÇÃO DE DNA	40
4.15	PREPARO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES	40

4.16	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO	41
4.17	CONJUGAÇÃO BACTERIANA	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	QUANTIFICAÇÃO DE PHB POR CITOMETRIA DE FLUXO	42
5.2	AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO BACTERIANO EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO	44
5.3	COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE <i>phbC</i>	46
5.3.1	Quantificação de PHB no transconjugante	51
5.3.2	Diferenças fenotípicas das colônias de <i>A. brasilense</i> FP2 e mutante <i>phbC52</i>	
5.3.3	Avaliação de crescimento celular	54
5.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE NITROGENASE	57
5.5	PADRÃO DE ADENILILAÇÃO DA GLUTAMINA SINTETASE	58
5.6	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	60
5.6.1	Extração de RNA	60
5.6.2	Controles utilizados para PCR semi quantitativa	61
5.6.3	Expressão de genes envolvidos no sistema Ntr e na fixação biológica de nitrogênio	63
5.6.4	Expressão de genes envolvidos no metabolismo de PHB	69
5.6.5	Expressão de genes envolvidos no metabolismo e transporte de glutamato	74
6	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

O polihidroxiбутирато (PHB) é um poliéster sintetizado por procariotos e armazenado na forma de grânulos insolúveis intracelulares. Há interesse industrial na síntese deste polímero, por ser uma opção biodegradável para substituição de plásticos provenientes do petróleo (VAN DER WALLE et. al, 2001).

Nas células bacterianas, o PHB atua como um sistema de armazenamento de carbono e energia, podendo ser mobilizado em condições em que há falta de nutrientes. Portanto, sua síntese é vista como uma vantagem para alguns organismos que são capazes de sintetizá-lo (OKON; ITZIGSOHN, 1992; DAWES; SENIOR, 1973).

Um dos organismos capazes de sintetizar PHB é a bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*. Bactérias desse gênero são promotoras de crescimento de plantas e podem ser utilizadas como inoculantes para diferentes espécies de plantas de interesse econômico, como o milho, trigo e arroz (DÖBEREINER; DAY, 1976). O acúmulo do polímero confere a *A. brasilense* uma maior resistência a diferentes tipos de estresse, o que é interessante na perspectiva de utilização dessa bactéria como inoculante, sendo que uma maior sobrevivência permite um período maior de validade do produto inoculante (TAL; OKON, 1985).

A comparação entre a estirpe selvagem e um mutante deficiente na síntese de PHB (*phbC*), construído por Kadouri e colaboradores (2002), mostrou que a estirpe selvagem é realmente capaz de resistir a diferentes tipos de estresse com mais eficiência do que a estirpe mutante *phbC*. Entretanto, os efeitos que a interrupção da síntese de PHB causou no metabolismo da célula não foram descritos.

Em outras estirpes de bactérias diazotróficas, a ausência da síntese e acúmulo de PHB mostrou efeitos distintos na sua capacidade de fixação de nitrogênio. Em *Herbaspirillum seropedicae*, o mutante deficiente na síntese de PHB tem sua atividade nitrogenase afetada consideravelmente (resultados não publicados – Marcelo Bueno Batista). Em *Rhizobium etli*, por outro lado, os resultados mostram que o mutante *phbC* apresenta uma atividade nitrogenase mais prolongada em nódulos (CEVALLOS et al., 1996). Portanto, o metabolismo de células deficientes na síntese de PHB pode ser afetado de diferentes modos, dependendo da espécie observada.

O objetivo do presente trabalho foi verificar diferenças entre as estirpes selvagem e mutante *phbC* de *A. brasilense*, com foco no metabolismo de nitrogênio, principalmente na fixação de nitrogênio e no sistema regulatório que sinaliza mudanças do status de nitrogênio da célula.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O GÊNERO *Azospirillum*

Bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* são alfa-proteobactérias, diazotróficas e de vida livre (DÖBEREINER; PEDROSA, 1987). Estas bactérias são capazes de associar-se com diversas plantas de importância agrônômica, promovendo o crescimento vegetal (DÖBEREINER; DAY, 1976; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). A inoculação com *Azospirillum* aumenta a densidade e comprimento dos pelos radiculares e alongamento de raízes laterais, aumentando a superfície de absorção da raiz (FALLIK; OKON; FISCHER, 1988; DOBBELAERE et al., 2001). A secreção de hormônios vegetais como auxinas, giberelinas e citocininas é um dos fatores responsáveis por esses efeitos (DOBBELAERE et al., 2001).

Uma das espécies pertencentes a esse gênero e mais amplamente estudada é *Azospirillum brasilense* (DÖBEREINER; DAY, 1976), principalmente em relação aos seus efeitos promotores de crescimento vegetal (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; DOBBELAERE et al., 2001). A sobrevivência bacteriana na rizosfera é essencial para que a promoção de crescimento vegetal ocorra (TAL; OKON, 1985; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; KADOURI et al., 2005). Um dos fatores envolvidos na sua competitividade na rizosfera é a capacidade de *A. brasilense* fixar nitrogênio atmosférico (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

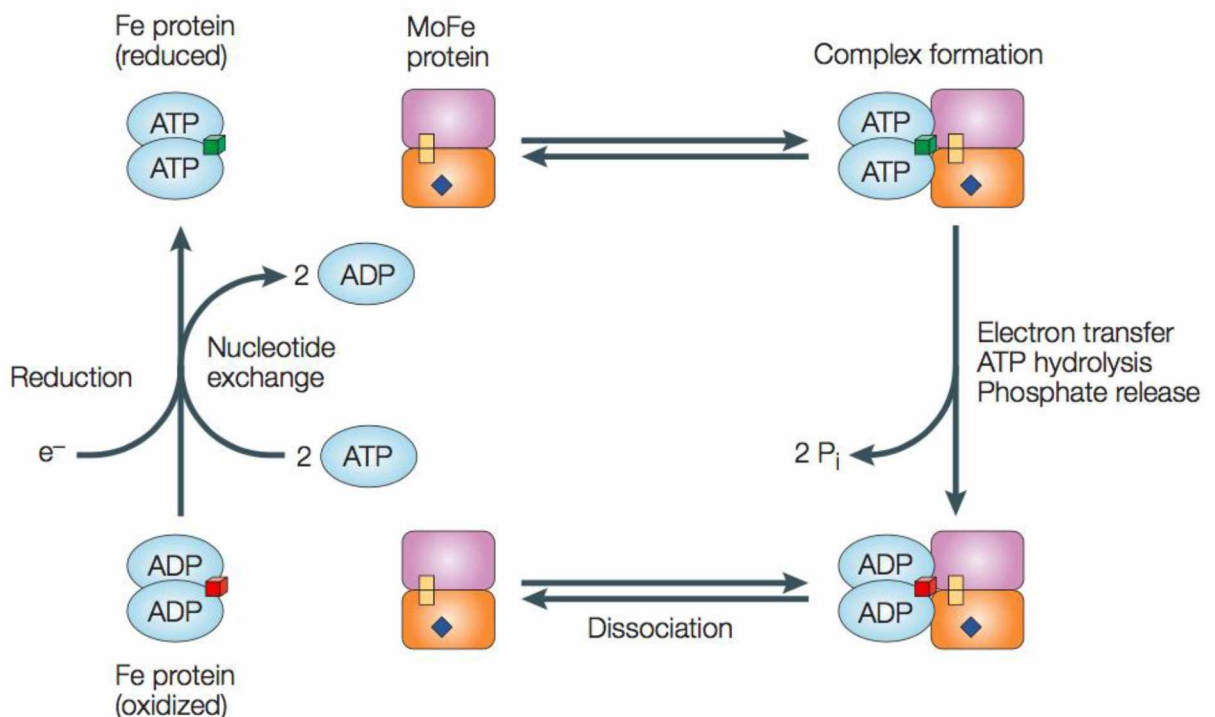
A fixação biológica de nitrogênio é um processo essencial, pois possibilita a alguns procariotos a capacidade de converter nitrogênio atmosférico em amônio, forma biologicamente disponível que pode ser incorporada na forma de biomoléculas como aminoácidos, ácidos nucleicos, ATP e outras moléculas nitrogenadas. Esse processo é realizado pelo complexo enzimático nitrogenase (SPRENT, 1990; CANFIELD; KRISTENSEN; THAMDRUP, 2005) que reduz o dinitrogênio gasoso (N_2) a amônio (NH_4^+), através da seguinte reação:



A nitrogenase possui dois componentes: um componente menor e dimérico, conhecido como proteína Fe, e um componente maior e heterotetramérico, a proteína FeMo, que contém o sítio catalítico do complexo enzimático. A proteína Fe funciona como doadora de elétrons, dependente de ATP, para a proteína FeMo, (DIXON; KAHN; 2004). A FIGURA 1 mostra o ciclo de formação e dissociação do complexo da nitrogenase que deve ocorrer a cada transferência de elétrons.

Como a transferência de cada elétron exige a hidrólise de duas moléculas de ATP, a redução de N_2 envolve um gasto energético alto. Além disso, a enzima não age muito rapidamente, o que requer uma síntese de grandes quantidades da nitrogenase. Portanto, há uma grande regulação a nível transcricional, em resposta à disponibilidade de nitrogênio fixado. Ambas as proteínas do complexo da nitrogenase também são sensíveis a oxigênio, o que causa uma limitação fisiológica às bactérias diazotróficas (DIXON; KAHN, 2004).

FIGURA 1 – ESQUEMA DO CICLO DE FORMAÇÃO E DISSOCIAÇÃO DO COMPLEXO DA NITROGENASE



FONTE: Dixon e Kahn (2004)

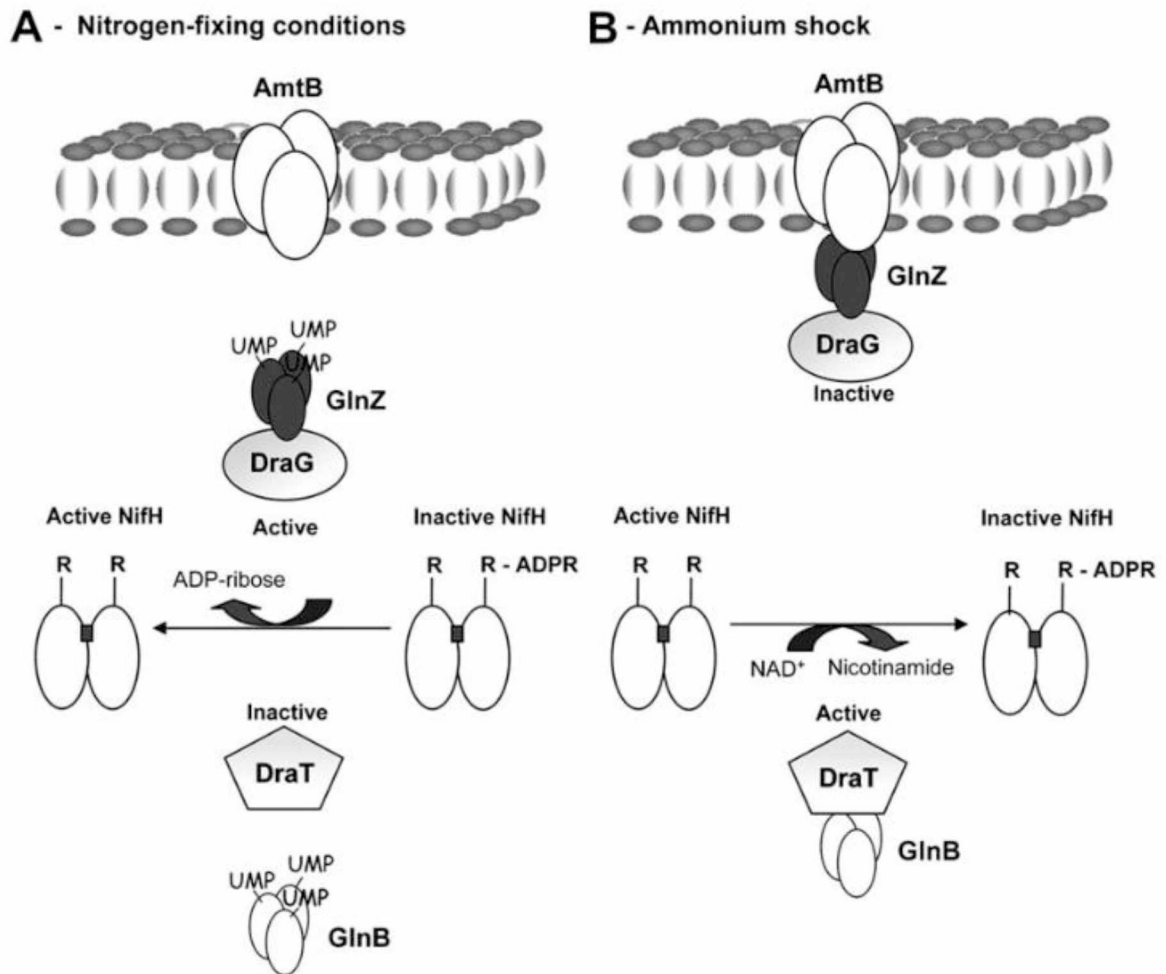
LEGENDA: O esquema mostra a formação do complexo da nitrogenase a partir da associação da proteína Fe com a proteína FeMo. Após a formação do complexo, ocorre a transferência de elétrons da proteína Fe para a proteína FeMo a partir da hidrólise de ATP, seguida da dissociação do complexo. Cada passo de transferência de elétron exige a ocorrência do ciclo de formação e dissociação do complexo.

Nas proteobactérias, os genes *nifHDK*, responsáveis pela estrutura da enzima nitrogenase, são sujeitos a ativação transcricional por NifA juntamente ao fator σ^{54} da RNA polimerase. NifA está envolvida na ativação da transcrição de genes em resposta a estímulos celulares (DIXON; KAHN, 2004). Em *A. brasilense*, NifA é expressa constitutivamente em uma forma inativa e depende da ativação pela proteína GlnB em condições ideais para a fixação de nitrogênio. Sem a ativação de NifA, a fixação de nitrogênio não ocorre (ARSENE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996).

Em *A. brasilense*, também há um mecanismo de regulação pós traducional da nitrogenase (ZHANG et al., 1997). A proteína Fe ou NifH é ADP-ribosilada e conseqüentemente inativada em resposta ao aumento da concentração de amônio, pela ação da enzima DraT (dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase). Na ausência de amônio, a ADP-ribosilação é revertida pela enzima DraG (dinitrogenase redutase glicohidrolase) e a atividade de NifH é reestabelecida (ZHANG et al., 1997). Tanto DraT quanto DraG são reguladas através de interações com as proteínas P_{II} (em *A. brasilense*, GlnB e GlnZ), como mostrado no modelo proposto na FIGURA 2.

Após choque de amônio, GlnZ e DraG interagem com AmtB. Essa interação causa um bloqueio ao canal transportador de amônio (HUERGO et al., 2006). Como GlnZ interage com AmtB em condições de altas concentrações de amônio extracelular, o bloqueio do transportador não afeta a capacidade do amônio em entrar na célula, já que sua entrada pode ocorrer por difusão.

FIGURA 2 – MODELO PARA REGULAÇÃO DAS PROTEÍNAS DraG e DraT PELAS PROTEÍNAS P_{II} GlnZ e GlnB



FONTE: HUERGO et al. (2006)

LEGENDA: **A** – Em condições de fixação de nitrogênio, as proteínas P_{II} GlnZ e GlnB estão uridililadas. DraG forma um complexo com GlnZ e está ativa, o que acarreta na ativação de NifH. **B** – Em condições de choque de amônio, GlnZ e GlnB são desuridililadas. GlnB desuridililada liga-se a DraT, ativando-a. A ativação de DraT causa a inativação de NifH. O complexo GlnZ e DraG se associa à proteína de membrana AmtB.

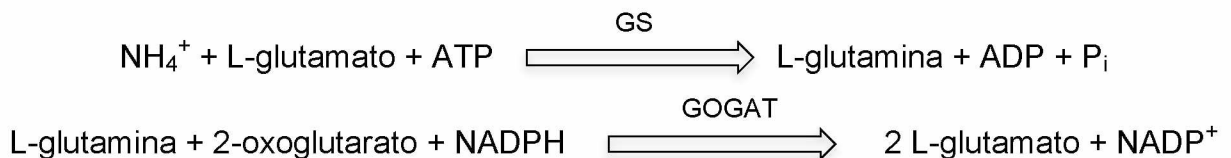
2.3 TRANSPORTE E ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIO

Em geral, amônio é a fonte principal de nitrogênio para bactérias Gram-negativas, pois possibilita uma maior taxa de crescimento quando comparado com outros compostos nitrogenados (REITZER, 2003; HUERGO; DIXON, 2015). Portanto, é necessário que a bactéria seja capaz de transportar esse nutriente para seu interior. Quando a concentração extracelular de amônio é alta, sua difusão pela

membrana é suficiente para suportar o metabolismo celular. A difusão ocorre na forma não protonada, NH_3 . Entretanto, em condições limitantes, é necessária a presença de proteínas transportadoras (KLEINER, 1985).

As principais proteínas transportadoras de amônio presentes em bactérias pertencem à família Amt, sendo AmtB uma das principais proteínas em *E. coli* (KHADEMI et al., 2004). Para o transporte de NH_4^+ pelo transportador, deve primeiro ocorrer sua desprotonação (KHADEMI et al., 2004). Moléculas de amônia, então, podem ser transportadas para o interior da célula (KHADEMI et al., 2004).

Quando o amônio é captado do meio extracelular ou sintetizado através da fixação de nitrogênio atmosférico, ele é assimilado pela célula através da sua conversão em glutamina e glutamato, precursores de outros compostos nitrogenados na célula (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001). A principal via de assimilação de amônio por *A. brasilense* envolve a ação das enzimas glutamina sintetase (GS), codificada por *glnA*, e glutamato sintase (GOGAT), como mostrado nas seguintes reações (WESTBY et al., 1987; ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001; PEDROSA; ELMERICH, 2007):



A atividade da glutamina sintetase é regulada através de modificações pós traducionais em resposta à concentração de nitrogênio fixado. Cada uma das 12 subunidades da GS pode ser adenililada por uma adenililtransferase (ATase), dependendo do nível de nitrogênio intracelular (SHAPIRO; STADTMAN, 1968; ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001). Como a atividade da GS depende do uso de ATP, sua regulação faz com que a célula não desperdice ATP nem glutamato, assim possibilitando um crescimento mais acelerado (SCHUTT; HOLZER, 1972; ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001). Em *A. brasilense*, o nível máximo de adenililação da GS foi observado em culturas com presença de alta concentração de amônio, enquanto o nível mínimo foi encontrado em condições de fixação de nitrogênio (WESTBY et al., 1987; OKON; ALBRECHT; BURRIS, 1976).

2.4 REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE NITROGÊNIO

Para que as modificações em GS possam ser efetuadas, é necessário que flutuações nos níveis de nitrogênio intracelulares sejam detectadas e que esses sinais sejam transmitidos. O sistema Ntr é responsável por essa regulação (MAGASANIK, 1988; ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001; PEDROSA; ELMERICH, 2007). Esse sistema envolve os produtos dos genes *ntr* e *gln*, cujos produtos agem como uma cascata regulatória nos níveis transcricional e pós traducional, respondendo a mudanças nos níveis de nitrogênio (PEDROSA; ELMERICH, 2007).

Uma das proteínas centrais nesse sistema é a GlnB, pertencente à família de proteínas P_{II}. Proteínas dessa família desempenham um papel importante na coordenação da regulação de processos metabólicos. Sinais das condições de carbono, nitrogênio e energia da célula são convertidos em diferentes conformações e modificações do estado das proteínas P_{II}. Essas proteínas podem interagir com diferentes proteínas alvo, principalmente aquelas que realizam ou regulam reações cruciais nas vias assimilatórias de nitrogênio (FORCHHAMMER, 2008). Ambas as P_{II} de *A. brasilense* estão relacionadas com o transporte de íons amônio e na regulação pós traducional da nitrogenase (DE ZAMAROSCZY, 1998; KLASSEN et al., 2005; HUERGO et al., 2005).

Em *A. brasilense* foram encontradas duas proteínas P_{II}: GlnB e GlnZ (DE ZAMAROCZY et al., 1996). O gene *glnB* está organizado em um operon com o gene *glnA*, que codifica para a GS. Ambos as proteínas são sintetizadas em mais altos níveis sob condições limitantes de nitrogênio e em menores quantidades sob condições de excesso de nitrogênio (DE ZAMAROCZY; PAQUELIN; ELMERICH, 1993). Por outro lado, *glnZ* é monocistrônico, mas também é expresso em maiores quantidades em condições de limitação de nitrogênio (DE ZAMAROSCZY, 1998).

2.5 POLIHIDROXIALCANOATOS

Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres sintetizados e acumulados por diversos grupos de micro-organismos, incluindo tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (DAWES; SENIOR, 1973). PHAs apresentam características semelhantes àquelas de plásticos sintéticos, porém são biodegradáveis, justificando

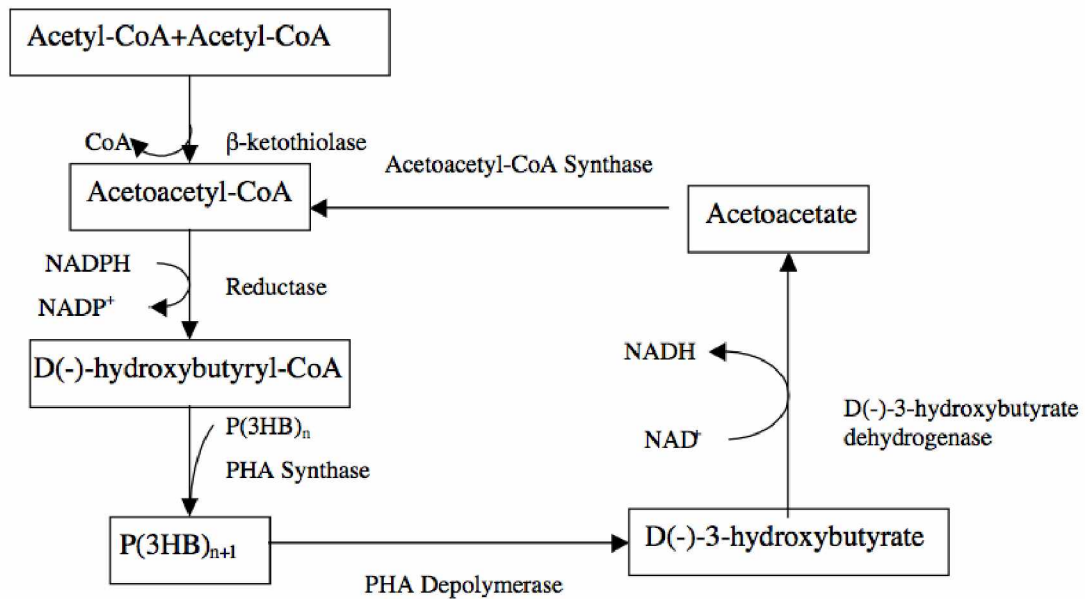
o grande interesse industrial, já que a maioria dos plásticos utilizados no mundo são de origem petroquímica e demoram a ser degradados na natureza (VAN DER WALLE et. al, 2001).

Para os micro-organismos, o acúmulo desses compostos faz parte de uma estratégia de estocagem de carbono, energia e reserva antioxidante. Sua síntese e acúmulo geralmente ocorrem em condições de disponibilidade de carbono mas limitação de algum outro nutriente para a célula, como nitrogênio, oxigênio, sulfato, magnésio ou fosfato e também quando há mais poder redutor sendo gerado do que consumido (STEINBÜCHEL, 1991; ANDERSON; DAWES, 1990; BABEL; ACKERMANN; BREUER, 2001). Para sintetizar PHAs, as bactérias utilizam NADPH e acetil-CoA, o que possibilita a disponibilização de carbono e energia quando degradado. Portanto, essa capacidade de geração de energia pode ser utilizada para abastecer vias que seriam bloqueadas ou retardadas na ausência de PHAs (KADOURI et al., 2005). Além disso, o seu acúmulo no interior das células pode servir como uma barreira para proteger os micro-organismos de estresse causado por danos físicos ou químicos (DAWES; SENIOR, 1973).

A estratégia de síntese e estocagem de PHA se mostra valiosa em ambientes de menor disponibilidade de nutrientes e maior competição, como o solo e a rizosfera (OKON; ITZIGSOHN, 1992; KADOURI et al., 2005). Como o crescimento de bactérias se dá muito mais vagarosamente nesses ambientes do que em laboratório, a utilização de PHAs pode se mostrar vital para garantir que as células sejam capazes de sobreviver e proliferar-se, conferindo uma vantagem ecológica àqueles organismos capazes de acumular tais polímeros (OKON; ITZIGSOHN, 1992; DAWES; SENIOR, 1973).

O tipo de PHA mais comumente encontrado é o poli-3-hidroxi-butirato (PHB). A sua síntese ocorre pela condensação de duas moléculas de acetil-CoA formando acetoacetil-CoA, processo catalisado pela enzima β -cetotiolase (codificada por *phaA*). O acetoacetil-CoA é reduzido para hidroxibutiril-CoA pela enzima acetoacetil-CoA redutase (codificada por *phaB*), em reação acoplada com o consumo de NADPH. Por fim, a PHB sintase (codificada por *phbC*) polimeriza moléculas de PHB. Já a sua mobilização ocorre pela ação da PHB depolimerase (codificada por *phaZ*), que hidrolisa o polímero em 3-hidroxi-butirato. Em seguida, o 3-hidroxi-butirato formado é oxidado a acetoacetato, gerando uma molécula de NADH, pela ação da 3-hidroxi-butirato desidrogenase (codificada por *bdhA*) (FIGURA 3).

FIGURA 3 – REAÇÕES ENZIMÁTICAS ESSENCIAIS NO ANABOLISMO E CATABOLISMO DE POLIHIDROXIBUTIRATO EM *Ralstonia eutropha*



FONTE: Khanna e Srivastava, 2004

LEGENDA: A figura mostra a síntese de polihidroxiacetato (PHA) no organismo modelo *Ralstonia eutropha*, através da condensação de duas moléculas de acetil-CoA, seguida da redução do acetoacetyl-CoA e seguinte síntese de PHA através da ação da PHA sintase. A mobilização do polímero ocorre pela ação da PHA depolimerase com formação de 3-hidroxiacetato que posteriormente pode gerar acetoacetato e acetoacetyl-CoA.

Ao redor do grânulo de PHB, há a ligação de diversas proteínas, essenciais para evitar a ligação inespecífica de outras proteínas, o que poderia prejudicar a síntese do polímero (JENDROSSEK, 2009). As proteínas encontradas mais abundantemente são as fasinas (codificadas por *phaP*), cuja ausência causa diminuição na síntese dos grânulos (JENDROSSEK, 2009). Também ao redor do grânulo é encontrada a proteína regulatória PhaR (codificada por *phaR*), que age como um repressor transcricional de diferentes genes envolvidos na síntese e degradação de PHB (YORK; STUBBE; SINSKEY, 2002; MAEHARA et al., 2002; PÖTTER et al., 2002; KADOWAKI et al., 2011).

2.6 O PAPEL DO POLIHIDROXIBUTIRATO EM *Azospirillum brasilense*

A. brasilense é capaz de sintetizar polihidroxiacetato (PHA) (TAL; OKON, 1985) e o acúmulo desses polímeros tem sido indicado como um dos fatores que pode levar a bactéria a possuir uma maior competitividade na rizosfera (OKON; ITZIGSOHN, 1992).

Semelhante a outros organismos, a produção de PHB em *A. brasilense* é favorecida quando há disponibilidade de carbono, mas carência de algum outro nutriente. A disponibilidade de O₂ e a proporção entre carbono e nitrogênio no meio são fatores determinantes no acúmulo de PHB em *A. brasilense* (TAL; OKON, 1985). Tal e Okon (1985) demonstraram que a pO₂ ideal para a síntese de PHB é de 30% e que, em alta aeração, o conteúdo do polímero acumulado nas células era bastante baixo. Por outro lado, a baixa disponibilidade de nitrogênio leva ao aumento na produção de PHB. Em ausência de NH₄Cl e em condição de fixação de nitrogênio, as células foram capazes de acumular 75% de seu peso em PHB. Esse conteúdo diminuiu no momento em que NH₄Cl foi adicionado ao meio. A razão C:N é, portanto, importante para a produção de PHB, observando-se maior acúmulo de PHB em razões maiores entre o conteúdo de carbono e nitrogênio. O acúmulo máximo se deu numa proporção de 70:1 (TAL; OKON, 1985).

As condições ideais de síntese e acúmulo do polímero podem ser relacionadas com a sobrevivência na rizosfera (BARBER; GUNN, 1974; TAL; OKON, 1985). Na região das raízes de cereais, a razão C:N é de aproximadamente 30:1. Isso possibilita o crescimento de micro-organismos e deixa espaço para que ocorra a síntese de PHB, por excesso de carbono (BARBER; GUNN, 1974; TAL; OKON, 1985). Esse acúmulo fornece uma vantagem àquelas bactérias produtoras de PHAs, pois podem degradar o composto em períodos de falta de nutrientes e de competição na rizosfera.

A energia obtida através da oxidação de PHB pode ser utilizada no processo de fixação de nitrogênio (TAL; OKON, 1985; WONG; EVANS, 1971). Células de *A. brasilense* ricas em PHB foram capazes de utilizar o polímero como a única fonte de energia para realizar a fixação biológica de nitrogênio, enquanto células sem acúmulo do polímero não foram capazes de realizar o processo (TAL; OKON, 1985). O mesmo foi observado em células de *Rhizobium* (WONG; EVANS, 1971; GERSON; PATEL; WONG, 1978).

O acúmulo de PHB também está relacionado à maior resistência a diferentes tipos de estresse em *A. brasilense*. Células em limitação de nutrientes ricas em PHB são mais viáveis em relação àquelas pobres no polímero (TAL; OKON, 1985). Elas foram capazes de sobreviver por maiores períodos em condições de irradiação ultravioleta, choque osmótico e dessecação (TAL; OKON, 1985). Como a associação com as plantas depende da capacidade da bactéria a

sobreviver no solo e se multiplicar, possuir diferentes mecanismos que possibilitem que as células prosperem em condições desfavoráveis lhes confere uma vantagem e a possibilidade de competir com outros micro-organismos pertencentes à rizosfera (TAL; OKON, 1985; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

Para compreender melhor os fatores que afetam a sobrevivência em presença ou ausência de PHB, células mutantes de *Azospirillum brasilense* Sp7 no gene *phbC* foram construídas (KADOURI et al., 2002; KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003a). O gene *phbC* codifica para a PHB sintase, enzima chave na produção do polímero. O mutante *phbC* (KADOURI et al., 2002) teve o gene interrompido pela inserção de um cassete de canamicina. A deficiência na síntese de PHB levou a menor sobrevivência em condições de limitações de nutrientes, em exposição a altas temperaturas e irradiação UV, em crescimento na presença de glicerol e peróxido de hidrogênio, e em veículos inoculantes já conhecidos, quando comparado com a estirpe selvagem (KADOURI et al., 2002; KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003a). Além disso, a estirpe selvagem mostrou tempos menores de geração em crescimento em diferentes fontes de carbono (KADOURI et al., 2002). Curiosamente, o mutante apresentou maior motilidade, mas menor quimiotaxia em condições de limitação de nutrientes (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003a). A ausência de quimiotaxia na estirpe mutante pode estar relacionada com a falta da utilização de PHB como fonte de energia (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003a). Esses resultados mostram que a estirpe mutante, não sendo capaz de sintetizar PHB, talvez não prosperasse tão bem quanto a estirpe selvagem na rizosfera. O fato de não apresentar quimiotaxia em condições limitantes de nutrientes faz com que a célula não seja capaz de nadar em direção ao exsudatos radiculares, processo importante na colonização radicular (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003a; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Entretanto, não foi encontrada diferença significativa na colonização de raízes nem na promoção do crescimento vegetal entre a estirpe selvagem e a mutante, mesmo havendo uma maior produção de exopolissacarídeos (EPS) e maior adesão à raiz na estirpe mutante (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003a). Como os experimentos foram realizados em laboratório, não se pode assumir que esses resultados seriam os mesmos em condições reais na rizosfera, onde há maior competição. O fato da estirpe mutante não resistir a situações de estresse indica que ela teria maiores dificuldades em sobreviver em condições adversas, o que demonstra a importância

da síntese e acúmulo de PHB para essa estirpe. A sobrevivência dessa bactéria é de principal importância quando utilizada em inoculantes comerciais, e entender o papel do acúmulo de PHB ajuda a compreender os mecanismos pelos quais as células são capazes de prolongar sua sobrevivência (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003a).

Quando mutantes de *A. brasilense* capazes de sintetizar PHB mas incapazes de degradar o polímero foram construídos, os resultados de resistência ao estresse foram similares àqueles obtidos com o mutante *phbC* (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003b). Foi construído um mutante no gene *phaZ* (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003b), que codifica para a PHB depolimerase de *Azospirillum brasilense*, enzima chave na degradação do polímero. O mutante também foi construído através da inserção de um cassete de canamicina em um sítio de restrição que permite a interrupção do gene. Diferentemente das células do mutante *phbC*, as células mutantes no gene *phaZ* são capazes de acumular PHB, mas não degradá-lo. Observou-se um acúmulo maior nas células mutantes do que na estirpe selvagem, mas a utilização do polímero em condições de limitação de nutrientes não se faz capaz devido à mutação no gene *phaZ*. As células mutantes sobreviveram por menos tempo em condições de limitação de nutrientes, em exposição a altas temperaturas e irradiação UV e, em crescimento na presença de glicerol e peróxido de hidrogênio, resultados muito similares àqueles encontrados no mutante *phbC*. O mutante *phaZ* teve menor produção de exopolissacarídeos (EPS), contrário ao encontrado no mutante *phbC*. O acúmulo e degradação de PHB tem efeito na produção de EPS por mobilizar fontes de carbono dentro das células. Assim, com maior síntese de PHB, o mutante *phaZ* teria menor fonte de carbono direcionada à produção de EPS. A estirpe selvagem também mostrou melhor e mais rápida utilização de fontes de carbono, mesmo o mutante tendo se mostrado tão versátil quanto as células selvagens na utilização de fontes de carbono. Essa utilização mais eficiente de carbono seria capaz de suportar o crescimento da bactéria na rizosfera, deixando-a mais competitiva no ambiente. Então, uma taxa de crescimento mais elevada é uma vantagem que a estirpe selvagem tem em relação às células que não são capazes de sintetizar ou utilizar PHB, e fornece à bactéria uma melhor chance de estabelecimento, proliferação e competitividade no solo (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003b). Esses resultados demonstram que o funcionamento adequado tanto da rota catabólica quanto da rota anabólica são

importantes para uma maior sobrevivência da bactéria em condições de estresse (KADOURI et al., 2005).

Outros estudos em diferentes bactérias também mostram a importância de PHB para a resistência ao estresse (ZHAO et al., 2007; BATTESTI; MAJDALANI; GOTTESMAN, 2011). Experimentos com mutantes no gene *phaC* de *Aeromonas hydrophila* mostraram dados similares àqueles em *Azospirillum brasilense*, com menor sobrevivência em condições de estresse ambiental, como cultivo em altas e baixas temperaturas, na presença de peróxido de hidrogênio, irradiação UV, etanol e em pressão osmótica alta (ZHAO et al., 2007). Também foi observada menor expressão do gene *rpoS* no mutante *phaC* de *Aeromonas hydrophila* em condições de estresse. O gene *rpoS* codifica para um fator sigma envolvido na resposta contra o estresse. RpoS interage com a RNA polimerase e controla a expressão de vários genes envolvidos na regulação e proteção da célula contra o estresse, o que leva a uma proteção global a diferentes estresses ao mesmo tempo (ZHAO et al., 2007; BATTESTI; MAJDALANI; GOTTESMAN, 2011). Essa menor expressão do gene *rpoS* indica que a presença de PHB pode apresentar uma resposta indireta que afeta a expressão de diferentes genes e que sua ausência causaria uma incapacidade das células a sobreviver por maiores períodos em condições de estresse (ZHAO et al., 2007).

Dados similares foram observados em mutantes *phaZ* em *Pseudomonas oleovorans* (RUIZ; LÓPEZ; MÉNDEZ, 2003). Esse mutante mostrou menor sobrevivência quando exposto a temperaturas extremas e a estresse oxidativo. Os autores também associaram essa maior resistência a uma maior expressão de *rpoS*, devido ao fato de que o mutante, quando complementado com o gene *phaZ*, mostrou maiores níveis de expressão de *rpoS* durante a despolimerização de PHB (RUIZ; LÓPEZ; MÉNDEZ, 2003). Esses resultados evidenciam que uma maior expressão de *rpoS* está relacionada com a mobilização de PHB e também com uma maior resistência a diferentes estresses ambientais. Mostram, também, que o funcionamento do ciclo de síntese e degradação de PHB é necessário para que a bactéria possa ter maior proteção contra esses estresses (RUIZ; LÓPEZ; MÉNDEZ, 2003; KADOURI et al., 2005).

Ao expressar um sistema de síntese e degradação de PHB em *E. coli*, também foi observada maior resistência ao estresse. Estirpes selvagens de *E. coli* não possuem os genes que codificam para a PHB sintase nem para a PHB

depolimerase. Experimentos de resistência ao estresse em diversas condições mostraram maior sobrevivência nas estirpes capazes de produzir e/ou degradar PHB, o que mostra que não é apenas a síntese e mobilização do polímero que conferem resistência ao estresse, mas também a sua presença como proteção física (WANG et al., 2009). Células capazes de mobilizar PHB mostraram maior sobrevivência em experimentos de crescimento em limitação de nutrientes, por possuírem uma fonte de carbono e energia disponível. Então, a presença de PHB não é um fator importante só em células que já são capazes de produzir o polímero, mas também pode ser um mecanismo interessante para proteção de células de estirpes que não são capazes de sintetizar o polímero naturalmente (WANG et al., 2009).

A presença ou ausência de metabolismo de PHB também pode afetar a interação entre plantas e bactérias. O mutante *phbC* de *A. brasilense* não mostrou diferenças na colonização e na promoção de crescimento de plantas quando comparado com a estirpe selvagem (KADOURI et al., 2003a), mas outros estudos mostram que a simbiose pode ser afetada (ANEJA; ZACHERTOWSKA; CHARLES, 2005; WANG et al., 2007; MANDON et al., 1998).

A falta de acúmulo de PHB afeta diferentes espécies de bactérias de diferentes maneiras. Plantas de *Medicago sativa* inoculadas com mutantes *phbC* de *Sinorhizobium meliloti* exibiram menor matéria seca da parte aérea e menor quantidade de nódulos (ANEJA; ZACHERTOWSKA; CHARLES, 2005). Plantas de *Medicago truncatula* inoculadas com a mesma estirpe tiveram nódulos menores e houve menor atividade nitrogenase nos nódulos (WANG et al., 2007). A inoculação de plantas de *Sesbania rostrata* com o mutante *phbC* de *Azorhizobium caulinodans* levou à formação de nódulos pequenos desprovidos de bactérias (MANDON et al., 1998). O mutante em *phbC* de *A. caulinodans*, além de não estar presente nos nódulos, não é capaz de fixar nitrogênio (MANDON et al., 1998). Por outro lado, mutantes *phbC* de *Rhizobium etli* formam nódulos em *Phaseolus vulgaris* que apresentam uma atividade nitrogenase mais prolongada, levando a um maior conteúdo de nitrogênio na planta (CEVALLOS et al., 1996).

O funcionamento do mecanismo de síntese e degradação de PHB pode ser essencial para a manutenção da simbiose entre plantas e bactérias. Um ciclo de PHB bem regulado é central para o uso balanceado da energia disponível e para uma distribuição balanceada de carbono, e pode afetar a interação planta-bactéria e

a capacidade da bactéria de fixar nitrogênio (MANDON et al., 1998; CEVALLOS et al., 1996; KADOURI et al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Determinar diferenças fenotípicas decorrentes da deficiência na síntese de polihidroxiacetato na estirpe mutante *phbC* de *Azospirillum brasilense* Sp7, em comparação com a estirpe selvagem FP2.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar as taxas de crescimento das estirpe mutante e selvagem sob diferentes condições e avaliar a produção de PHB nas estirpes
- b) Complementar o mutante *phbC* com o gene *phbC* e verificar a produção de PHB na estirpe mutante complementada
- c) Comparar a atividade nitrogenase entre as estirpes estudadas
- d) Avaliar modificações pós traducionais da glutamina sintetase após choque de amônio nas estirpes estudadas
- e) Determinar diferenças na expressão gênica entre as estirpes, com foco em genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio e de PHB.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESTIRPES E PLASMÍDEOS UTILIZADOS

As estirpes bacterianas e os plasmídeos utilizados estão descritos nos QUADROS 1 e 2.

QUADRO 1 – ESTIRPES DE BACTÉRIAS UTILIZADAS NO PRESENTE TRABALHO

Estirpes	Características	Referência
<i>A. brasilense</i> FP2	Nal ^R Sm ^R Estirpe selvagem, Sp7 Nif ⁺	Pedrosa; Yates, 1984
<i>A. brasilense</i> Sp7 mutante <i>phbC</i>	Km ^R Nif ⁺ <i>phbC::km</i>	Kadouri et al., 2002
<i>E. coli</i> TOP 10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR</i> <i>recA1 endA1 ara</i> Δ139 Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Sm ^R) <i>nupG λ</i> ⁻	Invitrogen
<i>E. coli</i> S17.1	<i>recA</i> , <i>hsdR</i> RP4-2- <i>Tc::Mu-Km::Tn7</i>	Simon; Priefer; Pühler, 1983

FONTE: O autor (2018).

QUADRO 2 – PLASMÍDEOS UTILIZADOS NO PRESENTE TRABALHO

Plasmídeos	Características	Referência
pBluescript II SK(+)	Alto número de cópias, Amp ^R	Agilent Technologies
pBBR1MCS-3	Tc ^R , OriT	Kovach et al., 1995
pBL01	pBluescript II SK contendo as regiões codificadora e promotora do gene <i>phbC</i> de <i>A. brasilense</i>	Este trabalho
pBL02	pBBR1MCS-3 contendo as regiões codificadora e promotora do gene <i>phbC</i> de <i>A. brasilense</i>	Este trabalho

FONTE: O autor (2018).

4.2 CULTIVO CELULAR

Para o cultivo bacteriano foram utilizados os meios de cultura Luria-Bertani (LB) e NFb lactato. O meio LB foi utilizado para o cultivo de *E. coli* enquanto NFb lactato foi utilizado para o cultivo de *A. brasilense*. Suas composições estão

mostradas no QUADRO 3 e QUADRO 4. Para meios sólidos, foi adicionado 15 g/L de ágar bacteriológico. O meio sólido LB foi chamado de meio LA.

QUADRO 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO LURIA-BERTANI (LB)

Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L
Triptona	10 g/L

FONTE: Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

QUADRO 4 – COMPOSIÇÃO DO MEIO NFb LACTATO

MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻¹ g/L
NaCl	1,0 x 10 ⁻¹ g/L
CaCl ₂	2,0 x 10 ⁻² g/L
Ácido nitrilo-triacético	5,6 x 10 ⁻² g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻² g/L
Lactato de sódio	5,0 g/L
Biotina	1,0 x 10 ⁻⁴ g/L
NaMoO ₄ .2H ₂ O	2,0 x 10 ⁻³ g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	2,35 x 10 ⁻³ g/L
H ₃ BO ₃	2,8 x 10 ⁻³ g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	8,0 x 10 ⁻⁵ g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻⁴ g/L
pH	6,5

FONTE: Machado et al. (1995).

Para cultivo de *A. brasilense* em NFb lactato, foi necessária a adição de fosfatos e uma fonte de nitrogênio ao meio de cultura. A solução de fosfatos foi composta de 17,8 g/L de K₂HPO₄ e 159,5 g/L de KH₂PO₄ e adicionada ao meio em volume de 50 mL/L. Como fonte de nitrogênio, foram utilizados NH₄Cl ou glutamato nas concentrações indicadas nos experimentos.

Culturas de *A. brasilense* foram incubadas a 30°C sob agitação enquanto as células de *E. coli* foram mantidas a 37°C, também sob agitação.

Os antibióticos utilizados e suas concentrações finais estão descritos no QUADRO 5. Para o cultivo de *A. brasilense* FP2 foram utilizados dois antibióticos: ácido nalidíxico e estreptomicina. No cultivo de *A. brasilense* mutante *phbC* foi utilizado o antibiótico canamicina.

QUADRO 5 – ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS PARA CULTIVO CELULAR E AS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES FINAIS EMPREGADAS

Antibiótico	Concentração final
Canamicina (Km)	100 µg/mL
Ácido Nalidíxico (Nal)	10 µg/mL
Estreptomicina (Sm)	80 µg/mL
Ampicilina (Amp)	100 µg/mL
Tetraciclina (Tc)	10 µg/mL

FONTE: O autor (2018).

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE PHB POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para confirmar o fenótipo da estirpe mutante *phbC*, foi feita a quantificação do conteúdo interno de PHB através do método descrito por Alves et al. (2017).

Culturas de *A. brasilense* FP2 e mutante *phbC* foram cultivadas a 30°C em meio NFb lactato acrescido de 50 mM de fosfatos e 20 ou 5 mM de NH₄Cl até uma D.O.₆₀₀ de 1,2. Para a análise das amostras, uma alíquota de 100 µL de cultura bacteriana foi centrifugada a 13.400 *xg* por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado em 1 mL de tampão TBAC (tampão PBS contendo 1 mM de EDTA e 0,01% (v/v) de Tween 20) contendo 50% de etanol. Após um minuto de incubação em temperatura ambiente, as amostras foram coradas com 31,25 µM de Vermelho Nilo (Nile Red – Sigma-Aldrich), mantidas por 5 minutos no escuro, e centrifugadas por 1 min a 13.400 *xg*. O *pellet* foi ressuspensado em tampão TBAC e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Como controle negativo, foram utilizadas células de *A. brasilense* FP2 não coradas com Vermelho Nilo.

Os experimentos foram realizados no citômetro de fluxo BD Accuri C5[®] equipado com um laser de 488 nm. Para cada amostra, usou-se 10.000 eventos e a mediana da intensidade de fluorescência foi obtida pelos histogramas do canal FL2-H 585/40 nm.

4.4 CURVAS DE CRESCIMENTO BACTERIANO

As curvas de crescimento das estirpes de *Azospirillum* foram realizadas em meio NFb líquido com 50 mL/L de solução de fosfatos (item 4.2) e em três condições

de nitrogênio: NH_4Cl 20 mM, NH_4Cl 2 mM e glutamato 5 mM. Garantiu-se que os frascos tivessem pelo menos 5 vezes de fase gasosa maior do que a fase líquida para melhor aeração. As culturas foram incubadas a 30°C sob agitação de 120 rpm e medidas de D.O._{600} foram realizadas em leitor de microplaca de hora em hora.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE NITROGENASE

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução do acetileno a etileno (DILWORTH, 1966; SCHOLLHORN; BURRIS, 1967). Células de *A. brasilense* foram cultivadas a 30°C em meio NFb lactato líquido contendo 50 mL/L de fosfatos, 5 mM de glutamato, 1% de meio LB e 1% de inóculo. Como inóculo, foi utilizada uma cultura saturada, cultivada por 48 horas. Após aproximadamente 20 horas de crescimento a 30°C, os frascos foram selados com tampas de borracha. Em cada frasco, foi injetado acetileno gasoso (10% do volume da fase gasosa). Após uma hora de incubação com acetileno, foi coletada uma amostra de 500 μL da fase gasosa para análise do etileno formado em cromatógrafo gasoso. As análises foram feitas no cromatógrafo gasoso Varian Star 3400 CX equipado com uma coluna de Porapak N e detector de ionização de chama. A temperatura da coluna foi mantida a 110°C e a do detector de chama a 200°C, com N_2 como gás de arraste e etileno como padrão.

O etileno formado foi quantificado utilizando a área do pico de etileno padrão (2,23 nmols de etileno a 1 atm e a 25°C). Para normalização dos resultados, foi feita a quantificação de proteína total na cultura bacteriana. A atividade nitrogenase foi expressa como nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína total.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

As quantificações de proteína foram realizadas pelo método de Bradford (1976) utilizando o reagente de Bradford (Sigma-Aldrich). As reações foram preparadas em microplacas de 96 poços, utilizando 30 μL de amostra e 170 μL do reagente. Albumina de soro bovino (BSA) foi utilizado como padrão para a construção da curva de calibração, em concentrações de 20 a 100 $\mu\text{g/mL}$. A leitura de absorbância a 595 nm foi feita em leitor de microplacas.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ADENILILAÇÃO DA GLUTAMINA SINTETASE (GS)

A determinação da adenililação da glutamina sintetase foi feita pelo método de *western blot* utilizando anticorpo anti-GS, que reconhece a glutamina sintetase.

4.7.1 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas de culturas cultivadas em meio NFb lactato, contendo 50 mL/L de fosfatos e 2 mM de NH_4Cl . Após aproximadamente 16 horas de crescimento, foi coletada a primeira amostra das culturas de *A. brasilense* FP2 e do mutante *phbC*. Foram adicionados 33 μL das culturas a 17 μL de tampão de amostra para eletroforese de proteínas 3x (2% SDS; 10% glicerol; 0,01% azul de bromofenol; 0,0625 M Tris-HCl pH 6,8; 5% de β -mercaptoetanol) e as amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido. Após essa primeira coleta, foi realizado um choque de amônio (concentração final na cultura: 200 μM de NH_4Cl) e outras amostras foram coletadas do mesmo modo nos tempos 0, 1/2, 1, 2, 5, 10 e 20 minutos. As amostras de culturas com tampão de amostra foram mantidas a -20°C até a sua utilização.

4.7.2 Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As amostras coletadas antes e após choque de amônio foram submetidas a eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes, como descrito por Laemmli (1970). Foi utilizado gel de poliacrilamida em concentração de 7,5%. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical (Mini Protean) seguindo as recomendações do fabricante (Biorad). Utilizou-se uma voltagem de 160 V em tampão de corrida Tris-glicina. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF.

4.7.3 Transferência de proteína para membrana em sistema semisseco

Após a corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida, foi montado um sistema semisseco de transferência de proteína para uma membrana de PVDF

(Hybond ECL – GE Healthcare). Foi utilizado papel filtro para criar camadas com tampões diferentes na placa do ânodo. A primeira foi formada por 4 camadas de papel filtro imersos em tampão A1 (QUADRO 6). A segunda, por 2 camadas de papel filtro imersas em tampão A2 (QUADRO 6). Então, foi colocada a membrana previamente ativada em metanol e posteriormente imersa em tampão A2. O gel, equilibrado em tampão C (QUADRO 6), foi adicionado em cima da membrana, juntamente com 6 camadas de papel filtro imersas no mesmo tampão. Então, um bastão de vidro foi usado para comprimir o sistema e eliminar eventuais bolhas de ar presentes no sistema. Finalmente, o sistema foi fechado com a placa do cátodo e conectado a uma fonte de eletroforese a 80 mA por 1 hora e 15 minutos.

QUADRO 6 – COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS PARA TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNA DO GEL DE POLIACRILAMIDA PARA MEMBRANA DE PVDF

Tampão A1	
Tris base pH 10	0,3 M
Metanol	20%
Tampão A2	
Tris base pH 10	0,025 M
Metanol	20%
Tampão C	
Tris base pH 10	0,024 M
Metanol	20%
Ácido caproico	0,04 M

FONTE: Huergo (2006).

4.7.4 Marcação de proteína com anticorpos

Após a transferência da proteína à membrana PVDF, esta foi bloqueada em solução de leite em pó desnatado 5% em tampão TBST (2,42 g/L Tris-HCl pH 7,6; 8 g/L NaCl; 1 mL/L Tween 20) por pelo menos uma hora em temperatura ambiente e sob agitação. Foram feitas três lavagens com tampão TBST antes de incubar a membrana em presença do anticorpo primário. Então, a membrana foi incubada com o leite em pó desnatado 1% em tampão TBST e anticorpo primário anti-GS (cedido por Wally Van Heeswijk) em diluição de 1:10.000. Essa incubação também ocorreu por pelo menos uma hora em temperatura ambiente sob agitação. Foram feitas mais três lavagens com tampão TBST e a membrana foi incubada com o anticorpo

secundário (anti IgG de coelho conjugado com a enzima peroxidase – GE Healthcare) em proporção de 1:10.000 nas mesmas condições das incubações anteriores. Mais três lavagens foram realizadas com o tampão TBST e a membrana foi submetida à etapa de revelação utilizando o sistema ECL (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. Os sinais foram capturados e revelados em filmes de raio-X (BioMax – GE Healthcare) segundo recomendações do fabricante.

4.8 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA de culturas de *A. brasilense* FP2 e mutante *phbC* cultivadas em condições de fixação de nitrogênio e submetidas a choque de amônio (concentração final: 200 μ M NH_4Cl) foi extraído utilizando Trizol. Amostras de 2 mL de cultura foram coletadas nos tempos -5 (anterior ao choque de amônio), 5 e 30 minutos (após choque). Antes da adição de amônio, foi feita a confirmação de que as culturas estavam em condição de fixação de nitrogênio pelo ensaio de redução do acetileno a etileno.

Logo após a coleta das amostras, os tubos foram centrifugados por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuscitado em 300 μ L de tampão de lise (0,6% SDS; 10 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8). Então, foi adicionado 1 mL de reagente TRizol (Thermo Fischer Scientific). O conteúdo foi homogeneizado e as amostras foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, 200 μ L de clorofórmio foram adicionados, seguido por agitação e incubação por 3 minutos em temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm em microcentrífuga por 5 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa foi coletada e transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com a adição de 500 μ L de isopropanol e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, seguida por 10 minutos de centrifugação em velocidade máxima na microcentrífuga. Após a centrifugação, o *pellet* foi lavado com etanol 70% duas vezes. Após as lavagens, o etanol foi descartado e os tubos foram deixados abertos para o *pellet* secar. O *pellet* foi ressuscitado em 40 μ L de H_2O tratada com DEPC para posterior análise.

Após a obtenção do RNA, aproximadamente 100 ng foram aplicados em gel de agarose 1% para uma corrida de eletroforese a 80 V. O gel foi visualizado após

incubação com brometo de etídio e as bandas foram observadas em transiluminador UV.

O RNA foi tratado com o kit TURBO DNA-free kit (Invitrogen – Thermo Fischer Scientific) para remoção de DNA da amostra, e estocado em freezer -80°C.

4.9 SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

O DNA complementar foi sintetizado a partir do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems – Life Technologies) a partir de 2 µg de RNA, de acordo com as orientações do fabricante. Para uso posterior, as amostras foram diluídas 10x e estocadas a -20°C.

4.10 AMPLIFICAÇÃO DE DNA ATRAVÉS DE PCR

Para amplificação de DNA foi utilizado o sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR). Em reações onde foi utilizado cDNA, a enzima utilizada na reação foi a GoTaq® (Promega Corporation). A cada reação, foi adicionado 200 ng de cDNA. O QUADRO 7 mostra os reagentes utilizados para amplificação de cDNA.

QUADRO 7 – REAGENTES UTILIZADOS NAS REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES

Reagentes	Concentração final
Tampão GoTaq 5x	1x
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM
dNTPs 5 mM	200 µM
Primers 10 µM	0,2 µM cada
GoTaq (5 U/µl)	0,25 U/10µl

FONTE: Promega Corporation

Para a amplificação de DNA genômico, a DNA polimerase utilizada foi a PfuX7, com seu respectivo tampão. A concentração dos outros componentes da reação foram as mesmas mostradas no QUADRO 7.

As reações foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e tempo variável a 72°C), e

um ciclo de alongamento final a 72°C por 5 minutos. O tempo de extensão foi baseado no tamanho esperado do produto, considerando 1 minuto para cada 1000 bases. No caso de PCR semi-quantitativa, amostras foram retiradas nos ciclos 18, 22, 26 e 30.

Os *primers* utilizados foram sintetizados pela Sigma-Aldrich e desenhados com ajuda do programa Primer-BLAST (YE et al., 2012). O QUADRO 8 mostra todos os *primers* utilizados.

QUADRO 8 – NOMES E SEQUÊNCIAS DE TODOS OS *PRIMERS* UTILIZADOS EM REAÇÕES DE PCR

Primer	Sequência
amtB F	5' TGGTCAGCATCCTGTGGTTC 3'
amtB R	5' TCAGGCTGTCCTTGGTGATG 3'
draT F	5' TGCTGCCCACCTATCACAAG 3'
draT R	5' TCGAGCTGCAGGTTGATGTT 3'
gdhA F	5' ATGGACGATCTGCTTTCGGG 3'
gdhA R	5' CTCAGCGTCTCCTTGGCATA 3'
glnA F	5' GTCAAGTACGTGGACCTCCG 3'
glnA R	5' GACTCGTTGATCGCCTTCCA 3'
glnB F	5' TCACGAAGTCGGCATCAAGG 3'
glnB R	5' TTCACCTTCGGCAGGAAGTC 3'
glnZ F	5' GTCGAGGCGATCCAGAAGG 3'
glnZ R	5' CAGAGAGCTTCGGTGTTGGT 3'
gltK F	5' CTCGGTGACCTACATCGAGC 3'
gltK R	5' ATGATGAAGGCGATCTGGGC 3'
nifH F	5' GCCCCGGAATTGAAGACA 3'
nifH R	5' GCAATCTGGCGCAAAGACAT 3'
phaA F	5' CACCTCCAAGGTCAACGTCA 3'
phaA R	5' ATCGCGCTTCTGCATCTCAT 3'
phaB F	5' GCGAAGATCACCAACCGAAGT 3'
phaB R	5' CACAGGTTGAAGCAGGAGGT 3'
phbC F	5' GCATTCTAGAGCGAACCTCACATCCAAACC 3'
phbC R	5' GTATGAGCTCTTTTCTTGTTCGGGCCGTCT 3'
recA F	5'GTCGAACTGCCTGGTGATCT 3'
recA R	5' GACGGAGGCGTAGAACTTCA 3'
sucA F	5' CACCACGAACCCGACCTATT 3'
sucA R	5' CTGATGTGGACGACGGACTC 3'

FONTE: O autor (2018).

4.11 ELETROFORESE DE DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em géis de agarose horizontal de concentrações variadas, a partir de 0,8% até 2%, feito com tampão TAE 1x, preparado a partir de TAE 50x (2 mol/L Tris base; 20 mM ácido acético glacial; 50 mM EDTA pH 8,0). As amostras foram misturadas com corante FEF Suds e aplicadas no gel. O tampão TAE também foi utilizado para a corrida de eletroforese, que teve como voltagem aproximadamente 5 V por centímetro de gel. Os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador UV com comprimento de onda de 302 nm.

4.12 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

O método de lise alcalina (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) foi utilizado para purificar DNA plasmidial. Culturas de *E. coli* contendo plasmídeos foram incubadas por aproximadamente 16 horas a 37°C sob agitação. Então, 1,5 mL dessas culturas foram transferidos para tubos eppendorf e submetidos a centrifugação em velocidade máxima em microcentrífuga de bancada. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 150 µL de tampão GET (50 mmol/L glucose; 10 mmol/L EDTA; 25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0). Em seguida, foram adicionados 150 µL de solução de lise (0,2 mol/L NaOH; SDS 1%). O DNA cromossomal, proteínas e o SDS foram precipitados por adição de 150 µL de KacF (3 mol/L acetato de potássio; 1,8 M ácido fórmico pH 4,8). Um novo passo de centrifugação por 8 minutos foi realizado e o sobrenadante foi coletado para um novo tubo. A amostra foi extraída com 50 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após agitação, os tubos foram centrifugados por 5 minutos, formando duas fases separadas por uma película branca. A fase aquosa foi coletada e transferida para um tubo novo. Adicionou-se 2 volumes de etanol absoluto à amostra para precipitação do DNA, seguido de uma nova centrifugação de 10 minutos, e seguinte lavagem do *pellet* com 1 mL de etanol 70%. O *pellet* foi seco em estufa por aproximadamente 10 minutos. O DNA plasmidial foi ressuscitado em água Milli-Q.

4.13 DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As reações de clivagem de DNA foram realizadas em volumes de reação de 10 μ L. Foram utilizadas as enzimas *EcoRV* (Thermo Scientific), *SacI* (Fermentas) e *XbaI* (Thermo Scientific), com os tampões indicados pelo fabricante. Todas as reações foram incubadas a 37°C por pelo menos 3 horas. As enzimas foram inativadas por aquecimento de acordo com as temperaturas indicadas pelo fabricante.

4.14 REAÇÕES DE LIGAÇÃO DE DNA

Para a ligação de fragmentos de DNA, o vetor linearizado e o DNA inserto foram incubados em conjunto em uma razão molar de 1:5. Foram adicionados tampão de ligação 1x e 1 U de T4 DNA ligase (Thermo Fischer Scientific). A mistura foi mantida em temperatura ambiente durante a noite antes de ser utilizada para clonagem.

4.15 PREPARO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES

Células de *E. coli* TOP10 e S17.1 quimiocompetentes foram preparadas a partir de tratamento com $MgCl_2$ e $CaCl_2$. Uma cultura das células foi cultivada por aproximadamente 16 horas e utilizada como inóculo para o preparo das células. As células foram cultivadas utilizando-se um inóculo de 800 μ L dessas culturas em 80 mL de meio LB e incubação a 37°C sob agitação até atingirem uma D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,4. Em seguida, as células foram transferidas para tubos tipo falcon autoclavados e mantidas em gelo. Elas foram centrifugadas a 2500 xg por 8 min a 4°C. O sedimento de células foi ressuspensionado em $MgCl_2$ 100 mM e foi feita nova centrifugação, nas mesmas condições. O *pellet* foi então ressuspensionado em $CaCl_2$ 100 mM e as amostras foram centrifugadas novamente. Por fim, as células foram ressuspensionadas em $CaCl_2$ 100 mM com glicerol 15%. Alíquotas de 100 μ L foram separadas e as células foram estocadas congeladas em freezer -80°C.

4.16 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO

As alíquotas de células termocompetentes foram retiradas do freezer -80°C, descongeladas rapidamente e mantidas em gelo. Aproximadamente 100 ng de DNA plasmidial foi adicionado a cada tubo e as amostras foram mantidas em gelo por 30 minutos e então submetidas a choque térmico a 42°C por 45 segundos, seguido de incubação em gelo por 15 minutos. Após esse período, 1 mL de meio LB foi adicionado a cada tubo e a suspensão foi incubada por 40 minutos a 37°C. Para seleção dos transformantes, as células foram plaqueadas em meio LA contendo antibióticos adequados e 40 µg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo (X-gal) para seleção de colônias brancas e azuis.

4.17 CONJUGAÇÃO BACTERIANA

Conjugação bacteriana foi utilizada para realizar a transferência de plasmídeos de células de *E. coli* S17.1 para células de *A. brasilense* FP2. Culturas das duas estirpes foram cultivadas em meio líquido separadamente e foram posteriormente misturadas, sendo *A. brasilense* utilizada numa proporção 10 vezes maior que *E. coli*. Essa mistura foi plaqueada em uma mistura de meio NFb lactato e LA na proporção 3:1. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas. A seleção das células que receberam o plasmídeo foi feita por cultivo em presença de antibiótico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

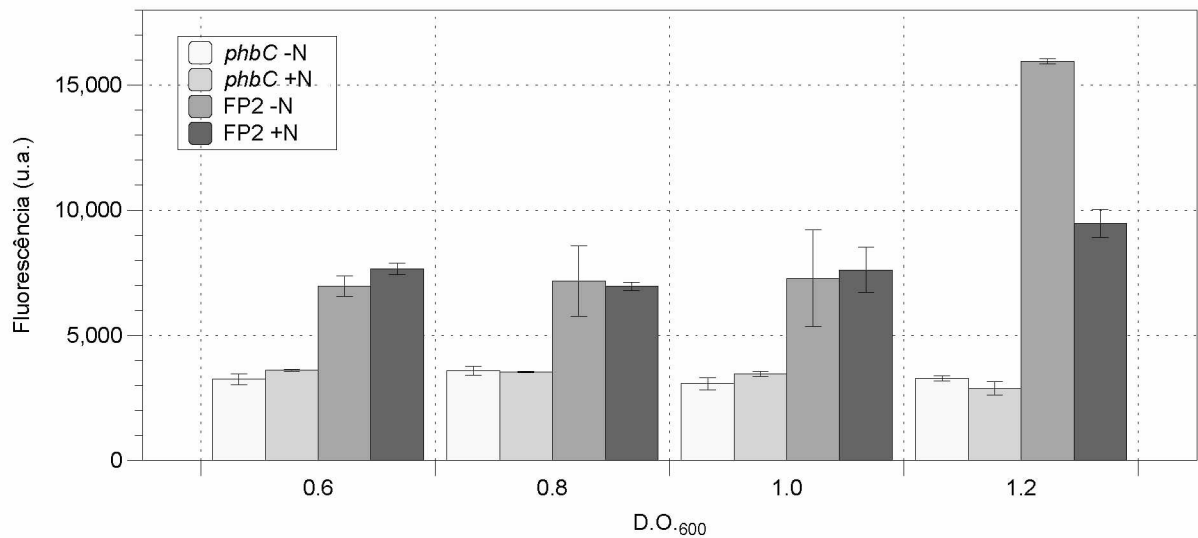
Foi observado que a ausência da síntese de polihidroxibutirato causa uma menor sobrevivência nas células de *A. brasilense* quando estas são expostas a estresses (KADOURI et al., 2002; KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003a). Entretanto, a influência do metabolismo de PHB em outras vias metabólicas neste organismo não foi verificada. Assim, o objetivo dos experimentos realizados nesse trabalho foi verificar a influência do metabolismo de PHB na expressão e/ou atividade de determinadas enzimas envolvidas no metabolismo de nitrogênio e de PHB.

5.1 QUANTIFICAÇÃO DE PHB POR CITOMETRIA DE FLUXO

A fim de determinar diferenças fenotípicas entre as estirpes FP2 e mutante *phbC* de *A. brasilense* foi feita a verificação de que a estirpe mutante não é capaz de sintetizar PHB, para que os resultados reflitam uma comparação entre uma estirpe que sintetiza o polímero e outra que é deficiente nessa síntese. A estirpe mutante *phbC* apresenta uma inserção no gene que codifica para a enzima PHB sintase (KADOURI et al., 2002).

PHB presente nas estirpes selvagem e mutante *phbC* foi avaliado utilizando citometria de fluxo de células coradas com Vermelho Nilo (ALVES et al., 2017). Considerando que a maior síntese de PHB ocorre quando há carbono disponível mas uma menor quantidade de NH_4Cl no meio de cultura (TAL; OKON, 1985), PHB foi determinado em bactérias cultivadas com 5 mM de NH_4Cl ou 20 mM de NH_4Cl . Os resultados obtidos são apresentados no GRÁFICO 1.

GRÁFICO 1 – DETERMINAÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR CITOMETRIA DE FLUXO EM *A. brasilense phbC* E FP2



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: As estirpes selvagem (FP2) e mutante (*phbC*) foram cultivadas na presença de 5 mM de NH_4Cl ou de 20 mM de NH_4Cl (-N ou +N, respectivamente) até atingirem a DO_{600} indicada. Após o cultivo as células foram coradas com Vermelho Nilo e avaliadas por citometria de fluxo conforme descrito em Materiais e Métodos. Os resultados correspondem à fluorescência (unidades arbitrárias) e são apresentadas como média e desvio padrão de triplicatas.

É possível observar que a estirpe selvagem (FP2) de *A. brasilense* apresenta aumento de fluorescência com o aumento da DO_{600} da cultura celular. A estirpe mutante *phbC*, no entanto, apresenta fluorescência bem menor quando comparada com os resultados da estirpe selvagem, indicando baixa produção ou ausência de PHB e confirmando, portanto, o fenótipo do mutante *phbC*. A fluorescência observada na estirpe mutante pode ser considerada basal, devido ao fato do corante Vermelho Nilo não ser específico para PHB, mas também ser capaz de corar lipídios presentes na célula (GREENSPAN; MAYER; FOWLER, 1985). Observa-se também que a intensidade de fluorescência se mantém similar em todas as amostras do mutante *phbC*, não havendo diferença em diferentes concentrações de amônio no meio de cultivo e em diferentes densidades ópticas. Os resultados demonstrados são condizentes e similares àqueles publicados por Alves et al. (2017), onde a estirpe mutante *phbC* também foi utilizada.

A diferença de fluorescência observada entre células de *A. brasilense* FP2 cultivadas em diferentes concentrações de amônio é esperada. Como proporções altas entre C:N levam a uma maior síntese do polímero, haver maior fluorescência nas células cultivadas em 5 mM de NH_4Cl é coerente (TAL; OKON, 1985). Na

D.O.₆₀₀ de 1,2, observa-se maior fluorescência nas células de *A. brasilense* FP2 e maior diferença de intensidade de fluorescência entre as células cultivadas em baixas e altas concentrações de amônio, o que indica que as concentrações de amônio no meio estão sendo reduzidas, aumentando assim a razão C:N.

Alves et. al. (2017) mostraram que na estirpe FP2, os valores de fluorescência obtidos após a D.O.₆₀₀ de 1,0 são maiores nas amostras cultivadas em 5 mM de NH₄Cl. Até a D.O.₆₀₀ de 1,0, não há diferenças nos valores de fluorescência obtidos entre as amostras cultivadas em menores e maiores concentrações de amônio. É possível concluir que depois que a cultura passa da D.O.₆₀₀ de 1,0, a proporção C:N torna-se progressivamente maior nas culturas contendo 5 mM de amônio. Por esse motivo, a síntese de PHB aumenta nessas culturas mas não naquelas culturas contendo 20 mM de amônio, uma concentração onde não há limitação de amônio para o crescimento.

Os resultados obtidos nesse experimento indicam que não há síntese de PHB na estirpe mutante. Também, que a diferença nos valores de fluorescência obtidos entre as amostras de FP2 cultivadas em diferentes concentrações de amônio demonstram que uma maior proporção C:N leva a uma maior síntese do polímero (TAL; OKON, 1985; ALVES et al., 2017).

5.2 AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO BACTERIANO EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

Como a falta de síntese de PHB pode afetar o metabolismo da célula, a capacidade da estirpe mutante *phbC* em crescer em diferentes condições de nitrogênio foi avaliada e comparada com a estirpe selvagem FP2. O crescimento foi acompanhado por medidas de D.O.₆₀₀ feitas de hora em hora. O meio NFb lactato foi acrescido de solução de fosfatos numa concentração de 50 mL/L e uma fonte de nitrogênio em diferentes condições: 20 mM de NH₄Cl, 2 mM de NH₄Cl ou 5 mM de glutamato.

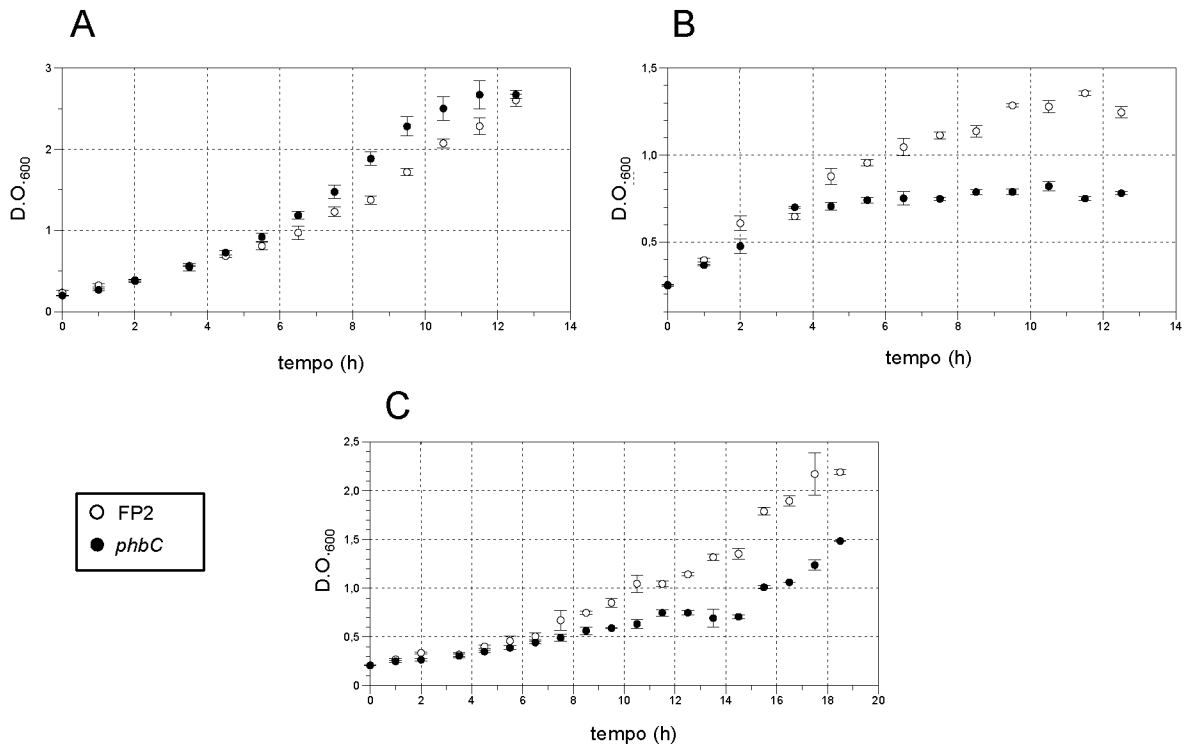
Em 20 mM de cloreto de amônio ambas estirpes mostram um padrão similar, com crescimento rápido (GRÁFICO 2A). Amônio é a fonte principal de nitrogênio para a maioria dos micro-organismos, pois possibilita uma maior taxa de crescimento (REITZER, 2003; HUERGO; DIXON, 2015). Quando fornecido em

excesso, o crescimento não é limitado pela quantidade de nitrogênio no meio. Nesse caso, a estirpe selvagem não tem dificuldades em crescer.

Em concentrações menores de amônio é possível notar uma diferença em crescimento maior entre as duas estirpes (GRÁFICO 2B). Enquanto o crescimento do mutante estaciona em uma D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,8, a estirpe selvagem é capaz de chegar até uma D.O.₆₀₀ de 1,3 no mesmo período de crescimento. Um padrão similar é observado em crescimento em 5 mM de glutamato (GRÁFICO 2C), em que o crescimento da estirpe mutante é retardado em relação àquele da estirpe selvagem.

O crescimento do mutante *phbC* não é afetado quando altas concentrações de amônio estão disponíveis à célula, mas é prejudicado em menores concentrações do nutriente e quando glutamato é utilizado como fonte de nitrogênio. A capacidade da bactéria crescer em condições de limitação de nitrogênio no meio é menor em relação à estirpe selvagem, o que indica que podem haver alterações no metabolismo de nitrogênio da célula, inclusive envolvendo a capacidade da bactéria em fixar nitrogênio.

GRÁFICO 2 – AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES *A. brasilense* FP2 E *A. brasilense* MUTANTE *phbC* EM PRESENÇA DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: As estirpes selvagem (FP2) e mutante (*phbC*) foram cultivadas em meio NFb lactato líquido acrescido de fosfatos. GRÁFICO A – meio acrescido de 20 mM de NH₄Cl. GRÁFICO B – meio acrescido de 2 mM de NH₄Cl. GRÁFICO C – meio acrescido de 5 mM de glutamato. O crescimento foi acompanhado através de medidas de D.O.₆₀₀ em leitor de microplaca. Os resultados mostrados no gráfico representam a média e desvio padrão de triplicatas.

5.3 COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE *phbC*

A fim de confirmar que os resultados observados foram causados realmente pela interrupção do gene *phbC*, foi feita uma complementação plasmidial com o gene *phbC* amplificado a partir da estirpe FP2. Os *primers* utilizados para a amplificação foram desenhados para incluir a região promotora e a região codificadora do gene *phbC*. A FIGURA 4 mostra a região amplificada pelos *primers*. A sequência potencialmente reconhecida por σ^{70} na região promotora do gene foi prevista pelo programa BPROM (SOLOVYEV; SALAMOV, 2011).

O *primer* *phbC* F inclui um sítio de restrição para a enzima *Xba*I (sublinhado) na sua sequência: 5' GCATTCTAGAGCGAACCTCACATCCAAACC 3'. Já o *primer* *phbC* R inclui um sítio de restrição para a enzima *Sac*I (sublinhado) e contém a seguinte sequência: 5' GTATGAGCTCTTTTCTTGTTTCGGGCCGTCT 3'. Esses sítios de restrição foram incluídos a fim de facilitar a clonagem do fragmento.

FIGURA 4 – REGIÃO DO GENOMA DE *A. brasilense* AMPLIFICADA PELOS PRIMERS *phbC F* E *phbC R*

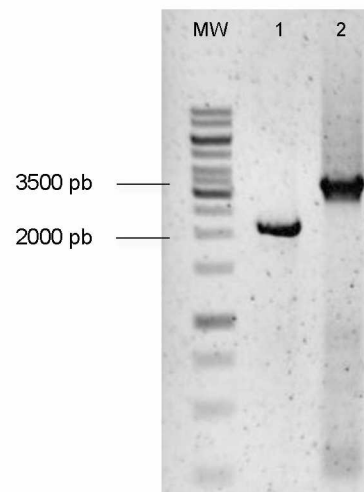
CGAACCTCACATCCAAACC CATCCGGCCGCTTGAACGGTGGTGGGCGAA**ATGAAAT**CTTCATACGAGAG**GTGTATGAC**GGAC
 CCCGGCTCGAACGGACATGGCATAAGCTGTCCGGGATGCCAGGACCGGAACGCACCTCCGACCGAACAGACTTCCGGCAGGCAC
 TGTATAAACCGCACAACTCCCTCCTGAAGCCTAAACTCGCCTAAAGAAGAAGGACCGCACCA**ATGGCCGAAAACCAGGCC**
 CTGACGTCAAGCTTCCCGACCCGGTGGAGATGTCCGGGGGATGACCCCGCATCGCCGAGCAGAGCCAGCGGCTGGTCCACCGAA
 TTCCTGTCCCGTCAGGCCTCGGACGGCGTCGGCGCGAAGAACCCCGACCCGATGGGCGTCGGCCATGCGTTCTGGAGATGAC
 CACGGCATGATGGCCGATCCGGCAAGCTGATGAAGGGCGAGATGACGCTGTGGCAGGATTACCTGACCCTGTGGCAGCGCA
 CGACCAGCGCTTCTTCGGCCAGGACGCCAGCCGGTGTATCGCCCCGGCGAAGGACGACCGCCGCTTCAAGGATTCGGCCCTGG
 GACGAGAACACCCCTGTTGACTTCATCAAGCAGTCTACCTGCTGTTCGGCCCGGTGGATGCAGTCCACGGTCAACGAGGTGGA
 CGGGCTGGACGACCACCGGCCAAGAAGGTGACTTCTACACCCGGCAGTTCTGTCGACGCGATGGCGCCCTCCA**ACTTCGTCA**
 TGACGAACCCGGAGGTGCTGCGCACGACCATCGAGACGGGCGGAGAACTTCGTCAGGGCCCTGGAGCACCTGCTGAAGGAC
 CTGGAGCGCGCAAGGGCGAGCTGCGCATCTCCATGACCGACTACGACGCCTTCCAGGTTCGGCAAGAACATCGCCGTCACCCC
 GGGCAAGGTGCTTTC**CAAACCGATCTGATGCAGT**CATCCAGTACACCCCGACACGCGGAGGTGAACAAGCGGCCGCTGA
 TGATCGTGCCGCCCTGGATCAACAAGTATTACATCCTGGATCTGCGCGAGAAGAACAGCTTCATCAAGTGGGCGGTGGACCAG
 GGCCACAGCGTCTTCGTCTGTCTGGGTGAACCCGGACGAGAAGCTGGCCCAAGAAGGGCTTCGAAGACTACATGTTTCGAAGG
 CGTGTGGCCCGCTGGACGCCATCGAGAAGGTGACCGGCGAGAAGGACGTAACGCCATCGGCTATGCGCTGGCGCGCACGC
 TGCTGGCCTCCACCTGTCTTACATGGCCGCCAAGAAGGACGACCCGATCAAGTCCGGCACCTTCTTACCACCATGCTCGAC
 TTCACCGAAGCCGGCGAGCTGTGAGTCTTATCGACGAGGAGCAGCTCACCATGATCGAGAGCCAGATGGCCCAACAGGGCTA
 CCTGGACGGCTCGAAGATGGCGACCACCTTCAACATGCTGCGGCCAACGATCTCATCTGGTTCGTTGCTGTAACAAC**TACC**
 TGCTCGGCAAGGATCCGTTCCCGTTCGACCTGCTTACTGGAACAGCGATTTCGACCCGCATGCCGGCGCGGATGCACAGCTTC
 TACCTGCGCAACATGTACCAGAAGAACCTTCTGGCGCAGCCGGGTGCGGTGACGCTGGGCGGCGTCCCGATCGACCTGCGCAA
 GGTGAAGACCCCGTCTTCTTCTGTTCGGCCCGGAGGACCACATCGCGCCGTGGAAGTCCACCTACATGGGCGCCACCTGT
 TCTCCGGCCCGGTGAAGTTCGTGCTGGCGGCCCTCCGGCCACATCGCCGGCGTGGTGAACCCGCGCCCGCGCAAGTACTGC
 TACTGGACCAACGCCAAGCTGCCGAAGGCTTCGGACGATTGGCTGGCCCTCGTTCGGAGCAGACCCCGGCTCCTGGTGGCCGGA
 GTGGAACAAC**TGGGTCTCCACCTTCTCCGAAGGCAAGGTCCCGGCGCGCAATCCGGAAAAGGGCGGCCTGCCCGTCTGGAAG**
 ACGCCCGCGCTCCTACGCCAAGGTGCGCATCGTCTGAT**GTCCGAAATCCGGAGGGCGGTCCGCGCCCTCCGGAGGCCCGGA**
GCCATTGGCATGCCGGACCGAATGAGACGGCCGAACAAGAAA

Fonte: O autor (2018).

LEGENDA: Região do genoma de *A. brasilense* amplificada pelos primers *phbC F* e *phbC R*. As regiões em que os *primers* se anelam estão destacadas em amarelo. Em vermelho, a possível região -35/-10 na sequência promotora. Em azul, a região codificadora para o gene *phbC*. Acesso no GenBank: CP012914 (fita complementar: 1468516-1470619).

Primeiramente, foi realizada uma PCR para confirmar que os *primers* desenhados para o gene *phbC* realmente abrangiam o gene que foi interrompido por Kadouri et al. (2002). A reação com o DNA genômico de FP2 teve um tempo de extensão de 2 minutos, enquanto que a extensão do DNA genômico do mutante *phbC* foi de 3 minutos. Os fragmentos obtidos através de PCR tiveram tamanhos diferentes devido ao cassete de canamicina presente no gene da estirpe mutante (FIGURA 5).

O fragmento observado em FP2 tem um tamanho de 2118 pares de base (pb), enquanto o fragmento do mutante *phbC* tem um tamanho de aproximadamente 3500 pb. O cassete de canamicina inserido no mutante tem um tamanho de 1400 pb (KADOURI et al., 2002), o que faz com que o gene seja mais extenso. O fragmento amplificado inclui a região promotora e codificadora do gene *phbC*.

FIGURA 5 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *phbC* DE *A. brasilense* FP2 E MUTANTE *phbC*

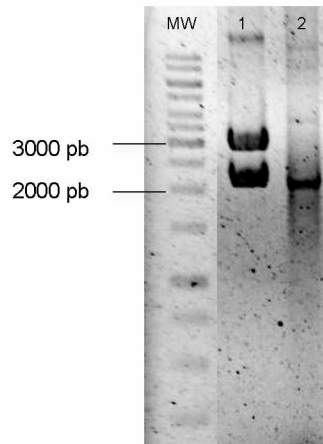
FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE das amostras obtidas da amplificação do gene *phbC* em *A. brasilense* FP2 (linha 1) e *A. brasilense* mutante *phbC* (linha 2). O tempo de extensão utilizado para a amplificação do gene em FP2 foi de 2 minutos. No mutante *phbC*, o tempo de extensão utilizado foi de 3 minutos. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida em sistema UVP. A linha MW indica o marcador de massa molecular (1 kb ladder) e os fragmentos de 2 e 3,5 kb estão indicados. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem foi obtida utilizando sistema UVP.

Em uma reação de PCR com tempo de extensão de 2 minutos, o DNA genômico do mutante *phbC* não é amplificado (dados não mostrados).

Após a obtenção do fragmento do gene *phbC* por PCR utilizando o DNA genômico de FP2 como molde, esse fragmento foi clonado no plasmídeo pBluescript II SK. Foi utilizado o produto de PCR amplificado pela enzima *Pfu* e o plasmídeo digerido com a enzima de restrição *EcoRV*, para realizar uma clonagem com *blunt ends*. Células de *E. coli* TOP 10 foram transformadas com a ligação do plasmídeo ao fragmento de PCR e foi feita uma seleção de colônias brancas e azuis. O plasmídeo das colônias brancas selecionadas foi extraído por *miniprep* e submetido a restrição com as enzimas *SacI* e *XbaI*. Com a restrição, o inserto foi liberado e separado do plasmídeo. A FIGURA 6 mostra o resultado da restrição do plasmídeo obtido por *miniprep*, em que o inserto tem um tamanho de 2118 pb e o plasmídeo pBluescript tem um tamanho total de 2961 pb (amostra 1). A figura também mostra o produto de PCR obtido a partir da amplificação do DNA plasmidial (amostra 2). O plasmídeo obtido foi chamado de pBL01.

FIGURA 6 – PLASMÍDEO pBL01 DIGERIDO POR *SacI* E *XbaI* E AMPLIFICAÇÃO DO GENE *phbC* A PARTIR DO DNA PLASMIDIAL

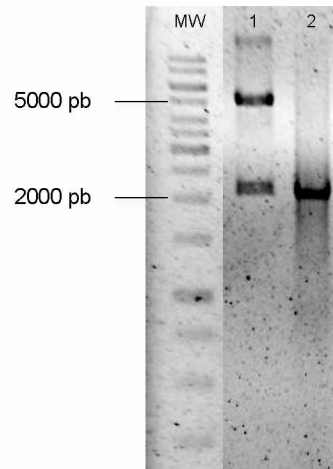


FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE. A linha 1 mostra o plasmídeo pBL01 extraído de células de *E. coli* TOP10 após restrição com as enzimas *SacI* e *XbaI*, resultando em uma banda de aproximadamente 3 kb referente ao plasmídeo linearizado e uma banda de aproximadamente 2,1 kb referente ao gene *phbC*. A linha 2 mostra o amplificado com os *primers* *phbC* F e R utilizando o plasmídeo pBL01 como molde. A linha MW indica o marcador de massa molecular (1 kb ladder) e os fragmentos de 2 e 3 kb estão indicados. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem foi obtida utilizando sistema UVP.

Em seguida, o fragmento correspondente ao gene *phbC* foi transferido para o plasmídeo pBBR1MCS-3 utilizando os sítios *SacI* e *XbaI*, dando origem ao plasmídeo pBL02. A FIGURA 7 mostra o resultado da restrição do plasmídeo pBL02 (amostra 1) liberando o inserto (2118 pb) e o plasmídeo pBBRMCS-3 (5280 pb). A figura também mostra a amplificação do plasmídeo por PCR, indicando a presença do inserto (amostra 2).

FIGURA 7 – PLASMÍDEO pBL02 DIGERIDO POR *SacI* E *XbaI* E AMPLIFICAÇÃO DO GENE *phbC* A PARTIR DO DNA PLASMIDIAL

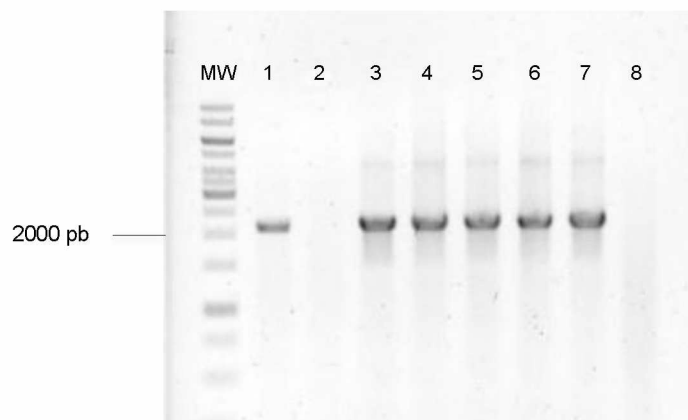


FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE. A linha 1 mostra o plasmídeo pBL02 após restrição com as enzimas *SacI* e *XbaI*. A linha 2 mostra o produto de PCR com os *primers* *phbC* F e R utilizando o plasmídeo pBL02 como molde. A linha MW indica o marcador de massa molecular (1 kb ladder) e os fragmentos de 2 e 5 kb estão indicados. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem foi obtida utilizando sistema UVP.

Após a obtenção de pBL02, o plasmídeo foi transformado em *E. coli* S17.1 e posteriormente transferido, por conjugação, para a estirpe mutante *phbC*. A estirpe mutante *phbC* é resistente à canamicina, enquanto o plasmídeo pBL02 confere resistência a tetraciclina, então colônias resistentes a canamicina e a tetraciclina foram selecionadas e a presença de pBL02 foi confirmada por amplificação por PCR a partir de colônias (FIGURA 8).

FIGURA 8 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *phbC* DE TRANSCONJUGANTES SELECIONADOS DE *A. brasilense* MUTANTE *phbC*



FONTE: O autor (2018).

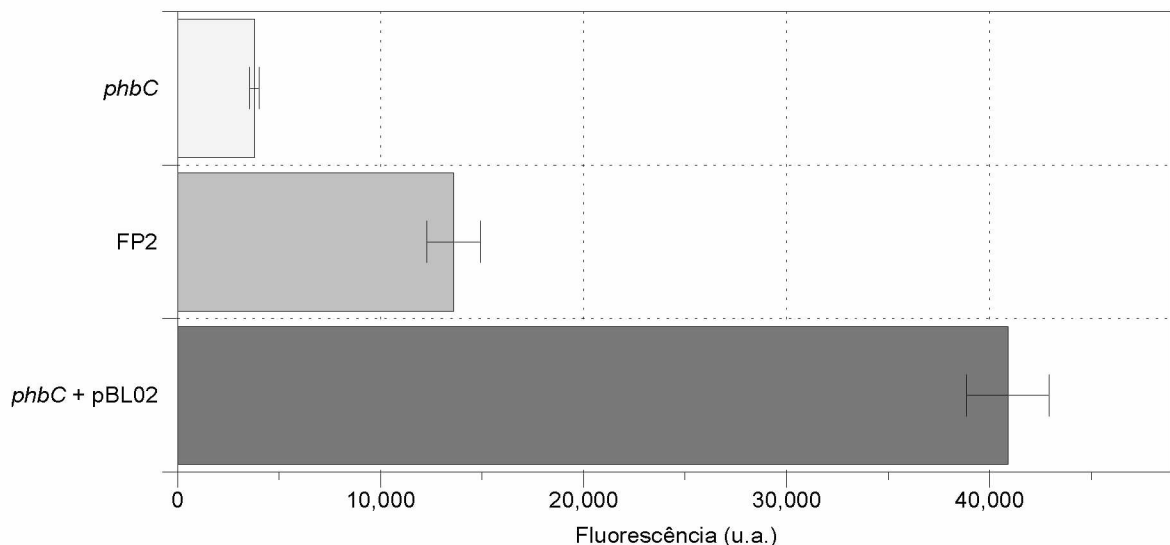
LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE. Amostras são resultados de amplificação por PCR do gene *phbC* utilizando colonias de bactérias selecionadas. Na linha 1, está o controle positivo em que foi utilizado DNA genômico de FP2 como molde. Na linha 2, foi utilizado o DNA genômico de *A. brasilense* mutante *phbC* como molde, não havendo amplificação. Nas linhas 3

a 7, estão as amostras amplificadas a partir de colônias do mutante *phbC* complementadas com o plasmídeo pBL02. Na linha 8, o controle negativo, sem DNA adicionado à reação. A linha MW indica o marcador de massa molecular (1 kb ladder) e o fragmento de 2 Kb está indicado. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem foi obtida utilizando sistema UVP.

5.3.1 Quantificação de PHB no transconjugante

Quando confirmado que o plasmídeo pBL02 realmente estava presente nas células do mutante *phbC*, foi realizado o experimento de quantificação de PHB para confirmar que a estirpe complementada com pBL02 era capaz de sintetizar o polímero. Culturas de *A. brasilense* FP2, mutante *phbC* e mutante *phbC* transformado com o plasmídeo pBL02 foram cultivadas em meio NFb lactato contendo 5 mM de NH_4Cl até atingirem uma D.O._{600} de 1,2. O experimento foi realizado em duplicata. Os valores de fluorescência (u.a.) obtidos através de análise por citometria de fluxo estão representados no GRÁFICO 3.

GRÁFICO 3 – DETERMINAÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR CITOMETRIA DE FLUXO EM *A. brasilense phbC*, FP2 e *phbC* COMPLEMENTADA COM pBL02



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: As estirpes selvagem (FP2), mutante (*phbC*) e complementada (*phbC* + pBL02) foram cultivadas na presença de 5 mM de NH_4Cl até atingirem a DO_{600} de 1,2. Após o cultivo, as células foram coradas com Vermelho Nilo e avaliadas por citometria de fluxo conforme descrito em Materiais e Métodos. Os resultados correspondem à fluorescência (unidades arbitrárias) e são apresentados como média e desvio padrão de triplicatas.

Os resultados obtidos mostram que a estirpe mutante *phbC* transformada com o plasmídeo pBL02 apresenta valores de fluorescência superiores àqueles apresentados pelo mutante, indicando complementação e produção de PHB. Os

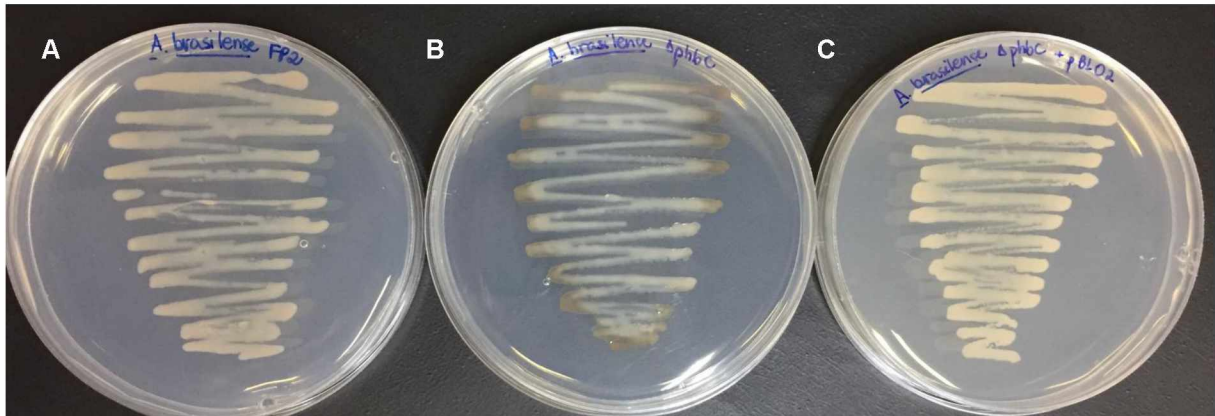
valores de fluorescência foram maiores do que aqueles obtidos para a estirpe selvagem FP2. Apesar do plasmídeo usado, pBBR1MCS-3, possuir baixo número de cópias, é possível que cada célula apresente uma maior expressão do gene *phbC* e conseqüentemente a síntese de PHB, devido ao maior número de cópias do gene presente nos transformantes. Este fato pode explicar os valores de fluorescência mais elevados no mutante complementado com pBL02. Os resultados também confirmam que a deleção do gene *phbC* é o que causava a ausência de acúmulo de PHB na estirpe mutante *phbC*.

5.3.2 Diferenças fenotípicas das colônias de *A. brasilense* FP2 e mutante *phbC*

Quando cultivada em placas, as células de *A. brasilense* FP2 e de *A. brasilense* mutante *phbC* têm diferenças aparentes. À princípio, as colônias parecem semelhantes. Porém, se as placas tiverem maior tempo de incubação a 30°C, as colônias do mutante *phbC* tendem a apresentar uma coloração escura (FIGURA 9B). Já em placas com FP2, as colônias se mantêm na mesma coloração branco-amarelada (FIGURA 9A).

Feita a complementação com o plasmídeo pBL02, as colônias do mutante *phbC* contendo pBL02 não demonstraram mais aspecto amarronzado. Elas se mantiveram da mesma coloração que FP2 mostra (FIGURA 9C). O escurecimento das células do mutante *phbC*, então, pode ser causado devido a algum estresse sofrido pela célula por não ser capaz de acumular PHB.

FIGURA 9 – PLACAS DE CULTIVO DE *A. brasilense* ESTIRPES FP2, MUTANTE *phbC* E MUTANTE *phbC* COMPLEMENTADO COM O PLASMÍDEO pBL02



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: As bactérias foram cultivadas em meio NFb lactato sólido contendo 50 mL/L de fosfatos e 20 mM de NH_4Cl . As placas foram mantidas por 4 dias em estufa a 30°C. A – aparência de *A. brasilense* FP2 após 4 dias a 30°C; B – aparência de *A. brasilense* mutante *phbC* após 4 dias a 30°C; C – aparência de *A. brasilense* mutante *phbC* complementada com o plasmídeo pBL02 após 4 dias a 30°C.

A presença de pigmentos escuros já foi observada em *A. brasilense* (SADASIVAN; NEYRA, 1987; GOWRI; SRIVASTAVA, 1996). Esse pigmento foi descrito como sendo similar à melanina, e apareceu em *A. brasilense* ATCC 29145 em culturas antigas, com limitações de carbono e nitrogênio no meio. (SADASIVAN; NEYRA, 1987). Em *A. brasilense* Sp7, um pigmento similar foi identificado em culturas expostas a Zn^{2+} (GOWRI; SRIVASTAVA, 1996). Esse efeito pode ser relacionado à capacidade do pigmento de ser capaz de ligar-se a cátions possivelmente tóxicos para a célula (RILEY, 1997). A síntese desse pigmento também está relacionada à floculação de *A. brasilense* (SADASIVAN; NEYRA, 1985). A floculação ocorre quando a bactéria sintetiza maior quantidade de EPS (SADASIVAN; NEYRA, 1985). A exposição a Zn^{2+} também causa maior síntese de EPS, o que indica que a presença de melanina pode ser um indicativo de que a bactéria pode estar prestes a sofrer floculação (GOWRI; SRIVASTAVA, 1996).

A síntese de melanina também é uma estratégia utilizada por micro-organismos como proteção a fatores ambientais (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003). A sua presença pode conferir resistência a irradiação UV, a peróxido de hidrogênio, a altas e baixas concentrações de oxigênio, ao frio e ao calor e a metais pesados (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003). Como a ausência de síntese de PHB pelo mutante *phbC* de *A. brasilense* causa maior susceptibilidade a diferentes fatores ambientais (KADOURI et al., 2002), a síntese de pigmentos como a melanina

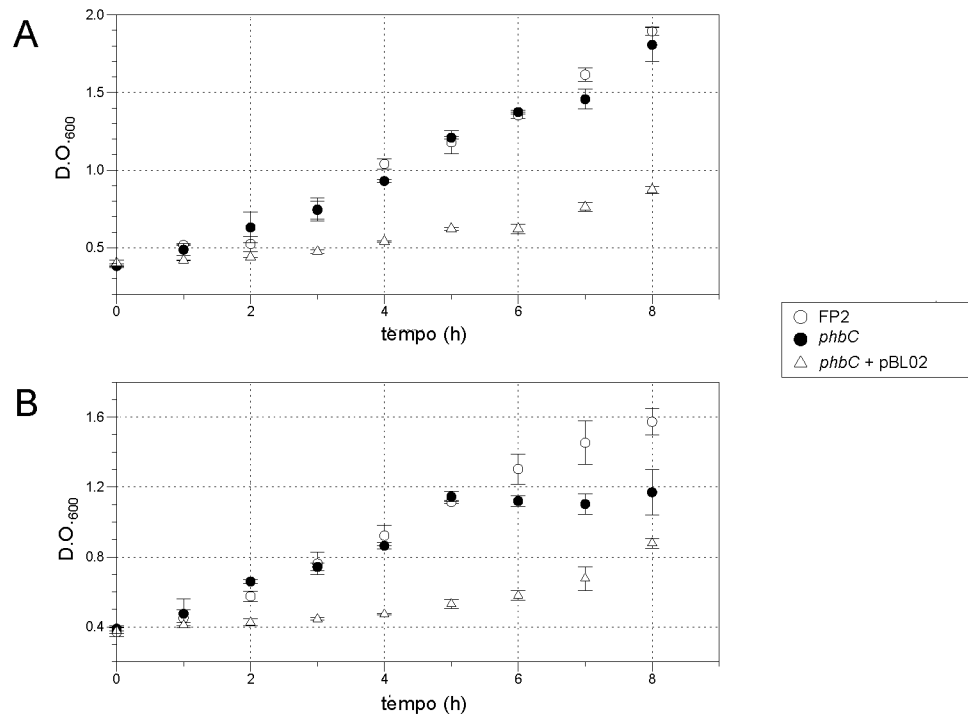
pode ser parte de uma estratégia para proteção das células, já que não há acúmulo de PHB.

O mutante *phbC* também sofre floculação mais facilmente do que *A. brasilense* FP2 (dados não apresentados). Se culturas forem deixadas por períodos mais extensos sob agitação a 30°C, é possível observar floculação nas culturas da estirpe mutante quando em cultivo com menores concentrações de amônio. Isso pode ser relacionado à maior síntese de EPS observada nessa estirpe (KADOURI et al., 2002). Como a síntese de EPS está relacionada à floculação, parece que condições de cultivo em meio NFb lactato com 2 mM de NH₄Cl favorecem a formação de cistos na estirpe mutante.

5.3.3 Avaliação de crescimento celular

Para avaliar a capacidade de *A. brasilense* mutante *phbC* contendo pBL02 em crescer em diferentes concentrações de amônio, foram feitas novas curvas de crescimento utilizando as estirpes FP2, mutante *phbC* e mutante *phbC* contendo pBL02 (gráfico 4). Esperava-se que, em baixo amônio, o crescimento do mutante *phbC* contendo pBL02 fosse similar àquele de FP2. Porém, o observado foi que o crescimento da estirpe foi menor quando comparado tanto a FP2 quanto ao mutante *phbC*, independente da concentração de amônio utilizada. O GRÁFICO 4A mostra o crescimento das estirpes em 20 mM de NH₄Cl. Enquanto a estirpe selvagem FP2 e a mutante *phbC* têm um perfil similar de crescimento, a estirpe mutante *phbC* complementada com pBL02 mostrou limitações no seu crescimento. Em 2 mM de NH₄Cl, o crescimento do mutante *phbC* é estacionado após o consumo de amônio no meio, como visto anteriormente. Porém, a taxa de crescimento da estirpe complementada também é menor quando comparada com FP2 e com o mutante *phbC* (GRÁFICO 4B).

GRÁFICO 4 – AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DAS DIFERENTES ESTIRPES DE *A. brasilense* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NH_4Cl



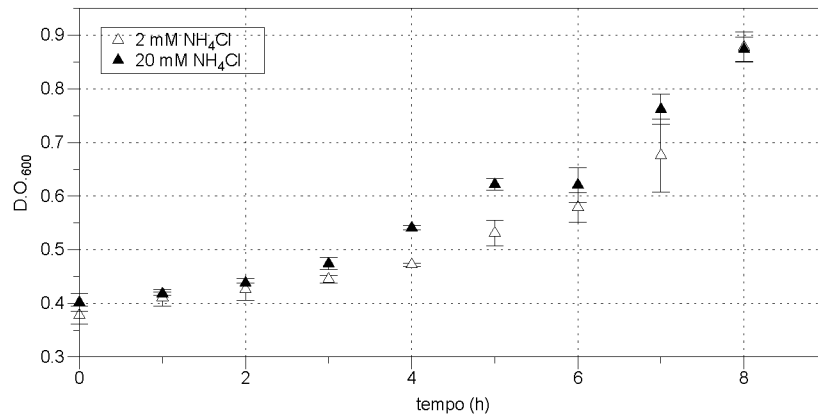
FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: As estirpes selvagem (FP2), mutante (*phbC*) e complementada (*phbC* + pBL02) foram cultivadas em meio NFb lactato líquido acrescido de fosfatos e na presença de 20 mM de NH_4Cl (GRÁFICO A) ou 2 mM de NH_4Cl (GRÁFICO B). O crescimento foi acompanhado através de medidas de D.O._{600} em leitor de microplaca. Os resultados mostrados no gráfico representam a média e desvio padrão de duplicatas.

Após cultivo por dois dias, a cultura do mutante *phbC* contendo pBL02 também não atinge uma D.O._{600} final igual àquela de FP2 e do mutante *phbC* (dados não apresentados). Enquanto a estirpe FP2 e a mutante *phbC* chegam a crescer até uma D.O._{600} de 3,0, a estirpe complementada com pBL02 não passa de 1,8.

Apesar das diferenças de crescimento observados entre as estirpes selvagem ou mutante *phbC* e a estirpe mutante complementada, quando esta última é comparada quando em cultivo em baixo e alto amônio, não é observada diferença de crescimento (GRÁFICO 5).

GRÁFICO 5 – AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DO MUTANTE *phbC* COMPLEMENTADO COM pBL02 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NH_4Cl



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: A estirpe mutante *phbC* complementada com pBL02 foi cultivada em meio NFb lactato líquido acrescido de fosfatos e na presença de 2 mM ou 20 mM de NH_4Cl . Os resultados mostrados no gráfico representam a média e desvio padrão de duplicatas.

A ausência de diferenças no crescimento em altas e baixas concentrações de amônio indica que nitrogênio não é um nutriente limitante para o crescimento da estirpe mutante *phbC* complementada com pBL02, nas densidades ópticas observadas. Portanto, deve haver outro fator que esteja afetando o crescimento da estirpe. Uma possibilidade é que o metabolismo da célula está voltado à maior produção de PHB, já que há mais cópias do gene do que na estirpe selvagem FP2. Com maior síntese de PHB, grande parte do metabolismo de carbono da célula pode estar voltado à essa função e não ao crescimento (TYO et al., 2011).

A síntese e o acúmulo de PHB usam grande parte do carbono disponível à célula, e o excesso do acúmulo do polímero pode chegar a ser tóxico para a célula. Por isso, quando se quer aumentar a síntese do polímero, deve-se ter um balanço entre o crescimento e produção da molécula (TYO et al., 2011; ANDERSON; DAWES, 1990). A síntese do polímero ocorre principalmente durante a fase estacionária de crescimento e na fase exponencial há normalmente pouco acúmulo de PHB (WANG; LEE, 1997). Quando se quer produzir maior quantidade de PHB, então, deve-se sacrificar a taxa de crescimento para que seja possível a síntese do polímero na fase exponencial (TYO et al., 2011). A produtividade pode aumentar por redução da taxa de crescimento, o que provavelmente é o que ocorre com a complementação da estirpe mutante *phbC* pelo plasmídeo pBL02. Portanto, a menor taxa de crescimento pelo mutante *phbC* contendo pBL02 muito provavelmente deve-se à maior síntese de PHB observada nos resultados de quantificação de PHB por

citometria de fluxo. Por haver maior produção do polímero, a taxa de crescimento é menor.

Apesar das diferenças nas taxas de crescimento observadas, nossos resultados indicam que o gene *phbC*, interrompido na estirpe mutante *phbC*, é aquele responsável pela síntese do polímero PHB em *A. brasilense*. Entretanto, considerando as diferenças nas taxas de crescimento apresentadas pela estirpe complementada, os experimentos apresentados a seguir foram conduzidos somente com as estirpes selvagem e mutante.

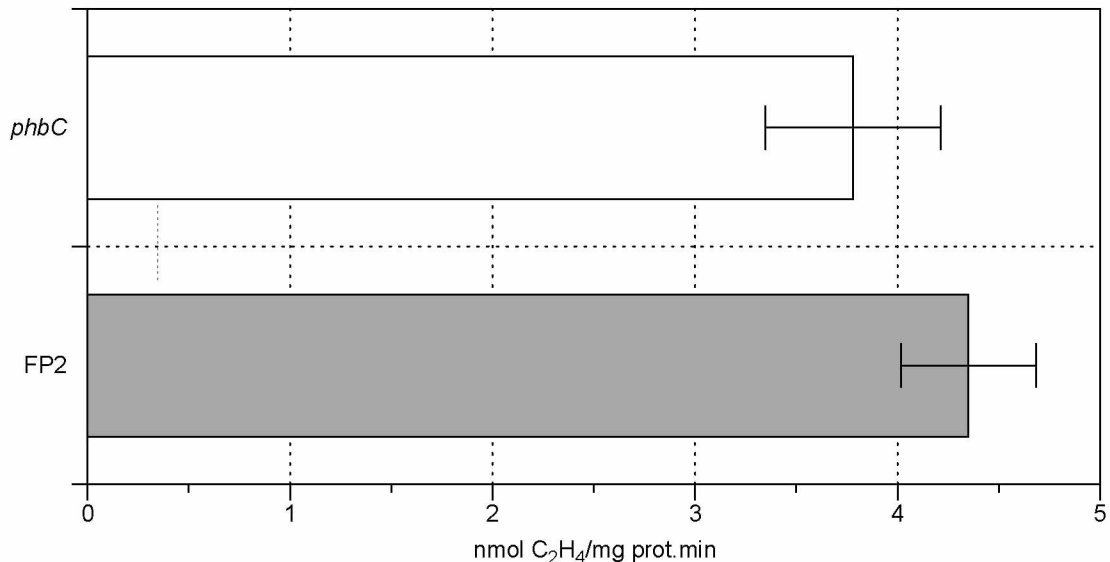
5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE NITROGENASE

Como o mutante *phbC* apresentou uma menor taxa de crescimento em baixas concentrações de amônio e em glutamato, é possível que as células da estirpe mutante tenham a atividade nitrogenase prejudicada. Desta forma, a atividade da nitrogenase foi determinada utilizando seis replicatas biológicas de cada estirpe de *A. brasilense* (GRÁFICO 6). Os resultados indicam que a estirpe mutante *phbC* é capaz de fixar nitrogênio de forma semelhante à estirpe selvagem FP2, sugerindo portanto, que a menor taxa de crescimento observada entre as estirpes em baixa concentração de amônio ou em glutamato não está relacionado à capacidade de fixar nitrogênio.

A fixação de nitrogênio é um processo que exige um investimento alto de energia da célula, sendo necessário o uso de duas moléculas de ATP para a transferência de cada elétron envolvido no processo (DIXON; KAHN, 2004). Como o metabolismo de PHB tem um papel no balanço de energia disponível e na distribuição de recursos provenientes de carbono (KADOURI et al., 2005), a alteração causada pela inativação do gene *phbC* pode alterar o balanço energético e de carbono da célula (MANDON et al., 1998). A ausência da síntese de PHB em *Azorhizobium caulinodans* leva à perda da atividade nitrogenase (MANDON et al., 1998). Mandon e colaboradores (1998) atribuem a ausência de fixação a um desbalanço no metabolismo de carbono, o que prejudica o fornecimento de energia para a fixação de nitrogênio. Os resultados mostrados no GRÁFICO 6 sugerem que o mesmo não ocorre em *A. brasilense*, já que não há uma diferença significativa entre a capacidade das estirpes selvagem e mutante em fixarem nitrogênio. Portanto, a atividade nitrogenase do mutante *phbC* não foi afetada pela interrupção

do gene *phbC*, sugerindo não haver um desbalanço energético significativo na célula que possa afetar a fixação de nitrogênio.

GRÁFICO 6 – ATIVIDADE NITROGENASE DAS ESTIRPES *A. brasilense* FP2 E *A. brasilense* MUTANTE *phbC*



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: A atividade nitrogenase das estirpes de *A. brasilense* FP2 e mutante *phbC* foi determinada através do ensaio de redução do acetileno a etileno. As bactérias foram cultivadas por aproximadamente 20 horas em meio NFb lactato contendo 50 mL/L de fosfatos, 5 mM de glutamato e 1% de LB. A formação de etileno a partir de acetileno foi determinada por cromatografia gasosa. O gráfico mostra os valores médios de nmols de etileno formados por minuto e por miligrama de proteína total contida nas células e as barras de erro indicam o desvio padrão entre as seis replicatas utilizadas.

5.5 PADRÃO DE ADENILILAÇÃO DA GLUTAMINA SINTETASE

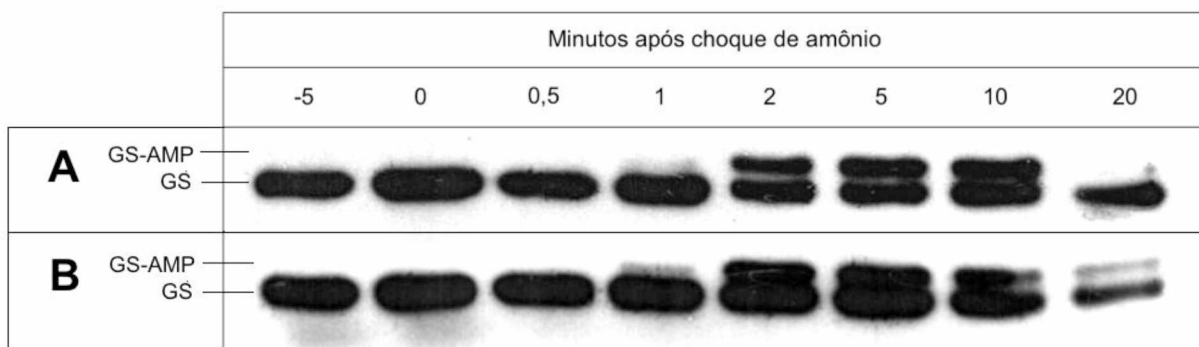
A produção de PHB é maior em condições onde a relação C:N é elevada (TAL; OKON, 1985; KADOURI et al., 2005). Assim, analisamos o efeito da deficiência da produção de PHB no controle pós-traducional da enzima glutamina sintetase. A assimilação de amônio é efetuada principalmente pela enzima glutamina sintetase (GS) sob condições de baixa concentração (SHAPIRO; STADTMAN, 1968; ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001).

A atividade da glutamina sintetase (GS) é regulada também por modificações pós traducionais (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001). A regulação da enzima é necessária para evitar um desperdício de glutamato e um excesso de uso de ATP em condições em que há excesso de nitrogênio disponível para a célula (SCHUTT; HOLZER, 1972). A GS é uma enzima homooligomérica. Ela

possui 12 subunidades iguais e todas elas podem ser adenililadas de modo reversível, em resposta à disponibilidade de nitrogênio no meio (SHAPIRO; STADTMAN, 1968; ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001). Quando há baixa concentração de amônio, a enzima está desadenililada e conseqüentemente ativa. Em excesso de nitrogênio, suas subunidades são adenililadas e conseqüentemente inativadas (DE ZAMAROCZY et al., 1996). Se essa regulação não ocorre corretamente, a célula pode estar consumindo substratos importantes para o seu crescimento sem necessidade, o que pode levar a uma menor taxa de crescimento (SCHUTT; HOLZER, 1972).

Para entender se a regulação da GS é um dos fatores que afeta o crescimento do mutante *phbC* de *A. brasilense* em baixas concentrações de amônio e em glutamato, o perfil de adenililação da estirpe selvagem e da mutante em resposta a choque de amônio foi analisado utilizando o sistema de *western blot* (FIGURA 10). As subunidades adeniladas da proteína GS apresentam taxa de migração diferente daquelas não adeniladas e podem ser diferenciadas após separação por eletroforese e reconhecimento com anticorpo anti-GS. Assim, quando há apenas uma banda, a proteína está completamente desadenililada, enquanto a presença de duas bandas corresponde a uma porção das subunidades da GS adenililada.

FIGURA 10 – PERFIL DE MODIFICAÇÃO DA GLUTAMINA SINTETASE APÓS CHOQUE DE AMÔNIO EM *A. brasilense* ESTIRPES FP2 E mutante *phbC*



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: O perfil de adenililação da glutamina sintetase foi determinado através de *western blot*. As estirpes selvagem (FP2) e mutante (*phbC*) foram cultivadas em meio NFb lactato 2 mM até atingirem D.O.₆₀₀ de 0,8. Foi adicionado NH₄Cl para obter uma concentração final 200 μM. Foram retiradas amostras antes e após o choque de amônio, nos tempos indicados na figura, sendo que o tempo -5 é anterior a adição de amônio. As amostras foram processadas como descrito em Materiais e Métodos. A banda com menor taxa de migração (superior) corresponde à subunidade adenililada (GS-AMP) e a inferior (taxa maior de migração) corresponde à subunidade não adenililada (GS). **A** – perfil de adenililação da GS em *A. brasilense* FP2. **B** – perfil de adenililação da GS em *A. brasilense* mutante *phbC*.

Anteriormente ao choque de amônio (5 minutos antes da adição de amônio), todas as subunidades da GS encontram-se desadenililadas. Por outro lado, um minuto após o choque é possível observar que algumas subunidades da GS começam a ser adenililadas e, em dois minutos, um maior número de subunidades encontram-se modificadas. A presença de subunidades modificadas nas amostras é observada até dez minutos após o choque de amônio. Entretanto, 20 minutos após o choque de amônio, observa-se a diminuição da intensidade da banda de GS adenililada, o que indica que uma maior parte das subunidades da enzima está desadenililada. O perfil observado corresponde ao esperado em resposta a choque de amônio em *A. brasilense*, como descrito anteriormente por Huergo (2006) e por Gerhardt (2012).

O padrão de adenililação da GS entre as amostras de FP2 e mutante *phbC* parece ser similar, indicando que há resposta à variação da concentração de amônio no meio de cultura através de modificações pós traducionais da GS em ambas as estirpes.

Considerando que a capacidade da estirpe mutante em ativar e inativar a GS parece ser similar àquela da estirpe selvagem, a regulação pós traducional da GS aparentemente não é um fator que afeta o crescimento da estirpe mutante em baixas concentrações de amônio. Outros fatores podem estar envolvidos nessa dificuldade de crescimento que o mutante apresenta.

5.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A fim de verificar se a expressão de alguns genes é alterada no mutante *phbC*, a técnica de PCR semi quantitativa foi utilizada. Foram escolhidos genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio e de PHB que postulamos poder ter sido afetados pela ausência da síntese de PHB em *A. brasilense*.

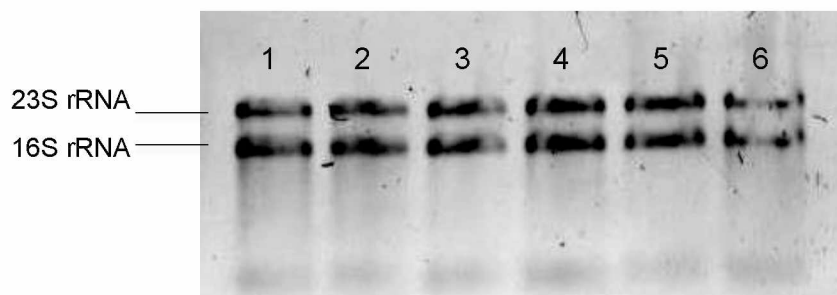
5.6.1 Extração de RNA

As estirpes de *A. brasilense* FP2 e mutante *phbC* foram cultivadas em baixa concentração de nitrogênio e posteriormente submetidas a um choque de amônio.

As células foram processadas, antes e depois do choque de amônio, e o RNA total extraído.

O RNA extraído foi submetido a uma corrida de eletroforese a fim de verificar visualmente a qualidade das amostras (FIGURA 11). O padrão de duas bandas é o esperado, correspondendo aos rRNAs 23S e 16S. O padrão obtido mostrou-se adequado e o material pode ser usado para síntese de cDNA.

FIGURA 11 – RNA TOTAL EXTRAÍDO DE AMOSTRAS DE *A. brasilense* FP2 E MUTANTE *phbC* ANTES E APÓS CHOQUE DE AMÔNIO



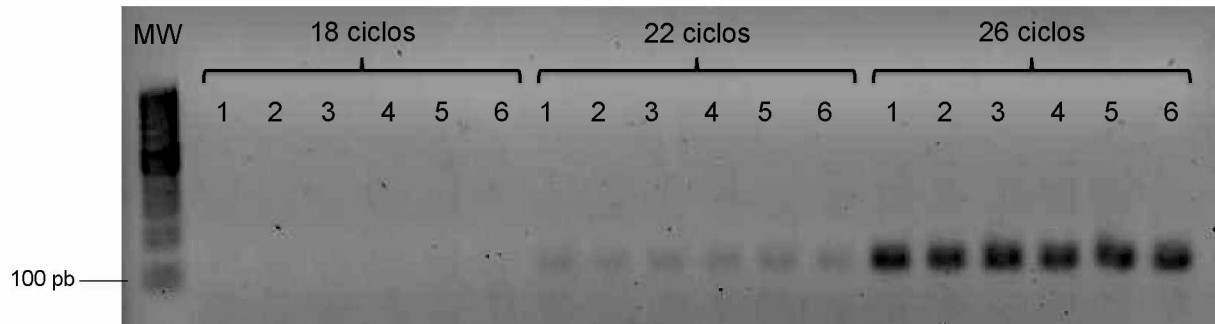
FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão borato de sódio, com amostras do RNA total extraído das células cultivadas por 20 horas em meio NFb lactato contendo 5 mM de glutamato e submetida a choque com 200 μ M de amônio. O RNA foi extraído antes do choque com amônio (tempo -5 minutos) e após 5 ou 30 minutos da adição de amônio. Linhas 1, 3 e 5 correspondem a amostras da estirpe selvagem FP2 anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. Linhas 2, 4 e 6 correspondem a amostras da estirpe mutante *phbC* anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque. As bandas mais visíveis correspondem aos 23S rRNA e 16S rRNA. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida em sistema UVP.

5.6.2 Controles utilizados para PCR semi quantitativa

Após a extração de RNA, realizou-se síntese de cDNA a partir das amostras, para realização de PCR semi quantitativa. Utilizou-se uma concentração de 300 ng de cDNA de cada amostra para a realização das reações. A fim de confirmar que a quantidade de cDNA era semelhante em todas as amostras, a amplificação do gene *recA*, envolvido no reparo e manutenção do DNA, foi utilizada como controle. Os amplificadores após 18, 22 e 26 ciclos de PCR foram avaliados em gel (FIGURA 12). O resultado indica que a quantidade dos amplificadores obtidos foram semelhantes em todas as amostras, indicando que as amostras de cDNA podem ser utilizadas para a determinação da expressão dos genes de interesse.

FIGURA 12 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *recA* A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES DE *A. brasilense* FP2 E MUTANTE *phbC*



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE das amostras obtidas da amplificação de fragmento do gene *recA* utilizando cDNA como molde e diferentes ciclos de amplificação. Linhas 1, 3 e 5 correspondem a amostras da estirpe selvagem FP2 anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. Linhas 2, 4 e 6 correspondem a amostras da estirpe mutante *phbC* anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. A linha MW indica o marcador de massa molecular (100 bp ladder) e o fragmento de 100 pb está indicado. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida em sistema UVP.

A fim de confirmar que as amostras de RNA não possuíam DNA genômico antes de serem utilizadas para síntese de cDNA, foi realizada amplificação por PCR utilizando *primers* para o gene *recA* utilizando amostras de RNA com o tampão de reação da transcriptase reversa, mas sem a adição da enzima. Os resultados foram observados em gel de agarose 2% (FIGURA 13) e não mostram amplificação do gene *recA*. Essas condições foram utilizadas como controle negativo para todas as reações de PCR realizadas.

FIGURA 13 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *recA* UTILIZANDO AMOSTRAS DE RNA TOTAL EXTRAÍDO DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE *phbC* DE *A. brasilense*



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE das amostras obtidas da amplificação de fragmento do gene *recA* por 30 ciclos de PCR utilizando RNA como molde. Linhas 1, 3 e 5 correspondem a amostras da estirpe selvagem FP2 anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. Linhas 2, 4 e 6 correspondem a amostras da estirpe mutante *phbC* anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. A linha MW indica o marcador de massa

molecular (100 bp ladder) e o fragmento de 100 pb está indicado. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida em sistema UVP.

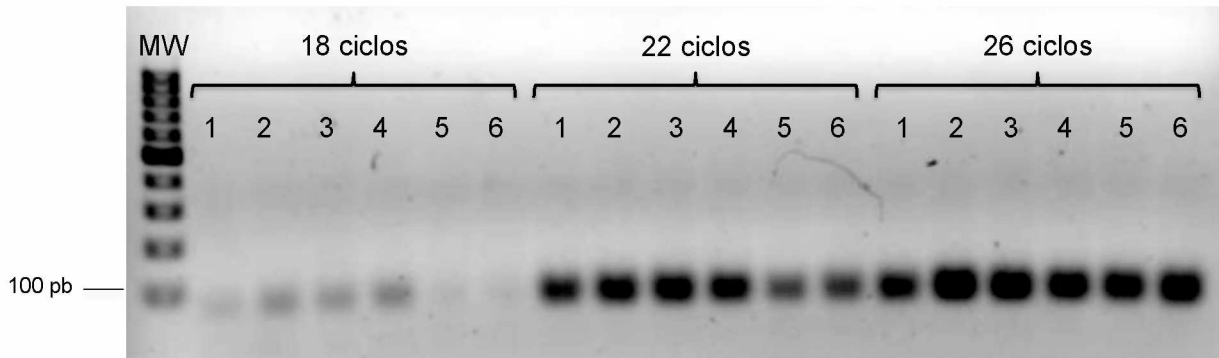
5.6.3 Expressão de genes envolvidos no sistema Ntr e na fixação biológica de nitrogênio

Alguns dos genes escolhidos para avaliação de expressão estão envolvidos com a fixação de nitrogênio e sua regulação. O primeiro gene avaliado foi *nifH*, que codifica para a proteína Fe da nitrogenase. A proteína Fe ou NifH é chave no processo de fixação, por transferir elétrons à proteína FeMo para que ocorra a redução de nitrogênio molecular a amônio (KIM; REES, 1994; DIXON; KAHN, 2004).

A FIGURA 14 mostra que as estirpes mostram um padrão similar de expressão: tanto a estirpe selvagem FP2 quanto o mutante *phbC* mostraram *nifH* sendo mais expresso anteriormente ao choque de amônio e 5 minutos após o choque. Nas amostras retiradas 30 minutos após o choque de amônio, é possível ver uma grande diminuição da expressão do gene, mais evidente nas amostras amplificadas com 18 e 22 ciclos. Os resultados, então, são condizentes àqueles obtidos no ensaio de redução do acetileno a etileno, por mostrarem que a expressão de *nifH* segue o mesmo padrão nas duas estirpes. Desta forma, não há influência da capacidade de síntese de PHB na expressão ou atividade da nitrogenase em *A. brasilense*.

A expressão de *nifH* é diminuída após choque de amônio pois a entrada de amônio no sistema gera sinais que regulam a expressão do gene para que não haja fixação de nitrogênio quando não há necessidade (DIXON; KAHN, 2004; YAN et al., 2010). O mesmo padrão foi observado quando a expressão de genes relacionados com fixação de nitrogênio foi avaliada antes e depois choque de amônio em *Pseudomonas stutzeri* (YAN et al., 2010). Os genes *nifH*, *glnA*, *glnK* (homólogo de *glnZ*) e *amtB* tiveram sua expressão diminuída após 10 minutos do choque de amônio e o mesmo ocorreu com outros genes relacionados à fixação de nitrogênio ou à sua regulação (YAN et al., 2010).

FIGURA 14 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *nifH* PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE *phbC* DE *A. brasilense*



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE das amostras obtidas da amplificação de fragmento do gene *nifH* utilizando cDNA como molde e diferentes ciclos de amplificação. Linhas 1, 3 e 5 correspondem a amostras da estirpe selvagem FP2 anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. Linhas 2, 4 e 6 correspondem a amostras da estirpe mutante *phbC* anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. A linha MW indica o marcador de massa molecular (100 bp ladder) e o fragmento de 100 pb está indicado. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida em sistema UVP.

Também foi avaliada a expressão do gene *glnA* que codifica para a glutamina sintetase. A glutamina sintetase tem um papel essencial no metabolismo de nitrogênio por catalisar a condensação de glutamato e amônio para formar glutamina (KUMADA et al., 1993). Por *western blot*, foi concluído que não há alteração no mecanismo de regulação pós traducional da GS entre a estirpe selvagem e a estirpe mutante *phbC* (FIGURA 10), mas a técnica não permite avaliar a expressão do gene *glnA*.

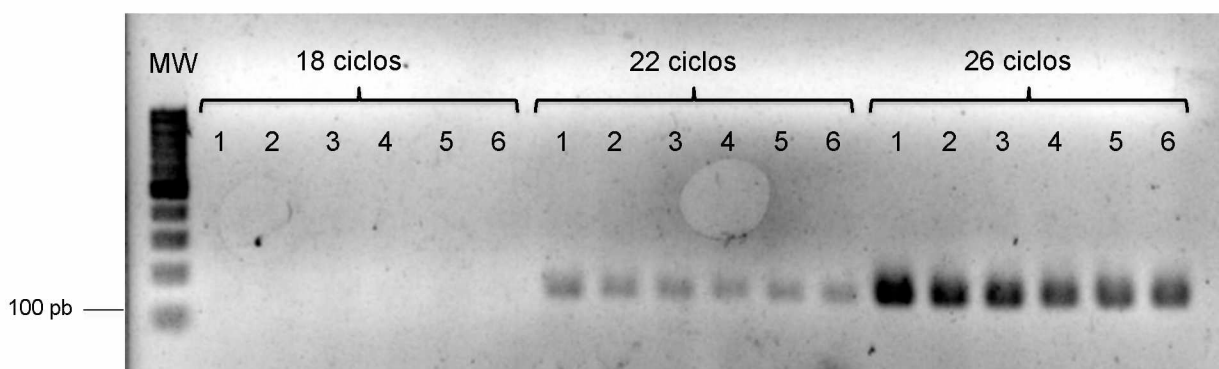
Em experimentos realizados com *E. coli*, Bren e colaboradores (2007) mostraram que a atividade do promotor de *glnA* (que codifica a enzima glutamina sintetase) sofre um aumento de 4 a 6 vezes uma geração antes do crescimento estacionar, em condições de limitação de nitrogênio. Quando o crescimento bacteriano entra na fase estacionária, a atividade do promotor volta a níveis mais baixos. O mesmo não ocorre quando há amônio em excesso no meio (18,7 mM). Os autores sugerem que esse aumento de expressão possibilita que a bactéria tenha seu crescimento estendido por mais uma geração, utilizando os substratos que estão escassos. Se houver uma alteração nesse mecanismo, é possível que a bactéria não seja capaz de crescer por um período mais prolongado.

Em *A. brasilense*, a síntese de GS é apenas parcialmente reprimida por concentrações altas de amônio intracelular, além da sua atividade ser modulada por adenililação (WESTBY et al., 1987; DE ZAMAROCZY; DELORME; ELMERICH,

1990). A expressão de *glnA* pode ocorrer em conjunto àquela de *glnB*, em um mRNA *glnB-glnA*, ou separadamente, formando um mRNA do gene *glnA* apenas. O gene é predominantemente transcrito isoladamente, em diferentes condições de nutrientes e disponibilidade de nitrogênio. Em condições de fixação de nitrogênio, *glnA* é transcrito quase que exclusivamente em conjunto com *glnB*. Isso é possível pois a expressão dos genes é regulada por diferentes promotores (DE ZAMAROCZY; DELORME; ELMERICH, 1990). Após o choque de amônio, a transcrição do gene passa a ser realizada isoladamente. Porém, em altas concentrações de amônio, observa-se uma repressão dos dois tipos de transcritos. Isso leva a uma diminuição da expressão de *glnA* no geral (DE ZAMAROCZY; DELORME; ELMERICH, 1990).

A FIGURA 15 mostra o gel de agarose com as amostras amplificadas por PCR utilizando os *primers* para o gene *glnA*. O experimento foi repetido três vezes e não houve diferença notável observada entre a intensidade das bandas das seis amostras. Não é possível observar diferenças de expressão de *glnA* antes e após choque de amônio, mas é possível observar um perfil de expressão similar entre as estirpes. Tanto a expressão quanto a regulação pós traducional da GS parecem ter o mesmo perfil em FP2 e no mutante *phbC*.

FIGURA 15 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *glnA* A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE *phbC* DE *A. brasilense*



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE das amostras obtidas da amplificação de fragmento do gene *glnA* utilizando cDNA como molde e diferentes ciclos de amplificação. Linhas 1, 3 e 5 correspondem a amostras da estirpe selvagem FP2 anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. Linhas 2, 4 e 6 correspondem a amostras da estirpe mutante *phbC* anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. A linha MW indica o marcador de massa molecular (100 bp ladder) e o fragmento de 100 pb está indicado. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida em sistema UVP.

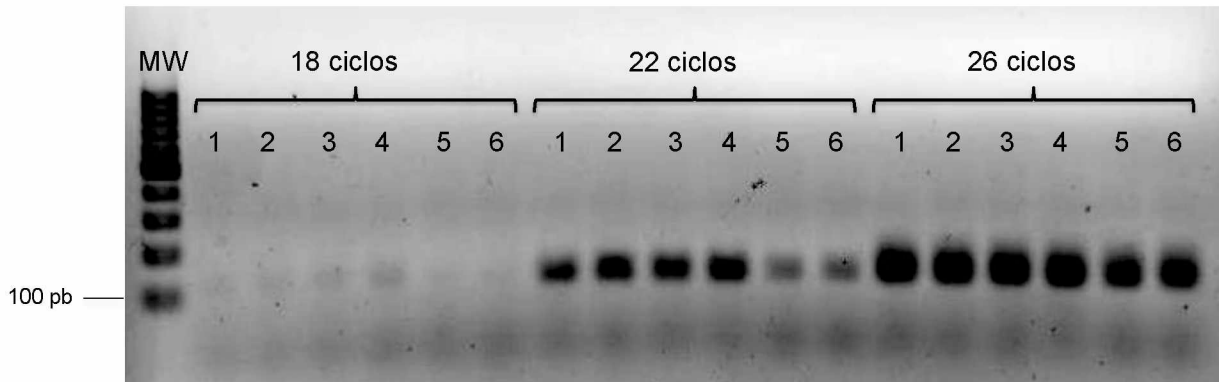
O próximo gene a ser avaliado foi o *glnB*, que codifica para uma das proteínas P_{II} de *A. brasilense*. Já foi observado que a expressão de *glnB* é menor em condições de excesso de amônio em *A. brasilense* (DE ZAMAROCZY; DELORME; ELMERICH, 1990; DE ZAMAROCZY; PAQUELIN; ELMERICH, 1993). Em *A. brasilense*, o gene *glnB* é transcrito exclusivamente em conjunto com *glnA*, não sendo encontrado como um transcrito único. Sua expressão é maior em condições de fixação de nitrogênio e menor em altas concentrações de amônio, devido à ativação de diferentes promotores em diferentes condições de nitrogênio (DE ZAMAROCZY; DELORME; ELMERICH, 1990).

GlnB tem papel central no sistema de regulação do metabolismo de nitrogênio (Ntr), funcionando como uma molécula sinalizadora dos níveis de nitrogênio e carbono (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001; HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013). A proteína sofre regulação pós-traducional através da uridililação por GlnD, em condições de limitação de nitrogênio. GlnD é uma proteína bifuncional e, em excesso de nitrogênio, GlnD desuridilila PII-UMP. Tanto a forma uridililada quanto a desuridililada de PII podem interagir com diversas proteínas em resposta a variações no nível de nitrogênio (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001).

Em *A. brasilense*, GlnB também é responsável pelo controle da atividade de NifA, proteína essencial para a transcrição dos genes *nif* (DE ZAMAROCZY; PAQUELIN; ELMERICH, 1993; ARSENE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996). Sem a expressão de *glnB*, não ocorre fixação de nitrogênio, pois NifA não é ativada. Consequentemente, não há expressão dos genes necessários para a fixação de nitrogênio (ARSENE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996).

A FIGURA 16 mostra que há maior expressão de *glnB* em condições de fixação de nitrogênio e até 5 minutos após o choque de amônio, mas 30 minutos após o choque há uma diminuição significativa na sua expressão. Esse padrão é melhor observado nas amostras retiradas após 22 ciclos. Esse é o perfil esperado já que a síntese de GlnB é reprimida quando há excesso de nitrogênio (DE ZAMAROCZY; DELORME; ELMERICH, 1990). Tanto a estirpe FP2 quanto o mutante *phbC* mostram um perfil similar de expressão de *glnB* indicando, portanto, que não há influência da síntese de PHB no processo .

FIGURA 16 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *glnB* A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE *phbC* DE *A. brasilense*



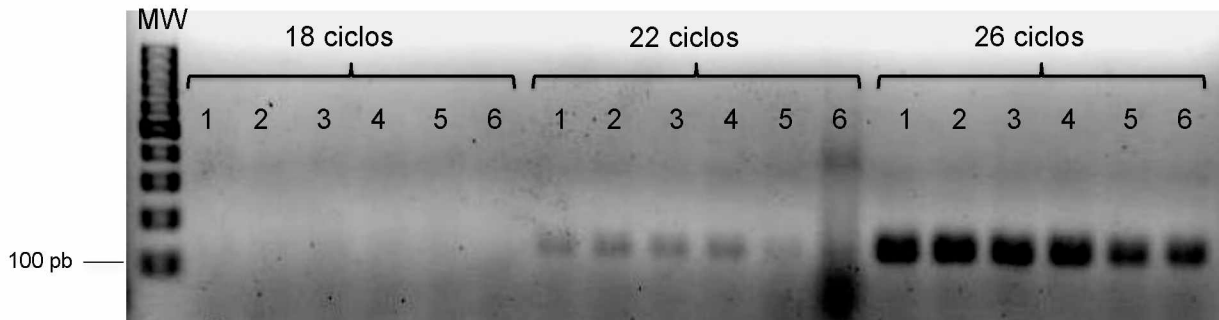
FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE das amostras obtidas da amplificação de fragmento do gene *glnB* utilizando cDNA como molde e diferentes ciclos de amplificação. Linhas 1, 3 e 5 correspondem a amostras da estirpe selvagem FP2 anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. Linhas 2, 4 e 6 correspondem a amostras da estirpe mutante *phbC* anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. A linha MW indica o marcador de massa molecular (100 bp ladder) e o fragmento de 100 pb está indicado. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida em sistema UVP.

O gene *glnZ* codifica para a outra proteína P_{II} de *A. brasilense*, denominada de GlnZ (DE ZAMAROCZY et al., 1996). Diferentemente de GlnB, a presença de GlnZ não é essencial para o processo de fixação de nitrogênio (DE ZAMAROCZY, 1998). GlnB e GlnZ têm semelhanças estruturais, mas estão envolvidas em processos regulatórios diferentes (DE ZAMAROCZY, 1998). A expressão de *glnZ* é monocitrônica e é maior em condições de fixação de nitrogênio, devido à regulação da expressão gênica pelo sistema Ntr, que responde ao estado de nitrogênio da célula (DE ZAMAROCZY, 1998). GlnZ regula negativamente a captação de amônio por AmtB (DE ZAMAROCZY, 1998) e é necessária para a reativação de NifH por DraG (KLASSEN et al., 2001; HUERGO, 2006). Ambas proteínas P_{II}, GlnB e GlnZ, estão envolvidas no crescimento de *A. brasilense*. Um duplo mutante *glnB-glnZ* mostrou deficiência em crescimento quando comparado com a estirpe selvagem, principalmente em meio de cultivo em baixas concentrações de amônio (DE ZAMAROCZY, 1998).

A FIGURA 17 mostra o padrão de expressão de *glnZ* em *A. brasilense* FP2 e no mutante *phbC*. Em 30 minutos após o choque de amônio é possível observar uma diminuição na expressão do gene, notável nas amostras retiradas após 22 e 26 ciclos de PCR. Os resultados mostram uma diminuição de expressão similar em ambas as estirpes, o que indica não haver variação na expressão de *glnZ* no mutante *phbC*.

FIGURA 17 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *glnZ* A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE *phbC* DE *A. brasilense*



FONTE: O autor (2018).

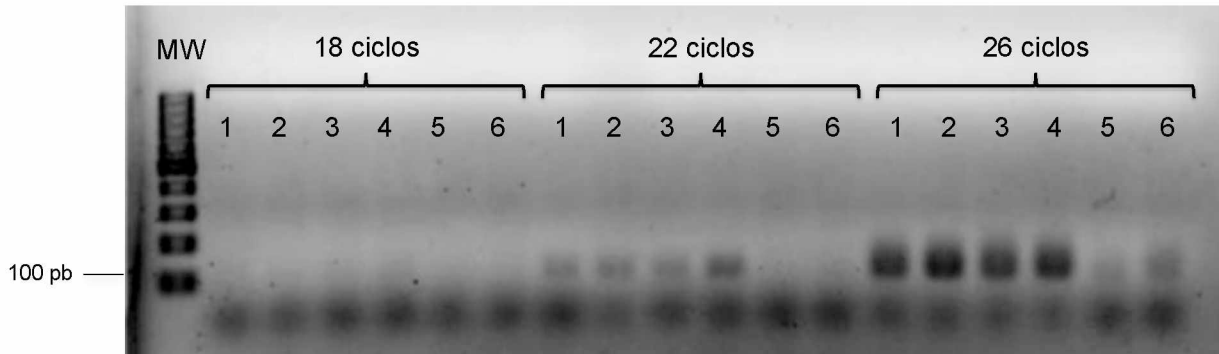
LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE das amostras obtidas da amplificação de fragmento do gene *glnZ* utilizando cDNA como molde e diferentes ciclos de amplificação. Linhas 1, 3 e 5 correspondem a amostras da estirpe selvagem FP2 anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. Linhas 2, 4 e 6 correspondem a amostras da estirpe mutante *phbC* anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. A linha MW indica o marcador de massa molecular (100 bp ladder) e o fragmento de 100 pb está indicado. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida em sistema UVP.

Outro gene envolvido no sistema Ntr é o *amtB*, que codifica para a proteína transportadora de amônio AmtB. Essa proteína é necessária para que o amônio seja transportado para o interior das células em condições de limitação de nitrogênio. Em condições de excesso de nitrogênio, o transporte de amônio ocorre principalmente por difusão pela membrana (KLEINER, 1985).

Huergo e colaboradores (2006) mostraram que após choque de amônio, AmtB interage com GlnZ e DraG e não é capaz de realizar transporte de amônio devido ao seu bloqueio. Além disso, a síntese de AmtB é regulada pelo sistema Ntr, já que em mutantes *ntrB* e *ntrC* não há transporte de amônio através do transportador (MILCAMPS et al., 1996). Por haver regulação pelo sistema Ntr, a expressão de *amtB* também responde a níveis de nitrogênio intracelulares.

A FIGURA 18 mostra que há maior expressão de *amtB* antes do choque de amônio, e 30 minutos após o choque as bandas observadas no gel são muito menos intensas. Para esse gene, também não foi possível observar diferenças de expressão entre a estirpe selvagem e a estirpe mutante *phbC*.

FIGURA 18 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *amtB* A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE *phbC* DE *A. brasilense*



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE das amostras obtidas da amplificação de fragmento do gene *amtB* utilizando cDNA como molde e diferentes ciclos de amplificação. Linhas 1, 3 e 5 correspondem a amostras da estirpe selvagem FP2 anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. Linhas 2, 4 e 6 correspondem a amostras da estirpe mutante *phbC* anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. A linha MW indica o marcador de massa molecular (100 bp ladder) e o fragmento de 100 pb está indicado. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida em sistema UVP.

Todos os genes envolvidos no sistema Ntr e na regulação da fixação de nitrogênio parecem ter o mesmo padrão de expressão em *A. brasilense* FP2 e em *A. brasilense* mutante *phbC*. Esse perfil era o esperado já que não houve diferença nos resultados do ensaio de redução de acetileno a etileno. Portanto, os dados de expressão gênica são condizentes com aqueles de determinação da atividade nitrogenase.

5.6.4 Expressão de genes envolvidos no metabolismo de PHB

A expressão de genes relacionados ao metabolismo de PHB também foi avaliada, já que o mutante *phbC* não é capaz de sintetizar o polímero. A fim de avaliar a expressão gênica dos genes *phaA* e *phaB*, primeiramente foi feita uma análise dos genes envolvidos no metabolismo de PHB em *Azospirillum*. Os genes de *Ralstonia eutropha* H16 foram utilizados como base, já que o organismo é modelo para estudos relacionados à síntese de PHAs. O QUADRO 9 mostra os genes encontrados em *A. brasilense* Sp7 e sua localização no genoma, a partir de análise pela Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - KEGG (OGATA et al., 1999). Todos os genes *pha* de *R. eutropha* foram analisados em relação à sua similaridade com os genes de *A. brasilense*.

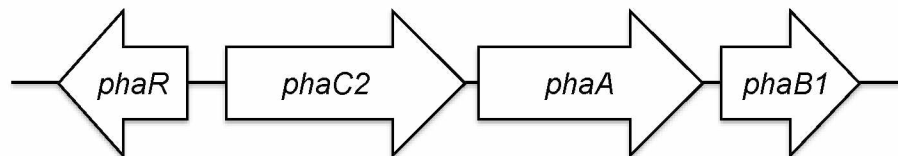
QUADRO 9 – DESCRIÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE PHB EM *A. brasilense* Sp7, QUANDO COMPARADOS COM AQUELES DE *R. eutropha* H16

Gene em <i>R. eutropha</i> H16	Gene correspondente em <i>A. brasilense</i> Sp7	Localização no genoma de <i>A. brasilense</i>
<i>phaA</i>	AMK58_26795	Plasmídeo ABSP7_p3
	AMK58_23235	Plasmídeo ABSP7_p2
	AMK58_19435	Plasmídeo ABSP7_p1
<i>phaB1</i>	AMK58_24020	Plasmídeo ABSP7_p2
	AMK58_26800	Plasmídeo ABSP7_p3
<i>phaC1</i>	AMK58_06740	Cromossomo
<i>phaC2</i>	AMK58_26790	Plasmídeo ABSP7_p3
<i>phaP1</i>	AMK58_17045	Plasmídeo ABSP7_p1
<i>phaZ1</i>	AMK58_13180	Cromossomo
<i>phaR</i>	AMK58_26785	Plasmídeo ABSP7_p3

FONTE: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (2018).

O plasmídeo ABSP7_p3 contém a maior parte dos genes, e eles estão organizados lado a lado, como mostra a FIGURA 19. Mesmo contendo os genes em conjunto, o gene similar a *phaC2* não foi aquele interrompido por Kadouri et al. (2002) que deu a origem ao mutante *phbC*. O gene mutado pelos autores é aquele que tem maior semelhança ao *phaC1* de *R. eutropha* e que está presente no cromossomo de *A. brasilense* Sp7. A expressão de *phbC* (similar a *phaC1*) parece ser monocistrônica. A descrição dos genes feita por Kadouri et al. (2002) não está precisa, e pode ser corrigida devido ao sequenciamento total da estirpe Sp7 de *A. brasilense*.

FIGURA 19 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE PHB NO PLASMÍDEO ABSP7_p3 DE *A. brasilense*



FONTE: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (2018).

LEGENDA: Organização dos genes *phaR*, *phaC2*, *phaA* e *phaB1* no genoma de *A. brasilense*. Os genes se encontram lado a lado no plasmídeo ABSP7_p3 e estão envolvidos no metabolismo de PHB.

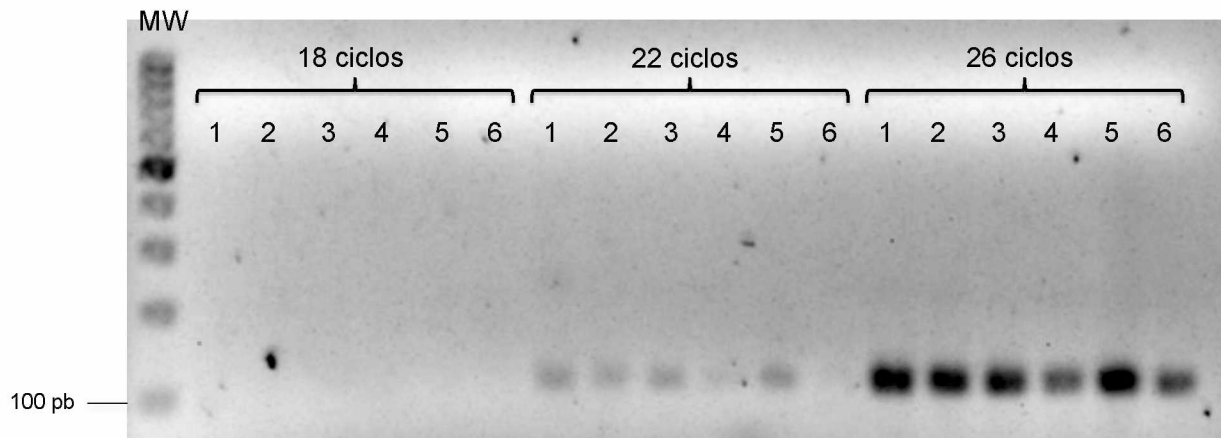
Em *Herbaspirillum seropedicae*, o mutante no gene *phaC1* também não é capaz de acumular PHB (TIRAPELLE et al., 2013). Quando complementado por

phaC2 ou *phaC3*, o mutante continua não sendo capaz de sintetizar o polímero, o que indica que o gene *phaC1* é essencial para a síntese de PHB na célula (BATISTA et al., 2016). O mesmo ocorre em *R. eutropha* (REINECKE; STEINBÜCHEL, 2009). Em *Bradyrhizobium japonicum*, a síntese de PHB é interrompida apenas quando o gene *phaC1* é mutado, mas não quando o mesmo é feito com *phaC2* (QUELAS et al., 2013).

Para a avaliação de expressão gênica, foram escolhidos os genes *phaA* e *phaB* que se encontram no plasmídeo ABSP7_p3, devido à proximidade em que se encontram e a presença de *phaR* na mesma região, responsável pela regulação do metabolismo de PHB. Em *R. eutropha*, a expressão de todos os genes envolvidos no metabolismo de PHB, excepto *phaP*, parece ser constitutiva (HAYWOOD; ANDERSON; DAWES, 1989; LAWRENCE et al., 2005). Em *A. brasilense*, a atividade da β -cetotiolase (codificada por *phaA*) é maior em culturas com menor concentração de NH_4Cl , em condições ideais para a síntese de PHB. Em culturas com NH_4Cl em excesso, a atividade da enzima é mais baixa (TAL; SMIRNOFF; OKON, 1990). O mesmo ocorre com a atividade da acetoacetil-CoA redutase, codificada pelo gene *phaB* (TAL; SMIRNOFF; OKON, 1990). Esses resultados indicam que a atividade das enzimas provavelmente é regulada pelo status de carbono e nitrogênio da célula.

A FIGURA 20 mostra a expressão do gene *phaA*, que codifica para a β -cetotiolase, enzima responsável pela condensação de duas moléculas de acetil-CoA anteriormente à síntese de PHB. Em *R. eutropha*, três genes são responsáveis pela maior parte da atividade da β -cetotiolase na síntese de PHB, incluindo os genes *phaA*, *bktB* e H16_A0170 (LINDENKAMP et al., 2010). Para a síntese dos *primers* utilizados para o gene *phaA* de *A. brasilense*, utilizou-se a sequência do gene que tem maior similaridade ao *phaA* de *R. eutropha* (AMK58_26795). A figura mostra que a expressão de *phaA* é menor na estirpe mutante *phbC* quando comparado com FP2. Essa diferença é mais marcante quando as amostras de *A. brasilense* mutante *phbC* em 5 e 30 minutos após choque de amônio retiradas após 22 e 26 ciclos (amostras 4 e 6) são analisadas. O mesmo experimento foi realizado duas vezes com resultados similares.

FIGURA 20 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *phaA* A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE *phbC* DE *A. brasilense*

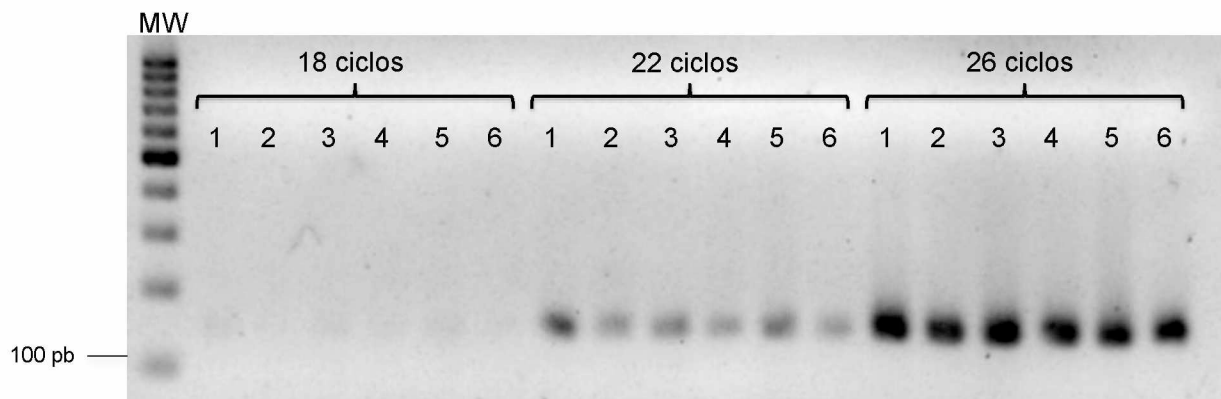


FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE das amostras obtidas da amplificação de fragmento do gene *phaA* utilizando cDNA como molde e diferentes ciclos de amplificação. Linhas 1, 3 e 5 correspondem a amostras da estirpe selvagem FP2 anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. Linhas 2, 4 e 6 correspondem a amostras da estirpe mutante *phbC* anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. A linha MW indica o marcador de massa molecular (100 bp ladder) e o fragmento de 100 pb está indicado. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida em sistema UVP.

A expressão de *phaB* parece ter o mesmo perfil, com diminuição de expressão do gene na estirpe mutante *phbC*. A FIGURA 21 mostra bandas menos intensas nas amostras de *A. brasilense* mutante *phbC* retiradas anteriormente ao choque de amônio, 5 e 30 minutos após (amostras 2, 4 e 6). Porém, quando comparados com aqueles resultados obtidos para o gene *phaA*, a diferença parece ser mais sutil. O experimento foi repetido três vezes, com resultados similares.

FIGURA 21 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *phaB* A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE *phbC* DE *A. brasilense*



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE das amostras obtidas da amplificação de fragmento do gene *phaB* utilizando cDNA como molde e diferentes ciclos de amplificação. Linhas 1, 3 e 5 correspondem a amostras da estirpe selvagem FP2 anterior ao choque,

5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. Linhas 2, 4 e 6 correspondem a amostras da estirpe mutante *phbC* anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. A linha MW indica o marcador de massa molecular (100 bp ladder) e o fragmento de 100 pb está indicado. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida em sistema UVP.

Em *R. eutropha*, os genes *phaB1* e *phaB2* são responsáveis pela maior atividade acetoacetil-CoA redutase da célula. A deleção desses genes faz com que a síntese de PHB seja bem menor. O gene *phaB1* parece ser mais importante, entretanto, pois sua deleção causa um efeito mais deletério na síntese de PHB (BUDDE et al., 2010). A deleção de *phaB1* também causa um aumento de expressão de *phaA*, indicando que deleções ou interrupções dos genes envolvidos com o metabolismo de PHB podem afetar a expressão de outros genes (BUDDE et al., 2010).

A expressão de *phaB* também pode ser afetada dependendo do meio de cultura utilizado. Em *Ralstonia eutropha*, foi observada uma diferente expressão de *phaB1* em diferentes condições. Quando as células foram cultivadas em presença de frutose, a expressão do gene se manteve constante. Em meio com trioleato, um ácido graxo, a expressão de *phaB1* aumentou em condições de limitação de nitrogênio (BUDDE et al., 2010).

A expressão dos genes envolvidos na síntese de PHB parece ser regulada negativamente no mutante *phbC*. A partir de análise de sequências promotoras utilizando o programa BPROM (SOLOVYEV; SALAMOV, 2011), há uma possível região promotora -35 e -10 anteriormente ao gene *phaA* mas não na região intergênica entre *phaA* e *phaB*, o que indica que os genes estão organizados em um operon. Com isso, faz sentido que a expressão gênica de ambos os genes seja menor, caso eles sejam regulados por um promotor em comum. Essa regulação pode ser explicada pela ação proteína regulatória PhaR, capaz de se ligar a regiões promotoras de genes envolvidos no metabolismo de PHB, agindo como um repressor transcricional (YORK; STUBBE; SINSKEY, 2002; MAEHARA et al., 2002; PÖTTER et al., 2002; KADOWAKI et al., 2011). PhaR também se liga aos grânulos de PHB, o que previne sua interação com as regiões promotoras dos genes envolvidos no metabolismo de PHB, conseqüentemente diminuindo sua função de repressor transcricional (PÖTTER et al., 2002; KADOWAKI et al., 2011; BATISTA et al., 2016). Como a estirpe mutante *phbC* não é capaz de sintetizar PHB, a repressão pelo regulador PhaR não é regulada pela ligação da proteína aos grânulos de PHB.

Com isso, a ação repressora de PhaR em células que não sintetizam PHB é mais forte, levando a uma diminuição da expressão gênica dos genes envolvidos no metabolismo de PHB. Portanto, a diminuição da expressão de *phaA* e *phaB* pode ser explicada pela ação de PhaR.

Os resultados indicam que a falta de síntese de PHB pode afetar a expressão gênica de outros genes envolvidos na síntese do polímero. A expressão dos genes envolvidos no metabolismo de PHB, portanto, pode estar sendo regulada pela presença ou ausência de outros genes envolvidos no metabolismo ou do produto desses genes.

5.6.5 Expressão de genes envolvidos no metabolismo e transporte de glutamato

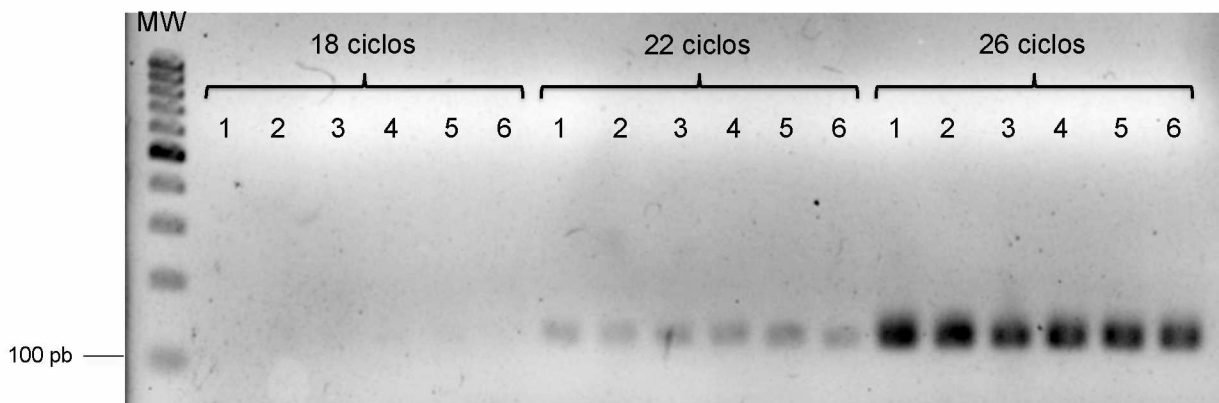
Como houveram diferenças no crescimento entre as estirpes selvagem FP2 e mutante *phbC* em glutamato, alguns genes relacionados ao metabolismo de glutamato foram escolhidos com base na literatura e nos efeitos que uma menor expressão desses genes poderia causar à célula.

Um desses genes é o *sucA* (gene AMK58_02560 em *A. brasilense*) que codifica para a 2-oxoglutarato desidrogenase, enzima envolvida no ciclo do ácido cítrico. O 2-oxoglutarato (2-OG) é um intermediário chave do ciclo do ácido cítrico, e age como o principal esqueleto de carbono em reações assimilatórias de nitrogênio (BUNIK; FERNIE, 2009). Ele está na interseção entre o metabolismo de carbono e de nitrogênio, conectando a função catabólica do ciclo do ácido cítrico com a função anabólica das reações assimilatórias de nitrogênio (HUERGO; DIXON, 2015). O 2-OG também está envolvido na sinalização celular, inclusive interagindo com proteínas P_{II} em resposta ao status de nitrogênio da célula (BUNIK; FERNIE, 2009; HUERGO; DIXON, 2015).

Em *Rhizobium leguminosarum*, o mutante *phaC* tem a atividade da 2-oxoglutarato desidrogenase diminuída para 38% da atividade da estirpe selvagem (WALSHAW et al., 1997). Em células mutantes em *sucA*, as concentrações intracelulares de 2-OG e de glutamato são afetadas. A concentração de glutamato em mutantes *sucA* de *R. leguminosarum* foi 13 vezes maior do que aquela da estirpe selvagem, e tanto 2-OG quanto glutamato são secretados pelas células. Isso sugere que uma parte do 2-OG acumulado pela mutação em *sucA* é convertido a glutamato (WALSHAW et al., 1997).

Devido a esses resultados, avaliamos a expressão de *sucA* em *A. brasilense* FP2 e no mutante *phbC*. A FIGURA 22 mostra que a expressão de *sucA* em ambas as estirpes parece ser similar. Para obter resultados mais conclusivos, seria necessário avaliar a atividade da enzima 2-OG desidrogenase em adição aos ensaios de expressão gênica. À princípio, não há alteração na expressão de *sucA* proveniente da falta de síntese da PHB sintase.

FIGURA 22 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *sucA* A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE *phbC* DE *A. brasilense*



FONTE: O autor (2018).

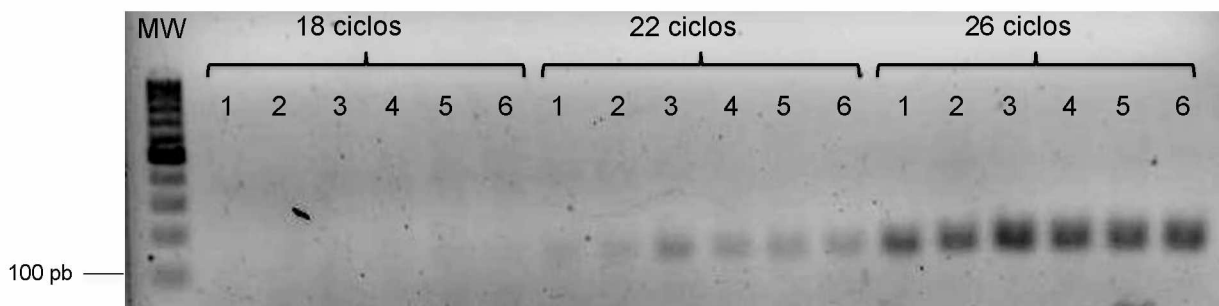
LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE das amostras obtidas da amplificação de fragmento do gene *sucA* utilizando cDNA como molde e diferentes ciclos de amplificação. Linhas 1, 3 e 5 correspondem a amostras da estirpe selvagem FP2 anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. Linhas 2, 4 e 6 correspondem a amostras da estirpe mutante *phbC* anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. A linha MW indica o marcador de massa molecular (100 bp ladder) e o fragmento de 100 pb está indicado. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida em sistema UVP.

A estirpe mutante *phbC* apresentou uma taxa de crescimento inferior quando comparada à estirpe selvagem quando cultivada em glutamato (GRÁFICO 2C). Desta forma, avaliamos a expressão gênica de *gdhA* (gene AMK58_22825 em *A. brasilense*), que codifica para a glutamato desidrogenase. A glutamato desidrogenase é uma das enzimas responsáveis pela síntese de glutamato a partir de amônio e 2-oxoglutarato, além da GOGAT (HUERGO; DIXON, 2015). Como a síntese de glutamato está diretamente envolvida aos níveis de 2-OG na célula, a hipótese de que há maior síntese de glutamato no mutante *phbC* foi testada através da avaliação de expressão gênica de *gdhA*. Como pode ser observado na FIGURA 23, não há alterações significativas entre as amostras de FP2 e do mutante *phbC*, indicando não haver diferenças na expressão do gene. Portanto, se há alterações no metabolismo de 2-OG e de glutamato, elas não podem ser observadas através da

avaliação da expressão gênica. Seria necessária uma quantificação de metabólitos para obter resultados mais conclusivos.

Em *Botrytis cinerea*, a expressão de *gdhA* é regulada pela fonte de nitrogênio adicionada ao meio (SANTOS et al., 2001). Níveis altos de expressão foram vistos em meio com asparagina como fonte de nitrogênio, enquanto a transcrição foi menor em cultivo com glutamato ou amônio (SANTOS et al., 2001). Se o mesmo for verdade em *A. brasilense*, não esperaríamos observar diferenças na expressão do gene antes e depois do choque de amônio.

FIGURA 23 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *gdhA* A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE *phbC* DE *A. brasilense*



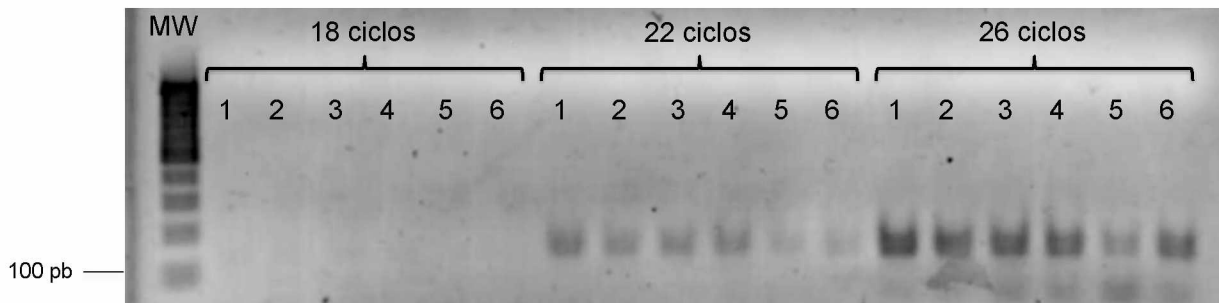
FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE das amostras obtidas da amplificação de fragmento do gene *gdhA* utilizando cDNA como molde e diferentes ciclos de amplificação. Linhas 1, 3 e 5 correspondem a amostras da estirpe selvagem FP2 anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. Linhas 2, 4 e 6 correspondem a amostras da estirpe mutante *phbC* anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. A linha MW indica o marcador de massa molecular (100 bp ladder) e o fragmento de 100 pb está indicado. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida em sistema UVP.

O último gene a ser avaliado quanto à sua expressão gênica foi o *gltK* (gene AMK58_07655 em *A. brasilense*), que codifica para um transportador de glutamato. Como células do mutante *phbC* têm uma menor taxa de crescimento em glutamato do que a estirpe selvagem, levantou-se a hipótese de que o transporte de glutamato não era tão eficiente. Em dados de transcriptoma de *Herbaspirillum seropedicae* comparando a estirpe selvagem SmR1 e o mutante *phaC*, o gene *gltK* é 5 vezes mais expresso na estirpe selvagem (BATISTA et al., 2018). Por isso, testamos se o mesmo era verdade comparando as estirpes de *A. brasilense*. A FIGURA 24 mostra que a expressão do gene tem um perfil similar em *A. brasilense* FP2 e no mutante *phbC*. A expressão do gene parece ser reprimida 30 minutos após o choque de amônio, do mesmo modo que ocorre com *amtB*. A partir de experimentos de PCR

semi quantitativa, não é possível demonstrar diferenças na expressão do gene entre FP2 e o mutante *phbC*, que podem ser mais sutis.

FIGURA 24 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *gltK* A PARTIR DO cDNA DAS ESTIRPES SELVAGEM FP2 E MUTANTE *phbC* DE *A. brasilense*



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE das amostras obtidas da amplificação de fragmento do gene *gltK* utilizando cDNA como molde e diferentes ciclos de amplificação. Linhas 1, 3 e 5 correspondem a amostras da estirpe selvagem FP2 anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. Linhas 2, 4 e 6 correspondem a amostras da estirpe mutante *phbC* anterior ao choque, 5 e 30 minutos após o choque, respectivamente. A linha MW indica o marcador de massa molecular (100 bp ladder) e o fragmento de 100 pb está indicado. O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida em sistema UVP.

Considerando os resultados de avaliação da expressão gênica, as únicas diferenças observadas entre a estirpe selvagem FP2 e a estirpe mutante *phbC* são em relação aos genes envolvidos no metabolismo de PHB. Em *R. eutropha*, a expressão dos genes parece ser constitutiva (HAYWOOD; ANDERSON; DAWES, 1989; LAWRENCE et al., 2005). Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que a expressão dos genes *phaA* e *phaB* varia de acordo com a presença da PHB sintetase e do próprio polihidroxibutirato (FIGURAS 20 e 21). Como não há síntese da PHB devido à interrupção do gene *phbC*, a expressão de *phaA* e *phaB* é diminuída. Essa diminuição de expressão pode ser explicada pela ação da proteína regulatória PhaR.

A expressão dos genes relacionados ao sistema Ntr, à fixação de nitrogênio e ao metabolismo de glutamato parecem ter o mesmo perfil de expressão nas duas estirpes analisadas. Unindo os resultados de análise de expressão gênica à determinação da atividade nitrogenase e à análise do padrão de adenililação da GS, é possível concluir que o funcionamento do sistema Ntr não é afetado pela interrupção do gene *phbC* e pela falta de síntese de PHB.

Os resultados obtidos para *A. brasilense* são diferentes daqueles obtidos em mutantes para a síntese de PHB em *Azorhizobium caulinodans* e *Rhizobium etli*.

Enquanto o mutante em *A. caulinodans* não é capaz de fixar nitrogênio (MANDON et al., 1998), o mutante em *R. etli* fixa nitrogênio em maiores quantidades e leva a uma maior promoção de crescimento em plantas (CEVALLOS et al., 1996). Isso fortalece o fato de que a falta do metabolismo de PHB tem efeitos distintos em espécies bacterianas diferentes e que não é possível prever os efeitos que a ausência do polímero possa causar em diferentes espécies de bactéria.

A capacidade de *A. brasilense* de fixar nitrogênio não é o fator principal que faz com que o crescimento de plantas inoculadas com a bactéria seja mais eficiente (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Porém, o processo é essencial para que a bactéria consiga prosperar na rizosfera. Experimentos comparando a capacidade do mutante *phbC* em promover crescimento de plantas com a estirpe selvagem Sp7 mostraram que não há diferenças nos efeitos causados nas plantas quando inoculadas com as duas estirpes bacterianas (KADOURI et al., 2002). Entretanto, os resultados foram obtidos em laboratório e podem não refletir a real condição da rizosfera, já que o ambiente é mais competitivo. Por não serem capazes de resistir a diferentes estresses tão bem quanto a estirpe selvagem, as bactérias da estirpe mutante podem ter menor vantagem em ambientes competitivos (KADOURI et al., 2002). Entretanto, o fato de serem capazes de fixar nitrogênio em taxas similares às daquelas da estirpe selvagem faz com que as células do mutante *phbC* sejam capazes de sobreviver em condições onde nitrogênio é um nutriente limitante, e que essa desvantagem não seja tão decisiva na sobrevivência da bactéria.

Neste trabalho avaliamos o efeito da inativação do gene *phbC* no crescimento celular, na atividade das enzimas glutamina sintetase e nitrogenase, e na expressão de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio e PHB. O mutante de *A. brasilense* que não é capaz de produzir PHB apresenta maior dificuldade em crescer sob condições limitantes de amônio ou em glutamato, mas os resultados apresentados não permitiram determinar a razão. Nossos resultados mostraram, no entanto, que a ausência de síntese PHB em *A. brasilense* não interfere com a atividade da nitrogenase ou na regulação pós-traducional da glutamina sintetase, assim como na expressão dos genes *nifH*, *glnA*, *glnB*, *glnZ*, *amtB*, *sucA*, *gdhA* e *gltK*. A expressão dos genes *phaA* e *phaB*, envolvidos no metabolismo de PHB, parece ser afetada pela ausência da síntese de PHB.

6 CONCLUSÕES

- A interrupção e consequente inativação do gene *phbC* em *Azospirillum brasilense* leva a uma menor taxa de crescimento bacteriano em meio líquido contendo baixas concentrações de amônio ou glutamato.
- A complementação plasmidial do gene *phbC* faz com que a estirpe mutante *phbC* de *Azospirillum brasilense* se torne capaz de sintetizar PHB.
- Quando feita a complementação plasmidial do gene *phbC*, a bactéria é capaz de sintetizar mais PHB do que a estirpe mutante FP2, mas essa maior síntese afeta sua taxa de crescimento tanto em concentrações altas quanto baixas de amônio.
- Não há diferenças significativas entre a capacidade de *A. brasilense* FP2 e *A. brasilense* mutante *phbC* de fixar nitrogênio, o que sugere não haver um desbalanço energético severo na estirpe mutante.
- O padrão de adenilação da glutamina sintetase em ambas as estirpes (FP2 e mutante *phbC*) mostrou-se semelhante quando realizado choque de amônio.
- Não há diferença no padrão de expressão de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio quando as duas estirpes são comparadas.
- No mutante *phbC*, parece haver menor transcrição de genes envolvidos na síntese de PHB (*phaA* e *phaB*), em resposta à ausência da síntese de PHB.
- Genes envolvidos no metabolismo e transporte de glutamato não têm sua expressão alterada em resposta à inativação de *phbC*.

REFERÊNCIAS

- ALVES, L. P. S. et al. A simple and efficient method for poly-3-hydroxybutyrate quantification in diazotrophic bacteria within 5 minutes using flow cytometry. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [s.l.], v. 50, n. 1, 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20165492>.
- ANEJA, P.; ZACHERTOWSKA, A.; CHARLES, T C. Comparison of the symbiotic and competition phenotypes of *Sinorhizobium meliloti* PHB synthesis and degradation pathway mutants. **Canadian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 51, n. 7, p.599-604, jul. 2005. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/w05-042>.
- ARANDA, P. S.; LAJOIE, D. M.; JORCYK, C. L. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. **Electrophoresis**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.366-369, jan. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201100335>.
- ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 65, n. 1, p. 80–105, mar. 2001.
- ARSENE, F; A KAMINSKI, P; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 178, n. 16, p.4830-4838, ago. 1996. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.178.16.4830-4838.1996>.
- BABEL, W.; ACKERMANN, J.; BREUER, U. Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). **Biopolyesters**, [s.l.], p.125-157, 2001. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1007/3-540-40021-4_4.
- BATISTA, M. B. et al. Potentiality of *Herbaspirillum seropedicae* as a Platform for Bioplastic Production. **Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability**, [s.l.], p.23-39, 2016. Springer Singapore. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-2555-6_2.
- BATISTA, M. B. et al. PHB Biosynthesis Counteracts Redox Stress in *Herbaspirillum seropedicae*. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 9, p.1-12, 15 mar. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.00472>.
- BATTESTI, A.; MAJDALANI, N.; GOTTESMAN, S. The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 65, n. 1, p.189-213, 13 out. 2011. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102946>.
- BARBER, D. A.; GUNN, K. B. The effect of mechanical forces on the exudation of organic substances by the roots of cereal plants grown under sterile conditions. **New Phytologist**, [s.l.], v. 73, n. 1, p.39-45, jan. 1974. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1974.tb04604.x>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 72, n. 1-2, p.248-254, maio 1976. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BREN, A. et al. The last generation of bacterial growth in limiting nutrient. **Bmc Systems Biology**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.27-35, 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-7-27>.

BUDDE, C. F. et al. Roles of Multiple Acetoacetyl Coenzyme A Reductases in Polyhydroxybutyrate Biosynthesis in *Ralstonia eutropha* H16. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 192, n. 20, p.5319-5328, 20 ago. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00207-10>.

BUNIK, V. I.; FERNIE, A. R. Metabolic control exerted by the 2-oxoglutarate dehydrogenase reaction: a cross-kingdom comparison of the crossroad between energy production and nitrogen assimilation. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 422, n. 3, p.405-421, 15 set. 2009. Portland Press Ltd. <http://dx.doi.org/10.1042/bj20090722>.

CANFIELD, D. E.; KRISTENSEN, E.; THAMDRUP, B. The Nitrogen Cycle. **Advances In Marine Biology**, [s.l.], p.205-267, 2005. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2881\(05\)48007-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2881(05)48007-4).

CEVALLOS, M. A. et al. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly-beta-hydroxybutyrate. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 178, n. 6, p.1646-1654, mar. 1996. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.178.6.1646-1654.1996>.

DAWES, E. A.; SENIOR, P. J. The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms. **Advances In Microbial Physiology Volume 10**, [s.l.], p.135-266, 1973. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60088-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60088-0).

DE ZAMAROCZY, M.; DELORME, F.; ELMERICH, C. Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum brasilense*. **Molecular And General Genetics Mgg**, [s.l.], v. 224, n. 3, p.421-430, dez. 1990. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00262437>.

DE ZAMAROCZY, M; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 9, p. 2507–2515, 1993.

DE ZAMAROCZY, M. et al. Coexistence of two structurally similar but functionally different P_{II} proteins in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 14, p. 4143– 4149, 1996.

DE ZAMAROCZY, M. Structural homologues P_{II} and P_z of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signalling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.449-463, jul. 1998. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00938.x>.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 2, n. 8, p.621-631, ago. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro954>.

DOBBELAERE, S. et al. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol.* **28**: 871–879. 2001

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON W.E.; NYMAN, C.J. (Eds). *Intl. Symp. Nitrogen Fixation*. Pullman: USA: Washington Univ. Press, v.2, p.518-538, 1976.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. **Nitrogen-fixing Bacteria in Nonleguminous Crop Plants**. Madison, WO: Science Tech, Inc., 1987. 155 p.

FALLIK, E.; OKON, Y.; FISCHER, M. The effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on metabolic enzyme activity in maize root seedlings. **Symbiosis**, 6, p.17-28, 1988.

FORCHHAMMER, K. PII signal transducers: novel functional and structural insights. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 65–72, 2008.

GERHARDT, E. C. M. Regulação Pós-Traducional Da Enzima Nitrogenase Em *Azospirillum brasilense*. **Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.**, p. 1–128, 2012.

GERSON, T.; PATEL, J. J.; WONG, M. N. The Effects of Age, Darkness and Nitrate on Poly- β -hydroxybutyrate Levels and Nitrogen-Fixing Ability of *Rhizobium* in *Lupinus angustifolius*. **Physiologia Plantarum**, [s.l.], v. 42, n. 4, p.420-424, abr. 1978. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1978.tb04107.x>.

GREENSPAN, P.; MAYER, E. P.; FOWLER, S. D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. **The Journal Of Cell Biology**, [s.l.], v. 100, n. 3, p.965-973, 1 mar. 1985. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.100.3.965>.

GOWRI, P. M.; SRIVASTAVA, S. Encapsulation as a response of *Azospirillum brasilense* sp7 to zinc stress. **World Journal Of Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.319-322, jul. 1996. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00340207>.

HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 57, n. 1, p.1-6, jan. 1989.

HUERGO, L. F. et al. Regulation of *glnB* gene promoter expression in *Azospirillum brasilense* by the NtrC protein. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 223, n. 1, p.33-40, jun. 2003. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097\(03\)00346-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097(03)00346-x).

HUERGO, L. F. et al. Effect of the over-expression of PII and PZ proteins on the nitrogenase activity of *Azospirillum brasilense*. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 253, n. 1, p.47-54, dez. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.026>.

HUERGO, L. F. et al. Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. **Febs Letters**, [s.l.], v. 580, n. 22, p.5232-5236, 5 set. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.054>.

HUERGO, L. F. Regulação do Metabolismo de Nitrogênio em *Azospirillum brasilense*. **Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná**, 2006.

HUERGO, L. F. et al. In Vitro Interactions between the P_{II} Proteins and the Nitrogenase Regulatory Enzymes Dinitrogenase Reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) and Dinitrogenase Reductase-activating Glycohydrolase (DraG) in *Azospirillum brasilense*. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 284, n. 11, p.6674-6682, 8 jan. 2009. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m807378200>.

HUERGO, L. F.; CHANDRA, G.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 37, n. 2, p.251-283, mar. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00351.x>.

HUERGO, L. F.; DIXON, R. The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 79, n. 4, p.419-435, 30 set. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/membr.00038-15>.

ITZIGSOHN, R.; YARDEN, O.; OKON, Y. Polyhydroxyalkanoate analysis in *Azospirillum brasilense*. **Canadian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 41, n. 13, p.73-76, 15 dez. 1995. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/m95-171>.

JENDROSSEK, D. Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 191, n. 10, p.3195-3202, 6 mar. 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.01723-08>.

KADOURI, D. et al. Identification and Isolation of Genes Involved in Poly(β -Hydroxybutyrate) Biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and Characterization of a *phbC* Mutant. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 68, n. 6, p.2943-2949, 1 jun. 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.6.2943-2949.2002>.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Involvement of the Reserve Material Poly- β -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root

Colonization. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 69, n. 6, p.3244-3250, 1 jun. 2003a. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.6.3244-3250.2003>.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Poly- β -hydroxybutyrate depolymerase (PhaZ) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a phaZ mutant. **Archives Of Microbiology**, [s.l.], v. 180, n. 5, p.309-318, 1 nov. 2003b. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-003-0590-z>.

KADOURI, D. et al. Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Critical Reviews In Microbiology**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.55-67, jan. 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408410590899228>.

KADOWAKI, M. A. S. et al. Identification and characterization of PhbF: A DNA binding protein with regulatory role in the PHB metabolism of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. **Bmc Microbiology**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.230-238, 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-11-230>.

KHADEMI, S.; O'CONNELL, J.; REMIS, J. et al. Mechanism of Ammonia Transport by Amt/MEP/Rh: Structure of AmtB at 1.35 Å. **Science**, v. 305, n. 5690, p. 1587–1594, 2004.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 40, n. 2, p.607-619, fev. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.389-397, 18 jan. 1994. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi00168a001>.

KLASSEN, G. et al. Control of Nitrogenase Reactivation by the GlnZ Protein in *Azospirillum brasilense*. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 183, n. 22, p.6710-6713, 15 nov. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.183.22.6710-6713.2001>.

KLASSEN, G. et al. Nitrogenase Switch-Off by Ammonium Ions in *Azospirillum brasilense* Requires the GlnB Nitrogen Signal-Transducing Protein. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 71, n. 9, p.5637-5641, 1 set. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.9.5637-5641.2005>.

KLEINER, D. Bacterial ammonium transport. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, n. 2, p. 87–100, 1985.

KUMADA, Y. et al. Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 90, n. 7, p.3009-3013, 1 abr. 1993. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.7.3009>.

KOVACH, M. E. et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **Gene**, [s.l.], v. 166, n.

1, p.175-176, dez. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00584-1](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(95)00584-1).

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, [s.l.], v. 227, n. 5259, p.680-685, 15 ago. 1970. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.

LAWRENCE, A. G. et al. Transcriptional analysis of *Ralstonia eutropha* genes related to poly-(R)-3-hydroxybutyrate homeostasis during batch fermentation. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 68, n. 5, p.663-672, 28 maio 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-1969-3>.

LINDENKAMP, N. et al. Impact of Multiple β -Ketothiolase Deletion Mutations in *Ralstonia eutropha* H16 on the Composition of 3-Mercaptopropionic Acid-Containing Copolymers. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 76, n. 16, p.5373-5382, 2 jul. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01058-10>.

MACHADO, H.B.; YATES, M.G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of *nifR3*-like-*ntrB-ntrC* operon and are negatively regulated. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p.674-684, 1995

MAEHARA, A. et al. A Repressor Protein, PhaR, Regulates Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthesis via Its Direct Interaction with PHA. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 184, n. 14, p.3992-4002, 15 jul. 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.184.14.3992-4002.2002>.

MAGASANIK, B. Reversible phosphorylation of an enhancer binding protein regulates the transcription of bacterial nitrogen utilization genes. **Trends In Biochemical Sciences**, [s.l.], v. 13, n. 12, p.475-479, dez. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0968-0004\(88\)90234-4](http://dx.doi.org/10.1016/0968-0004(88)90234-4).

MANDON, K. et al. Poly-beta-hydroxybutyrate turnover in *Azorhizobium caulinodans* is required for growth and affects *nifA* expression. **J. Bacteriol**, [s.l.], v. 180, n. 19, p.5070-5076, out. 1998.

MILCAMP, A. et al. The *Azospirillum brasilense rpoN* gene is involved in nitrogen fixation, nitrate assimilation, ammonium uptake, and flagellar biosynthesis. **Canadian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 42, n. 5, p.467-478, maio 1996. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/m96-064>.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.203-223, abr. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x>.

OGATA, H. et al. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.29-34, 1 jan. 1999. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/27.1.29>.

OKON, Y.; ALBRECHT, S. L.; BURRIS, R. H. Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferum*. **Journal Of Bacteriology**, S.I., v. 128, n. 2, p.592-597, nov. 1976.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 103, n. 2-4, p.131-139, dez. 1992. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90302-5](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097(92)90302-5).

PEDROSA, F. O.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr (gln)* type gene products. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.95-101, jun. 1984. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1984.tb01042.x>.

PEDROSA, F. O.; ELMERICH, C. Regulation of nitrogen fixation and ammonia assimilation in associative and endophytic nitrogen fixing bacteria. In: ELMERICH, C.; NEWTON, W. E.. **Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations**. [s.l.]: Springer, 2007. p. 41-72.

PÖTTER, M. et al. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology**, [s.l.], v. 148, n. 8, p.2413-2426, 1 ago. 2002. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-148-8-2413>.

QUELAS, J. I. et al. Analysis of Two Polyhydroxyalkanoate Synthases in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 195, n. 14, p.3145-3155, 10 maio 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.02203-12>.

REINECKE, F.; STEINBÜCHEL, A. *Ralstonia eutropha* Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. **Journal Of Molecular Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 16, n. 1-2, p.91-108, 2009. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000142897>.

REITZER, L. Nitrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 57, p.155-176, out. 2003.

RILEY, P. A. Melanin. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 29, n. 11, p.1235-1239, nov. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725\(97\)00013-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725(97)00013-7).

RUIZ, J. A.; LÓPEZ, N. I.; MÉNDEZ, B. S. RpoS Gene Expression in Carbon-Starved Cultures of the Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Species *Pseudomonas oleovorans*. **Current Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 6, p.396-400, jun. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-003-4183-5>

SADASIVAN, L.; NEYRA, C. A. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 163, n. 2, p.716-723, ago. 1985.

SADASIVAN, L.; NEYRA, C. A. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 169, n. 4, p.1670-1677, abr. 1987. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.169.4.1670-1677.1987>.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning, A Laboratory Manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, M. et al. Characterization of the *gdhA* Gene from the Phytopathogen *Botrytis cinerea*. **Fungal Genetics And Biology**, [s.l.], v. 34, n. 3, p.193-206, dez. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/fgbi.2001.1298>.

SCHUTT, H.; HOLZER, H. Biological Function of the Ammonia-Induced Inactivation of Glutamine Synthetase in *Escherichia coli*. **European Journal Of Biochemistry**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.68-72, mar. 1972. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1972.tb01740.x>.

SHAPIRO, B. M.; STADTMAN, E.R. Glutamine synthetase deadenylylating enzyme. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.32-37, jan. 1968. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291x\(68\)90708-0](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291x(68)90708-0).

SOLOVYEV, V.; SALAMOV, A. Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In: LI, R. W. **Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies**. [s.i]: Nova Science Publishers, 2011. Cap. 4. p. 61-78.

SPRENT, J. I. The biology of nitrogen transformations. **Soil Use And Management**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.74-77, jun. 1990. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1475-2743.1990.tb00806.x>.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 24, n. 4, p.487-506, out. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x>.

STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: BYRAM, D. **Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources**. New York: Stockton, 1991. p. 124-213.

TAL, S.; OKON, Y. Production of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. **Canadian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 31, n. 7, p.608-613, jul. 1985. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/m85-115>.

TAL, S.; SMIRNOFF, P.; OKON, Y. The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* during balanced growth and starvation. **Journal Of General Microbiology**, [s.l.], v. 136, n. 7, p.1191-1196, abr. 1990.

TIRAPELLE, E. F. et al. Identification of Proteins Associated with Polyhydroxybutyrate Granules from *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 - Old Partners, New Players. **PLOS One**, [s.l.], v. 8, n. 9, p.1-6, 25 set. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075066>.

TYO, K. E. J. et al. Analysis of polyhydroxybutyrate flux limitations by systematic genetic and metabolic perturbations. **Metabolic Engineering**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.187-195, maio 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2009.10.005>.

van der WALLE, G. A. M. et al. Properties, Modifications and Applications of Biopolyesters. **Biopolyesters**, [s.l.], p.263-291, 2001. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1007/3-540-40021-4_9.

WALSHAW, D. et al. Regulation of the TCA cycle and the general amino acid permease by overflow metabolism in *Rhizobium leguminosarum*. **Microbiology**, [s.l.], v. 143, n. 7, p.2209-2221, 1997.

WANG, C. et al. Roles of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) and glycogen in symbiosis of *Sinorhizobium meliloti* with *Medicago* sp. **Microbiology**, [s.l.], v. 153, n. 2, p.388-398, 1 fev. 2007. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.29214-0>.

WANG, F.; LEE, S. Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 63, n. 12, p.4765-4769, dez. 1997.

WANG, J. G.; BAKKEN, L. R. Screening of Soil Bacteria for Poly-β-Hydroxybutyric Acid Production and Its Role in the Survival of Starvation. **Microbial Ecology**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.94-101, 1 jan. 1998. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s002489900063>.

WANG, Q. et al. Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application. **Microbial Cell Factories**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.47-55, 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-8-47>.

WESTBY, C. A. et al. Assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 169, n. 9, p.4211-4214, set. 1987. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.169.9.4211-4214.1987>.

WONG, P. P.; EVANS, H. J. Poly-β-hydroxybutyrate Utilization by Soybean (*Glycine max* Merr.) Nodules and Assessment of Its Role in Maintenance of Nitrogenase Activity. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 47, n. 6, p.750-755, 1 jun. 1971. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.47.6.750>.

YAN, Y. et al. Global transcriptional analysis of nitrogen fixation and ammonium repression in root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.11-23, 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-11>.

YE, J. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **Bmc Bioinformatics**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.134-144, 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.

YORK, G. M.; STUBBE, J.; SINSKEY, A. J. The *Ralstonia eutropha* PhaR Protein Couples Synthesis of the PhaP Phasin to the Presence of Polyhydroxybutyrate in Cells and Promotes Polyhydroxybutyrate Production. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 184, n. 1, p.59-66, 1 jan. 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.184.1.59-66.2002>.

ZHANG, Y. et al. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 152, n. 2, p.195-204, jul. 1997. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10428.x>.

ZHAO, Y. H. et al. Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 276, n. 1, p.34-41, nov. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x>.