

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCISCO JOSÉ TELES MOTA

CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *phaZ1* E *phaZ2* E MOBILIZAÇÃO DE
POLIHIDROXIBUTIRATO EM *Herbaspirillum seropedicae*



CURITIBA

2020

FRANCISCO JOSÉ TELES MOTA

CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *phaZ1* E *phaZ2* E MOBILIZAÇÃO DE
POLIHIDROXIBUTIRATO EM *Herbaspirillum seropedicae*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Prof. Dr^a. Leda Satie Chubatsu

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos

CURITIBA

2020

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Mota, Francisco José Teles, 1988-

Caracterização dos genes *phaZ1* e *phaZ2* mobilização de polihidroxi butirato em *Hesbaspirillum seropedicae* / Francisco José Teles Mota. – Curitiba, 2020.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Prof. Dr^a. Leda Satie Chubatsu.

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos.

1. Herbaspirillum. 2. Polihidroxi butirato. 3. Polissacarídeos. 4. Tâmara. I. Chubatsu, Leda Satie, 1966-. II. Müller-Santos, Marcelo, 1979-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

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 **FRANCISCO JOSE TELES MOTA** intitulada: **Caracterização dos genes *phaZ1* e *phaZ2* e mobilização de polihidroxitirato em *Herbaspirillum seropedicae***, sob orientação do Prof. Dr. LEDA S. CHUBATSU, que após terem inquirido o aluno e realizada 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, 30 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

30/03/2020 18:28:57.0

LEDA S. CHUBATSU

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/03/2020 18:23:54.0

MARIA BERENICE REYNAUD STEFFENS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

31/03/2020 13:37:55.0

ANA CLAUDIA BONATTO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico essa dissertação à Roberta Renner pelo amor e carinho, por me apoiar e investir nos nossos sonhos.

AGRADECIMENTOS

A carreira acadêmica é repleta de desafios, contudo ganhamos suporte e incentivo dos colegas, amigos e professores que inúmeras vezes nos ajudam frente aos obstáculos. Meus sinceros agradecimentos a minha orientadora Prof.^a Dr.^a Leda Satie Chubatsu que me orienta há seis anos e sempre contribuiu imensamente para que estas palavras pudessem ser redigidas. Agradeço a Professora Dr.^a Maria Berenice R. Steffens pelas contribuições na correção do relatório e pela amizade sincera. Ao meu coorientador Prof. Dr. Marcelo Muller-Santos por está sempre nos motivando nas atividades acadêmicas, trazendo novas ideias e nos acompanhando na bancada. A Prof.^a Dr.^a Rose Adele Monteiro por nos alegrar diariamente, por acreditar no nosso potencial quando muitas vezes não confiamos em si mesmo. O meu agradecimento se estende ainda ao Prof. Dr. Emanuel Maltempi, Fábio de Oliveira Pedrosa e ao secretário do programa de pós-graduação Thiago Vello pelo apoio com os documentos.

Aos amigos do laboratório NFN: Edson Kim, Isabela Cavalcante, Marcos Andrei, Marcos Damrley, Brenno Miranda, Fernanda Kashiwagi, Beatriz, Alex Tramontin, Ryu Masaki, Júlia Liebl, Kalinka Gonzales, Adriano Stefanello, Luis Paulo Alves, Maritza, Carol Conrado, Manuel Piñero, Mayara Almeida e Robson Carlos.

Aos técnicos Rose Prado, Valter Baura, Thalita e Bruna pela atenção com reagentes e uso de equipamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, essencial para a realização desse sonho.

“Palavras são, na minha nada humilde opinião, nossa inesgotável fonte de magia. Capazes de formar grandes sofrimentos e também de remediá-los”.

Alvo Dumbledore, Harry Potter e as Relíquias da Morte (J. K. Rowling, autora).

RESUMO

Os polihidroxicanoatos são uma classe de biopolímeros com enorme potencial de aplicação biotecnológica e, nesse grupo de compostos, o polihidroxibutirato (PHB) é um dos mais conhecidos, sendo sintetizado por uma diversidade de microrganismos. A biossíntese de PHB em bactérias ocorre enzimaticamente em três etapas: 2 moléculas de acetil-CoA são condensadas a acetoacetil-CoA, catalisada pela enzima β -cetoacil-CoA tiosintetase, em seguida acetoacetil-CoA é reduzido a 3-hidroxibutiril-CoA com consumo de NADPH pela enzima acetoacetil-CoA redutase e, por último, a PHB sintase polimeriza 3-hidroxibutiril-CoA formando o polímero PHB. Quando necessário, PHB é mobilizado através da PHB depolimerase. A bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* sintetiza e degrada PHB através dessa via metabólica. Esta bactéria apresenta dois genes que codificam para PHB depolimerases. O gene *phaZ1* é expresso constitutivamente na presença de PHB, enquanto a repressão foi observada no mutante $\Delta phaC1$, uma estirpe que não produz o polímero. Encontramos evidências de que o repressor transcricional PhaR modula esse processo. Nossos resultados indicam que PhaZ1 é a principal PHB depolimerase para a mobilização do polímero, uma vez que foi observado acúmulo de PHB nos mutantes $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ12$. Além disso, esses mutantes são deficientes em motilidade do tipo “swarming”. Enquanto o gene *phaZ1* apresenta expressão constitutiva, o gene que codifica para a segunda PHB depolimerase, *phaZ2*, tem sua expressão dependente de nitrogênio e, é regulada por NtrC.

Palavras-chave: Polihidroxibutirato (PHB), PHB depolimerase, *Herbaspirillum seropedicae*

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates are a class of biopolymers with enormous potential for biotechnological application, and within this group the best known is polyhydroxybutyrate (PHB), which is synthesized by a diversity of microorganisms. In bacteria PHB is synthesized by the condensation of two acetyl-CoA molecules by a β -ketoacyl-CoA thiolase to form acetoacetyl-CoA, which is subsequently reduced to 3-hydroxybutyryl CoA by an acetoacetyl-CoA reductase using NADPH. Finally, PHB synthase polymerizes 3-hydroxybutyryl-CoA to form PHB usually yielding intracellular granules. The diazotrophic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* synthesizes PHB through this metabolic pathway and degrades the polymer through PHB depolymerases coded by *phaZ*. In this organism, two similar genes were found, *phaZ1* and *phaZ2*. The *phaZ1* gene is expressed constitutively in the presence of PHB, whereas repression of expression was observed in the mutant Δ *phaC1*, a strain that does not produce the polymer. We found evidence that the transcriptional repressor PhaR modulates this process. Our results indicated that PhaZ1 is the main PHB depolymerase to mobilize PHB, since PHB accumulation was observed in Δ *phaZ1* and Δ *phaZ12* mutants. In addition, these mutants showed to be deficient in “swarming” motility. Although *phaZ1* was shown to be constitutively expressed, the gene that codes for the second PHB depolymerase, *phaZ2*, had its expression dependent on nitrogen levels and it was regulated by NtrC.

Keywords: Polyhydroxybutyrate (PHB), PHB depolymerase, *Herbaspirillum seropedicae*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – ESTRUTURA GERAL DOS PHAs | 18 |
| FIGURA 2 – VIA METABÓLICA DE SÍNTESE DE PHB E ESTRUTURA DOS GRÂNULOS | 21 |
| FIGURA 3 – GENES ENVOLVIDOS COM O METABOLISMO DE PHB EM <i>H. seropedicae</i> | 29 |
| FIGURA 4 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE PHB DEPOLIMERASES..... | 44 |
| FIGURA 5 - ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS PROTEÍNAS PHAZ..... | 46 |
| FIGURA 6 - PERFIL DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> | 48 |
| FIGURA 7- QUANTIFICAÇÃO DE PHB NOS MUTANTES $\Delta phaC1$ E $\Delta phaZ1$ | 50 |
| FIGURA 8 - QUANTIFICAÇÃO DE PHB EM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> | 52 |
| FIGURA 9 - ATIVIDADE ESPECÍFICA DE β -GALACTOSIDASE EM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> CONJUGADAS COM A FUSÃO <i>phaZ1::lacZ</i> | 53 |
| FIGURA 10 – ILUSTRAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>phaZ1</i> .. | 55 |
| FIGURA 11 – ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE NOS MUTANTES $\Delta phaC1$, $\Delta phaR$, $\Delta phaC1\Delta phaR$ E SELVAGEM SmR1 | 56 |
| FIGURA 12 - CONFIRMAÇÃO DA DELEÇÃO CROMOSSOMAL DO GENE <i>phaR</i> DE <i>H. seropedicae</i> NA ESTIRPE $\Delta phaC1$ | 58 |
| FIGURA 13 - – ILUSTRAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>phaZ2</i> | 60 |
| FIGURA 14- REGIÕES INTERGÊNICAS USADAS NAS ANÁLISES DE EXPRESSÃO DO GENE <i>phaZ2</i> | 62 |
| FIGURA 15 – CURVAS DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES ET8000 E NT8000 | 64 |
| FIGURA 16 – ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE <i>phaZ2</i> | 65 |
| FIGURA 17 – ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i> $\Delta phaZ1$ E $\Delta phaZ12$ EM MEIO SEMI-SÓLIDO | 66 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 18 – ENSAIO DE MOTILIDADE DO TIPO "SWARMING" DAS ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> | 67 |
| FIGURA 19 – ENSAIO DE MOTILIDADE DO TIPO "SWARMING" DE ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> EM MEIO CONTENDO BAIXA CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIO..... | 68 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – GENES ENVOLVIDOS COM O METABOLISMO DE PHB EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SMR1 | 28 |
| TABELA 2 – MEIO LB | 31 |
| TABELA 3 – COMPOSIÇÃO MEIO MÍNIMO M9..... | 31 |
| TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO NFB-MALATO | 32 |
| TABELA 5 - LISTA DE ESTIRPES BACTERIANAS..... | 33 |
| TABELA 6 – LISTA DE PLASMÍDEOS | 34 |
| TABELA 7 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES..... | 36 |
| TABELA 8 - PBSA (SOLUÇÃO SALINA FOSFATO) | 41 |
| TABELA 9 - SIMILARIDADE E IDENTIDADE GLOBAL DAS PROTEINAS PhaZs | 45 |
| TABELA 10 - CONSTANTE DE CRESCIMENTO (K) E TEMPO DE DUPLICAÇÃO EM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> AVALIADAS QUANTO AO PERFIL DE CRESCIMENTO..... | 49 |

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

3HB - 3-Hidroxibutirato

3HV - 3-Hidroxivalerato

EDTA - ácido etileno-diamino-tetracético

e-PHB depolimerases - Polihidroxibutirato depolimerases extracelulares

i-PHB depolimerases - Polihidroxibutirato depolimerases intracelulares

ONPG - 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo

PCR - Reação em cadeia da DNA polimerase

PGAPs - proteínas associadas ao grânulo de PHB

PHA - Polihidroxialcanoatos

PHB - Polihidroxibutirato

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 2.1 | POLIHIDROXIALCANOATOS..... | 18 |
| 2.2 | POLIHIDROXIBUTIRATO..... | 19 |
| 2.3 | PHB DEPOLIMERASES INTRACELULARES | 23 |
| 2.4 | METABOLISMO DE PHB EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> | 26 |
| 3 | JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS | 30 |
| 3.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 30 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 31 |
| 4.1 | MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO | 31 |
| 4.1.1 | Antibióticos | 32 |
| 4.2 | ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS..... | 33 |
| 4.3 | PREPARAÇÃO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA | 34 |
| 4.4 | TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA..... | 35 |
| 4.4.1 | Extração de DNA genômico, minipreparação de plasmídeos, purificação de DNA a partir de gel de agarose e quantificação de DNA.... | 35 |
| 4.4.2 | PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) | 35 |
| 4.4.3 | Reações de ligação de DNA..... | 36 |
| 4.4.4 | Sequenciamento de DNA | 37 |
| 4.5 | Clonagem das regiões promotoras do gene <i>phaZ2</i> de <i>H. seropedicae</i> | 37 |
| 4.6 | CONJUGAÇÃO BACTERIANA | 37 |
| 4.7 | ESTRATÉGIA DE DELEÇÃO DO GENE <i>phaR</i> NA ESTIRPE Δ <i>phaC1</i> DE <i>H. seropedicae</i> | 38 |
| 4.8 | CURVAS DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> .. | 39 |
| 4.9 | ENSAIOS DE β -GALACTOSIDASE..... | 40 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.10 | QUANTIFICAÇÃO DE PHB POR CITOMETRIA DE FLUXO..... | 41 |
| 4.11 | ENSAIOS DE MOTILIDADE CELULAR..... | 42 |
| 4.12 | ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA..... | 42 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 43 |
| 5.1 | ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA..... | 43 |
| 5.2 | PERFIL DE CRESCIMENTO | 46 |
| 5.3 | QUANTIFICAÇÃO DE PHB POR CITOMETRIA DE FLUXO..... | 49 |
| 5.4 | ANÁLISE DA EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DO GENE <i>phaZ1</i> | 52 |
| 5.4.1 | Modelo de regulação do gene <i>phaZ1</i> | 53 |
| 5.5 | ESTRATÉGIA PARA A MUTAGÊNESE DO GENE <i>phaR</i> DE <i>H. seropedicae</i> NA ESTIRPE Δ <i>phaC1</i> | 57 |
| 5.6 | ANÁLISE DA EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DO GENE <i>phaZ2</i> | 59 |
| 5.7 | MOTILIDADE | 65 |
| 6 | CONCLUSÕES | 69 |
| 7 | REFERÊNCIAS | 70 |

1 INTRODUÇÃO

Os polihidroxicanoatos (PHAs) correspondem a uma classe de biopolímeros produzidos por vários microrganismos e armazenados na forma de grânulos insolúveis dentro da célula, consistindo em uma importante reserva energética para o organismo (LEE, 1996). As propriedades termoplásticas associadas à biodegradabilidade são os fatores que contribuem para o uso na produção de bioplásticos, sendo portanto uma alternativa aos produtos de origem petroquímica (CHEN, 2009). Uma outra característica dos PHAs é a biocompatibilidade, permitindo sua utilização na produção de materiais biomédicos como próteses, malhas cirúrgicas, microesferas para encapsulamento de fármacos e fibras para suturas (BRIGHAM; SINSKEY, 2012). Devido a essas características, os PHAs vem despertando o interesse de muitos pesquisadores que estão investigando as vias metabólicas relacionadas a produção de polihidroxicanoatos, permitindo a criação de sistemas heterólogos para produção do polímero em larga escala (CHEN, 2009).

O polihidroxibutirato (PHB) é um dos principais polímeros incluído na classe dos PHAs e vem sendo estudado há quase um século desde a sua descoberta em 1926 pelo microbiologista Francês Maurice Lemoigne (LEMOIGNE, 1926). Além de conter as propriedades características dos PHAs quanto à aplicação biotecnológica, o PHB vem demonstrando ser de grande importância para os microrganismos que o produzem pois está relacionado à maior taxa de sobrevivência em condições ambientais desfavoráveis (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003; TRIBELLI; LÓPEZ, 2011; OBRUCA et al., 2016). Isso faz com que a pesquisa visando a compreensão do metabolismo de PHB tenha grande relevância e de fato vários genes e suas respectivas proteínas tem sido estudados. Isso levou a descoberta da via metabólica clássica da síntese de polihidroxibutirato no organismo modelo *Ralstonia eutropha* H16 (ANDERSON; DAWES, 1990). Essa bactéria vem sendo estudada há mais de 50 anos devido a capacidade em produzir e armazenar grandes quantidades de polihidroxibutirato e outros poliésteres de interesse biotecnológico para a produção de bioplásticos. Uma das proteínas mais importantes dessa via são as PHB depolimerases que realizam a degradação do polímero acumulado,

disponibilizando carbono e equivalentes redutores para vias anabólicas (ANDERSON; DAWES, 1990). As PHB depolimerases apresentam uma grande diversidade estrutural e funcional, com diferentes classes, algumas são exclusivamente PHB depolimerases extracelulares e outras atuam somente dentro da célula (PHB depolimerases intracelulares), apesar do que já foi descoberto sobre algumas dessas enzimas (descritas adiante), ainda há muitas questões em relação ao grupo das PHB depolimerases intracelulares (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002). Essas enzimas mobilizam exclusivamente o polímero intracelular na sua forma nativa.

Diante da importância dos PHAs, entres eles o PHB, torna-se importante conhecer esse parte do metabolismo em outras bactérias. Nesse projeto procuramos expandir o conhecimento sobre as PHB depolimerases na bactéria *Herbaspirillum seropedicae*; essa espécie é uma β -proteobactéria que coloniza gramíneas de interesse econômico, entre elas milho, sorgo, trigo e arroz (RONCATO-MACCARI et al., 2003; PEDROSA et al., 2011; BALSANELLI et al., 2016; PANKIEVICZ et al., 2016; BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2019). Essa bactéria contém ao menos 13 genes incluídos no metabolismo de polihidroxiabutirato, dois deles codificam PHB depolimerases intracelulares, sabe-se que esses genes são expressos em condições de interação planta-bactéria, sendo que a deleção de ambos os genes resulta na redução dessa bactéria em promover crescimento vegetal (ALVES et al., 2019). Considerando a relevância de *H. seropedicae* como um organismo diazotrófico e do PHB como um biopolímero de uso biotecnológico, esse estudo procurou contribuir com novos conhecimentos sobre o papel desses genes nessa bactéria.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 POLIHIDROXIALCANOATOS

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres sintetizados por uma grande variedade de microrganismos a partir de monômeros de 3-hidroxicanoatos (Figura 1) (MADISON; HUISMAN, 1999). Essas moléculas são polimerizadas em grânulos insolúveis e armazenados no citoplasma podendo atingir diâmetro entre 0,2 a 0,5 μm (ANDERSON; DAWES, 1990). A visualização dos polihidroxicanoatos geralmente é feita por técnicas de microscopia eletrônica microscopia de contraste de fase e microscopia de fluorescência, e a quantificação do PHB acumulado ocorre por meio de cromatografia gasosa (DE RIJK et al., 2005; TAN et al., 2014). Existe uma grande quantidade e diversidade desses biopolímeros, podendo ser grânulos homo ou heteropoliméricos dependendo do monômero incorporado na síntese e da especificidade das PHB sintases (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995).

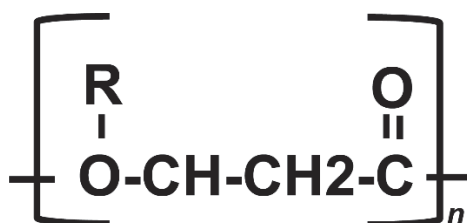


FIGURA 1 – ESTRUTURA GERAL DOS PHAs

Estrutura geral de um polihidroxicanoato. O grupo R indica diferentes radicais que podem ser utilizados. A estrutura indica as unidades monoméricas que formam o polímero.

Fonte: Adaptado de ANDERSON & DAWES (1990).

PHAs podem ser classificados como aqueles de cadeia curta ou média, dependendo do número de carbonos das unidades monoméricas. Os PHAs de cadeia curta (SCL PHA, do inglês *short-chain-length*) apresentam 3 a 5 átomos de carbono como 3-Hidroxicbutirato (3HB) e 3-Hidroxicvalerato (3HV) (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995); os PHAs de cadeia média (MCL PHA, do inglês *medium chain-length*) possuem de 6-14 átomos de carbonos, sendo o

ácido 3-hidroxiocetanoico um exemplo. Entre os heteropolímeros, o copolímero P(3HB-co-3HV) incorpora em sua síntese monômeros de 3-hidroxiobutirato e 3-hidroxi valerato (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995).

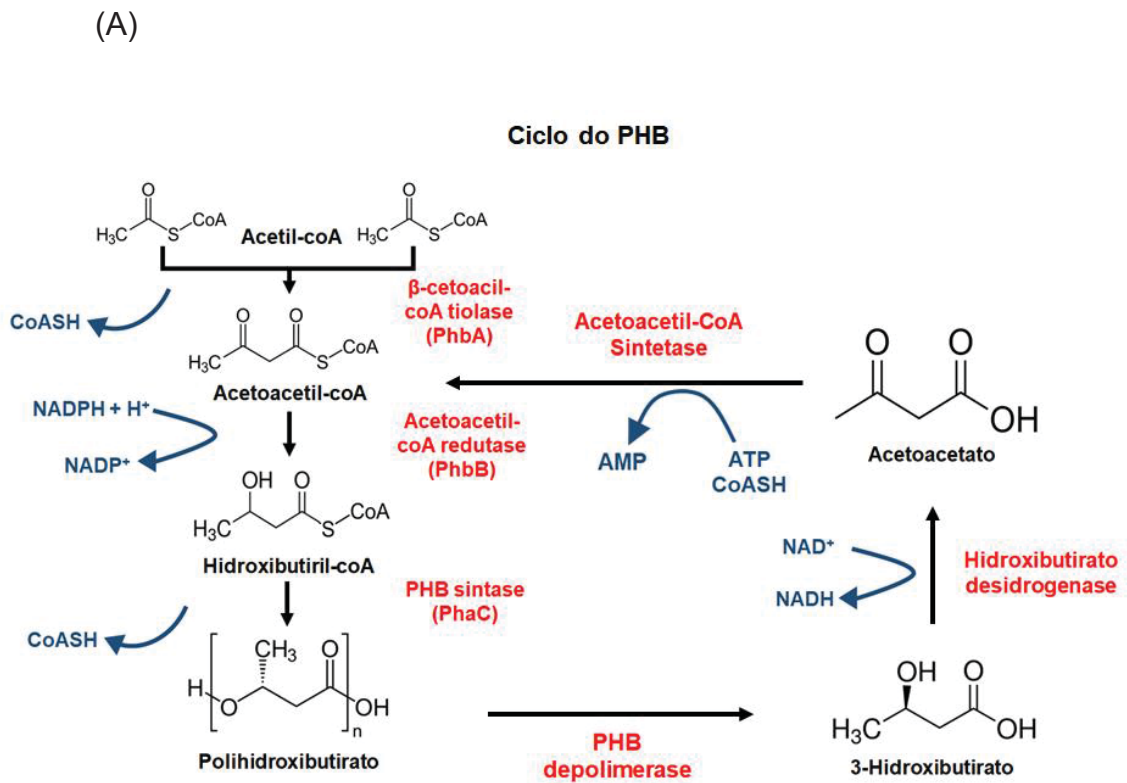
Os PHAs apresentam características físico-químicas como baixo ponto de fusão, baixa resistência a tração, comportam-se ainda como elastômeros e são semicristalinos, além de apresentarem similaridades com materiais usados na produção dos plásticos convencionais. No entanto, diferente dos plásticos, PHAs são biodegradáveis e derivados de fontes renováveis (MADISON; HUISMAN, 1999). A biodegradabilidade dos materiais de PHAs em conjunto com as características termoplásticas faz dos mesmos um forte atrativo para a indústria de bioplásticos. Essa é umas das aplicações biotecnológicas mais promissoras desses biopolímeros. Uma outra propriedade importante é a biocompatibilidade, permitindo seu uso na produção de próteses, fibras para suturas, cápsulas para armazenamento de fármacos e diversos produtos biomédicos (CHEN, 2009; BRIGHAM; SINSKEY, 2012; RAY; KALIA, 2017).

2.2 POLIHIDROXIBUTIRATO

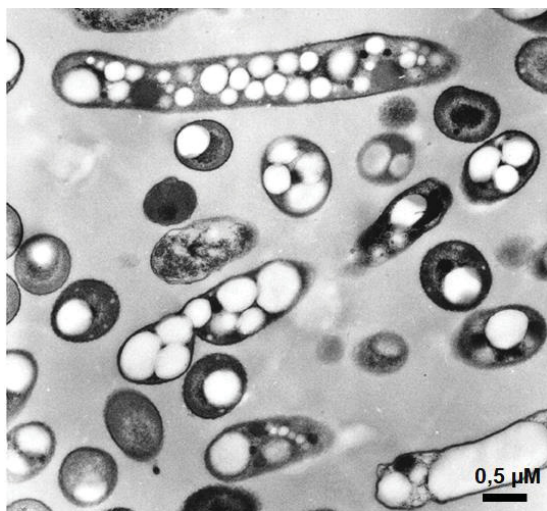
O polihidroxiobutirato (PHB) é o PHA mais utilizado e estudado. Consiste em um poliéster alifático resultante da polimerização do ácido (R)-3-hidroxiobutirato, e se apresenta na forma de grânulos em uma estrutura compacta (COBNTBEKT; MABCHESSAULT, 1972). A biossíntese de PHB ocorre a partir de acetil-CoA em três passos: 2 moléculas de acetil-CoA são condensadas a acetoacetil-CoA, catalisado pela enzima β -cetoacil-CoA tiosintetase, acetoacetil-CoA é reduzido a 3-hidroxiobutiril-CoA com consumo de NADPH pela enzima Acetoacetil-CoA redutase e em sequência a PHB sintase (PhaC) polimeriza 3-hidroxiobutiril-CoA formando PHB (Figura 2A), (LEE, 1996).

O grânulo de PHB formado (nativo) é recoberto por diferentes proteínas (PGAPs - *PHB granule associated proteins*) sendo a majoritária a fasina (PhaP) que tem a função de evitar a coalescência do grânulo. As fasinas apresentam um domínio hidrofóbico que se liga à superfície do polímero e um domínio hidrofílico exposto ao citoplasma (WIECZOREK et al., 1995; PÖTTER; MÜLLER;

STEINBÜCHEL, 2005). Outras PGAPs correspondem a proteínas envolvidas no metabolismo de PHB, como PHB sintase e PHB depolimerase, além de outras cuja função na associação com o grânulo não é clara (JENDROSSEK; PFEIFFER, 2014; BRESAN et al., 2016).



(B)



(C)

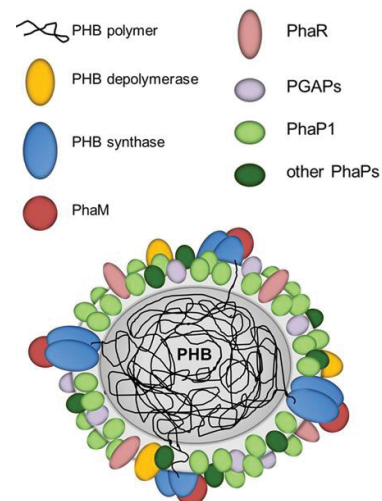


FIGURA 2 – VIA METABÓLICA DE SÍNTESE DE PHB E ESTRUTURA DOS GRÂNULOS

Acima em (A) via metabólica clássica de síntese e degradação de PHB em bactérias, essa via foi descrita em *R. eutropha* H16 e é usada como modelo em estudos do metabolismo de polihidroxibutirato em outros organismos. Na cor azul, a esquerda, estão descritos os subprodutos das reações enzimáticas e a direita em vermelho as enzimas e as respectivas siglas. Em (B) imagem de microscopia eletrônica de transmissão de *R. eutropha* H16 contendo grânulos de PHB dentro da célula. Em (C) esquema ilustrando o modelo dos grânulos de PHB nativo associado à proteínas.

Fonte: (A), Modificado de LEE (1996); (B), TIAN (2005) e (C), (BRESAN et al., 2016).

A síntese de PHB e o subsequente armazenamento em estruturas granulares é determinado por condições nutricionais específicas do ambiente, principalmente a disponibilidade de fontes de carbono e ausência de um determinado nutriente, sendo que limitação de fosfato, nitrogênio ou oxigênio são fatores importantes que privilegiam a síntese e o acúmulo de PHB (BYROM, 1987).

O PHB acumulado funciona como estoque de carbono e potencial redutor na forma de elétrons, incorporado nas reações redox dos compostos intermediários usados na síntese do polímero. Essa reserva energética parece ter uma ampla importância biológica e têm sido relacionada a adaptações e capacidade de sobrevivência dos microrganismos frente a condições ambientais desfavoráveis (JAMES et al., 1999; OBRUCA et al., 2016). Nessas situações os microrganismos degradam o polímero acumulado viabilizando o fluxo de carbono e energia para o metabolismo. Estirpes bacterianas de importância elevada em termos econômicos, como as fixadoras de nitrogênio, mobilizam o PHB para sobreviver quando as variações físico-químicas do solo são adversas (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003) ou ainda manter energeticamente a fixação de nitrogênio usando apenas o polímero previamente acumulado (TAL; OKON, 1985). Resultados recentes indicam que a capacidade de mobilizar o PHB acumulado é importante no papel desempenhado por esses organismos na promoção do crescimento vegetal (ALVES et al., 2019).

Assim como os demais PHAs, o PHB possui significativa importância biotecnológica e, em função da biodegradabilidade, vem sendo usado como precursor na produção de bioplásticos. O PHB apresenta similaridade com o polipropileno, obtido a partir de combustíveis fósseis e usado na produção do plástico convencional (MADISON; HUISMAN, 1999). Essa é uma das principais motivações no estudo de bactérias capazes de sintetizar PHB e tem motivado muitos pesquisadores a estudar esses microrganismos. Mais recentemente a construção de estirpes bacterianas engenheiradas para a produção do polímero ou mesmo a sua síntese em sistemas heterólogos como *Escherichia coli* e leveduras como *Saccharomyces* (RAHMAN et al., 2013; LIN et al., 2015; SANDSTRÖM et al., 2015; DE LAS HERAS et al., 2016).

2.3 PHB DEPOLIMERASES INTRACELULARES

A mobilização do polihidroxibutirato armazenado na célula ocorre enzimaticamente por meio de PHB depolimerases intracelulares. Essas enzimas degradam exclusivamente o grânulo endógeno no estado nativo (HANDRICK; REINHARDT; JENDROSSEK, 2000; TOKIWA; CALABIA, 2004). As depolimerases são carboxilesterases e pertencem a família das α/β -hidrolases. Dentro dessa família existe um grupo de proteínas que apresentam um domínio conservado, nomeado como *PHB_depo_C* (Domínio PHB depolimerase C terminal). Esse domínio é encontrado em proteínas que foram caracterizadas como sendo PHB depolimerases intracelulares, conhecidas pela função na degradação de PHB (KNOLL et al., 2009). Na base de dados de família de proteínas – Pfam, foram agrupadas 1640 sequências (código de acesso PF06850) que apresentam esse domínio conservado (FINN et al., 2008).

A maioria das PHB depolimerases possuem uma tríade catalítica conservada contendo os resíduos de aminoácidos serina-histidina-ácido aspártico no sítio ativo. A serina com função catalítica geralmente está imersa em uma região conhecida como "lipase box" e fica entre os resíduos de aminoácidos conservados GxSxG (Glicina-x-Serina-x-Glicina, onde x corresponde a qualquer aminoácido) (KNOLL et al., 2009). Apesar dessa região ter sido caracterizada, não foram encontradas sequências conservadas relacionadas com a função de ligação ao substrato (PHB), uma vez que as PHB depolimerases são encontradas comumente associadas aos grânulos de PHB (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002). As PHB depolimerases são classificadas com relação ao tipo de PHB no qual atuam mobilizando, SCL PHB depolimerases (*short-chain-length* PHB depolimerases) e MCL PHB depolimerases (*medium-chain-length* PHB depolimerases), degradam PHB de cadeia curta e PHB de cadeia média, respectivamente. As depolimerases que degradam o PHB de cadeia curta comumente não possuem o domínio *lipase box* ou a tríade catalítica conservados (KNOLL et al., 2009).

Os principais estudos com PHB depolimerases intracelulares foram realizados com *Ralstonia eutropha* H16. Essa estirpe contém sete genes, nomeados *phaZa1* a *phaZa7* que codificam PHB depolimerases intracelulares

dos quais apenas o produto dos genes *phaZa1* e *phaZa2* estão envolvidos com a mobilização do polímero nessa bactéria de acordo com os estudos realizados (HANDRICK; REINHARDT; JENDROSSEK, 2000; SZNAJDER; JENDROSSEK, 2014). O primeiro gene *phaZ* (sigla usada para os genes codificantes de PHB depolimerases) clonado foi o gene *phaZa1* de *Ralstonia eutropha* H16 (SAEGUSA et al., 2001). A análise da sequência de aminoácidos indicou que apesar da similaridade com PHB depolimerases extracelulares, não havia a sequência conservada referente a tríade catalítica ou mesmo o resíduo de serina da sequência "lipase box" (GxSxG) (SAEGUSA et al., 2001). O gene foi clonado e expresso em uma estirpe de *Escherichia coli* recombinante contendo o operon *phbCAB* que codifica as enzimas envolvidas com a síntese de PHB, que permite a produção de polihidroxibutirato (MADISON; HUISMAN, 1999). Os pesquisadores observaram que o produto do gene *phaZa1* degradava o PHB nativo em oligômeros de 3HB como principal composto (SAEGUSA et al., 2001). Esses resultados não foram corroborados por estudos subsequentes, no qual foi detectado somente pequenas quantidades de 3-hidroxibutirato resultante da degradação de PHB por PhaZa1 (UCHINO; SAITO; JENDROSSEK, 2008). Os estudos seguintes identificaram 3-hidroxibutiril-CoA (3HB-CoA) e crotonil-CoA como produto da atividade da PHB depolimerase PhaZa1, sugerindo uma possível conexão entre o metabolismo de PHB e a via metabólica de β -oxidação (EGGERS; STEINBÜCHEL, 2013). Além disso os autores sugerem que essa enzima é capaz de mobilizar o PHB a 3HB-CoA e em seguida catalisar a formação de crotonil-CoA a partir do 3-HB-CoA.

Os experimentos conduzidos com a estirpe mutante *phaZa1* de *R. eutropha* mostraram que um dos principais efeitos da deleção do gene nessa bactéria foi um aumento no acúmulo de PHB com respectiva redução na liberação de 3-hidroxibutirato quando comparado com a estirpe selvagem. Além disso análises de microscopia mostraram grânulos de PHB maiores após a fase estacionária de crescimento (SAEGUSA et al., 2001). Como essa estirpe mutante não perdeu a capacidade de mobilizar PHB ficou implícito que outros genes codificantes de PHB depolimerase poderiam complementar essa função na bactéria. Saegusa e cols. (2002) estudando oligômeros hidrolases, enzimas que estão envolvidas com a hidrólise de oligômeros de 3-hidroxibutirato de vários

comprimentos em monômeros de 3-Hidroxibutirato, identificaram uma nova depolimerase em *R. eutropha* que foi nomeada como PhaZa2 (HARUHISA; MARI; TERUMI, 2002). Essa enzima apresentava maior versatilidade quando comparada com PhaZa1, sendo capaz de hidrolisar PHB em 3HB e dímeros, trímeros, tetrâmeros e pentâmeros de 3HB eficientemente. Ensaios de imunohistoquímica indicaram que a proteína PhaZa2 estava presente tanto no grânulo quanto na fração citoplasmática de *E. coli* recombinante, enquanto PhaZa1 foi encontrada apenas associada aos grânulos de PHB (SAEGUSA et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2003).

Alguns estudos de transcriptoma realizados com *R. eutropha* trouxeram contribuições significativas para o entendimento do padrão de expressão dos genes do metabolismo de PHAs em diferentes fases do crescimento e em condições de acúmulo de PHB. Com relação à expressão de PHB depolimerases foi observado que o gene *phaZa1* é expresso constitutivamente enquanto os genes codificantes de *phaZa2* e *phaZa3* eram regulados, sendo expressos somente após a fase exponencial do crescimento (LAWRENCE et al., 2005; PEPLINSKI et al., 2010). Esse padrão de expressão confirmou alguns resultados obtidos com o mutante do gene *phaZa1* (Δ *phaZa1*), onde a mobilização de PHB via PhaZa2 ocorreu em fases mais tardia do crescimento, possivelmente em condições de escassez de fontes de carbono (YORK et al., 2003). Duas questões podem ser levantadas a partir dessas observações: Como ocorre a regulação desses genes? E como a expressão constitutiva de uma depolimerase não resulta em um “ciclo fútil” de síntese e degradação simultânea de PHB?

Apesar da regulação transcricional dos genes que codificam para PHB depolimerases ser pouco conhecida, estudos em organismos como *Rhodobacter sphaeroides* e *Paracoccus denitrificans* sugerem a participação da proteína regulatória PhaR. Esta proteína atua como repressora na transcrição de genes envolvidos no metabolismo de PHB, incluindo aqueles que codificam para fasinias e também pode regular a transcrição de *phaZ* (MAEHARA et al., 2001; POTTER et al., 2002; CHOU; YANG, 2010).

A proteína PhaR é capaz de ligar-se à sequências de DNA conservadas, ricas em bases TGC na região promotora de genes relacionados ao metabolismo

de PHB, mas também pode ser encontrada associada aos grânulos de PHB. Desse modo, foi proposto que a proteína PhaR atuaria como um repressor da expressão de genes do metabolismo de PHB mantendo-se ligada à região promotora e, quando a síntese do polímero é favorecida, PhaR é deslocada do DNA para o grânulo de PHB, permitindo assim a expressão desses genes (MAEHARA et al., 2002). A possibilidade de que PhaR possa atuar como repressor transcricional das depolimerases foi hipotetizado por Maehara e cols. (2002) e confirmado em *Rhodobacter sphaeroides* (CHOU et al., 2009).

A observação de que algumas PHB depolimerases intracelulares eram expressas constitutivamente levou os pesquisadores a explicarem possíveis mecanismos de regulação pós-traducional no controle da degradação de PHB, no entanto, ainda não é claro como esse mecanismo ocorre. Existem evidências de que PhaZa1 de *R. eutropha* é fosforilada em diferentes resíduos de aminoácidos dependendo da fase de crescimento celular (JUENGERT; PATTERSON; JENDROSSEK, 2018). Foi mostrado que o resíduo de serina 35 (Ser35) encontra-se fosforilado nas fases exponencial e estacionária do crescimento, enquanto os resíduos de treonina (Thr26 e Thr28) encontram-se fosforilados apenas na fase estacionária; adicionalmente foi observado que mutações pontuais nesses sítios afetam a mobilização de PHB por essa enzima (JUENGERT; PATTERSON; JENDROSSEK, 2018).

2.4 METABOLISMO DE PHB EM *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é uma β -proteobactéria diazotrófica gram-negativa com tamanho entre 0,6 a 0,7 μm ; possui morfologia vibrióide em forma de bastonete; é uma bactéria endofítica que pode associar-se com gramíneas de interesse comercial (BALDANI et al, 1986). O genoma desta bactéria foi sequenciado e anotado (PEDROSA et al, 2011; GenBank: CP002039).

Esta bactéria é capaz de produzir uma grande quantidade de PHB (chegando a 36% do peso seco) e também pode produzir o copolímero poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) P(3HB-co-3HV) (CATALÁN et al., 2007).

A análise do genoma de *H. seropedicae* indicou a presença de 13 genes relacionados ao metabolismo de polihidroxiacetato, (Tabela 1) (KADOWAKI et al., 2011; PEDROSA et al., 2011).

Os genes *phaA1* e *phaA2* codificam as enzimas β -cetoacil-CoA tiolase 1 e β -cetoacil-CoA tiolase 2, respectivamente. A enzima β -cetoacil-CoA tiolase catalisa uma reação de condensação usando como substrato duas moléculas de acetil-CoA formando o produto acetoacetil-coA. Essa molécula é o substrato da reação seguinte na qual acetoacetil-CoA é reduzido a 3-hidroxiacetil-CoA em uma reação catalisada pela enzima PhaB, dois genes estão presentes no genoma *phaB1* e *phaB2*.

A terceira reação da via envolve a polimerização de monômeros de 3-hidroxiacetato em grânulos de PHB. Há três genes codificantes de PHB sintases no genoma de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 – *phaC1*, *phaC2* e *phaC3*. Em *Ralstonia eutropha* os genes envolvidos com a síntese de PHB fazem parte de um operon (operon *phbCAB*) (MADISON; HUISMAN, 1999), essa organização não ocorre em *Herbaspirillum seropedicae*, visto que há maior proximidade genômica entre os genes *phaC1*, *phaB1* e *phaR*, contudo estruturalmente não formam um operon (Figura 3).

A análise através do alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas a partir da sequência de nucleotídeos desses genes mostraram que estas possuem resíduos de aminoácidos conservados relacionados as PHB sintases, assim como a tríade catalítica e os domínios α/β hidrolase característicos das PHB sintases, no entanto a síntese de PHB ocorre somente se o gene *phaC1* estiver presente. Uma análise filogenética realizada com as sequências de aminoácidos desses genes mostrou que essas proteínas possuem diferenças sutis e estão agrupadas em diferentes clados, enquanto PhaC1 de *H. seropedicae* está agrupada no mesmo clado de PhaC1 de *Ralstonia eutropha*, PhaC2 e PhaC3 são mais similares com as PHB sintases 2 e 5 de *Bradyrhizobium japonicum* USD110, respectivamente e há evidências que essas proteínas não sintetizam PHB (QUELAS et al., 2013; BATISTA; MÜLLER-SANTOS, 2016). Adicionalmente PhaC1 encontra-se associada aos grânulos de

PHB representando cerca de 12% das proteínas aderidas aos grânulos de PHB em *H. seropedicae* SmR1 (TIRAPELLE et al., 2013).

O processo de polimerização do PHB está intimamente relacionado com a cobertura dos grânulos pelas fasinas. Essas proteínas estão envolvidas também com a estabilidade e quantidade dos grânulos na célula (POTTER et al., 2002). Há dois genes codificantes para proteínas com essa função em *Herbaspirillum*. O gene *phaP1* (HSERO_RS08150) codifica a principal fasina, cuja deleção resulta na desrepressão do gene *phaP2* compensando a ausência de *phaP1*. Como consequência a bactéria mantém a capacidade de acumular PHB, contudo há uma redução de aproximadamente 50% na quantidade de polímero acumulado. A deleção dos dois genes, (estirpe $\Delta phaP1\Delta phaP2$) tem como consequência incapacidade de formar os grânulos (ALVES et al., 2016), além disso há uma redução significativa no crescimento bacteriano. Um terceiro gene identificado como codificante de fasina (HSERO_RS12005) foi descartado por haver muita divergência na similaridade de sequência e função quando comparado as fasinas PhaP1 e PhaP2 (ALVES et al., 2016).

TABELA 1 – GENES ENVOLVIDOS COM O METABOLISMO DE PHB EM *Herbaspirillum seropedicae* SMR1

| Gene | Nome | Locus tag | Tamanho (bp) |
|--------------|----------------------------------|---------------|--------------|
| <i>phaA1</i> | β -cetoacil-CoA thiolase 1 | HSERO_RS01265 | 1197 |
| <i>phaA2</i> | β -cetoacil-CoA thiolase 2 | HSERO_RS01180 | 1176 |
| <i>phaB1</i> | Acetoacetil-CoA redutase 2 | HSERO_RS15035 | 741 |
| <i>phaB2</i> | Acetoacetil-CoA redutase 2 | HSERO_RS16605 | 762 |
| <i>phaC1</i> | PHB sintase 1 | HSERO_RS15040 | 1767 |
| <i>phaC2</i> | PHB sintase 2 | HSERO_RS12020 | 1773 |
| <i>phaC3</i> | PHB sintase 3 | HSERO_RS01310 | 1131 |
| <i>phaR</i> | repressor transcricional | HSERO_RS15030 | 567 |
| <i>phaP1</i> | fasina 1 | HSERO_RS08150 | 564 |
| <i>phaP2</i> | fasina 2 | HSERO_RS23810 | 570 |
| <i>phaZ1</i> | PHB depolimerase 1 | HSERO_RS08080 | 1236 |
| <i>phaZ2</i> | PHB depolimerase 2 | HSERO_RS03195 | 1227 |

Fonte: O autor.

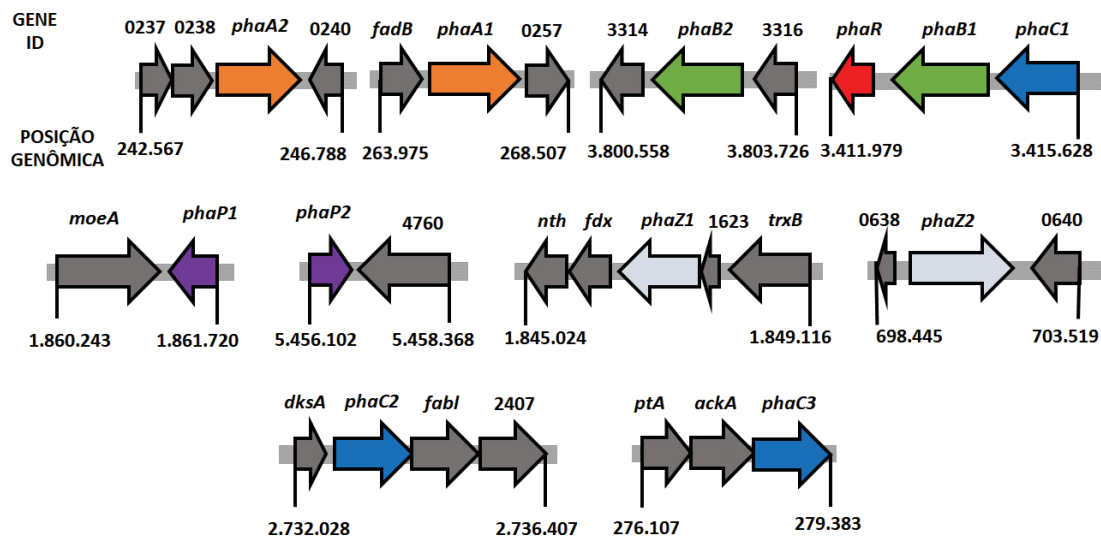


FIGURA 3 – GENES ENVOLVIDOS COM O METABOLISMO DE PHB EM *H. seropedicae*

Os genes coloridos estão envolvidos com o metabolismo de PHB, os genes adjacentes são apresentados em cinza escuro. As setas indicam o sentido de transcrição do gene (indicados pelos nomes ou locus tag). Os números abaixo das setas indicam a posição no genoma (acesso GenBank CP002039).

Fonte: Adaptado de BATISTA et al., 2017.

Dois genes foram identificados e anotados como PHB depolimerases: o gene *phaZ1* (HSERO_RS08080) possui 1236 pares de base e codifica uma proteína de 46,6 kDa, e foi encontrada associada aos grânulos de PHB na célula. O segundo gene identificado foi nomeado como *phaZ2* (HSERO_RS03195), possui 1227 pares de base e codifica uma proteína de 45,5 kDa (TIRAPELLE et al., 2013).

A deleção dos dois genes que codificam as PHB depolimerases tem um efeito significativo na capacidade de *Herbaspirillum* promover o crescimento vegetal em *Setaria viridis* (ALVES et al., 2019), além disso os genes *phaZ1* e *phaZ2* são expressos durante a colonização da planta, sugerindo que esses genes desempenham um papel importante no processo de interação planta-bactéria. Os genes *phaZs* tiveram expressão diferencial em outros estudos de interação planta-bactéria (BALSANELLI et al., 2016; PANKIEVICZ et al., 2016).

Apesar desses resultados ainda não há estudos sobre os efeitos da deleção das depolimerases na mobilização de PHB, além disso não se sabe os

mecanismos subjacentes a regulação da expressão desses genes. Esses foram os principais fatores que motivaram esse estudo.

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os polímeros de PHAs, dentre eles o PHB, são atualmente uma das principais alternativas aos materiais produzidos a partir dos plásticos convencionais, que vem causando muitos problemas ambientais (CÓZAR et al., 2014). Esses materiais têm como propriedades inovadoras a biodegradabilidade e origem a partir de recursos naturais renováveis. No entanto a aplicação industrial desses biopolímeros é bastante restrita, tendo como uma das principais limitações o elevado custo de produção (CHEN, 2009). Recentemente esses biopolímeros vem ganhando atenção por seu papel fisiológico, pois aumentam a resistência à diversos tipos de condições ambientais desfavoráveis nos organismos que o produzem (LÓPEZ et al., 2015). Desse modo as investigações que levem a novas descobertas sobre a função do PHB nos microrganismos, assim como a construção de estirpes que sintetizem grandes quantidades do polímero para aplicações biotecnológicas são motivações que direcionam as pesquisas com PHAs.

Esse projeto tem como objetivo avaliar o papel das PHB depolimerases na bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de crescimento das estirpes de *H. seropedicae* $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ12$.
- Quantificar PHB por citometria de fluxo nos mutantes $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ12$.
- Analisar a expressão dos genes *phaZ1* e *phaZ2* utilizando fusões plasmidiais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As estirpes mutantes dos genes *phaZ1* e *phaZ2* analisadas nesse projeto foram construídas por ALVES et al., 2019 e cedidas pelo Professor Dr. Marcelo Muller-Santos. Os experimentos desse projeto foram realizados no Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

4.1 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido LB (Tabela 2) a 37 °C sob agitação orbital constante de 120 rpm e em meio sólido LA (LB com 15 g/L de ágar) (SAMBROOK et al., 1989). Para os ensaios de expressão gênica as estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Mínimo M9 (Tabela 3). As células de *E. coli* foram estocadas a -20 °C em glicerol 50%.

TABELA 2 – MEIO LB

| Composição | Concentração |
|---------------------|--------------|
| Extrato de levedura | 5 g/L |
| Triptona | 10 g/L |
| NaCl | 10 g/L |
| pH | 7 |

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO MEIO MÍNIMO M9

| Composição | Concentração |
|----------------------------------|--------------|
| Na ₂ HPO ₄ | 10 g/L |
| KH ₂ PO ₄ | 5 g/L |
| NaCl | 2,5 g/L |
| Glucose 20% | 20 ml/L |
| MgSO ₄ 1 M | 2 ml/L |
| CaCl ₂ 1 M | 0,1 ml/L |
| NH ₄ Cl | 10 ou 1 mM |

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas a 30 °C sob agitação orbital de 120 rpm em meio Nfb-malato (KLASSEN et al., 1999) utilizando malato (37 mmol/L) como fonte de carbono, NH₄Cl 20 mmol/L como fonte de nitrogênio, solução de fosfatos (K₂HPO₄ (17,8 g/L) e KH₂PO₄ (159,5 g/L) e antibiótico

adequado. Os experimentos em baixas concentrações de nitrogênio foram realizados com meio Nfb-malato usando NH_4Cl na concentração de 2 mmol/L. A composição do meio Nfb-malato está indicado na Tabela 4. Para preparo de meio sólido adicionou-se ágar (15 g/L) ao meio líquido Nfb-malato.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO NFB-MALATO

| Composição | Concentração |
|--|---------------------------|
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | $2,0 \times 10^{-1}$ g/L |
| NaCl | $1,0 \times 10^{-1}$ g/L |
| CaCl_2 | $2,0 \times 10^{-2}$ g/L |
| Ácido nitrilo-triacético | $5,6 \times 10^{-2}$ g/L |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | $2,0 \times 10^{-2}$ g/L |
| Ácido málico | 5,0 g/L |
| Biotina | $1,0 \times 10^{-4}$ g/L |
| $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | $2,0 \times 10^{-3}$ g/L |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | $2,35 \times 10^{-3}$ g/L |
| H_3BO_3 | $2,8 \times 10^{-3}$ g/L |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | $8,0 \times 10^{-5}$ g/L |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | $2,4 \times 10^{-4}$ g/L |
| pH | 6,5 |

4.1.1 Antibióticos

Para os cultivos realizados com *H. seropedicae* foram utilizados os antibióticos estreptomicina para estirpe selvagem e mutantes (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$); canamicina e estreptomicina (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente) para seleção de estirpes que sofreram o primeiro evento de recombinação nos experimentos de deleção gênica. As estirpes contendo as fusões *phaZ1::lacZ* e *phaZ2::lacZ* foram cultivadas na presença simultânea dos antibióticos tetraciclina e estreptomicina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente).

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas na presença de antibióticos selecionados de acordo com a resistência conferida pelo plasmídeo: Ampicilina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (vetores pTZ57RT e pCR2.1), canamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (vetor pK18*mobsacB* e estirpe NT8000), tetraciclina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (vetores pPW452, pMP220).

4.2 ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS

As estirpes bacterianas de *Escherichia coli* e *Herbaspirillum seropedicae* utilizadas estão descritas na Tabela 5, assim como as características genéticas relevantes.

TABELA 5 - LISTA DE ESTIRPES BACTERIANAS

| Estirpes | Características | Referências |
|--------------------------------|--|---------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| Top 10 | Estirpe de clonagem | INVITROGEN |
| S17-1 | Estirpe conjugante/SmR Tra+ | SIMON <i>et al.</i> , 1983 |
| ET8000 | <i>rbs lacZ::IS1 gyr A hutC^{c_K}</i> (estirpe salvagem) | MACNEIL <i>et al.</i> , 1982 |
| NT8000 | <i>rbs lacZ::IS1 gyr A hutC^{c_K} ntrC10::Tn5</i> | REYES-RAMIREZ; LITTLE; DIXON, 2001 |
| <i>H. seropedicae</i> | | |
| SmR1 | Estirpe parental, Sm ^R , Nif+ | SOUZA <i>et al.</i> , 2000 |
| $\Delta phaZ1$ | Deleção cromossômica do gene <i>phaZ1</i> | ALVES <i>et al.</i> , 2019 |
| $\Delta phaZ2$ | Deleção cromossômica do gene <i>phaZ2</i> | ALVES <i>et al.</i> , 2019 |
| $\Delta phaZ1.2$ | Deleção cromossômica dos genes <i>phaZ1</i> e <i>phaZ2</i> | ALVES <i>et al.</i> , 2019 |
| $\Delta phaC1$ | Deleção cromossômica do gene <i>phaC1</i> | TIRAPELLE <i>et al.</i> , 2013 |
| $\Delta phaC1\Delta phaR$ | Deleção cromossômica dos genes <i>phaC1</i> e <i>phaR</i> | Esse projeto |

Os plasmídeos utilizados neste projeto estão descritos na Tabela 6 e foram utilizados em ensaios de expressão, deleção gênica ou etapas de subclonagem.

TABELA 6 – LISTA DE PLASMÍDEOS

| Plasmídeos | Características | Referências |
|---------------------|---|------------------------------|
| pTZ57R | Amp ^R , α -complementação | (THERMO FISHER SCIENTIFIC) |
| pCR2.1A/T | Amp ^R , α -complementação | INVITROGEN |
| pMP220 | Tc ^R , vetor com o gene <i>lacZ</i> sem promotor.(apresenta sítio de policlonagem em orientação inversa ao pPW452) | SPAINK et al, 1987 |
| pPW452 | Tc ^R , vetor com o gene <i>lacZ</i> sem promotor. | WOODLEY; BUCK; KENNEDY, 1996 |
| pK18- Δ phaR | Vetor pK18-mobsacB contendo a sequência usada na deleção do gene <i>phaR</i> | TEIXEIRA, 2015 |
| pTMPZ1 | Região promotora do gene <i>phaZ1</i> clonado no vetor pTZ57RT | MOTA, 2017 |
| pTMPZ2 | Região promotora do gene <i>phaZ2</i> clonado no vetor pTZ57RT | MOTA, 2017 |
| pTMPZ2N1 | Região promotora do gene <i>phaZ2</i> com suposto sítio de ligação a NtrC | Esse projeto |
| pTMPZ2N2 | Região promotora do gene <i>phaZ2</i> com 509 bp | Esse projeto |
| pPWPZ1 | <i>phaZ1::lacZ</i> | MOTA, 2017 |
| pPWPZ2 | <i>phaZ2::lacZ</i> (RP1)* | MOTA, 2017 |
| pMPZ2N1 | <i>phaZ2::lacZ</i> (RP2)* | Esse projeto |
| pMPZ2N2 | <i>phaZ2::lacZ</i> (RP3)* | Esse projeto |

Fonte: O autor.

Nota: * RP1, RP2 e RP3 estão ilustrados na Figura 11A.

4.3 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

As células de *E. coli* quimiocompetentes foram preparadas de acordo com a metodologia de Chan (CHAN et al., 2013) e estocadas em alíquotas de 100 μ L em tubos tipo Eppendorf estéreis a -80 °C. Para transformação bacteriana, utilizou-se 3 μ L de amostra de DNA com concentração de 25 ng/ μ L que foi misturado com a suspensão de células quimiocompetentes e incubado por 30 minutos em gelo, seguido de incubação por 60 segundos a 42°C e resfriamento por 2 minutos em gelo. Em seguida, 900 μ L de meio LB foram adicionados e a suspensão incubada por 60 minutos em estufa a 37 °C para recuperação das células. Após, as células foram plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos necessários para a seleção das bactérias transformantes e incubadas em estufa 37 °C por 12 horas.

4.4 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA

4.4.1 Extração de DNA genômico, minipreparação de plasmídeos, purificação de DNA a partir de gel de agarose e quantificação de DNA

A extração de DNA genômico foi realizada de acordo a metodologia proposta por STIRLING (2003). Os plasmídeos bacterianos foram extraídos pelo método de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989) e analisados por eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mmol/L e EDTA 1mmol/L pH 8,3) (SAMBROOK et al., 1989). A extração de DNA do gel de agarose foi efetuada com o kit Silica Bead DNA Gel Extraction (FERMENTAS). O DNA foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (THERMO SCIENTIFIC).

4.4.2 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Reações de amplificação de DNA (PCR) foram realizadas utilizando DNA genômico, DNA plasmidial purificado ou colônias bacterianas como molde. O sistema de reação, com volume final de 20 μ L continha 1-4 ng/mL de DNA plasmidial, 0,5 pmol/ μ L de cada oligonucleotídeo iniciador ("primer"), 0,2 mmol/L de dNTPs, tampão de reação X7 (NØRHOLM, 2010), 2,5 mmol/L de MgCl₂ e 0,2 μ L de PfuX7 DNA Polimerase (NØRHOLM, 2010) ou Taq DNA polimerase. A amplificação foi realizada em 25 ciclos: 20 segundos a 96 °C, 20-15 segundos para anelamento dos "primers" na temperatura adequada para cada par e 30-120 segundos a 72 °C para extensão. Os "primers" utilizados nas reações de PCR estão descritos na Tabela 7.

TABELA 7 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

| Primers | Sequências (5'→3') | Sítios de restrição | Referências |
|-----------------|---------------------------------------|----------------------------|--------------------|
| Pr. phaZ1_For | GCGACATCAAC ACCT ATCCG | SetI | MOTA, 2017 |
| Pr. phaZ1_Rev | CTGCAG TCGGGTTTCAGAAACG | PstI | MOTA, 2017 |
| Pr. phaZ2_For | CGATGTCTTCCTCGAAGGAG | - | MOTA, 2017 |
| Pr. phaZ2_Rev | CTGCAG TAGTTCTGGTAGAGC | PstI | MOTA, 2017 |
| Fw_Up_phaZ1 | TC GGATCCC AAGCAACTGAAGGTGAT | BamHI | ALVES et al., 2019 |
| Rev_Down_phaZ1 | TCT CTAGAT GCTGATGCAATCGACCGGG | XbaI | ALVES et al., 2019 |
| Fw_Up_phaZ2 | TC GGATCCC CATACCAGTAC | BamHI | ALVES et al., 2019 |
| Rev_Down_phaZ2 | TT CTGCAG TGAATTCGGTGGTCTTCT | PstI | ALVES et al., 2019 |
| FO_phaZ2 | GGGGCGGATTTTCGTTGAGA | - | ALVES et al., 2019 |
| phaZ2GSTF | GAATTC ATCCCTACCTATCAGCTCT | EcoRI | Esse projeto |
| PhaZ2GSTR | AAGCTT CTTGCTGGCCCTAC | HindIII | Esse projeto |
| phaZ2_Promo_Rev | T ACTGCAG GGAACGCCGCCTCTGGAT | PstI | Esse projeto |
| pmpfor | GCTCACCCCAAAAATGGCA | - | WASSEM, R. |
| laczrev | GCAAGGCGATTAAGTTGGGT | - | WASSEM, R. |
| M13F | CAGGAAACAGCTATGAC | - | THERMO SCIENTIFIC |
| M13R | GTAAAACGACGGCCAGT | - | THERMO SCIENTIFIC |
| FO_phbF | 5"-GGTTTCGGTCGCATCATCAA-3" | - | TEIXEIRA, 2015 |
| RO_phbF | 5"-CTTCATCGGACTTGACCAGG-3" | - | TEIXEIRA, 2015 |

As bases indicadas em negrito correspondem a sítios de restrição introduzidos nas sequências para reconhecimento das enzimas de restrição indicadas.

4.4.3 Reações de ligação de DNA

As reações de ligação com 10 µL de volume final continham: 3 µL de DNA inserto (concentrações ajustadas para 100 ng/µL), 2 µL de vetor (25 ng/µL), 1 µL de T4 DNA ligase (200 U/µL) e 1 µL de tampão T4 DNA ligase (concentração final 1X). A reação de ligação foi incubada em sala climatizada a 16°C por 12 horas. A reação foi transformada em *E. coli* estirpe TOP10 quimiocompetente e a seleção dos plasmídeos recombinantes foi feita após o crescimento das colônias em meio LA contendo 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo (X-gal). Os plasmídeos recombinantes foram confirmados por restrição e sequenciamento.

4.4.4 Sequenciamento de DNA

Os plasmídeos recombinantes foram sequenciados para confirmação da identidade dos insertos com os “primers” M13F e M13R. A reação de sequenciamento foi realizada com os oligonucleotídeos M13F e M13R (Tabela 7) e kit de sequenciamento BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (THERMO SCIENTIFIC), após amplificação a reação foi analisada no equipamento 3500xL Genetic Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS).

4.5 Clonagem das regiões promotoras do gene *phaZ2* de *H. seropedicae*

A região promotora do gene *phaZ2* contendo 509 bp a montante mais 38 bp a jusante do códon de início de tradução (547 bp no total) foi amplificada utilizando os "primers" FO_phaZ2 e Pr. phaZ2_Rev e clonada no vetor pCR2.1A/T gerando o plasmídeo pTMPZ2N1. Esse plasmídeo foi digerido com as enzimas *EcoRI/PstI*, liberando o fragmento correspondente a região promotora. Esse fragmento foi purificado do gel e clonado no vetor pMP220 (SPAINK et al., 1987) originando o vetor pMPZ2N1.

Uma outra sequência da região promotora do gene *phaZ2* foi obtida após amplificação por PCR usando os oligonucleotídeos iniciadores FO_phaZ2 e phaZ2_Promo_Rev, essa sequência contém 509 bp a montante do códon de início de tradução e também foi clonada no vetor pCR2.1A/T gerando o plasmídeo pTMPZ2N2, da mesma forma que a sequência promotora anterior, esta também foi clonada no vetor pMP220 originando o vetor pMPZ2N2.

4.6 CONJUGAÇÃO BACTERIANA

Os plasmídeos pPW452 contendo as fusões *phaZ1::lacZ* e *phaZ2::lacZ* foram transferidos para as estirpes de *H. seropedicae*, através de conjugação bacteriana. A estirpe conjugante de *E. coli* S17-1 (SIMON et al., 1983) quimiocompetente foi previamente transformada com as fusões. As estirpes de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram cultivadas na noite anterior à conjugação (aproximadamente 16 horas) em meio NFbHPN-malato e LB, respectivamente, suplementados com os antibióticos necessários à seleção. No dia da conjugação, as culturas saturadas foram novamente inoculadas nos

meios de cultura adequados, sem antibiótico. Um volume de 75 μL das estirpes de *H. seropedicae* (receptora) foram inoculadas em 2,5 mL de Nfb-malato, 3 horas antes do inóculo da estirpe S17.1. Sendo que para essa estirpe (doadora) foi inoculado 25 μL da cultura crescida durante a noite em 2 mL de meio LB. Os tempos de cultivo, para a conjugação, das estirpes de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram de aproximadamente 6 e 3 horas, respectivamente, nas condições ideais de crescimento. Posteriormente foram realizadas misturas da cultura de *H. seropedicae* com a cultura de *E. coli* em duas proporções distintas. Em um microtubo, tipo Eppendorf, foram misturados 50 μL da cultura de *H. seropedicae* com 5 μL da cultura de *E. coli* e em outro 100 μL da cultura de *H. seropedicae* com 2 μL da cultura de *E. coli*. As suspensões de células foram colocadas em polos distintos na placa (sem plaquear), contendo meio LA/Nfb-malato (proporção de 1:3) e incubadas a 30°C por 16 horas. Após incubação, a massa celular foi raspada e ressuspensa em 1 mL de meio líquido Nfb-malato e a suspensão plaqueada (250 μL /placa) em placa com meio Nfb-malato (solução de fosfatos, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ foi usado para seleção de estirpes recombinantes em experimentos de deleção gênica) ou Nfb-malato sólido contendo 20 mmol/L de NH_4Cl e os antibióticos adequados.

4.7 ESTRATÉGIA DE DELEÇÃO DO GENE *phaR* NA ESTIRPE ΔphaC1 DE *H. seropedicae*

A deleção do gene *phaR* na estirpe ΔphaC1 foi realizada através da técnica de deleção em fase. Para isso obtemos o plasmídeo pK18- ΔphaR (pK18mobSacB contendo o produto de deleção do gene *phaR*), cedido por TEIXEIRA, 2015. O produto de deleção foi construído pelo autor previamente citado, conforme descrito a seguir. Foi utilizado 2 pares de oligonucleotídeos iniciadores: O par Fw_phaR_UP (5'-GAGGATCCCGTGACCGTCAACACCGTCT-3') e Rev_phaR_UP (5'-AGATCTCTTAGGTCGTCTCTATGCAGTAGTCATCTGAAGTCC AGTC-3'). A reação de PCR com esse par de oligonucleotídeo resultou no fragmento de 556 pb (fragmento phaR_UP). Esse fragmento contém 544 pb *upstream* (a montante) ao códon de início de tradução do gene *phaR* e 12 pb *downstream* (a jusante) ao códon de início de tradução do gene *phaR*. O segundo par de

oligonucleotídeo: Fw_phaR_DOWN
(5'TAGAGACGACCTAAGAGATCTATGTTTCGGCACCTTCCCC-3') e
Rev_phaR_DOWN (5'-GTTCTGCAGTTGCCGCGATTCATGGTGG-3') foi
utilizado para amplificação do fragmento phaR_DOWN. O fragmento amplificado
possui 507 pb: 453 pb *downstream* ao códon de término de tradução e 54 pb
upstream ao códon de término de tradução de *phaR*. Os oligonucleotídeos
Rev_phaR_UP e Fw_phaR_DOWN possuem uma sequência complementar de
21 bp em suas respectivas extremidades 5'. Essa região foi utilizada na técnica
de *PCR overlapping* (HECKMAN e PEASE, 2007) para junção dos fragmentos.
Após a *PCR overlapping* foi obtido um fragmento de 1087 bp (Δ phaR), que foi
então subclonado no vetor pTZ18R, posteriormente foi excisado desse vetor
com enzimas de restrição e clonado no vetor pK18mobSacB gerando o
plasmídeo pK18- Δ phaR, (para mais detalhes ver TEIXEIRA, 2015; Materiais e
métodos item 4.5). Para construção do duplo mutante Δ phaC1 Δ phaR esse
plasmídeo foi transformado na estirpe S17.1 de *E. coli* e conjugado com a estirpe
 Δ phaC1 de *H. seropedicae*. O primeiro evento de recombinação e a deleção
cromossomal do gene *phaR* foram confirmados usando o par de
oligonucleotídeos FO_phbF e RO_phbF (Tabela 7), essas sequências anelam
115 pb *upstream* e 123 pb *downstream* da região deletada, respectivamente. Os
fragmentos amplificados possuem 1840 pb na estirpe selvagem e 1381 pb no
mutante Δ phaR.

4.8 CURVAS DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae*

As estirpes de *Herbaspirillum seropedicae*, SmR1 (selvagem) e os
mutantes Δ phaC1, Δ phaZ1, Δ phaZ2, Δ phaZ12 foram cultivados a 30 °C em
meio Nfb-malato (KLASSEN et al., 1999) contendo malato (37 mmol/L) como
fonte de carbono, NH₄Cl 20 mmol/L como fonte de nitrogênio, 50 mL/L de solução
de fosfatos (159,5 g/L de KH₂PO₄ e 17,8 g/L de K₂HPO₄) e antibiótico
estreptomicina (80 µg/mL).

A determinação do tempo de geração de cada estirpe foi realizado
seguindo o procedimento descrito por Miller (1972). As curvas de crescimento
foram obtidas após crescimento das estirpes em frascos de 60 mL contendo 10
mL meio líquido Nfb-malato. Essas culturas foram utilizadas como inóculo e

ajustando a densidade ótica (DO_{600}) no início do crescimento para 0,01 e incubadas a 30 °C sob agitação orbital de 120 rpm. A DO_{600} de cada cultura foi monitorada ao longo de 18 horas de crescimento através de espectrofotômetro de microplacas Epoch (BIOTEK®) usando volume de 200 μ L de cultura. Para determinar o tempo de duplicação de cada estirpe, os valores de DO_{600} foram convertidos em logaritmo base 10 e plotados em função do tempo (em horas). A região linear do gráfico foi analisada e o coeficiente angular determinado. O coeficiente angular de uma reta durante o crescimento exponencial bacteriano é designado como K, a constante de crescimento (MILLER, 1972). Esse parâmetro foi utilizado para calcular o tempo de duplicação de acordo com o seguinte princípio, o aumento no número de células (N) por unidade de tempo (t) é proporcional ao número de células presentes na cultura no início do intervalo de tempo (N_0). Essa relação é expressa pela fórmula apresentada abaixo (MILLER, 1972):

$$\text{Log}(N) = \text{Log}(N_0) + Kt \quad (1)$$

4.9 ENSAIOS DE β -GALACTOSIDASE

A análise de expressão dos genes *phaZ1* e *phaZ2* foi feita através de fusões plasmidiais das regiões promotora com o gene *lacZ* por meio do ensaio de β -galactosidase (MILLER, 1992) seguido da determinação da atividade específica. Células de *H. seropedicae* transformadas com as construções *phaZ1::lacZ* ou *phaZ2::lacZ* foram cultivadas em meio NFbHPmalato, contendo tetraciclina (10 μ g/mL), estreptomicina (80 μ g/mL) e 20 ou 2 mM de NH_4Cl a 30 °C e 120 rpm.

O sistema de reação para medir a atividade de β -galactosidase continha 900 μ L de tampão Z, 30 μ L de clorofórmio e 100 μ L de cultura. O sistema de reação foi mantido em banho-maria a 30°C, a reação foi iniciada com adição de 200 μ L de 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) (SIGMA) 4 mg/L e foi interrompida com 500 μ L de Na_2CO_3 (1 mol/L). Os tubos Eppendorf contendo o sistema de reação foram centrifugados durante 10 minutos a 4 °C e então 200 μ L do sobrenadante foi coletado para determinação da absorbância do o-nitrofenol (ONP) formado, a 420 e 550 nm. A atividade específica de β -

galactosidase foi calculada após dosagem de proteínas (BRADFORD, 1976) e expressa em nmol de ONP formado por mg de proteína por tempo em minutos, usando curva de calibração com o-nitrofenol.

4.10 QUANTIFICAÇÃO DE PHB POR CITOMETRIA DE FLUXO

A estirpe SmR1 (selvagem) e os mutantes *ΔphaC1*, *ΔphaZ1*, *ΔphaZ2* e *ΔphaZ1.2* foram cultivadas em frascos de 60 mL com 10 mL de cultura cada (Meio Nfb-malato). As culturas para realização dos ensaios estavam no início da fase estacionária de crescimento com DO₆₀₀ variando entre 1,2 e 1,4.

A quantificação de PHB por citometria de fluxo foi realizada segundo procedimento descrito por Alves et al. (2017). Foram coletados 100 µL de cada cultura e as células sedimentadas por centrifugação, durante 60 segundos a 14.100 × g. O meio de cultura foi descartado e as células ressuspendidas em 1 mL de tampão TBAC (Tampão PBSA (Tabela 8) pH 7,2, com 1 mM de ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) e 0.01% de Tween 20) contendo 50% de etanol absoluto. Após 1 minuto a temperatura ambiente foi adicionado vermelho do Nilo à suspensão de células (10 µL de uma solução estoque 1 mg/mL), seguido de incubação por 60 segundos na ausência de luz e centrifugação a 12000 rpm por 30 segundos. Após centrifugação, as células foram ressuspendidas em 1 mL de tampão TBAC sem etanol e analisadas por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6 Flow Cytometer). Foram contabilizados 100.000 eventos para cada amostra. A mediana da intensidade de fluorescência captada pelo filtro FL2-H foi considerada nas análises de quantificação relativa de PHB para as estirpes avaliadas. O filtro ótico FL2-H (BD Accuri™ C6 Flow Cytometer) seleciona a emissão de fluorescência emitida entre 540 a 585 nm, faixa de emissão de fluorescência para PHB corado com vermelho do Nilo (DEGELAU et al., 1995); GREENSPAN; MAYER; FOWLER, 1985).

TABELA 8 - PBSA (SOLUÇÃO SALINA FOSFATO)

| Composição | Concentração |
|------------|--------------|
|------------|--------------|

| | |
|----------------------------------|------------|
| NaCl | 137 mmol/L |
| KCl | 2,7 mmol/L |
| Na ₂ HPO ₄ | 8,0 mmol/L |
| KH ₂ PO ₄ | 1,4 mmol/L |

4.11 ENSAIOS DE MOTILIDADE CELULAR

O teste de motilidade foi realizado em placas de petri de poliestireno contendo 20 mL de meio NFb-malato semi-sólido (ágar 0,17%), solução de fosfatos e NH₄Cl nas concentrações 20 e 2 mM. Para realização do ensaio a DO₆₀₀ da cultura foi ajustada em 0,01 e 10 µL foram inoculados no centro da placa de petri. As placas de meio semi-sólido foram mantidas em estufa a 30 °C e os resultados registrados por meio de imagem.

4.12 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

As sequências das proteínas PhaZ1 (Número de acesso (NA): ADJ63135) e PhaZ2 (NA: ADJ62158) de *H. seropedicae*, assim como as sequências das depolimerases de *R. eutropha* PhaZa1 (NA: WP_011614907) e PhaZa2 (NA: WP_010813770) foram obtidas do banco de dados de proteínas NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). As sequências foram salvas no formato fasta. O alinhamento foi realizado no programa MEGA-X (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms*) com o algoritmo MUSCLE (*Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) (KUMAR et al., 2018). Os resultados do alinhamento foram salvos em formato fasta. Para geração do arquivo de imagem (Figura 4), o resultado do alinhamento foi submetido ao programa BoxShade (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html); usamos a configuração *EPS_portrait* como formato de saída do resultado do alinhamento. Esse arquivo foi analisado no programa Adobe Illustrator® e exportado no formato JPG. Os parâmetros de identidade e similaridade do alinhamento foram calculados usando o programa SIAS (Sequences Identities And Similarities) disponível em <<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>>.

A análise filogenética foi realizada com 23 sequências de aminoácidos de proteínas depolimerases obtidas do banco de dados NCBI. Sendo 20 sequências de diferentes espécies do gênero *Herbaspirillum*, as depolimerases PhaZa1 e PhaZa2 de *R. eutropha* e como grupo externo da análise a sequência da

depolimerase PhbZ1 de *Azotobacter vinelandii*. A análise foi realizada no programa MEGA-X usando o método de *Neighbor-Joining*, com *bootstrap* associado, referente a 10.000 replicatas. A distância evolucionária foi computada usando o método *p-distance* e estão em unidades do número de aminoácidos diferentes por sítios.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* possui dois genes que codificam proteínas PHB depolimerases envolvidas com a mobilização de polihidroxibutirato: *phaZ1* e *phaZ2*. PhaZ1 está registrada na base de dados NCBI com o número de acesso ADJ63135 e PhaZ2 com número de acesso ADJ62158. As sequências foram extraídas da base de dados NCBI e submetidas a base de dados Pfam (*Protein Family Database*) (FINN et al., 2008). Essa base de dados identifica os domínios conservados e agrupa as proteínas de acordo com a similaridade desses domínios em diferentes famílias. De acordo com a análise as proteínas PhaZ1 e PhaZ2 compartilham o domínio depolimerase-C terminal, representado pela família de PHB depolimerases intracelulares bacterianas agrupadas sob código de acesso PF06850. Essa família de proteínas é caracterizada por sua função na mobilização de PHB em oligômeros e monômeros de 3-hidroxibutirato (KNOLL et al., 2009). As PHB depolimerases de *Ralstonia eutropha* H16, PhaZa1 (NCBI: WP_011614907) e PhaZa2 (NCBI: WP_010813770) também pertencem a essa família de proteínas. Em virtude dessa similaridade as respectivas sequências dessas proteínas foram utilizadas em conjunto com as sequências das PHB depolimerases de *H. seropedicae* na análise de alinhamento (Figura 4).

são consideradas homólogas quando elas compartilham mais que 30% de identidade ao longo da sequência, confirmando portanto que as proteínas analisadas são homólogas.

TABELA 9 - SIMILARIDADE E IDENTIDADE GLOBAL DAS PROTEÍNAS PhaZs

| Sequências | Identidade | | Similaridade | |
|----------------|-------------|-------------|--------------|-------------|
| PhaZ2_Hsero | 46,60% | | 58,07% | |
| PhaZa1_R.e-H16 | 65,10% | 44,73% | 77,04% | 56,90% |
| PhaZa2_R.e-H16 | 44,96% | 60,18% | 56,67% | 69,32% |
| | PhaZ1_Hsero | PhaZ2_Hsero | PhaZ1_Hsero | PhaZ2_Hsero |

Fonte: O autor.

Quando comparamos a identidade ou a similaridade entre as sequências das depolimerases, observamos que os valores foram maiores entre proteínas homólogas de diferentes espécies (PhaZ1 ou PhaZ2) do que num mesmo organismo. Isso indica ser relevante para ambas as espécies manterem a conservação dessas proteínas ao longo da evolução. Com objetivo de expandir essa análise para o gênero *Herbaspirillum*, as sequências codificantes de depolimerases em algumas espécies foram obtidas do banco de dados NCBI e alinhadas através do algoritmo MUSCLE presente no software MEGA-X (FELSENSTEIN, 1985; SAITOU et al., 1987; KUMAR et al., 2018). Após a obtenção do alinhamento, o arquivo gerado foi usado para análise filogenética (Figura 5).

Os resultados mostraram que essas proteínas se agrupam em dois clados distintos: um com o agrupamento homólogo das proteínas PhaZ1 e o segundo com proteínas homólogas à PhaZ2. Ambas as proteínas de *R. eutropha* distribuem-se entre os clados. A presença de duas proteínas aparentemente com a mesma função pode não ser redundante para essas espécies, uma vez que elas conservam os resíduos de aminoácidos que levam a distinção observada, com divisão em dois clados. Em relação ao gênero *Herbaspirillum* esses resultados indicam que essas proteínas não surgiram através de processos evolutivos dentro do gênero, por exemplo evento de duplicação gênica. Possivelmente, os genes que deram origem a essas proteínas já estavam presentes no ancestral comum ao gênero, ou foram adquiridos por transferência horizontal.

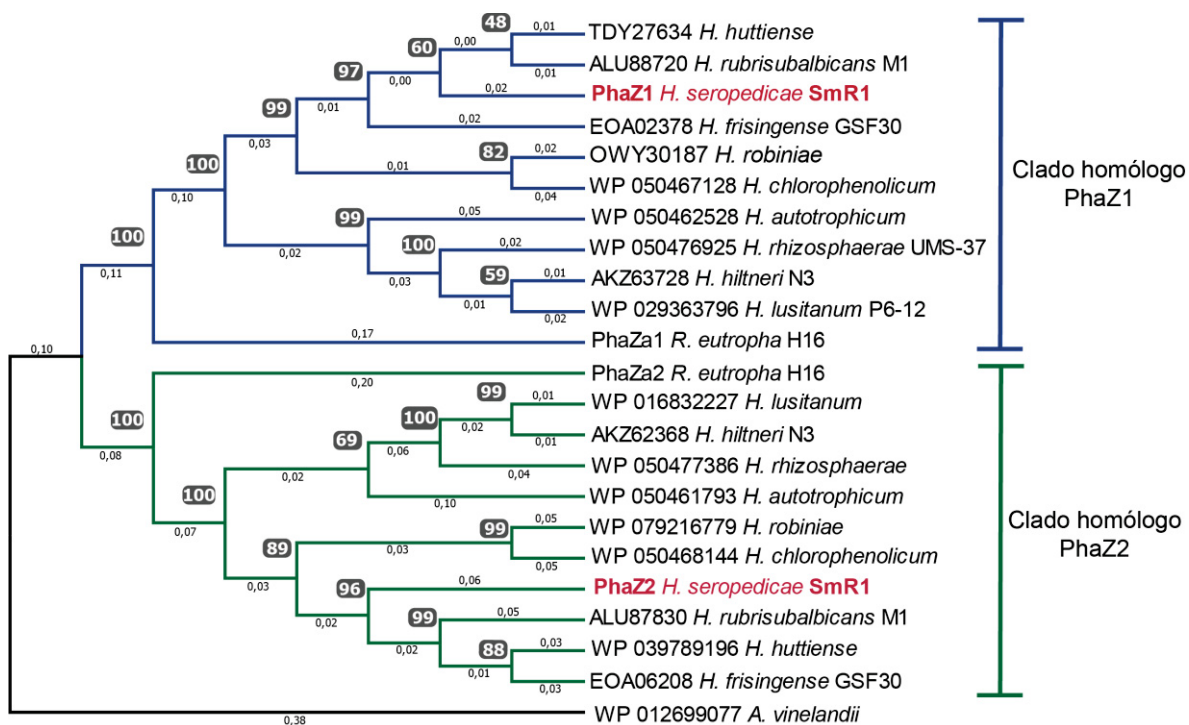


FIGURA 5 - ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS PROTEÍNAS PHAZ

A análise filogenética dividiu as PHB depolimerases de *H. seropedicae* (indicado em vermelho) em dois clados distintos. O clado das proteínas homólogas PhaZ1 (azul) reúne as PHB depolimerases de espécies do gênero *Herbaspirillum* com maior similaridade à proteína PhaZa1 de *R. eutropha*, enquanto aquelas com maior similaridade a PhaZa2 de *R. eutropha* são apresentadas em verde. A metodologia utilizada foi Neighbor-Joining. A imagem obtida corresponde a melhor topologia com a soma total do comprimento dos ramos de 2,22 (valores individuais em cada ramo). Os números brancos destacados em cinza correspondem a porcentagem dos valores de *bootstrap* correspondendo a 10000 replicatas. As distâncias evolucionárias foram computadas através do método *p-distance* e estão em unidades do número de aminoácidos diferentes por sítios. O respectivo número de acesso das sequências está mostrado à esquerda do nome da espécie.

Fonte: O autor.

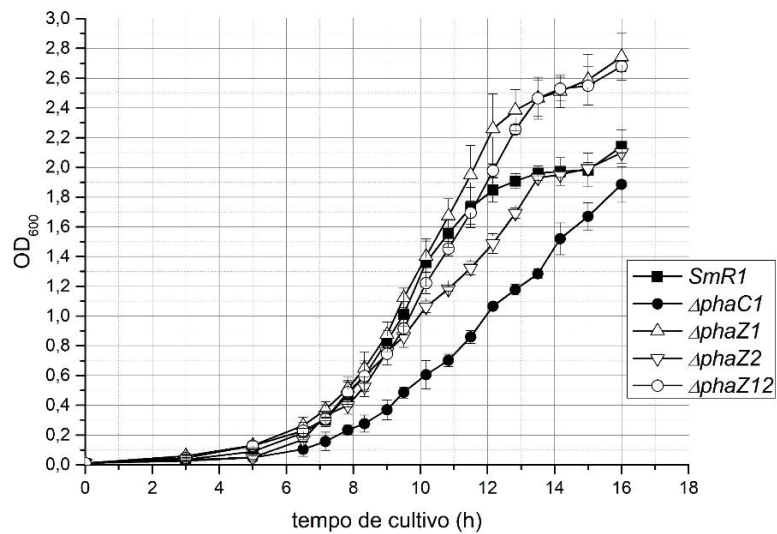
5.2 PERFIL DE CRESCIMENTO

Uma das análises realizadas com as estirpes mutantes foi em relação ao perfil de crescimento. Para isso, as estirpes $\Delta phaC1$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$, $\Delta phaZ12$ e estirpe selvagem SmR1 foram cultivadas por 16 horas e as medidas de DO₆₀₀ foram obtidas e utilizadas para avaliar se as deleções dos genes *phaZ1* e *phaZ2* afetavam o perfil de crescimento em comparação com a estirpe selvagem SmR1 (Figura 6). O valor de absorvância (DO₆₀₀) foi usado para calcular a constante de crescimento (K) e o tempo de duplicação das estirpes na fase exponencial do crescimento (Tabela 10).

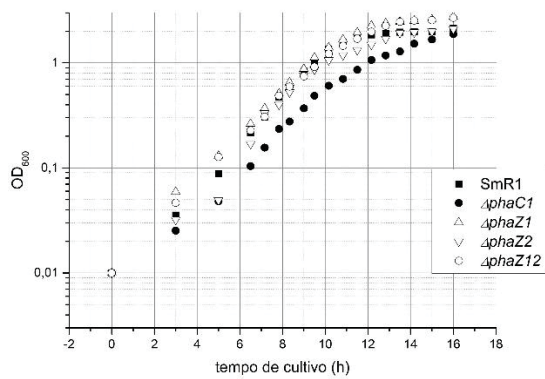
O tempo de duplicação da estirpe SmR1 foi de 1,3 horas (h). As estirpes mutantes nos genes de mobilização de PHB tiveram tempos de duplicação ligeiramente maiores, sendo 1,4 h para $\Delta phaZ1$; 1,6 h para $\Delta phaZ2$ e 1,5 h para $\Delta phaZ12$. Com relação ao perfil de crescimento da estirpe $\Delta phaC1$, deficiente na síntese de PHB, observamos que em comparação com as demais estirpes, ela possui uma fase lag de crescimento mais longa.

Ao final da fase estacionária de crescimento as estirpes *phaZ1* e *phaZ12* apresentaram densidades ópticas maiores que as demais estirpes. A maior DO_{600} apresentada não necessariamente implica em um maior número de células, mas está relacionada a maior quantidade de PHB cujos grânulos formados são opticamente ativos e podem influenciar as leituras de absorvância (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002). Esse fenômeno foi observado em *Burkholderia thailandensis* (MARTINEZ; DÉZIEL, 2019).

(A)



(B)



(C)

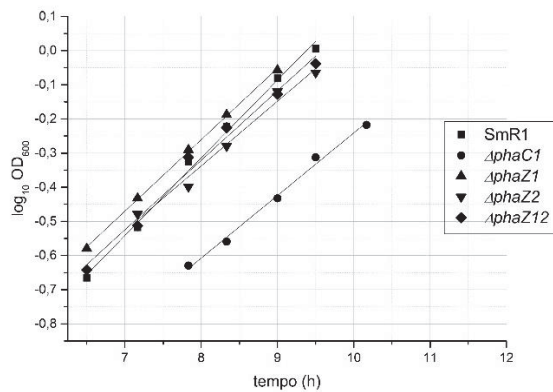


FIGURA 6 - PERFIL DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae*

O gráfico (A) contém as leituras de absorbância plotadas em função do tempo. Em (B) os dados de absorbância foram convertidos em log base 10 e plotados em função do tempo. A partir desse gráfico foram selecionados os pontos que melhor refletem a fase exponencial de crescimento, esse pontos foram plotados novamente no gráfico (C), e para cada estirpe foi realizado regressão linear e extraídos os valores do coeficiente angular (K). Os valores dos coeficientes de correlação (R^2) foram 0,98 para as estirpes $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ12$, e 0,99 para as demais. Os pontos representam a média \pm desvio padrão de triplicatas biológicas.

Fonte: O autor.

TABELA 10 - CONSTANTE DE CRESCIMENTO (K) E TEMPO DE DUPLICAÇÃO EM DIFERENTES ESTIRPES DE *H. seropedicae* AVALIADAS QUANTO AO PERFIL DE CRESCIMENTO.

| Estirpe | Constante de crescimento (k) | Tempo de duplicação (h) |
|-----------------|------------------------------|-------------------------|
| SmR1 | 0,227 | 1,3 |
| $\Delta phaC1$ | 0,183 | 1,6 |
| $\Delta phaZ1$ | 0,209 | 1,4 |
| $\Delta phaZ2$ | 0,189 | 1,6 |
| $\Delta phaZ12$ | 0,203 | 1,5 |

Fonte: O autor

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE PHB POR CITOMETRIA DE FLUXO

Diversas técnicas tem sido utilizadas para detectar e quantificar polihidroxiacetato em bactérias, dos quais microscopia, cromatografia gasosa e metodologias por fluorescência são as mais usadas (DE RIJK et al., 2005; TAN et al., 2014; ALVES et al., 2017). A quantificação de PHB nas estirpes de *H. seropedicae* foi realizada usando citometria de fluxo, após as células serem coradas com vermelho nilo utilizando metodologia descrita (ALVES et al., 2017). O vermelho nilo interage com o grânulo de PHB levando à fluorescência da célula, entretanto essa interação não é específica e a interação com lipídeos neutros também ocorre (GREENSPAN; MAYER; FOWLER, 1985). O ensaio realizado com o mutante $\Delta phaC1$ (que não produz PHB) e o $\Delta phaZ1$ é apresentado na Figura 7. Apesar da densidade celular coletada ser a mesma, o perfil de fluorescência é diferente para as duas estirpes: menor em $\Delta phaC1$, logo a curva de fluorescência (Figura 7A) dessa estirpe é deslocada para a esquerda, enquanto a estirpe que produz o polímero possui curva deslocada para a direita, porque emite mais fluorescência em condições semelhantes de crescimento devido a presença de PHB. A emissão de fluorescência no mutante $\Delta phaC1$ corresponde à ligação do corante à lipídeos neutros (GREENSPAN; MAYER; FOWLER, 1985) uma vez que essa estirpe não produz PHB (TIRAPELLE et al., 2013). Desta forma, a fluorescência apresentada pela estirpe $\Delta phaC1$ foi considerado basal na análise das demais estirpes.

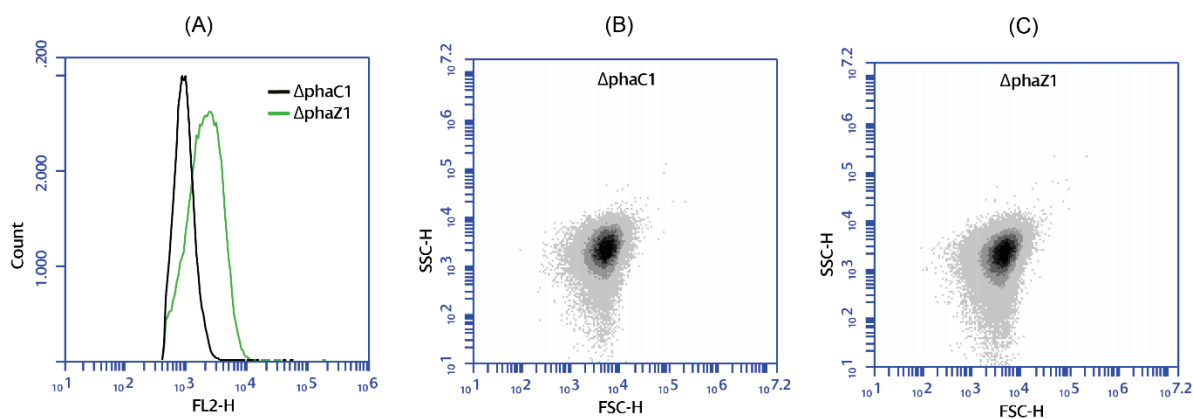


FIGURA 7- QUANTIFICAÇÃO DE PHB NOS MUTANTES $\Delta phaC1$ E $\Delta phaZ1$

Os gráficos foram gerados pelo software BD accuri C6 plus (BD Accuri™ C6 Flow Cytometer) e em (A) correspondem a sobreposição da fluorescência emitida pelas estirpes $\Delta phaC1$ e $\Delta phaZ1$ coradas com vermelho Nilo, DO_{600} : 1,1 e 1,2 respectivamente. No eixo vertical é representado o número de eventos contabilizados, refere-se às células que ao serem excitadas a 488 nm emitiram fluorescência em 585 nm. A fluorescência emitida nesse comprimento de onda foi detectada pelo filtro ótico FL2-H, conseqüentemente o eixo horizontal descreve a intensidade de fluorescência em log emitida pelas estirpes. Em (B) e (C) os gráficos correspondem a densidade celular mostrando que o padrão é bastante similar.

Fonte: O autor

Os resultados obtidos com a quantificação de polihidroxibutirato nas diferentes estirpes de *H. seropedicae* são apresentados (Figura 8). Enquanto a estirpe $\Delta phaC1$, apresenta uma baixa fluorescência, independente da densidade ótica da cultura, a estirpe selvagem SmR1 apresenta aumento de fluorescência com o aumento da DO da cultura, sugerindo aumento da quantidade de PHB e indicando que a síntese ocorre durante a fase exponencial de crescimento e a quantidade do polímero atinge o máximo em DO_{600} : 1,0; final da fase exponencial e início da fase estacionária. Posteriormente é observada a diminuição da fluorescência (particularmente em DO acima de 1,5), indicando a mobilização do polímero. Esse resultado indica que *H. seropedicae* começa a acumular PHB durante a fase exponencial de crescimento e esse acúmulo é estabilizado no início da fase estacionária. Entretanto, ao final da fase estacionária ocorre diminuição da quantidade do polímero, indicando mobilização e atingindo níveis de fluorescência semelhantes ao início do crescimento. Esse perfil de acúmulo e mobilização de PHB é semelhante ao observado em *Ralstonia eutropha* H16 (HANDRICK; REINHARDT; JENDROSSEK, 2000; SAEGUSA et al., 2001).

O mutante $\Delta phaZ1$ apresenta o perfil de acúmulo de PHB mais acentuado, sugerindo um maior acúmulo do polímero. A diminuição da fluorescência é

observada mais tardiamente na fase estacionária de crescimento, mas não chega a atingir os níveis de fluorescência observado no início do crescimento. Esse comportamento sugere a importância de PhaZ1 na mobilização de PHB e é reforçado pelo comportamento apresentado pelo mutante $\Delta phaZ2$ que foi semelhante à estirpe selvagem SmR1. Não foi observado diminuição da fluorescência no duplo mutante $\Delta phaZ12$ indicando que PHB não é mobilizado. Estes resultados sugerem que PhaZ1 corresponde a principal PHB depolimerase em *H. seropedicae* e que PhaZ2 também é capaz de degradar PHB mas sua atividade é observada na fase estacionária mais avançada, na ausência de PhaZ1.

O mutante do gene *phaZ2* ($\Delta phaZ2$) apresentou um perfil de mobilização similar a estirpe selvagem, ou seja, acúmulo de PHB ao longo da fase exponencial e início da fase estacionária, e a mobilização ocorrendo em um período tardio do crescimento, esse resultado reafirma a função da depolimerase PhaZ1 na mobilização de PHB em *Herbaspirillum seropedicae*. Por outro lado, quando observamos a curva de fluorescência da estirpe $\Delta phaZ2$ no gráfico (Figura 8), notamos uma redução na quantidade de PHB acumulado em relação as demais estirpes (exceto $\Delta phaC1$). A princípio esse resultado não parece ser um efeito direto da deleção de *phaZ2*.

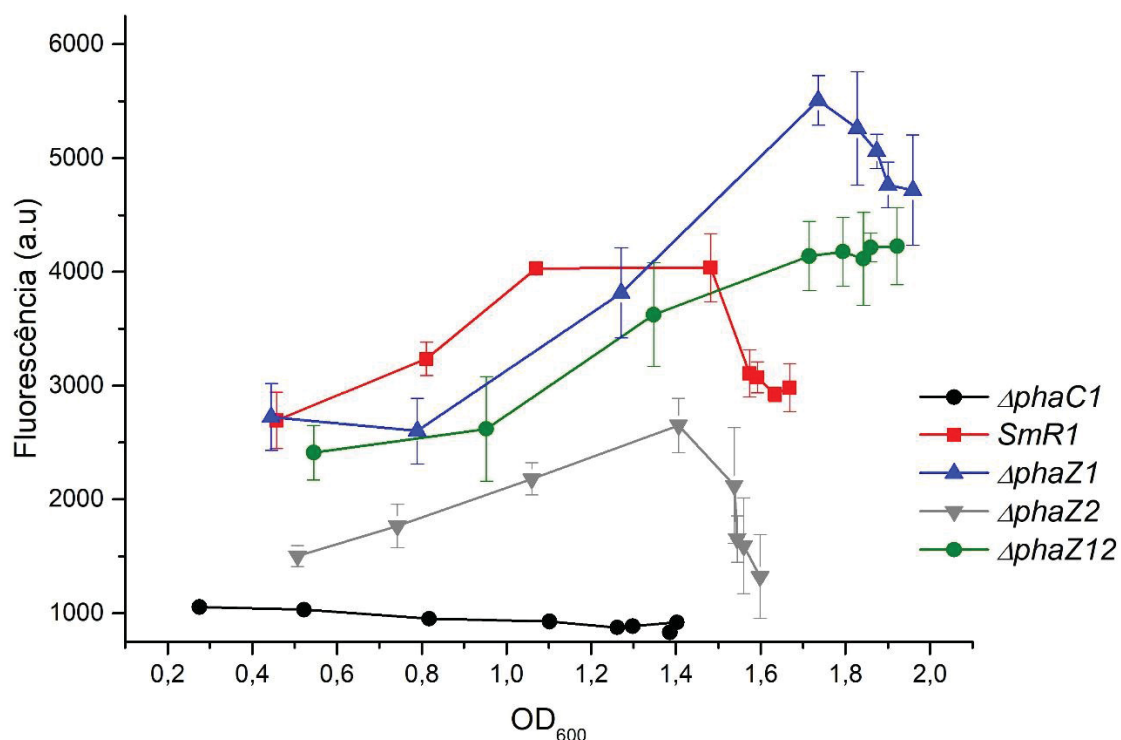


FIGURA 8 - QUANTIFICAÇÃO DE PHB EM DIFERENTES ESTIRPES DE *H. seropedicae*

Determinação de PHB por citômetro de fluxo conforme descrito em Material e Métodos. O gráfico corresponde à fluorescência apresentada por cada estirpe em relação à densidade ótica da cultura. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão de 3 culturas independentes.

Fonte: O autor.

5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DO GENE *phaZ1*

A expressão dos genes para as PHB depolimerases de *Herbaspirillum seropedicae* foi avaliada através de fusões plasmidiais da região promotora com o gene repórter *lacZ*. Essa análise foi anteriormente apresentada por Mota (2017). A expressão do gene *phaZ1* apresentou um padrão de expressão constitutiva na estirpe selvagem e mostrou uma redução significativa de expressão quando testada na estirpe $\Delta phaC1$.

A expressão da fusão *phaZ1::lacZ* foi realizada novamente nas estirpes mutantes $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e duplo mutante $\Delta phaZ12$ em culturas na fase estacionária de crescimento (Figura 9). Observa-se que a expressão de *phaZ1* ocorre na estirpe selvagem e nos mutantes para PHB depolimerases, essencialmente no mesmo nível. Por outro lado, essa expressão é diminuída no

mutante $\Delta phaC1$ que não produz PHB, indicado que a ausência do polímero inibe a expressão do gene *phaZ1*. A redução na expressão do gene *phaZ1* no mutante $\Delta phaC1$ também foi confirmado por meio de análise transcriptômica em relação a estirpe SmR1 (TEIXERA et al., 2015).

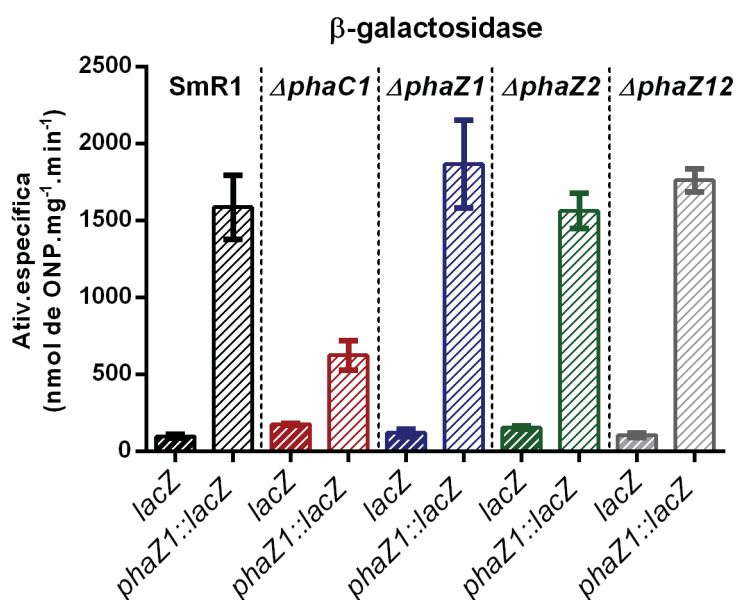


FIGURA 9 - ATIVIDADE ESPECÍFICA DE β -GALACTOSIDASE EM DIFERENTES ESTIRPES DE *H. seropedicae* CONJUGADAS COM A FUSÃO *phaZ1::lacZ*

Ensaio de β -galactosidase realizado com as estirpes de *H. seropedicae* conjugadas com a fusão *phaZ1::lacZ* e com o repórter sem promotor – *lacZ* (vetor pPW452). As estirpes foram cultivadas por 16 horas a 30 °C sob agitação a 120 rpm em NFbHP-malato, contendo 20 mmol/L de NH₄Cl e os antibióticos tetraciclina (10 μ g/mL) e estreptomicina (80 μ g/mL). Os dados correspondem a média \pm desvio padrão de duplicatas independentes analisadas em duplicatas.

Fonte: O autor.

5.4.1 Modelo de regulação do gene *phaZ1*

O gene *phaR* (anteriormente denominado *phbF*) de *Herbaspirillum seropedicae* codifica uma proteína com função regulatória dentro do metabolismo de PHB (KADOWAKI et al., 2011). Essa proteína atua reprimindo a expressão dos genes *phaP1*, *phaP2* e a sua própria expressão na ausência de PHB (KADOWAKI et al., 2011; ALVES et al., 2016). Assim como ocorre em outras bactérias, as evidências experimentais sugerem que PhaR tem afinidade por sequências ricas em bases TGC presentes na região promotora dos genes do metabolismo de PHB e também para o grânulo de PHB. Na presença de PHB

a proteína PhaR apresenta maior afinidade de ligação ao grânulo, desligando-se da região promotora e, isso resulta na desrepressão dos genes (KADOWAKI et al., 2011; ALVES et al., 2016; MAEHARA et al., 2002). Kadowaki et al (2011) analisaram as sequências promotoras dos genes envolvidos no metabolismo de PHB, identificando a sequência consenso de ligação de PhaR (TG[N]TGC[N]3GCAA).

Em *Rhodobacter sphaeroides* FJ1 a proteína homóloga PhaR reprime a expressão dos genes *phaP*, *phaZ* e sua própria expressão (CHOU et al., 2009). Na bactéria *Paracoccus denitrificans* a atividade de uma proteína com as mesmas características também denominada PhaR apresenta a capacidade de reprimir a expressão de *phaC* e *phaP*, com possibilidade de *phaZ* ser um dos alvos de regulação dessa proteína (MAEHARA et al., 2002).

A expressão de *phaZ1* em *H. seropedicae* ocorre supostamente a partir de um promotor σ^{70} (sigma 70), sendo que a sequência consenso de ligação da proteína PhaR, presente na região promotora desse gene sobrepõe o sítio σ^{70} (Figura 10). Esses dados, os resultados de expressão gênica via fusão *phaZ1::lacZ* (Figura 9) e análise transcriptômica, indicando redução na expressão de *phaZ1* no mutante $\Delta phaC1$ (TEIXEIRA, 2015) apontam que o gene *phaZ1* pode ser regulado pela proteína PhaR. Essas características permitiram hipotetizar que a redução na expressão de *phaZ1* no mutante $\Delta phaC1$ ocorre devido ao efeito repressor da proteína PhaR, uma vez que essa proteína pode ligar-se a região promotora (KADOWAKI et al., 2011). Com o objetivo de verificar indiretamente se a proteína PhaR possui a capacidade de atuar como repressor da expressão do gene *phaZ1* construímos uma estirpe com deleção dos genes *phaC1* e *phaR* ($\Delta phaC1\Delta phaR$) e testamos a expressão da fusão *phaZ1::lacZ* (Figura 10A).

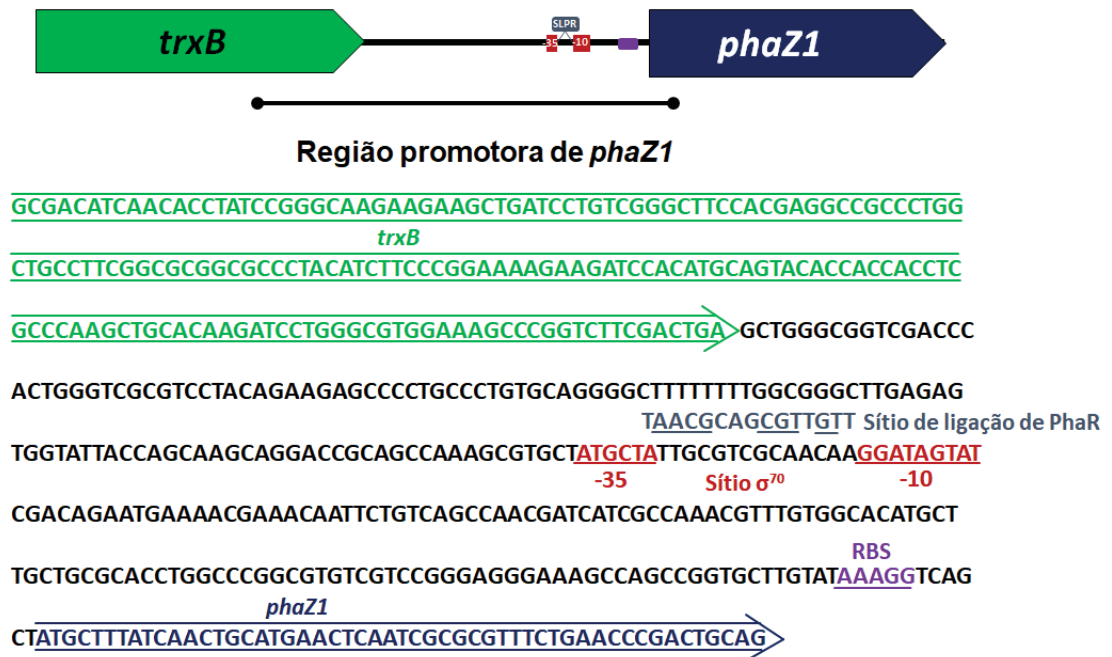


FIGURA 10 – ILUSTRAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *phaZ1*

Ilustração contendo a sequência promotora do gene *phaZ1* usada nas análises de expressão gênica. Em verde está indicado parte da sequência do gene *trxB*; em vermelho a sequência sigma 70 conservada. A sequência de ligação da proteína PhaR sobrepõe o sítio sigma 70 e está presente na fita de DNA complementar; em roxo a provável sequência RBS e em azul escuro o início do gene *phaZ1*.

Fonte: O autor.

Novamente, a fusão *phaZ1::lacZ* apresentou atividade de β -galactosidase na estirpe selvagem (SmR1) nos diferentes períodos de crescimento (10 a 16 horas), enquanto foi observada baixa atividade na estirpe mutante Δ *phaC1* (Figura 11). Na estirpe mutante Δ *phaR*, a fusão *phaZ1::lacZ* é expressa em níveis levemente superiores aqueles observados na estirpe selvagem, sugerindo o potencial efeito repressor da proteína PhaR. Esse resultado foi confirmado pelo ensaio realizado no duplo mutante Δ *phaC1 Δ *phaR*, onde a atividade de β -galactosidase é significativamente superior àquela observada na estirpe mutante Δ *phaC1*. Ensaio de quantificação de PHB por fluorescência, no citômetro de fluxo, confirmaram que o duplo mutante Δ *phaC1 Δ *phaR* não produz PHB (dados não apresentados).**

(A)

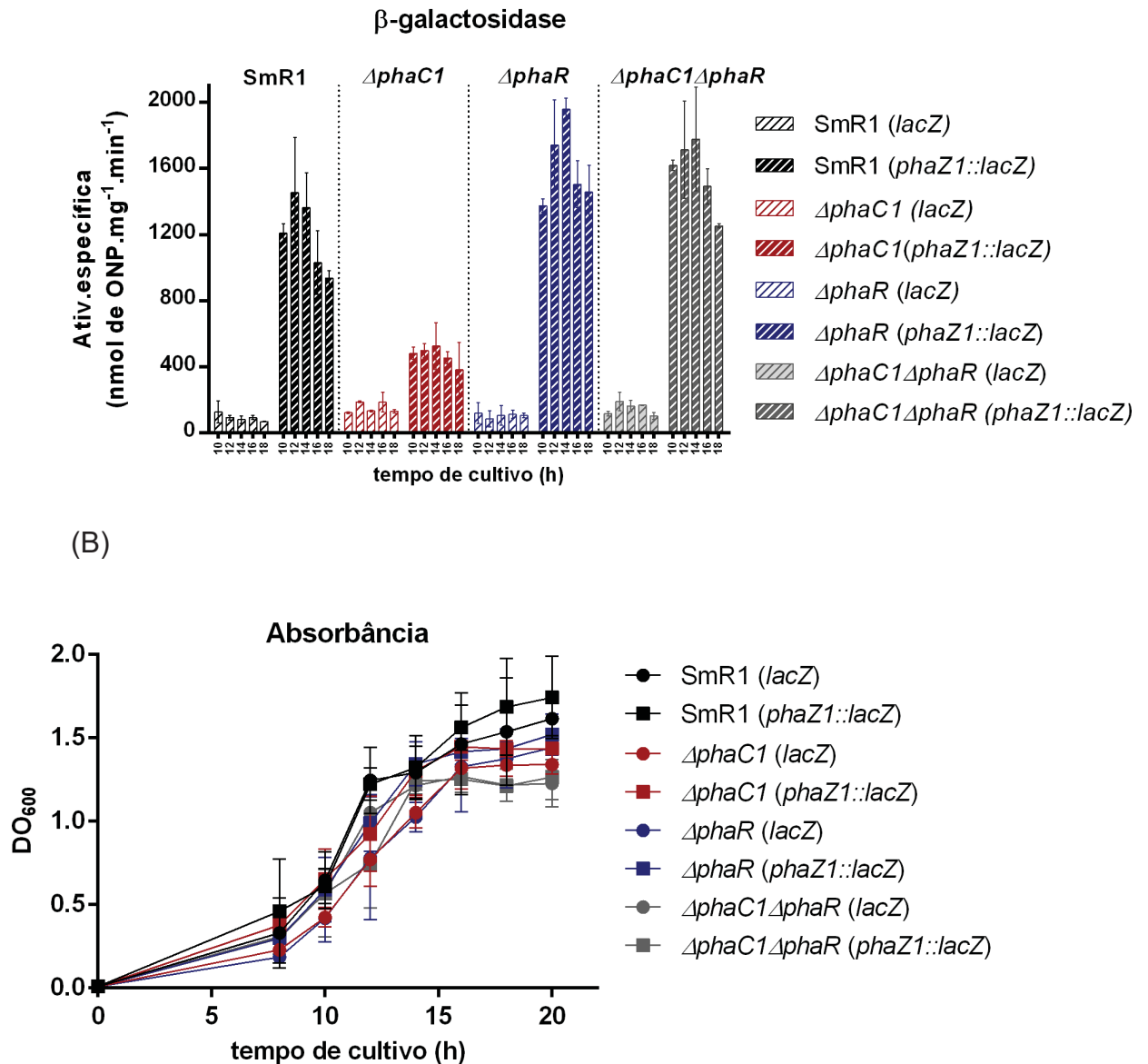


FIGURA 11 – ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE NOS MUTANTES Δ *phaC1*, Δ *phaR*, Δ *phaC1* Δ *phaR* E SELVAGEM SmR1

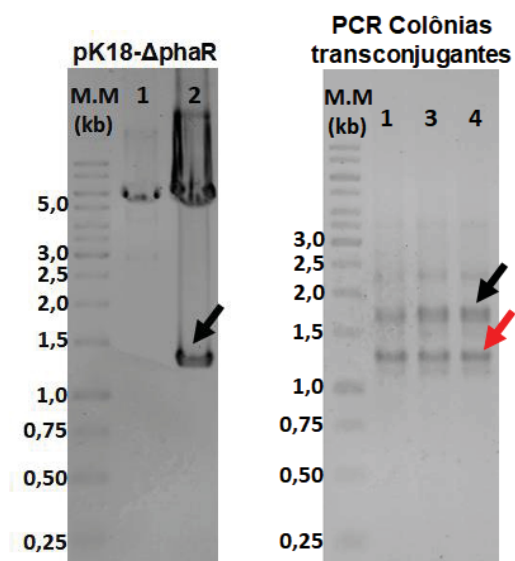
Painel (A): Atividade específica de β -galactosidase nas estirpes selvagem SmR1 e mutantes Δ *phaC1*, Δ *phaR*, Δ *phaC1* Δ *phaR* conjugados com a fusão *phaZ1::lacZ* ou vetor pPW452 sem promotor (*lacZ*). A atividade foi determinada em culturas nos tempos indicados de crescimento. Em (B) perfil de crescimento das estirpes ao longo do experimento, as leituras foram realizadas via espectrofotômetro Beckman UV/VIS usando cubetas de 1 mL. As estirpes foram cultivadas por 18 horas a 30 °C sob agitação a 120 rpm em NFb-malato, contendo 20 mmol/L de NH₄Cl e os antibióticos tetraciclina (10 μ g/mL) e estreptomicina (80 μ g/mL), DO₆₀₀ inicial de 0,01. O ensaio de β -galactosidase foi realizado em 10, 12, 14, 16 e 18 horas após o início do crescimento, conforme indicado no eixo x (gráfico A). Cada barra corresponde a média de duplicatas independentes analisadas em duplicatas. As barras de erro correspondem ao desvio padrão entre as análises.

Fonte: O autor.

5.5 ESTRATÉGIA PARA A MUTAGÊNESE DO GENE *phaR* DE *H. seropedicae* NA ESTIRPE $\Delta phaC1$

A deleção cromossomal do gene *phaR* de *H. seropedicae* foi realizado pelo método de deleção em fase, na estirpe $\Delta phaC1$. O vetor pK18mobsacB contendo o produto de deleção do gene *phaR* (pK18- $\Delta phaR$) foi construído por TEIXERA, 2015 e gentilmente cedido para construção dessa estirpe. O produto de deleção clonado foi confirmado por meio de reação de restrição com as enzimas *XbaI* e *PstI* (Figura 12, Painel A). Após a confirmação, esse vetor foi transformado na estirpe S17-1 de *E. coli* e conjugado com a estirpe $\Delta phaC1$ de *Herbaspirillum seropedicae*. Após o crescimento as colônias transconjugantes foram confirmadas através de PCR de colônias (Figura 12, Painel A). Essas colônias foram cultivadas por doze horas em meio líquido Nfb-malato suplementado com 20 mmol/L de NH_4Cl e na ausência de antibióticos para realização do segundo evento de recombinação. Após o crescimento, 100 μL da cultura foram diluídos de forma seriada em 900 μl de solução de NaCl 0,9% e plaqueados em meio Nfb-malato suplementado com 20 mmol/L de NH_4Cl , 10 mL/L de solução de fosfatos (159,4 g/L de KH_2PO_4 e 17,8 g/L de K_2HPO_4), antibiótico streptomina (80 $\mu g/mL$) e sacarose 10% (m/v). As colônias obtidas foram usadas em reações de PCR e os resultados confirmam a deleção do gene *phaR*, uma vez que obtemos uma banda de DNA no gel correspondendo a amplificação do produto de deleção (Figura 12, painel B).

(A)



(B)

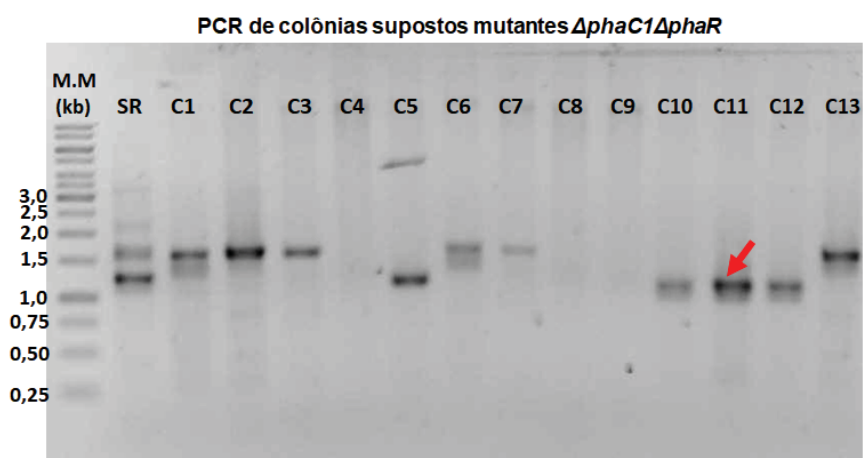


FIGURA 12 - CONFIRMAÇÃO DA DELEÇÃO CROMOSSOMAL DO GENE *phaR* DE *H. seropedicae* NA ESTIRPE $\Delta phaC1$

Eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X. Painel (A): a direita (pK18- $\Delta phaR$), na linha 2 indicado pela seta, resultado da reação de restrição com as enzimas XbaI e PstI do produto de deleção do gene *phaR* clonado no vetor pK18mobsacB; na linha 1 somente o vetor digerido, sem inserto. Ao lado PCR de colônias de estirpes $\Delta phaC1$ transconjugantes contendo as bandas referente ao gene íntegro (seta preta) e produto de deleção (seta vermelha).

Painel (B): Eletroforese dos produtos de PCR utilizando colônias de prováveis mutantes ($\Delta phaC1\Delta phaR$) resultantes do segundo evento de recombinação do produto de deleção do gene *phaR* na estirpe $\Delta phaC1$. A banda indicada com a seta corresponde a estirpe com deleção do gene *phaR*. As reações de PCR foram realizadas com os primers FO_phbF (5'-GGTTTCGGTTCGCATCATCAA-3') e RO_phbF (5'-CTTCATCGGACTTGACCAGG-3'). SR – Simple Recombinante (transconjugante); C1 a C13 correspondem as diferentes colônias testadas. M.M refere-se ao marcador de massa molecular de 1Kb (FERMENTAS). Os tamanhos das bandas estão indicados (em kb). O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem registrada utilizando transiluminador de luz ultravioleta com sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

Fonte: O autor.

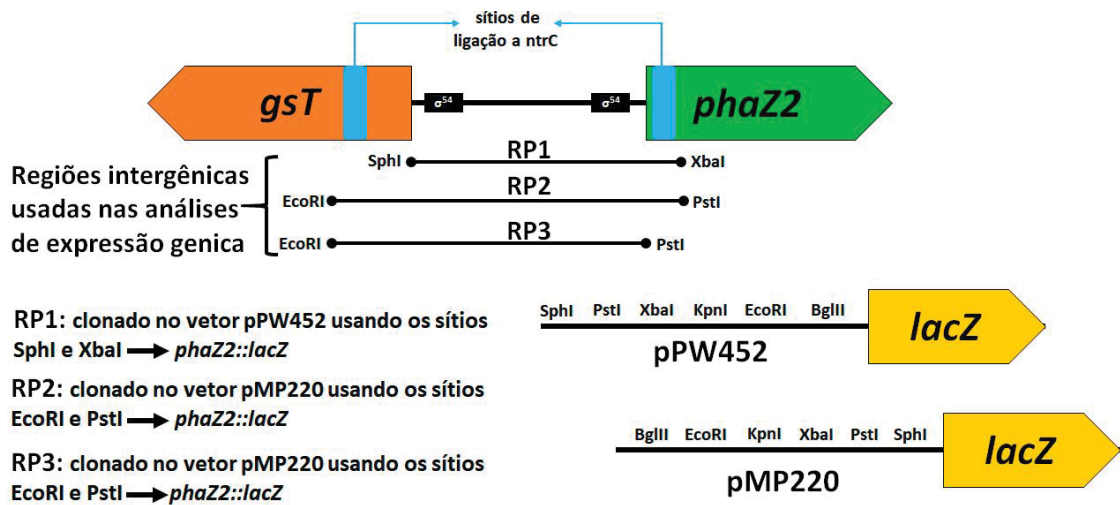
5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DO GENE *phaZ2*

A expressão do gene *phaZ2* foi avaliada por MOTA (2017), identificando uma provável relação entre o metabolismo de nitrogênio e o metabolismo de PHB, uma vez que a expressão desse gene aumentava em condições de cultivo realizado em baixas concentrações de NH_4Cl (2 mM). A expressão de *phaZ2* também foi detectada por meio de transcriptoma, em condições de interação planta-bactéria (PANKIEVICZ et al., 2016; BALSANELLI et al., 2016).

A dependência da expressão de *phaZ2* pelo metabolismo de nitrogênio ficou mais evidente após a identificação de um potencial sítio σ^{54} (sigma 54) na região promotora do gene e um suposto sítio de ligação da proteína NtrC (MOTA, 2017), conforme ilustrado (Figura 13). A transcrição de genes por RNA polimerase N (RpoN) é dependente de ativadores transcricionais (*enhancers*) (DIXON; KAHN, 2004). Em *H. seropedicae*, o gene *ntrC* (HSERO_RS15680) codifica para o principal ativador transcricional de genes envolvidos na utilização de formas alternativas de nitrogênio (TWERDOCHLIB et al., 2003; CHUBATSU et al., 2012). Além disso, foi observada uma redução na expressão de *phaZ2* no transcriptoma do mutante *ntrC* (estirpe DCP286A, SmR1 contendo inserção de transposon - *ntrC*::Tn5-B20) de *H. seropedicae* (Paloma Bonato, comunicação pessoal).

gene *phaZ2* mas com sentido de transcrição oposta. Assim a região intergênica entre *gsT* e *phaZ2* contém duas regiões promotoras aparentemente expressas em condições limitantes de nitrogênio, ambas ativadas por NtrC. Com o objetivo de eliminar um provável efeito repressor do segundo sítio NtrC identificado, realizamos a construção de uma terceira região promotora do gene *phaZ2* sem esse sítio NtrC – Região promotora 3 (RP3), 509 bp (Figura 14A). Desse modo, os ensaios de expressão gênica foram realizados com essas três sequências promotoras mais os vetores contendo apenas o gene repórter *lacZ*.

(A)



(B)

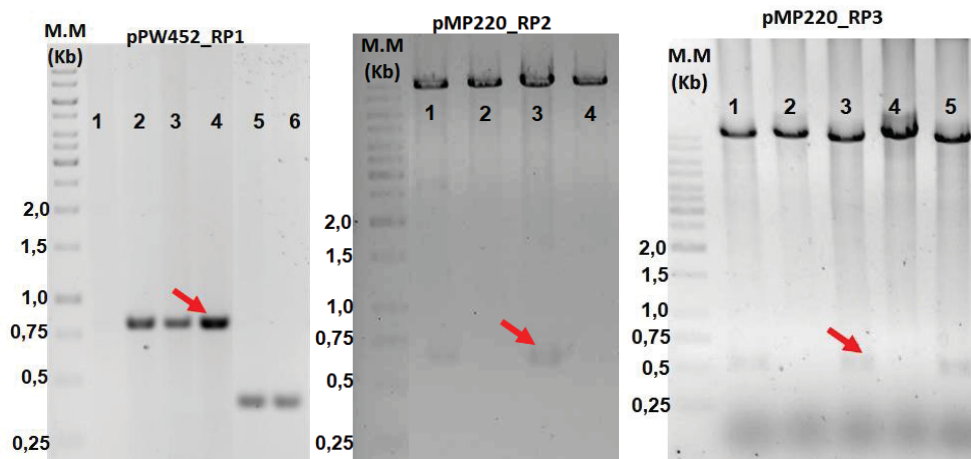


FIGURA 14- REGIÕES INTERGÊNICAS USADAS NAS ANÁLISES DE EXPRESSÃO DO GENE *phaZ2*.

Painel (A): A ilustração apresenta um esquema das regiões amplificadas e clonadas para análise da expressão do gene *phaZ2*. As regiões foram clonadas nos vetores pPW452 ou pMP220 conforme indicado.

Painel (B): Eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X; á direita (pPW452_RP1) produtos de PCR utilizando colônias transformadas com ligações do promotor do gene *phaZ2* clonado no vetor pPW452. A seta vermelha indica o produto obtido a partir de colônias isoladas (785 bp), linhas 5 e 6 contém o produto amplificado somente com o vetor sem inserção da região promotora (380 bp); *primers* pmpfor e laczrev. Ao lado pMP220_RP2 e pMP220_RP3 correspondem ao gel de eletroforese das reações de restrição com EcoRI e PstI usando vetor pMP220 com supostos clones das regiões promotoras 2 (pMP220_RP2) e 3 (pMP220_RP3), os clones positivos, ou seja no qual houve inserção da região promotora estão indicados com a seta vermelha, os tamanhos em pares de bases das bandas indicadas são aproximadamente 550 (RP2) e 509 (RP3). M.M refere-se ao marcador de massa molecular de 1Kb (FERMENTAS), os tamanhos das bandas estão indicados (em kb). O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem registrada utilizando transiluminador de luz ultravioleta com sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

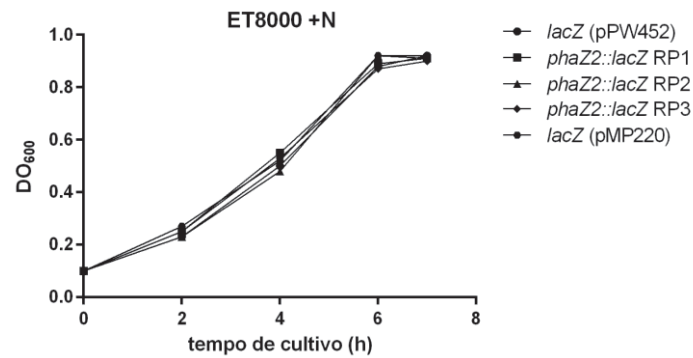
Fonte: O autor.

As estirpes de *E. coli* ET8000 (selvagem) (MACNEIL et al., 1982) e o mutante NT8000 ($\Delta ntrC$) (REYES-RAMIREZ; LITTLE; DIXON, 2001) transformadas com as regiões promotoras do gene *phaZ2* fusionadas ao gene repórter *lacZ* (*phaZ2::lacZ*) foram cultivadas em 10 mM (+N) e 1 mM (-N) de NH_4Cl . O cultivo em 1 mM de cloreto de amônio corresponde a condição de limitação de nitrogênio e, portanto, limitante ao crescimento (GYANESHWAR et al., 2005). Nestas condições, a expressão de genes dependentes de NtrC deve ocorrer (DIXON; KAHN, 2004).

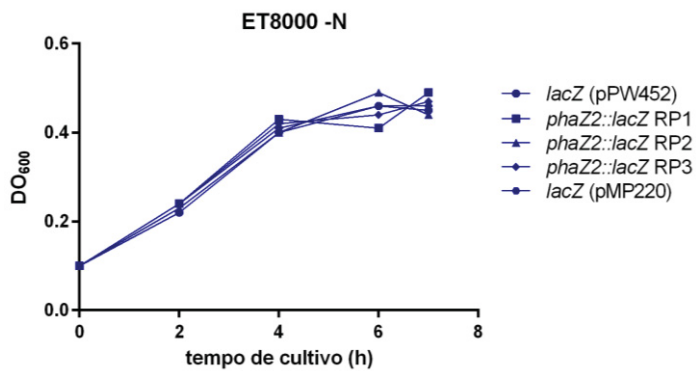
Os resultados obtidos confirmaram que as estirpes ET8000 e NT8000 cultivadas em 1 mM de NH_4Cl (-N) tiveram perfil de crescimento similar após 4 horas de crescimento (DO_{600} inicial = 0,1). A estirpe ET8000 cultivada em 10 mM de NH_4Cl (+N) atingiu DO_{600} de aproximadamente 1,0 após 7h de crescimento, tempo de cultivo no qual o ensaio de β -galactosidase foi realizado (Figura 15).

Os resultados de expressão gênica foram observados somente na condição -N, compatível com a ativação dependente de NtrC e transcrição por meio de σ^{54} , uma vez que as fusões tiveram perfil de atividade de β -galactosidase (Unidades Miller) somente na condição -N na estirpe selvagem. A estirpe mutante NT8000 contendo as fusões e cultivada em -N não apresentou padrão de atividade de β -galactosidase. O mesmo ocorreu com ET8000 cultivada em 10 mM de NH_4Cl (Figura 16). Além disso esses ensaios permitiram diferenciar a expressão nas três regiões promotoras de *phaZ2* utilizadas, sendo que a expressão na região promotora 3 (RP3) foi maior que RP1 ou RP2, esse padrão é condizente com a sequência consenso de ligação a NtrC previamente proposta e com o efeito repressor do segundo sítio NtrC observado nessas condições.

(A)



(B)



(C)

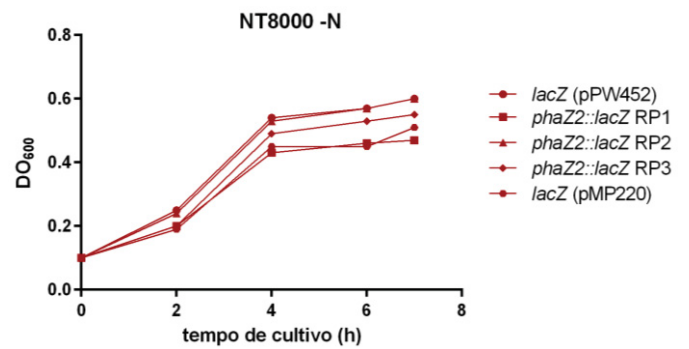


FIGURA 15 – CURVAS DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES ET8000 E NT8000

Curvas de crescimento das estirpes ET8000 (painéis A e B) e NT8000 (painel C) transformadas com as fusões indicadas. As células foram cultivadas na presença de 10 mM de NH_4Cl (+N) (painel A) ou 1 mM NH_4Cl (-N) (painéis B e C).

Cada barra ou ponto nos gráficos corresponde a média de duplicatas independentes analisadas em duplicatas. as barras de erro correspondem ao desvio padrão entre as análises.

Fonte: O autor.

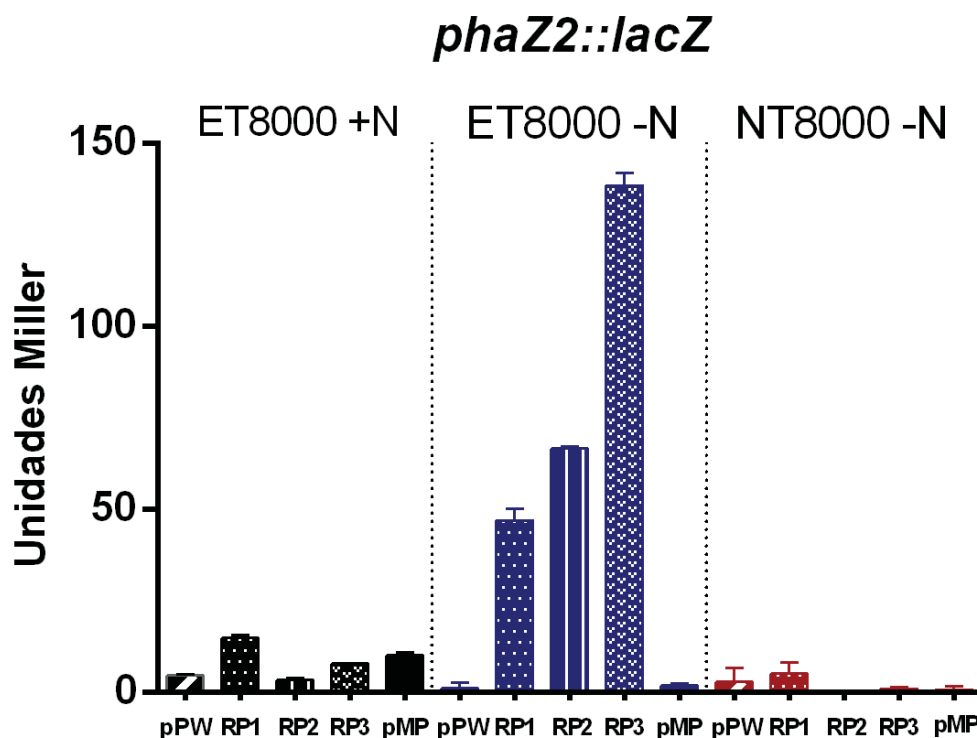


FIGURA 16 – ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE *phaZ2*

Análise de expressão do gene *phaZ2*, realizado nas estirpes ET8000 (selvagem) e NT8000 ($\Delta ntrC$) transformadas com as fusões *phaZ2::lacZ* (RP1, RP2 e RP3) e gene *lacZ* (vetor pPW452 e pMP220). A expressão das fusões ocorreu somente na estirpe ET8000 na condição 1 mM de NH_4Cl (gráfico D, barras azuis). Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de duplicatas biológicas.

Cada barra ou ponto nos gráficos corresponde a média de duplicatas independentes analisadas em duplicatas. as barras de erro correspondem ao desvio padrão entre as análises.

Fonte: O autor.

5.7 MOTILIDADE

As culturas de estoque mantidas em meio Nfb-malato semi-sólido das estirpes mutantes $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ12$ apresentaram um fenótipo inesperado, que consiste na incapacidade de formar película. Uma característica de *Herbaspirillum seropedicae* crescida nessas condições (BALDANI et al., 1986). A estirpe $\Delta phaZ2$ apresentou padrão similar ao SmR1 (Não mostrado). Adicionalmente esses mutantes cresceram apenas no ponto onde haviam sido inoculados (Figura 17). Em *H. seropedicae* esse fenótipo está associado a ausência de motilidade (BALSANELLI et al., 2016)

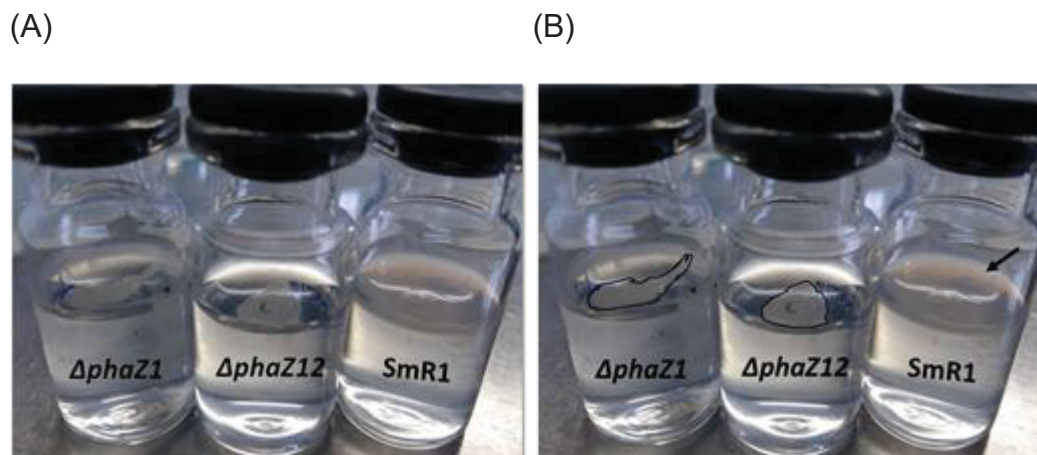


FIGURA 17 – ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae* $\Delta phaZ1$ E $\Delta phaZ12$ EM MEIO SEMI-SÓLIDO

As estirpes mutantes $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ12$ e a selvagem SmR1 em meio Nfb-malato semi-sólido após 24 horas de crescimento em estufa 30 °C (A). Em (B) o espaço ocupado pelas estirpes mutantes após crescimento está circundado em preto, e a seta indica o crescimento da estirpe selvagem.

Fonte: O autor.

Em vista do observado, foi testada a motilidade do tipo "swarming" nas estirpes $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$, $\Delta phaZ12$ e selvagem SmR1. A estirpe $\Delta fliC$ de *H. seropedicae* foi também utilizada como um controle de deficiência de motilidade (BALSANELLI et al., 2016). A motilidade do tipo "swarming" é um movimento bacteriano através de superfícies semi-sólidas influenciado por pili tipo IV e flagelo (KEARNS, 2010) e pode ser avaliado inoculando as estirpes em placas de petri contendo meio Nfb-malato com concentração de ágar 0,17%. As placas foram observadas a cada 24 horas e analisadas quanto à expansão do halo de motilidade formado no meio de cultura (Figura 18). Observou-se que a estirpe selvagem SmR1 após 24 horas de crescimento, começou a ocupar o centro do meio de cultura, e após 48 horas ocupou toda sua extensão. Um fenótipo semelhante foi observado para o mutante $\Delta phaZ2$. Por outro lado, o mutante $\Delta fliC$ (deficiente em motilidade) ocupou somente o centro do meio de cultura mesmo após 72 horas de cultivo. Os mutantes $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ12$ apresentaram fenótipo semelhante ao mutante $\Delta fliC$, indicando, portanto que a deleção do gene *phaZ1* afeta a motilidade do tipo "swarming" em *H. seropedicae*.

Os dados de expressão obtidos no tópico anterior indicaram que a expressão de *phaZ2* ocorre em condições de baixo nitrogênio no meio, com isso

realizamos os mesmos experimentos em presença de 2 mM de NH_4Cl com o objetivo de verificar se o padrão de motilidade alterava-se na estirpe ΔphaZ1 (Figura 19). No entanto, isso não ocorreu e observamos que o padrão obtido no cultivo em 20 mM de NH_4Cl se manteve.

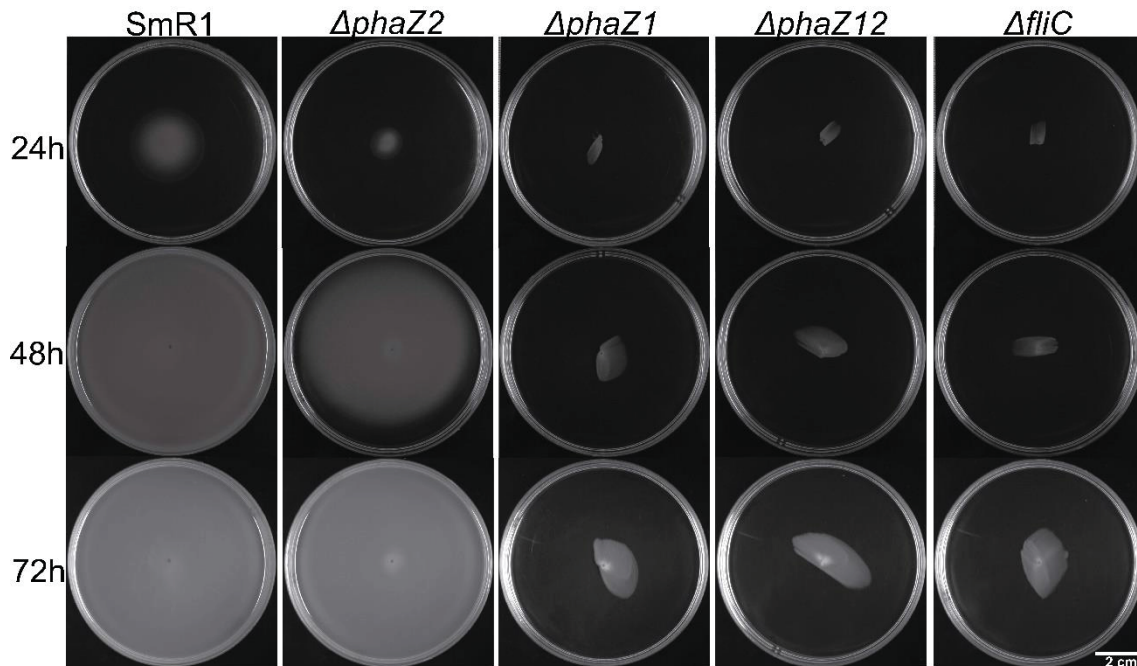


FIGURA 18 – ENSAIO DE MOTILIDADE DO TIPO "SWARMING" DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae*.

As estirpes indicadas foram plaqueadas no centro da placa contendo meio Nfb-malato semi-sólido com 20 mM de NH_4Cl e incubadas por um total de 72 horas em estufa a 30 °C e os registros obtidos a cada 24 horas conforme indicado a esquerda da imagem.

Fonte: O autor.

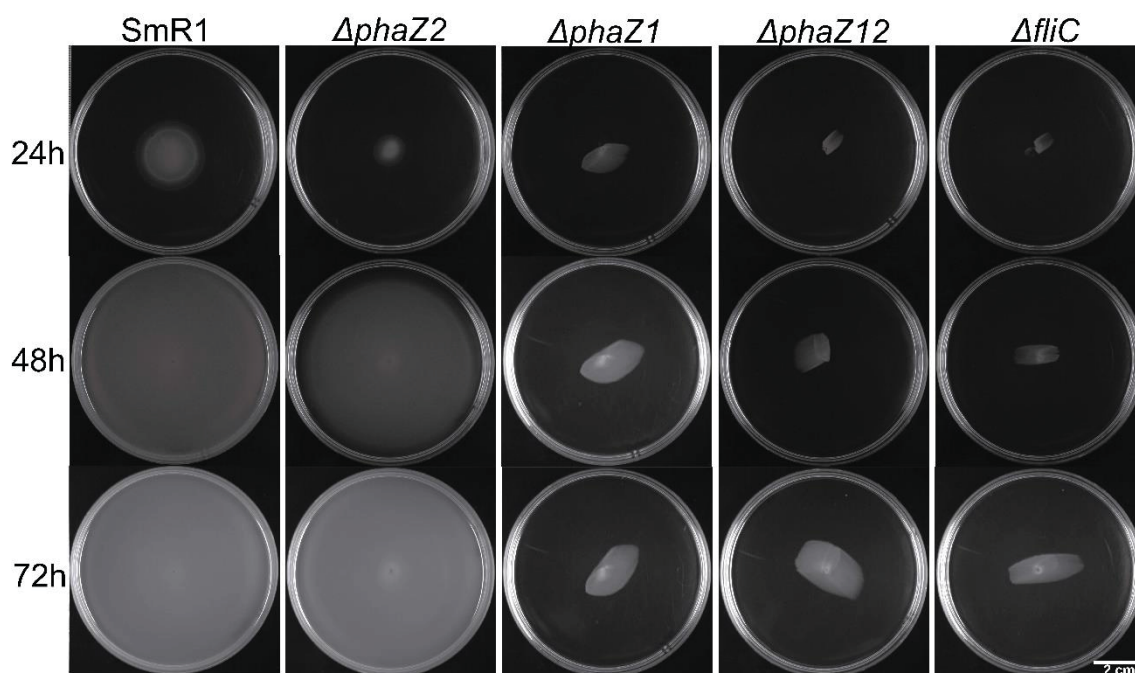


FIGURA 19 – ENSAIO DE MOTILIDADE DO TIPO "SWARMING" DE ESTIRPES DE *H. seropedicae* EM MEIO CONTENDO BAIXA CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIO

As estirpes indicadas foram plaqueadas no centro da placa contendo meio Nfb-malato semi-sólido com 2 mM NH_4Cl e incubadas por um total de 72 horas em estufa a 30 °C , os registros foram obtidos a cada 24 horas conforme indicado a esquerda da imagem.

Fonte: O autor.

A relação entre motilidade do tipo "swarming" e o metabolismo de PHB ainda não é clara. Um estudo (RABERG et al., 2008) empregando análise proteômica realizado com *Ralstonia eutropha* H16 mostrou que a estirpe selvagem apresenta flagelos em condições que permitem o acúmulo de PHB, mas perdem os flagelos quando a degradação de PHB é induzida, durante a fase estacionária do crescimento (RABERG et al., 2008). No mesmo estudo uma das principais proteínas envolvidas com motilidade que apresentou redução nessa condição foi FliC atingindo valores quase indetectáveis. Adicionalmente PEPLINSKI e colaboradores (2010) observaram redução da expressão em genes envolvidos com motilidade em *R. eutropha* H16 (PEPLINSKI et al., 2010) Apesar desses estudos terem usado diferentes abordagens, como proteômica, transcriptômica e análises de microscopia eletrônica, no qual ficou evidente a ausência de flagelos, não foram realizados ensaios de motilidade.

6 CONCLUSÕES

- Através da análise de mutantes dos genes codificantes para as PHB depolimerases de *H. seropedicae* determinamos indiretamente os níveis de PHB por meio de citometria de fluxo, e observamos que o gene *phaZ1* é fundamental para *H. seropedicae* degradar o PHB acumulado.
- A depolimerase PhaZ2 mobilizou PHB de forma tênue no mutante $\Delta phaZ1$ após o final da fase estacionária de crescimento; na estirpe $\Delta phaZ2$ houve redução no acúmulo do polímero em comparação com as estirpes selvagem e os mutantes $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ12$ e a mobilização de PHB ocorreu no final da fase estacionária.
- No duplo mutante $\Delta phaZ12$ houve acúmulo de PHB e ausência de mobilização indicando que os genes *phaZ1* e *phaZ2* são responsáveis pela mobilização de PHB em *Herbaspirillum seropedicae*.
- Os ensaios de β -galactosidase indicaram que *phaZ1* é expresso constitutivamente, sendo observada a repressão da expressão pela proteína repressora PhaR na ausência de PHB, conforme os resultados obtidos com a estirpe duplo mutante $\Delta phaC1\Delta phaR$. Por outro lado, a expressão de *phaZ2* é induzida em condições limitantes de nitrogênio e dependente de NtrC.
- Os mutantes $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ12$, apresentaram o fenótipo distinto de deficiência em motilidade do tipo “swarming” quando essas estirpes foram cultivadas em meio semi-sólido, independente do nível de nitrogênio no meio.

7 REFERÊNCIAS

ADAYA, L.; MILLÁN, M.; PEÑA, C.; JENDROSSEK, D.; ESPÍN, G.; TINOCO-VALENCIA, R.; GUZMÁN, J.; PFEIFFER, D.; SEGURA, D. Inactivation of an intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase of *Azotobacter vinelandii* allows to obtain a polymer of uniform high molecular mass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 6, p. 2693–2707, 2018.

ALVES, L. P. S.; TEIXEIRA, C. S.; TIRAPELLE, E. F.; DONATTI, L.; TADRASFEIR, M. Z.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L.S.; SANTOS, M. M. Backup Expression of the PhaP2 Phasin Compensates for phaP1 Deletion in *Herbaspirillum seropedicae*, Maintaining Fitness and PHB Accumulation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–13, 2016.

ALVES, L. P. S.; ALMEIDA, A. T.; CRUZ, L.M.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L.S.; SANTOS, M. M.; VALDAMERI, G. 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**, v. 50, n. 1, p. 1–10, 2017.

ALVES, L. P. S. AMARAL, F. P.; KIM, D.; BOM, M. T.; GAVÍDIA, M. P.; TEIXEIRA, C. S.; HOLTHMAN, F.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L.S.; SANTOS, M. M. STACEY, G. Importance of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) metabolism to the ability of *Herbaspirillum seropedicae* to promote plant growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 6, p. 1–14, 2019.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological reviews**, v. 54, n. 4, p. 450–472, 1990.

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

BALSANELLI, E.; TADRA-SFEIR, M. Z.; FAORO, H.; PANKIEVICZ, V. C. S.; BAURA, V. A. SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; DIXON, R.; MONTEIRO, R. A. Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2343–2356, 2016.

BATISTA, M. B.; SANTOS, M. M.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability. Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability. **Springer**, p. 23–39, 2016.

BRESAN, S.; SZNAJDER, A.; HAUF, W.; FORCHHAMMER, K.; PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. **Scientific Reports**, v. 6, p. 26612, 2016.

BRIGHAM, C. J.; REIMER, E. N.; RHA, C., SINSKEY, A. J. Examination of PHB Depolymerases in *Ralstonia eutropha*: Further Elucidation of the Roles of Enzymes in PHB Homeostasis. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 1–13, 2012.

BRIGHAM, C. J.; SINSKEY, A. J. Applications of Polyhydroxyalkanoates in the Medical Industry. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, p. 53–60, 2012.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C.; ALBERTON, D.; VALDAMERI, G.; CAMILIOS-NETO, D.; COVRE, R.; LOPES, K. P.; TADRA-SFEIR, M. Z.; FAORO, H.; MONTEIRO, R. A.; BARBOSA-SILVA, A.; BROUGHTON, H. J.; PEDROSA, F. O.; WASSEM, R.; SOUZA, E. M. Modulation of defence and iron homeostasis genes in rice roots by the diazotrophic endophyte *Herbaspirillum seropedicae*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019.

BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Trends in Biotechnology**, v. 5, n. 9, p. 246–250, 1987.

CATALÁN, A. I.; FERREIRA, F.; GILL, P. R. BATISTA, S. Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the *lacZlacY* genes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1352–1357, 2007.

CHAN, W.; VERMA, C. S.; LANE, D. P.; GAN, S. K. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. **Bioscience Reports**, v. 33, n. 6, p. 931–937, 2013.

CHEN, G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chemical Society reviews**, v. 38, n. 8, p. 2434–2446, 2009.

CHOU, M. E.; CHANG, W. T.; CHANG, Y. C.; YANG, M. K. Expression of four pha genes involved in poly- β -hydroxybutyrate production and accumulation in *Rhodobacter sphaeroides* FJ1. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 282, n. 1, p. 97–106, 2009.

CHOU, M. E.; YANG, M. K. Analyses of binding sequences of the PhaR protein of *Rhodobacter sphaeroides* FJ1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 302, n. 2, p. 138–143, 2010.

CHUBATSU, L. S.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; BONATTO, A. C.; HUERGO, L. F.; STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 197–207, 2012.

COBNTBEKT, J.; MABCHESSAULT, R. H. Physical properties of poly- β -hydroxybutyrate. IV. Conformational analysis and crystalline structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 71, n. 3, p. 735–756, 1972.

CÓZAR, A.; ECHEVARRÍA, F.; GORDILLO, J. I. G.; IRIGOIEN, X.; ÚBEDA, B. HERNÁNDEZ-LEÓN, S.; PALMA, À. T.; NAVARRO, S.; LOMAS, J. G.; RUIZ, A.; PUELLES, M. L. F.; DUARTE, C. M. Plastic debris in the open ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 28, p. 10239–10244, 2014.

DEGELAU, A.; SCHEPER, T.; BAILEY, J. E.; GUSKE, C. Fluorometric measurement of polyhydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus* by flow cytometry and spectrofluorometry. **European Journal of Applied Microbiology**, v. 42, p. 653–657, 1995.

DE RIJK, T. C.; MEER, P. V.; EGGINK, G.; WEUSTHUIS, R. A. Methods for Analysis of Poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) Composition. **Biopolymers Online**, p. 1–12, 2005.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004.

EGGERS, J.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) degradation in *Ralstonia eutropha* H16 is mediated stereoselectively to (S)-3-hydroxybutyryl coenzyme a (CoA) via crotonyl-CoA. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 14, p. 3213–3223, 2013.

FINN, R. D.; TATE, J.; MISTRY, J.; COGGILL P. C.; SAMMUT, S. J.; HOTZ, H. R.; CERIC, G.; FORSLUND, K; EDDY, S. R.; SONNHAMMER, E. L.; BATEMAN, A. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 281–288, 2008.

GEVERS, D., VANDEPOELE, K., SIMILLON, C., VAN DE PEER, Y. Gene duplication and biased functional retention of paralogs in bacterial genomes. **Trends Microbiol**, v. 12, p. 148–154, 2004.

GREENSPAN, P.; MAYER, E. P.; FOWLER, S. D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. **The Journal of Cell Biology**, v. 100, n. 10, p. 965–973, 1985.

GYANESHWAR, P.; PALIY, O.; MCAULIFFE, J.; POPHAM, D. L.; JORDAN, M. I.; KUSTU, S. Sulfur and nitrogen limitation in *Escherichia coli* K-12: Specific homeostatic responses. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 3, p. 1074–1090, 2005.

HANDRICK, R.; REINHARDT, S.; JENDROSSEK, D. Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 20, p. 5916–5918, 2000.

HARUHISA, S.; MARI, S.; TERUMI, S. Cloning of an intracellular D(-)-3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and identification of the active site serine residue by site-directed mutagenesis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 2, p. 106–112, 2002.

FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783–791, 1985.

JAMES B. W.; MAUCLINE, W. S.; DENNIS, P. J.; KEEVIL, C. W.; WAIT, R. Poly-3-hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an energy source for survival in low-nutrient environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 822–827, 1999.

JENDROSSEK, D.; HANDRICK, R. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 403–432, 2002.

JENDROSSEK, D.; PFEIFFER, D. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 2357–2373, 2014.

JUENGERT, J. R.; PATTERSON, C.; JENDROSSEK, D. Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) polymerase PhaC1 and PHB depolymerase PhaZa1 of *Ralstonia eutropha* are phosphorylated in vivo. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 13, 1 Jul. 2018.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Poly β -hydroxybutyrate depolymerase (PhaZ) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phaZ* mutant. **Archives of Microbiology**, v. 180, n. 5, p. 309–318, 2003.

KADOWAKI, M. A.; SANTOS, M. M.; REGO, F. G. M.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; STEFFENS, M. B. R. Identification and characterization of PhbF: A DNA binding protein with regulatory role in the PHB metabolism of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. **BMC Microbiology**, v. 11, 2011.

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nat Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 634 – 644, 2010.

KLASSEN, G.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. Sequencing and functional analysis of the *nifENXorf1orf2* gene cluster of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 181, n. 1, p. 165–170, 1999.

KNOLL, M.; HAMM, T. M.; WAGNER, F.; MARTINEZ, V.; PLEISS, J. The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 1–8, 2009.

KOVACH, M. E.; ELZER, P. H.; HILL, D. S.; ROBERTSON, G. T.; FARRIS, M. A.; ROOP, R. M. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **Gene**, v. 166, p. 175–176, 1995.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.

LAWRENCE, A. G.; SCHOENHEIT, J.; HE, A.; TIAN, J.; LIU, P.; STUBBE, J.; SINSKEY, A. J. Transcriptional analysis of *Ralstonia eutropha* genes related to poly-(R)-3-hydroxybutyrate homeostasis during batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 5, p. 663–672, 2005.

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

LEMOIGNE, M. "Produits de dehydration et de polymerisation de l'acide β -oxobutyrique" [Dehydration and polymerization product of β -oxy butyric acid]. **Bull. Soc. Chim. Biol.**, v. 8, p. 770–82, 1926.

LIN, Z.; ZHANG, Y.; YUAN, Q.; LIU, Q.; LI, Y.; WANG, Z.; MA, H.; CHEN, T.; ZHAO, X.; Metabolic engineering of *Escherichia coli* for poly(3-hydroxybutyrate) production via threonine bypass. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2015.

LÓPEZ, N. I.; PETTINARI, M. J.; NIKEL, P. I.; MÉNDEZ, B. S. Polyhydroxyalkanoates: Much More than Biodegradable Plastics. **Advances in Applied Microbiology**, v. 93, p. 73–106, 2015.

MACNEIL, T.; MACNEIL, D.; TYLER, B. Fine-structure deletion map and complementation analysis of the *glnA-glnL-glnG* region in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 150, n. 3, p. 1302–1313, 1982.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 1, p. 21–53, 1999.

MAEHARA, A.; DOI, Y.; NISHIYAMA, T.; TAKAGI, Y.; UEDA, S.; NAKANO, H.; YAMANE, T. PhaR, a protein of unknown function conserved among short-chain-length polyhydroxyalkanoic acids producing bacteria, is a DNA-binding protein and represses *Paracoccus denitrificans* phaP expression *in vitro*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 200, n. 1, p. 9–15, 2001.

MAEHARA, A.; TAGUCHI, S.; NISHIYAMA, T.; YAMANE, T.; DOI, Y.; A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 14, p. 3992–4002, 2002.

MARTINEZ, S.; DÉZIEL, E. Polyhydroxyalkanoate granule accumulation makes optical density measurement an unreliable method for bacterial growth assessment in *Burkholderia thailandensis*. **bioRxiv**, p. 1–13, 2019.

MILLER, J. H. **Experiments in Molecular Genetics**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 468 pg., 1972

MOTA, F. J. T. **Análise da expressão dos genes *phaZ1* e *phaZ2* no metabolismo de Polihidroxibutirato em *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2017. (Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

NØRHOLM, M. H. H. A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. **BMC biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 21, 2010.

OBRUCA, S.; SEDLACEK, P.; KRZYZANEK, V.; MRAVEC, F.; HRUBANOVA, K.; SAMEK, O.; KUCERA, D.; BENESOVA, P.; MAROVA, I. Accumulation of Poly (3-hydroxybutyrate) Helps Bacterial Cells to Survive Freezing. **PLOS ONE**, p. 1–16, 2016.

PANKIEVICZ, V. C. S.; CAMILIOS-NETO, D.; BONATO, P.; BALSANELLI, E.; TADRA-SFEIR, M. Z.; FAORO, H.; CHUBATSU, L. S.; DONATTI, L.; WAJNBERG, G.; PASSETTI, F.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing

wheat (*Triticum aestivum*) roots. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 589–603, 2016.

PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; CRUZ, L. M.; AYUB, R. A.; COLAUTO, N. B.; FERNANDEZ, M. A.; FUNGARO, M. H. P.; GRISARD, E. C.; HUNGRIA, M.; MADEIRA, H. M. F.; NODARI R. O. ET AL. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 5, 2011.

PEPLINSKI, K.; EHRENREICH, A.; DÖRING, C.; BÖMEKE, M.; REINECKE, F.; HUTMACHER, C.; STEINBÜCHEL A. Genome-wide transcriptome analyses of the «Knallgas» bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism. **Microbiology**, v. 156, n. 7, p. 2136–2152, 2010.

POTTER, M.; MADKOUR, M. H.; MAYER, F.; STEINBÜCHEL, A. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology**, v. 148, n. 2002, p. 2413–2426, 2002.

PÖTTER, M.; MÜLLER, H.; STEINBÜCHEL, A. Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 825–833, 2005.

QUELAS, J. I.; MONGIARDINI, E. J.; PÉREZ-GIMÉNEZ, J.; PARISI, G.; LODEIRO, A. R. Analysis of two polyhydroxyalkanoate synthases in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 14, p. 3145–3155, 2013.

RABERG, M.; REINECKE, F.; REICHEL, R.; MALKUS, U.; KÖNIG, S.; PÖTTER, M.; FRICKE, W. F.; POHLMANN, A.; VOIGT, B.; HECKER, M.; FRIEDRICH, B.; BOWIEN, B.; STEINBÜCHEL, A. *Ralstonia eutropha* H16 flagellation changes according to nutrient supply and state of poly(3-hydroxybutyrate) accumulation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 14, p. 4477–4490, 2008.

RAHMAN, A.; LINTON, E.; HATCH, A. D.; SIMS, R. C.; MILLER, C. D.; Secretion of polyhydroxybutyrate in *Escherichia coli* using a synthetic biological engineering approach. **Journal of Biological Engineering**, v. 7, n. 1, p. 1, 2013.

RAY, S.; KALIA, V. C. Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 261–269, 2017.

REYES-RAMIREZ, F.; LITTLE, R.; DIXON, R. Role of *Escherichia coli* nitrogen regulatory genes in the nitrogen response of the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA complex. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 10, p. 3076–3082, 2001.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O., ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, n. 1, p. 39–47, 2003.

SAEGUSA, H.; SHIRAKI, M.; KANAI, C.; SAITO, T. Cloning of an intracellular Poly[D(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 1, p. 94–100, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning a laboratory manual. 2 ed. **Cold Spring Harbor**, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDSTRÖM, A. G.; HERAS, A. M.; PORTUGAL-NUNES, D.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of poly-3-d-hydroxybutyrate from xylose. **AMB Express**, v. 5, n. 1, 2015.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G. Expression of the nifA gene of *Herbaspirillum seropedicae*: Role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, v. 146, n. 6, p. 1407–1418, 2000.

SPAINK, H. P.; OKKER, R. J. H.; WIJFFELMAN, C. A.; PEES, E.; LUGTENBERG, B. J. J. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. **Plant Molecular Biology**, v. 9, n. 1, p. 27–39, 1987.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 219–228, 1995.

STIRLING, D. DNA Extraction from Fungi, Yeast, and Bacteria. In: Bartlett J.M.S., Stirling D. (eds) PCR Protocols. **Methods in Molecular Biology**TM, vol 226. Humana Press, 2003.

SZNAJDER, A.; JENDROSSEK, D. To be or not to be a poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase: PhaZd1 (PhaZ6) and PhaZd2 (PhaZ7) of *Ralstonia eutropha*, highly active PHB depolymerases with no detectable role in mobilization of accumulated PHB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 16, p. 4936–4946, 2014.

TAL, S.; OKON, Y. Production of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 608–613, 1985.

TAN, G. Y. A.; CHEN, C.; LI, L.; GE, L.; WANG, L.; RAZAAD, I. M. N.; LI, Y.; ZHAO, L.; MO, Y.; WANG, J.; Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. **Polymers**, v. 6, n. 3, p. 706–754, 2014.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

TEIXEIRA, C. S. **Regulação da Expressão de Polihidroxialcanoato Sintases em *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1**. Curitiba, 2015. (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica. Universidade Federal do Paraná.

TIRAPELLE, E. F.; MÜLLER-SANTOS, M.; TADRA-SFEIR, M. Z.; KADOWAKI, M. A. S.; STEFFENS, M. B. R.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Identification of Proteins Associated with Polyhydroxybutyrate Granules from *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 - Old Partners, New Players. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B. P. Degradation of microbial polyesters. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 15, p. 1181–1189, 2004.

TRAINER, M.; CAPSTICK, D.; ZACHERTOWSKA, A.; LAM, K.; CLARK, S.; CHARLES, T. Identification and characterization of the intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase enzyme PhaZ of *Sinorhizobium meliloti*. **BMC Microbiology**, v. 10, 2010.

TRIBELLI, P. M.; LÓPEZ, N. I. Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. **Extremophiles**, v. 15, n. 5, p. 541–547, 2011.

TWERDOCHLIB, A. L.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B. R.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. Expression, purification, and DNA-binding activity of the solubilized NtrC protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expression and Purification**, v. 30, n. 1, p. 117–123, 2003.

UCHINO, K.; SAITO, T.; JENDROSSEK, D. Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZa1 is involved in mobilization of accumulated PHB in *Ralstonia eutropha* H16. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 1057–1063, 2008.

WIECZOREK, R.; PRIES, A.; STEINBÜCHEL, A.; MAYER, F. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 9, p. 2425–2435, 1995.

WOODLEY, P.; BUCK, M.; KENNEDY, C. Identification of sequences important for recognition of vnf genes by the VnfA transcriptional activator in *Azotobacter vinelandii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 135, n. 2–3, p. 213–221, 1996.

YORK, G. M.; LUPBERGER, J.; TIAN, J.; LAWRENCE, G.; STUBBE, J.; SINSKEY, A. J. *Ralstonia eutropha* H16 Encodes Two and Possibly Three Intracellular Poly[d(-)-3-Hydroxybutyrate] Depolymerase Genes. **Society**, v. 185, n. 13, p. 3788–3794, 2003.