

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCISCO JOSÉ TELES MOTA



MOBILIZAÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PHB DESPOLIMERASES, PHAZ1 E PHAZ2, EM *Herbaspirillum seropedicae*

CURITIBA

2024

FRANCISCO JOSÉ TELES MOTA

MOBILIZAÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) E ANÁLISE DA EXPRESSÃO
DAS PHB DESPOLIMERASES, PHAZ1 E PHAZ2, EM *Herbaspirillum seropedicae*

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Bioquímica) pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leda Satie Chubatsu
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos

CURITIBA

2024

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

Mota, Francisco José Teles, 1988-

Mobilização de polihidroxibutirato (PHB) e análise da expressão das PHB despolimerases, PhaZ1 e PhaZ2, em *Herbaspirillum seropedicae* / Francisco José Teles Mota. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

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

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

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos.

1. Herbaspirillum. 2. Polihidroxibutirato. 3. Despolimerases. 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.



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

ATA Nº366

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)

No dia vinte de dezembro de dois mil e vinte e quatro às 14:00 horas, na sala remota, Microsoft Teams, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese do doutorando **FRANCISCO JOSÉ TELES MOTA**, intitulada: **Mobilização de polihidroxibutirato (PHB) e análise da expressão das PHB despolimerases, PhaZ1 e PhaZ2, em *Herbaspirillum seropedicae***, sob orientação da Profa. Dra. LEDA SATIE CHUBATSU. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: LEDA SATIE CHUBATSU (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), ANA CLAUDIA BONATTO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), LUIS PAULO SILVEIRA ALVES (55001149), FABIO DE OLIVEIRA PEDROSA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, LEDA SATIE CHUBATSU, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 20 de Dezembro de 2024.

Assinatura Eletrônica
12/01/2025 12:27:29.0
LEDA SATIE CHUBATSU
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
12/01/2025 07:23:29.0
LUIS PAULO SILVEIRA ALVES
Avaliador Externo (55001149)

Assinatura Eletrônica
27/01/2025 15:30:10.0
ANA CLAUDIA BONATTO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
23/01/2025 22:02:33.0
FABIO DE OLIVEIRA PEDROSA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 420532

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 420532



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 CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FRANCISCO JOSÉ TELES MOTA** intitulada: **Mobilização de polihidroxibutirato (PHB) e análise da expressão das PHB despolimerases, PhaZ1 e PhaZ2, em *Herbaspirillum seropedicae*.**, sob orientação da Profa. Dra. LEDA SATIE 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 doutor 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, 20 de Dezembro de 2024.

Assinatura Eletrônica
12/01/2025 12:27:29.0
LEDA SATIE CHUBATSU
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
12/01/2025 07:23:29.0
LUIS PAULO SILVEIRA ALVES
Avaliador Externo (55001149)

Assinatura Eletrônica
27/01/2025 15:30:10.0
ANA CLAUDIA BONATTO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
23/01/2025 22:02:33.0
FABIO DE OLIVEIRA PEDROSA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

A Professora,
Maria Berenice Reynaud Steffens (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Leda S. Chubatsu, por sua orientação, paciência e apoio ao longo desta jornada, que teve início em 2014, meu primeiro ano como aluno de iniciação científica. Desde então suas contribuições nortearam a minha trajetória como pesquisador.

Agradeço ao Prof. Marcelo Muller meu orientador, o qual iniciou esse projeto e permitiu que eu desse continuidade a ele, o mesmo sempre acompanhou os experimentos e inúmeras vezes deu sugestões sobre procedimentos experimentais.

Ao Prof. Marco Aurélio (UEM) que me ajudou muito quando entrei no laboratório, através dos seus ensinamentos aprendi a realizar vários dos experimentos de biologia molecular, sua paciência e didática são exemplos a serem seguidos.

Ao Marcelo Bueno Batista que sempre foi um pesquisador disposto a ajudar independente da distância, você contribuiu muito com alguns dos experimentos que realizei, também me ensinou a analisar vetores de clonagem e dados de sequenciamento como ninguém.

Agradeço ao Prof. Emanuel Maltempi por ter me incentivado a tentar o doutorado sanduíche, sua insistência e confiança na minha capacidade foram maiores que as minhas e graças a isso eu pude realizar o sonho de desenvolver pesquisa no exterior. Também contribuíram com esse sonho o Prof. Luciano Huergo e a Prof.^a Edileusa Gerhardt que recomendaram-me ao Prof. Karl Forchhammer (Tübingen University), a quem devo os meus sinceros agradecimentos. Sua calorosa recepção na Alemanha e disponibilidade em ajudar contribuíram para a obtenção de alguns resultados desse projeto.

Aos meus amigos de Tübingen, Büsra Sarigul, Alvaro Darcourt, Yoonjung Kim, Wilson Martins e Júlio Moura, vocês foram mais que amigos, durante um ano foram minha família na Alemanha.

Aos colegas de laboratório em Tübingen que me auxiliaram sempre que precisei, especialmente Phillip Fink, que me auxiliou com os experimentos de HPLC; também

Tim Orthwein, Janette Alford, Teresa Müller, Ana Janović, Sherihan Samir, Nathan Manteuffel, Berenike Wagner, Nathalie Becker e Soumila Mondal.

Sou grato aos membros da banca, Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa e Prof. Dr. Luís Paulo Silveira Alves por aceitarem o convite para avaliar esta tese e por suas sugestões e comentários construtivos em relatórios anteriores.

Agradeço à UFPR e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) pela oportunidade de realizar minha trajetória de pós-graduando. Agradeço as agências de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro concedido através das bolsas de estudos que permitiram a produção desse trabalho.

Agradeço também a todos os professores do programa, que contribuíram para minha formação acadêmica e aos servidores técnicos, especialmente ao Valter Baura e Dona Rose Prado.

Um agradecimento especial aos meus colegas de laboratório, Brenno Miranda, Gustavo Bruschi, Lucas Junges, Marcos Damrlei e Maritza Bom pela amizade, companheirismo e colaboração ao longo destes anos. As discussões, trocas de ideias e momentos de descontração foram fundamentais para superar os desafios da rotina acadêmica.

Aos meus amigos e familiares, em especial a minha companheira, Roberta Renner pelo apoio, paciência, amor e compreensão durante esta caminhada.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos vocês, meu muito obrigado!

RESUMO

A β -proteobactéria *Herbaspirillum seropedicae* é uma espécie endofítica que se associa com plantas de interesse agrícola, promovendo o crescimento vegetal. Além disso, essa bactéria sintetiza polihidroxibutirato (PHB), um biopolímero armazenado dentro da célula em forma de grânulos insolúveis. O PHB é sintetizado a partir de três reações: (1) condensação de duas moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA, catalisada pela β -cetoacil-CoA tiolase; (2) redução do acetoacetil-CoA a 3-hidroxibutiril-CoA, catalisada pela acetoacetil-CoA redutase, com consumo de NADPH; e (3) polimerização do 3-hidroxibutiril-CoA pela PHB sintase, resultando no acúmulo de PHB. Quando as fontes externas de carbono se tornam limitadas, o PHB é mobilizado por PHB despolimerases (PhaZs). Em *H. seropedicae*, há dois genes que codificam essas enzimas: *phaZ1* e *phaZ2* e, neste trabalho analisamos o papel dessas PHB despolimerases no metabolismo de PHB em *H. seropedicae*. Ensaio realizados com mutantes nos genes *phaZ1* e *phaZ2* mostraram que a deleção de *phaZ1* (Δ *phaZ1*) resulta em taxas de degradação de PHB menores que SmR1 e Δ *phaZ2*, evidenciando a importância dessa despolimerase indicando que PhaZ1 é a principal enzima envolvida na mobilização de PHB, especialmente em cultivos com altas concentrações de íons amônio, com a degradação ocorrendo a partir da fase estacionária. Por outro lado, se as estirpes são cultivadas sob condições limitantes de amônio, o PHB não é degradado, mas é progressivamente sintetizado, resultando em concentrações superiores a 40% do peso seco celular na estirpe selvagem SmR1. A despolimerase PhaZ2 é fundamental para o acúmulo de concentrações mais elevadas de PHB, uma vez que os mutantes Δ *phaZ2* e Δ *phaZ1 Δ *phaZ2* acumularam 10% menos PHB que a estirpe SmR1 e o mutante Δ *phaZ1*. Nessas condições, os grânulos são morfológicamente maiores, apresentando interferência sobre as leituras de densidade óptica (DO₆₀₀) das culturas, consequentemente influenciando a avaliação do crescimento bacteriano. As análises de expressão gênica revelam que a expressão de *phaZ1* é dependente da presença de grânulos de PHB e de altas concentrações de íons NH₄⁺. No mutante Δ *phaC1*, a expressão de *phaZ1* é reprimida por PhaR. No entanto, mesmo com a formação de grânulos, se não houver NH₄⁺ disponível, *phaZ1* também é reprimido. Em oposição, a expressão de *phaZ2* ocorre em condições de limitação de nitrogênio sendo dependente dos fatores transcricionais NtrC e RpoN.*

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

ABSTRACT

The endophytic β -proteobacterium *Herbaspirillum seropedicae* associates with economically important crops, promoting plant growth. Additionally, this bacterium synthesizes polyhydroxybutyrate (PHB), a biopolymer stored inside the cell as insoluble granules. PHB is synthesized through the following reactions: (1) the condensation of two acetyl-CoA molecules to form acetoacetyl-CoA, catalyzed by β -ketothiolase; (2) the reduction of acetoacetyl-CoA to 3-hydroxybutyryl-CoA, catalyzed by acetoacetyl-CoA reductase, with NADPH consumption; and (3) the polymerization of 3-hydroxybutyryl-CoA by PHB synthase, resulting in PHB accumulation. When external carbon sources become limited, PHB is mobilized by PHB depolymerases (PhaZs). In *H. seropedicae*, two genes encode these enzymes: *phaZ1* and *phaZ2*. In this work we analysed the role of these PHB depolymerases in the *H. seropedicae* metabolism. Mutants with *phaZ1* deletion showed lower PHB degradation rates than the wild type strain SmR1 and mutant Δ *phaZ2*, highlighting the importance of this PHB depolymerase. Indicating that PhaZ1 is the main enzyme involved in PHB mobilization, especially under growth with high ammonium ion concentrations, with degradation occurring from the stationary phase. In contrast, when the strains are cultivated under ammonium-limiting conditions, PHB is not degraded and is progressively synthesized, resulting in concentrations exceeding 40% of the cell dry weight in SmR1. Furthermore, the PhaZ2 depolymerase is essential for the accumulation of higher PHB concentrations, as the Δ *phaZ2* and Δ *phaZ1* Δ *phaZ2* mutants accumulated 10% less PHB than the SmR1 strain and the Δ *phaZ1*. Under these conditions, the granules are morphologically larger, interfering with the optical density (OD₆₀₀) measurements of the cultures, which in turn impact the evaluation of bacterial growth. Gene expression analyses reveal that *phaZ1* expression depends on the presence of PHB granules and high concentrations of NH₄⁺ ions. In the Δ *phaC1* mutant, *phaZ1* expression is repressed by PhaR. However, even with granule formation, if NH₄⁺ is unavailable, *phaZ1* is also repressed. In contrast, *phaZ2* expression occurs under nitrogen-limiting conditions and depends on the transcriptional factors NtrC and RpoN.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Via metabólica ilustrando as três reações enzimáticas que levam à síntese de poli(3-hidroxiobutirato) em bactérias.....	13
Figura 2. Via metabólica do PHB (Ciclo do PHB).	23
Figura 3. Ilustração do tamanho dos fragmentos de DNA dos genes amplificados nas reações de PCR semi-quantitativa.....	53
Figura 4. Análise das sequências de aminoácidos das proteínas PhaZ1 e PhaZ2 de <i>H. seropedicae</i> SmR1.....	56
Figura 5. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas PhaZ1 (PhaZ1_Hsero) e PhaZ2 (PhaZ2_Hsero) de <i>H. seropedicae</i> , e PhaZa1 (PhaZa1_C.nec) e PhaZa2 (PhaZa2_C.nec) de <i>C. necator</i>	58
Figura 6. Predição da estrutura tridimensional das proteínas PhaZ1 e PhaZ2 de <i>H. seropedicae</i> e PhaZa1 e PhaZa2 de <i>C. necator</i>	60
Figura 7. Estruturas terciárias das proteínas PhaZ1 e PhaZ2 de <i>H. seropedicae</i> SmR1.	61
Figura 8. Alinhamento das estruturas terciárias das PHB despolimerases de <i>C. necator</i> e <i>H. seropedicae</i>	62
Figura 9. Perfis de crescimento das estirpes de <i>H. seropedicae</i>	64
Figura 10. Curva de calibração do ácido crotônico.	66
Figura 11. Padrão de crescimento e quantificação de PHB em estirpes de <i>H. seropedicae</i>	68
Figura 12. Análise de regressão linear para estimativa das taxas de síntese e degradação de PHB.....	69
Figura 13. Microscopia de fluorescência de grânulos de PHB em estirpes de <i>H. seropedicae</i>	72
Figura 14. Padrão de crescimento de estirpes de <i>H. seropedicae</i> em cultivo com limitação de NH ₄ Cl.	75
Figura 15. Quantificação e modelagem do acúmulo de PHB em estirpes de <i>H. seropedicae</i> cultivadas com limitação de NH ₄ Cl.	76
Figura 16. Padrão de crescimento e contagem de colônias de estirpes de <i>H. seropedicae</i> cultivadas em meio NFb-malato com 2 e 20 mM NH ₄ Cl.	80

Figura 17. Reação de redução do Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 1,3,5-trifenilformazana (TPF).	83
Figura 18. Placas de petri com colônias de estirpes de <i>H. seropedicae</i> cultivadas em meio com TTC.	86
Figura 19. Ilustração do método de análise dos grânulos de PHB (painel A) e células bacterianas (painel B) em imagens de microscopia.	87
Figura 20. Análise dos grânulos de PHB acumulado por célula em estirpes de <i>H. seropedicae</i> através de microscopia de fluorescência.	89
Figura 21. Placas de petri com colônias de estirpes de <i>H. seropedicae</i> cultivadas em meio com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio - TTC.	91
Figura 22. Perfil de crescimento e microscopia de fluorescência de <i>H. seropedicae</i> SmR1, $\Delta phaC1$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ em meio NFbHPLNG5.....	93
Figura 23. Análises dos grânulos de PHB em imagens de microscopia de fluorescência de <i>H. seropedicae</i> SmR1.....	96
Figura 24. Análises dos grânulos de PHB em células de $\Delta phaZ2$ obtidas a partir de imagens de microscopia de fluorescência.	97
Figura 25. Análise dos grânulos de PHB em imagens de microscopia de fluorescência da estirpe $\Delta phaZ1$	98
Figura 26. Análises dos grânulos de PHB em imagens de microscopia de fluorescência do mutante $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$	99
Figura 27. Análise do tamanho médio dos grânulos de PHB de estirpes de <i>H. seropedicae</i>	101
Figura 28. Análise da mobilização de PHB e sobrevivência celular em meio de cultivo sem carbono.....	104
Figura 29. Análise da expressão do gene <i>phaZ1</i> através de ensaio de atividade de β -galactosidase em estirpes de <i>H. seropedicae</i>	106
Figura 30. Ilustração da região promotora do gene <i>phaZ1</i>	107
Figura 31. Análise da regulação da expressão do gene <i>phaZ1</i>	109
Figura 32. Regulação da expressão de <i>phaZ1</i> em condições de limitação de nitrogênio.	112
Figura 33. Região promotora de <i>phaZ2</i>	114

Figura 34. Efeito da deleção dos genes *phaC1* e *phaR* sobre a expressão de *phaZ2*.
..... 116

Figura 35. RT-PCR semi-quantitativa utilizando cDNA das estirpes $\Delta rpoN$ e $\Delta ntrC$..
..... 117

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – GENES DO METABOLISMO DE PHB EM <i>H. seropedicae</i>	31
TABELA 2 – LISTA DE ESTIRPES BACTERIANAS	39
TABELA 3 – LISTA DE PLASMÍDEOS	40
TABELA 4 – TAMPÃO PBSA (SOLUÇÃO SALINA FOSFATO).....	48
TABELA 5 – REAGENTES DO KIT PROMEGA ONE STEP RT-PCR PARA SÍNTESE DE cDNA	52
TABELA 6 – TEMPERATURA E TEMPO DAS REAÇÕES DE SÍNTESE DE cDNA	52
TABELA 7 – PRIMERS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR SEMI-QUANTITATIVA.....	53
TABELA 8 – TAXAS DE CRESCIMENTO (K) E TEMPO DE DUPLICAÇÃO EM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i>	65
TABELA 9 – <i>p-VALUE</i> E TAXAS DE SÍNTESE DE PHB EM ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i>	69
TABELA 10 – <i>p-VALUE</i> E TAXAS DE DEGRADAÇÃO DE PHB EM ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i>	69
TABELA 11 – PARÂMETROS DA EQUAÇÃO DA FUNÇÃO LOGÍSTICA PARA ESTIMAR AS TAXAS DE SÍNTESE DE PHB EM ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> CULTIVADAS EM 2 mM DE NH ₄ Cl	77
TABELA 12 – QUANTIFICAÇÃO DE UFC EM ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i>	81
TABELA 13 – <i>p-VALUE</i> DA COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>phaZ1::lacZ</i> - TESTE GAMES-HOWELL	110
TABELA 14 – <i>p-VALUE</i> DA COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>phaZ1::lacZ</i> - TESTE GAMES-HOWELL	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3HB – 3-Hidroxibutirato

3HV – 3-Hidroxivalerato

cDNA – DNA complementar

CoA – Coenzima A

DO – Densidade óptica

EDTA – ácido etileno-diamino-tetracético

e-PHB despolimerases – Polihidroxibutirato despolimerases extracelulares

HPLC – Cromatografia Líquida de alta performance

i-PHB despolimerases – Polihidroxibutirato despolimerases intracelulares

PGAPs – proteínas associadas ao grânulo de PHB

PHA – Polihidroxialcanoato

PhaZ1 – PHB despolimerase 1

PhaZ2 – PHB despolimerase 2

PHB – Polihidroxibutirato

RT-PCR – Transcriptase reversa com reação em cadeia da polimerase

TTC – Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio

TPF – 1,3,5 trifenilformazana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	POLIHIDROXIALCANOATOS	14
1.2	METABOLISMO DE POLIHIDROXIBUTIRATO: PROPRIEDADES, BIOSÍNTESE E REGULAÇÃO	17
1.3	PHB DESPOLIMERASES E MOBILIZAÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO	20
1.4	REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE PHB: PAPEL DO (p)ppGpp E DO SISTEMA DE FOSFOTRANSFERASES DO METABOLISMO DE NITROGÊNIO (PTS ^{Ntr})	25
1.5	IMPORTÂNCIA DA SÍNTESE, ARMAZENAMENTO E MOBILIZAÇÃO DOS PHAS NA RESPOSTA BACTERIANA AO ESTRESSE	27
1.6	METABOLISMO DE PHB EM <i>H. seropedicae</i>	30
2	JUSTIFICATIVA	36
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	38
4.2	ANTIBIÓTICOS	39
4.3	ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS	39
4.4	CURVA DE CRESCIMENTO	40
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE PHB POR HPLC	41
4.5.1	Coleta e processamento das amostras	41
4.5.2	Curva de calibração	42
4.6	ESTIMATIVA DAS TAXAS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE PHB POR MODELO DE REGRESSÃO LINEAR	42
4.6.1	Estimativa e interpretação dos parâmetros	43
4.6.2	Validação do modelo e representação gráfica	44
4.6.3	Embasamento teórico	44
4.7	ESTIMATIVA DAS TAXAS DE SÍNTESE DE PHB POR MODELO LOGÍSTICO	44
4.8	QUANTIFICAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS	46
4.9	ENSAIOS DE ATIVIDADE METABÓLICA COM CLORETO DE TRIFENILTETRAZOLIO (TTC)	46
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
4.11	MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	47
4.12	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE IMAGENS DE MICROSCOPIA	48
4.13	ENSAIOS DE ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE	49
4.14	TÉCNICAS DE BIOLOGICA MOLECULAR	50

4.14.1	Extração de RNA e RT-PCR.....	50
4.14.2	Reações de PCR e oligonucleotídeos iniciadores	52
4.15	PREPARAÇÃO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	54
4.16	ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	ANÁLISES <i>IN SILICO</i> DAS PROTEÍNAS PHAZ1 E PHAZ2 DE <i>H. seropedicae</i> SmR1.....	55
5.2	PERFIL DE CRESCIMENTO	63
5.3	EFEITO DA DELEÇÃO DOS GENES <i>phaZ1</i> E <i>phaZ2</i> NA SÍNTESE E MOBILIZAÇÃO DE POLI- β -HIDROXIBUTIRADO EM <i>H. seropedicae</i>	65
5.3.1	Curva padrão de ácido crotônico	65
5.3.2	Efeito da alta concentração de íons amônio sobre a síntese e mobilização de Poli- β -Hidroxibutirado em <i>H. seropedicae</i>	66
5.3.3	Efeito da concentração limitante de íons amônio sobre a síntese e mobilização de Poli- β -Hidroxibutirado em <i>H. seropedicae</i>	74
5.4	OS GRÂNULOS DE PHB INTERFEREM NA DO ₆₀₀ DOS CULTIVOS DE <i>H. seropedicae</i>	79
5.5	ENSAIO DE REDUÇÃO DE TETRAZÓLIO POR BACTÉRIAS CULTIVADAS EM MEIO SÓLIDO.....	83
5.6	ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA BACTERIANA SOB CONDIÇÕES DE CULTIVO EM MEIO SEM CARBONO	92
5.7	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS NH ₄ ⁺ SOBRE A EXPRESSÃO DO GENE <i>phaZ1</i> EM <i>H. seropedicae</i>	104
5.8	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO LIMITANTE DE ÍONS NH ₄ ⁺ SOBRE A EXPRESSÃO DO GENE <i>phaZ2</i> EM <i>H. seropedicae</i>	113
6	CONCLUSÕES	118
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	119
8	ANEXOS.....	132

1 INTRODUÇÃO

O plástico é um dos principais recursos usado pela humanidade. Ele tem origem a partir de derivados dos combustíveis fósseis, entre os quais o etileno e o propileno, estes compostos são os monômeros mais empregados na confecção de plásticos. Além desses, são utilizadas resinas e outras fibras plásticas tais como polietileno, polipropileno, poliestireno, cloreto de polivinila (PVC), teraftalato de polietileno (PET) e poliuretano. O uso desses materiais intensificou-se a partir de 1950, com uma produção primária estimada em 8300¹ milhões de toneladas métricas até 2015 (GEYER; JAMBECK; LAW, 2017).

A maioria dos produtos plásticos possui vida útil curta, como as embalagens de alimentos, que duram em média 5 anos. Após o consumo, a maior parte é descartada e apenas uma pequena parcela é reciclada. Estima-se que o descarte cumulativo de plástico no meio ambiente ultrapasse 10 milhões de toneladas métricas entre 1950 e 2050 (GEYER; JAMBECK; LAW, 2017).

A matéria prima empregada na confecção de plásticos é xenobiótica, ou seja, não é degradada nem reciclada por seres vivos quando descartada no ambiente. Conseqüentemente, há acúmulo e geração de resíduos tóxicos, os quais estão poluindo diversas esferas bióticas. Um dos principais poluentes são os microplásticos; diversas evidências surgiram nos últimos anos correlacionando este poluente como causador de algumas doenças humanas, tais como carcinogênese, doenças cardiovasculares e disrupção endócrina (KELLY; FUSSELL, 2020; MARFELLA *et al.*, 2024). A toxicidade das micropartículas derivadas da degradação de plásticos também ameaça a biota de ecossistemas marinhos, terrestres e até mesmo plantas (RILLIG *et al.*, 2019; RILLIG; LEHMANN, 2020). Diante desse cenário alarmante, a substituição desses materiais por alternativas ecologicamente sustentáveis e menos poluentes torna-se necessária.

Os polihidroxicanoatos (PHAs) constituem uma classe estruturalmente diversa de poliésteres biológicos sintetizados por vários tipos de microrganismos, principalmente bactérias, cianobactérias, microalgas e arqueias (COSTA *et al.*, 2019; POLI *et al.*, 2011; VERLINDEN *et al.*, 2007). Esses compostos apresentam

¹ Uma tonelada métrica equivale a 1000 kg, portanto, um milhão de toneladas métricas equivale a 1 bilhão de kg (1.000.000.000 kg).

similaridades físico-químicas com poliésteres derivados da indústria petroquímica, sendo os mais similares o polipropileno, polietileno, náilon e o policloreto de vinila (PVC). No entanto, diferentemente dos materiais plásticos, os PHAs são biocompatíveis, biodegradáveis e tem origem a partir de fontes renováveis. Esses fatores contribuem para atratividade dos PHAs na indústria e como potencial substituinte dos plásticos convencionais.

O polihidroxibutirato (PHB) é um dos PHAs mais estudados, devido à menor complexidade da via metabólica e disponibilidade dos compostos precursores. A síntese desse polímero foi bem estudada em bactérias, notavelmente na β -proteobactéria *Ralstonia eutropha* H16 (hoje renomeada *Cupriavidus necator*). Nessa bactéria, duas moléculas de acetil-CoA são condensadas em acetoacetil-CoA pela enzima β -cetotiolase (PhaA), em seguida a enzima acetoacetil-CoA redutase (PhaB), catalisa a redução de acetoacetil-CoA em hidroxibutiril-CoA, em uma reação dependente de NADPH. Na última etapa, a enzima PHB sintase (PhaC), polimeriza os monômeros de hidroxibutiril-CoA em polihidroxibutirato (LEE, 1996; STEINBUCHEL; VALENTIN, 1995), conforme indicado na Figura 1. Esse conjunto de reações é bastante conservado em várias bactérias, e os genes que codificam essas enzimas foram isolados e vêm sendo sistematicamente utilizados para aumentar a síntese de PHB em outros organismos, principalmente *Escherichia coli* (JIANG et al., 2023; LING et al., ; RAHMAN et al., 2013).

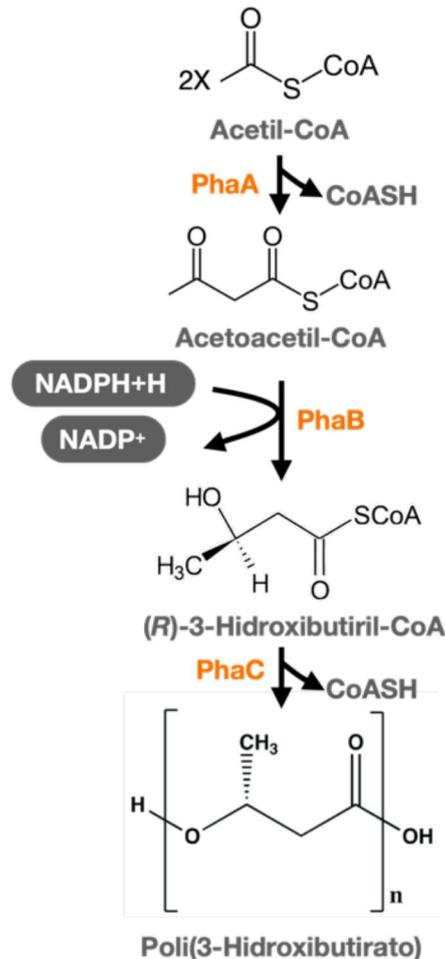


Figura 1. Via metabólica ilustrando as três reações enzimáticas que levam à síntese de poli(3-hidroxi-butarato) em bactérias. Na primeira reação, duas moléculas de acetil-CoA são condensadas em acetoacetil-CoA pela ação da enzima β -cetotilase (PhaA). Em seguida, a enzima acetoacetil-CoA redutase (PhaB) reduz o acetoacetil-CoA a (R)-3-hidroxi-butil-CoA, utilizando NADPH como cofator. A última etapa consiste na polimerização dos monômeros de (R)-3-hidroxi-butil-CoA em PHB, catalisada pela PHB sintase (PhaC). Fonte: Adaptado de Eggers *et al.*, (2013).

Além da produção de bioplásticos, os PHAs vêm despertando interesse por suas funções fisiológicas nos organismos promotores de crescimento vegetal. Em *Azospirillum brasilense*, a produção e degradação de polihidroxi-butarato estão associadas a maior resistência ao estresse osmótico, à dessecação e à radiação ultravioleta (UV) (OKON; ITZIGSOHN, 1992).

As vantagens competitivas de estirpes que acumulam PHB também foram demonstradas em relação ao processo de colonização vegetal. Em *Sinorhizobium meliloti*, mutantes deficientes em sintetizar PHB apresentam menor sobrevivência que a estirpe selvagem em condições de competição durante a colonização da Alfafa (*Medicago sativa*) (WILLIS; WALKER, 1998). Além disso, a degradação de PHB está associada a uma maior capacidade de colonização de Pinus (*Pinus sylvestris*) por

Methylobacterium extorquens, uma espécie endossimbionte promotora do crescimento vegetal do pinus escocês (BARUAH *et al.*, 2024).

Herbaspirillum seropedicae é uma β -proteobactéria promotora de crescimento vegetal que estabelece associação endofítica com diversas espécies vegetais de interesse econômico. Essa bactéria produz PHB, e sua capacidade de acumular e degradar o polímero está associada à promoção do crescimento vegetal, especificamente com o desenvolvimento de maiores quantidades de raízes laterais e aumento da área radicular total (ALVES *et al.*, 2019). Essas características são mais evidentes na estirpe selvagem SmR1, em comparação com estirpes mutantes do metabolismo de PHB, como o duplo mutante nos genes codificantes das PHB despolimerases, $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$.

As PHB despolimerases de *H. seropedicae* são enzimas intracelulares que atuam na mobilização deste polímero, permitindo sua utilização como fonte de carbono e energia. Embora *H. seropedicae* tenha dois genes codificantes de PHB despolimerases (*phaZ1* e *phaZ2*), os mesmos não são expressos simultaneamente, sugerindo que seus produtos gênicos podem desempenhar funções distintas.

A expressão de *phaZ2* foi observada em estudos de interação planta-bactéria, com trigo (PANKIEVICZ *et al.*, 2016) e milho (BALSANELLI *et al.*, 2016), nessas condições a expressão de *phaZ2* é maior do que a de *phaZ1*. A expressão de *phaZ2* na interação com a planta é corroborada por um outro estudo com *Setaria viridis*, no qual a expressão desse gene foi observada dentro dos tecidos radiculares através de um fusão da região promotora com o gene *gfp*.

Contudo, o papel das PHB despolimerases na mobilização de PHB ainda não foi determinado. Portanto, esse estudo teve como objetivos principais analisar a mobilização de PHB através de mutantes com deleção nos genes codificantes de PHB despolimerases e determinar a expressão desses genes, *phaZ1* e *phaZ2* em *H. seropedicae*.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS

As características sustentáveis e as propriedades químicas de interesse industrial dos polihidroxicanoatos impulsionaram diversas pesquisas nos últimos

anos, culminando na descoberta de mais de 150 diferentes biopolímeros (STEINBÜCHEL; STEINBÜCHEL, 1995). Em sua maioria, os PHAs são formados por monômeros de 3-hidroxi ácidos graxos unidos através de ligações éster, resultando em uma estrutura linear. A variabilidade estrutural e funcional dos PHAs é conferida, em parte, pela diversidade do grupo R pendente (lateral), presente em cada monômero, que pode variar de um único carbono (metil) até compostos com mais de 13 carbonos (tridecil).

Além da variação no grupo R, a incorporação de diferentes compostos durante a síntese também contribui para a diversidade dos PHAs. Polímeros mais simples como o polihidroxibutirato e o polihidroxicaproato são formados por cadeias repetitivas de um único monômero e constituem os PHAs homopoliméricos mais estudados. Por outro lado, a incorporação de diferentes monômeros, resulta na síntese de copolímeros, como o poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxicaproato), um dos mais comuns na natureza. Adicionalmente, a inserção de blocos de diferentes homopolímeros nas cadeias de PHAs, como no poli-3-hidroxibutirato-bloco-poli-3-hidroxi-hexanoato (PHB-b-PHHx) descrito por Tripathi *et al.* (2012), amplia ainda mais a gama de possibilidades estruturais e funcionais desses biopolímeros.

Os polihidroxicaproatos são classificados em três categorias de acordo com o número de carbonos presente na unidade monomérica:

- scl-PHAs (*short chain length PHAs*): são compostos que possuem até cinco átomos de carbonos. O PHB é um exemplo de scl-PHA, encontrado em bactérias como *Cupriavidus necator*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* YB-4, *Azotobacter sp.* e *Herbaspirillum seropedicae* (CATALAN *et al.*, 2007; LEE, 1996; MOŽEJKO-CIESIELSKA; KIEWISZ, 2016; TAL; OKON, 1985).
- Mcl-PHAs (*medium chain length PHAs*): Possuem de seis a quatorze átomos de carbono no monômero e são encontrados em diversas espécies de *Pseudomonas*, como *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e *Pseudomonas mendocina* (LE MEUR *et al.*, 2012; MOŽEJKO-CIESIELSKA; KIEWISZ, 2016). Os mcl-PHAs mais comuns são 3-hidroxi-hexanoato (3HHx), 3-hidroxi-octanoato (3HO), 3-hidroxi-2-octenoato (3H2O), e 3-hidroxi-decanoato (3H2D), sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* (LE MEUR *et al.*, 2012; TANIKKUL *et al.*, 2020).

- lcl-PHAs (*long chain length PHAs*): Possuem mais de 14 átomos de carbono na unidade monomérica, sendo os menos comuns e menos estudados entre os PHAs. Assim como os mcl-PHAs, podem ser sintetizados por espécies de *Pseudomonas*. Exemplos de monômeros de lcl-PHAs são o 3-hidroxihexadecanoato (3HHD) e o 3-hidroxiocetadecanoato (3HOD) com 16 e 18 carbonos, respectivamente, cujos polímeros foram caracterizados em *Pseudomonas aeruginosa* (SINGH; MALLICK, 2008).

O tipo de PHA produzido depende de fatores como a fonte de carbono utilizada para o crescimento bacteriano, a variabilidade genética do organismo e a especificidade catalítica das enzimas da via de biossíntese. Esse conjunto de fatores é bem descrito na bactéria *Cupriavidus necator*, o organismo modelo para estudos do metabolismo de polihidroxialcanoatos. Nessa bactéria o conjunto de reações que levam a síntese de PHAs e as enzimas envolvidas na via foram todas caracterizadas, inclusive em nível estrutural (KIM; KIM, 2014; KIM *et al.*, 2014; WITTENBORN *et al.*, 2016).

A primeira reação da via metabólica é catalisada por β -cetotilases e, dependendo da fonte de carbono, é uma das reações determinante para o tipo de polímero de PHA produzido. Quando é fornecido glucose, a oxidação ocorre em rotas metabólicas que levam a síntese de acetil-CoA, o principal precursor da síntese de PHB. Contudo, se a fonte de carbono é o propionato, as rotas oxidativas levam a síntese de diferentes compostos, sendo um deles o propionil-CoA, este é condensado com o acetil-CoA resultando na formação de 3-hidroxiacetoato, reação catalisada pela β -cetotilase B (β ktB), uma enzima alternativa do metabolismo de PHAs. Isso demonstra como a fonte de carbono fornecida pode afetar o tipo de monômero de PHA sintetizado (SLATER *et al.*, 1998). Essa flexibilidade do metabolismo de PHAs, com reações alternativas à via clássica, como aquelas catalisadas por PhaB e principalmente PhaC, permitem a produção de diferentes tipos de PHAs, demonstrando a versatilidade do metabolismo.

Em suma, os polihidroxialcanoatos representam uma classe promissora de biopolímeros com potencial para revolucionar a indústria de bioplásticos e contribuir para um futuro mais sustentável. A diversidade estrutural e funcional dos PHAs, aliada à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade, abre um leque de possibilidades para aplicações em diversos setores. O conhecimento sobre o metabolismo de PHAs em

bactérias e outros organismos, é fundamental para aumentar a produção e otimizar rotas biossintéticas para síntese de novos biopolímeros. No entanto, desafios como o alto custo de produção e a necessidade de ampliar a escala de produção ainda precisam ser superados para que esses biopolímeros alcancem seu pleno potencial como alternativa aos plásticos convencionais.

1.2 METABOLISMO DE POLIHIDROXIBUTIRATO: PROPRIEDADES, BIOSÍNTESE E REGULAÇÃO

O PHB, um dos principais biopolímeros estudados, foi isolado pela primeira vez em 1926 por Maurice Lemoigne a partir da bactéria *Bacillus megaterium* (LENZ; MARCHESSAULT, 2005). O PHB é sintetizado por organismos presentes nos três grandes domínios da classificação biológica: Bactéria, Arqueia e Eucaria. Entretanto as etapas da via metabólica são melhor descritas em bactérias heterotróficas. Nesses microrganismos, o PHB é produzido ao longo do crescimento como uma etapa fisiologicamente relevante do metabolismo celular, mas condições de cultivo em que há excesso de carbono e limitação de fontes de nitrogênio, fósforo ou oxigênio favorecem um maior acúmulo deste polímero (ANDERSON; DAWES, 1990). O PHB sintetizado é depositado no espaço intracelular do microrganismo sob a forma de grânulos insolúveis.

Assim, como outros PHAs, o PHB possui propriedades termoplásticas, apresenta biocompatibilidade e biodegradabilidade, características que o tornam atrativo para aplicações industriais, principalmente na indústria biomédica, como na produção de próteses, fibras, biomembranas, agentes carreadores de drogas e vacinas (FERNANDES *et al.*, 2014; MICHALAK *et al.*, 2013; PARLANE *et al.*, 2012). Além disso, o PHB tem sido utilizado na produção de bioplásticos e biocombustíveis (DIETRICH *et al.*, 2017; RIAZ *et al.*, 2021). No entanto, a aplicação industrial do PHB enfrenta desafios como o alto custo de produção, baixo rendimento, suscetibilidade à degradação e dificuldades de extração. Além disso o PHB sozinho é mecanicamente quebradiço e apresenta altos índices de cristalinidade e termoplasticidade, estas limitações vêm sendo superada pela síntese de biopolímeros híbridos contendo 3-hidroxiacetato e 3-hidroxi-valerato (DIETRICH *et al.*, 2017; KOLLER *et al.*, 2017; MADISON; HUISMAN, 1999).

O metabolismo de PHB tem sido extensivamente estudado em bactérias, e as três reações enzimáticas iniciais, catalisadas por PhaA, PhaB e PhaC, são bem conhecidas. No entanto, essas reações representam apenas uma parte do mecanismo de síntese desse biopolímero. Diversas outras enzimas e proteínas, com funções estruturais ou regulatórias, também participam da homeostase dos grânulos de PHB (JENDROSSEK, 2009). Essas proteínas são denominadas proteínas associadas aos grânulos de PHB (PGAPs, do inglês *PHB Granule-Associated Proteins*). Entre estas encontram-se as fasininas (PhaP), as PHB sintases (PhaC/PhbC), as PHB despolimerases (PhaZ) e proteínas com função regulatória, como PhaR e PhaM (JENDROSSEK; PFEIFFER, 2014; SZNAJDER *et al.*, 2015).

As fasininas são as proteínas mais abundantes associadas aos grânulos de PHB e desempenham um papel estrutural fundamental no controle da forma e tamanho dessas estruturas hidrofóbicas. São proteínas de baixa massa molecular, recebendo esse nome devido à sua similaridade funcional com as oleosinas, um grupo de proteínas que recobrem os triacilgliceróis em plantas (PIEPER *et al.*, 1994). As fasininas possuem natureza anfifílica, com regiões hidrofóbicas que interagem com o PHB e domínios hidrofílicos expostos ao citoplasma. Ao recobrir os grânulos, as fasininas evitam sua coalescência e isolam proteínas e estruturas citoplasmáticas de interações indesejadas com o PHB. Além disso, regulam a quantidade, o tamanho e a distribuição dos grânulos dentro da célula (MAESTRO; SANZ, 2017).

As fasininas também formam interações proteína-proteína entre si (homo-oligômeros e hetero-oligômeros) e com outras proteínas envolvidas no metabolismo de PHB, como as PHB despolimerases, a proteína regulatória PhaR e a PHB sintase PhaC (HANDRICK *et al.*, 2004; MAESTRO; SANZ, 2017; PFEIFFER *et al.*, 2011). Todavia, essas interações não são desempenhadas por todas as fasininas, mas sim por famílias específicas de fasininas encontradas em *C. necator*, *Rhodospirillum rubrum* e *Aeromonas caviae*. Atualmente, existem quatro famílias de fasininas na base de dados InterPro (PF09361, PF09602, PF09650 e PF05597), agrupadas de acordo com a similaridade de seus domínios conservados. Essa diversidade sugere que as fasininas podem desempenhar diferentes funções no metabolismo de PHB.

A proteína repressora PhaR, um homotetrâmero bifuncional capaz de se ligar ao DNA ou aos grânulos de PHB, regula a expressão de genes envolvidos no metabolismo do PHB em nível transcricional. De acordo com o mecanismo de regulação proposto por MAEHARA *et al.* (2002), PhaR se liga a sequências ricas em

bases TGC na região promotora desses genes, reprimindo a transcrição. Essa ligação é reversível, e a dissociação de PhaR do DNA é promovida por oligômeros de 3-hidroxi-butirato (3HB) ou moléculas de PHB recém-sintetizadas, que atuam como efetores da expressão gênica (MAEHARA *et al.*, 2002; YAMADA *et al.*, 2007; YAMADA *et al.*, 2013).

Após se desligar do DNA, PhaR se liga aos grânulos de PHB por meio de interações hidrofóbicas não específicas. Essa ligação é mais forte e mais estável em comparação à ligação PhaR-DNA, sugerindo uma maior afinidade da proteína pelos grânulos (MAEHARA *et al.*, 2001; MAEHARA *et al.*, 2002; YAMASHITA *et al.*, 2006). A interação de PhaR com o PHB resulta na expressão de genes previamente reprimidos. Por outro lado, a mobilização do PHB libera as proteínas PhaR, que voltam a se associar ao DNA e retomam seu papel repressor.

A repressão exercida por PhaR varia entre os genes-alvo, dependendo da variação da sequência consenso de ligação. Em *C. necator*, por exemplo, a sequência consenso na região promotora de *phaP1* (fasina 1) possui 32 pares de base (pb), enquanto a sequência na região promotora de *phaR* possui apenas 8 pb (YAMADA *et al.*, 2013), indicando uma autorregulação menos intensa em comparação à repressão sobre *phaP*. Esse mecanismo de regulação também ocorre em *Paracoccus denitrificans*, onde duas sequências consenso de ligação de PhaR foram identificadas na região promotora de *phaP*: uma sobrepondo um promotor σ^{70} e outra localizada a montante do promotor. A regulação de PhaR sobre seu próprio gene ocorre quando a proteína se liga a uma sequência que se sobrepõe à região -10 do promotor σ^{70} e se estende em direção à região de início da transcrição, ocupando 24 pares de base (MAEHARA *et al.*, 2002).

PhaR é uma proteína altamente conservada em várias espécies que produzem PHB, com proteínas homólogas e funções similares em *Pseudomonas oleovorans*, *Methylobacterium extorquens*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum brasilense*, *Rhodobacter sphaeroids*, *Bacillus megaterium* e *Haloferax mediterranei* (CHOU *et al.*, 2009; KADOWAKI *et al.*, 2011; MALINICH *et al.*, 2018; LAWRENCE *et al.*, 2005; LIDSTROM *et al.*, 2002; MCCOOL; CANNON, 2001; PO *et al.*, 2002).

Além das fasinas e de PhaR, outras proteínas se ligam aos grânulos de PHB. Dentre elas, estão proteínas com funções diretamente relacionadas ao metabolismo de PHB, como PHB sintases, PhaM - ativador fisiológico da PHB sintase (PFEIFFER *et al.*, 2014) e PHB despolimerases. Entretanto, também foram identificadas proteínas

sem relação direta evidente com o metabolismo de PHB (JENDROSSEK; PFEIFFER, 2014; PÖTTER; STEINBÜCHEL, 2005), é o caso das proteínas com função de porinas, identificadas em grânulos de PHB de *Pseudomonas* e *Herbaspirillum seropedicae* (HOKAMURA *et al.*, 2015; TIRAPELLE *et al.*, 2013). Essa diversidade de proteínas associadas aos grânulos de PHB sugere que eles não são apenas reservas de carbono, mas possuem uma importância fisiológica fundamental, sendo análogos a estruturas celulares complexas, como as organelas. Devido a essa complexidade, os grânulos de PHB passaram a ser chamados de “carbonossomos” (JENDROSSEK, 2009).

1.3 PHB DESPOLIMERASES E MOBILIZAÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO

A mobilização do polímero acumulado dentro da célula é uma etapa crucial no metabolismo de PHB, pois disponibiliza carbono, energia e o potencial redox armazenados nos grânulos para o metabolismo celular. O PHB é degradado pelas PHB despolimerases (PhaZs), proteínas classificadas conforme sua capacidade de degradar grânulos de PHB nativos ou cristalinos. As PhaZs que degradam os grânulos nativos, ou seja, aqueles encontrados dentro da célula e recoberto por proteínas, são denominadas PHB despolimerases intracelulares (i-PHB despolimerases). A outra classe compreende as PHB despolimerases extracelulares (e-PHB despolimerases), enzimas que degradam grânulos de PHB cristalinos resultantes da *lise* celular e que não apresentam proteínas aderidas à sua superfície (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002).

As e-PHB despolimerases foram extensivamente estudadas, de modo que seus mecanismos catalíticos são conhecidos. Além disso, a estrutura de algumas dessas enzimas foi elucidada, como é o caso das proteínas PhaZ de *Penicillium funiculosum*, *Alcaligenes faecalis* e *Microbacterium paraoxydans* (HISANO *et al.*, 2006; NOJIRI; SAITO, 1997; SAYYED *et al.*, 2019). Essas proteínas são exportadas para fora da célula e degradam o PHB cristalino em 3-hidroxiacetato (3-HA) e oligômeros de 3-hidroxiacetato.

Ambas as classes de PHB despolimerases pertencem à família das α/β -hidrolases, mas, apesar da similaridade estrutural, as i-PHB despolimerases degradam exclusivamente os grânulos de PHB nativos, enquanto as e-PhaZs têm sua atividade catalítica restrita à mobilização de grânulos cristalinos.

As PhaZs extracelulares apresentam uma arquitetura conservada, com um peptídeo sinal curto, uma região associada à ligação ao substrato, uma região onde se encontra o domínio catalítico e uma sequência intermediária. Esta última conecta o domínio de ligação ao substrato ao domínio catalítico. O domínio catalítico é formado por uma tríade de resíduos de aminoácidos: serina, histidina e aspartato. A serina catalítica está localizada em uma sequência conservada Gly-X-Ser-X-Gly, conhecida como “*lipase box*”, onde X pode ser qualquer outro resíduo de aminoácido. Esse pentapeptídeo é conservado não apenas nas e-PHB despolimerases, mas também em outras proteínas da família das hidrolases, como lipases, serina proteases e esterases (TOKIWA; CALABIA, 2004).

As i-PhaZs não possuem os mesmos domínios conservados observados nas despolimerases extracelulares. Em geral, apresentam especificidade em relação ao substrato, degradando PHB de cadeia média ou curta. Em relação a essa especificidade, dividem-se em dois grupos: aquelas que catalisam reações de clivagem do PHB de cadeia média (mcl-PHB despolimerases) e as enzimas capazes de degradar apenas o PHB de cadeia curta (scl-PHB despolimerases).

As scl-PHB despolimerases são classificadas em duas superfamílias:

1. **Tríade catalítica conservada:** Possuem a tríade catalítica com serina conservada entre os resíduos de aminoácidos catalíticos, sendo que a serina está inserida dentro da sequência “*lipase box*”; é o caso das proteínas PhaZd1 e PhaZd2 de *C. necator* (ABE; KOBAYASHI; SAITO, 2005; SZNAJDER *et al.*, 2014).

2. **Tríade catalítica modificada:** Nesse caso o resíduo de serina foi substituído por cisteína. Desse modo, a tríade é formada por cisteína, histidina e aspartato. Além disso, a sequência “*lipase box*” está ausente; é o caso da enzima PhaZa1 de *C. necator* (EGGERS; STEINBÜCHEL, 2013; UCHINO *et al.*, 2007).

Assim, as PHB despolimerases intracelulares são agrupadas em duas superfamílias: scl-PHB despolimerase com “*lipase box*” (SF1) e scl-PHB despolimerases sem “*lipase box*” (SF2), (KNOLL *et al.*, 2009).

Uma característica marcante das i-PHB despolimerases é sua afinidade pelos grânulos de PHB. Apesar de não haver um domínio de ligação conservado, essas proteínas são encontradas aderidas aos grânulos de PHB *in vivo*. Essa interação é fundamental para a estrutura e atividade catalítica dessas proteínas.

Os primeiros ensaios de atividade enzimática com i-PHB despolimerases, visando a identificação dos produtos de mobilização, assumiram *a priori*, que estes

poderiam ser os mesmos ou similares àqueles obtidos nos ensaios com e-PHB despolimerases, ou seja, monômeros ou oligômeros de 3-hidroxi-butirato (3-HB). De fato, os estudos iniciais identificaram 3-HB e seus oligômeros como produtos da mobilização de PHB pelas despolimerases intracelulares (HANDRICK; REINHARDT; JENDROSSEK, 2000; UCHINO; SAITO; JENDROSSEK, 2008; YORK *et al.*, 2003). Entretanto, isso gerou a teoria de que o ciclo do PHB apresentava características de um “ciclo fútil”, não apenas porque o produto da degradação era igual ao monômero incorporado na síntese, mas também devido a expressão constitutiva de genes codificantes de PHB despolimerases (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002).

Com o avanço das técnicas de sequenciamento e novos estudos sobre a mobilização de PHB, foi possível diferenciar as slc-PHB despolimerases e notar que os produtos da mobilização de PHB por essas proteínas não eram os mesmos. As scl-PHB despolimerases com tríade catalítica formada por Serina, Histidina e Aspartato com “lipase box” (SF1), ou seja, mais similares às e-PHB despolimerases, tinham como produtos de degradação 3-HB e oligômeros de 3-HB. No entanto, essas proteínas são estritamente reguladas e praticamente não apresentam fenótipo quando os genes são deletados, como é o caso das proteínas PhaZd, PhaZd1 e PhaZd2 de *C. necator* (ABE; KOBAYASHI; SAITO, 2005; SZNAJDER *et al.*, 2014). Os produtos dessas enzimas foram identificados devido à superexpressão gênica. Uma scl-PHB despolimerase com propriedades similares foi caracterizada em *Rhodospirillum rubrum*, mas, curiosamente, esta enzima fica localizada no espaço periplasmático (HANDRICK *et al.*, 2004).

As PHB despolimerases da superfamília SF2 catalisam reações tiolíticas de mobilização de PHB, e os produtos identificados foram (R)-3-hidroxi-butiril-CoA e crotonil-CoA. A principal enzima estudada foi PhaZa1 de *C. necator*. Com a descoberta de que as reações catalisadas por essas despolimerases eram diferentes das reações catalisadas pelas despolimerases SF1, principalmente em termos dos produtos formados, foram propostas alterações no ciclo do PHB, estabelecendo uma interface com o ciclo da β -oxidação de ácidos graxos (Figura 2).

De acordo com o modelo, a enzima PhaZa1 degrada o PHB em (R)-3-hidroxi-butiril-CoA. Entretanto, essa molécula não é liberada, sendo imediatamente convertida em crotonil-CoA. O crotonil-CoA liberado é o substrato da enzima multifuncional enoil-CoA hidratase (FadB, ECH), e como produto da reação é liberado (S)-3-hidroxi-butiril-CoA, em seguida, este é convertido em acetoacetil-CoA pela

enzima 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (FadB, HACD). Por último, o acetoacetyl-CoA é convertido em duas moléculas de acetil-CoA como resultado da reação da enzima 3-cetoacil-CoA tiolase (FadA) (EGGERS; STEINBÜCHEL, 2013).

As enzimas ECH, HACD e FadA são enzimas do ciclo da β -oxidação de ácidos graxos. Essa relação mostra que o ciclo do PHB e o ciclo da β -oxidação estão interligados, principalmente devido ao envolvimento das enzimas da β -oxidação no catabolismo do PHB. Essa rota também mostra que a molécula de NADPH consumida na síntese é regenerada, uma vez que a enzima HACD libera NADH na reação de oxidação de hidroxibutiril-CoA em acetoacetyl-CoA. Adicionalmente, as reações da degradação do PHB geram produtos que não são idênticos aos monômeros incorporados na síntese. Portanto, a formação de crotonil-CoA e (S)-3-hidroxibutiril-CoA impede sua reincorporação à síntese, descartando a hipótese de um “ciclo fútil” (EGGERS; STEINBÜCHEL, 2013).

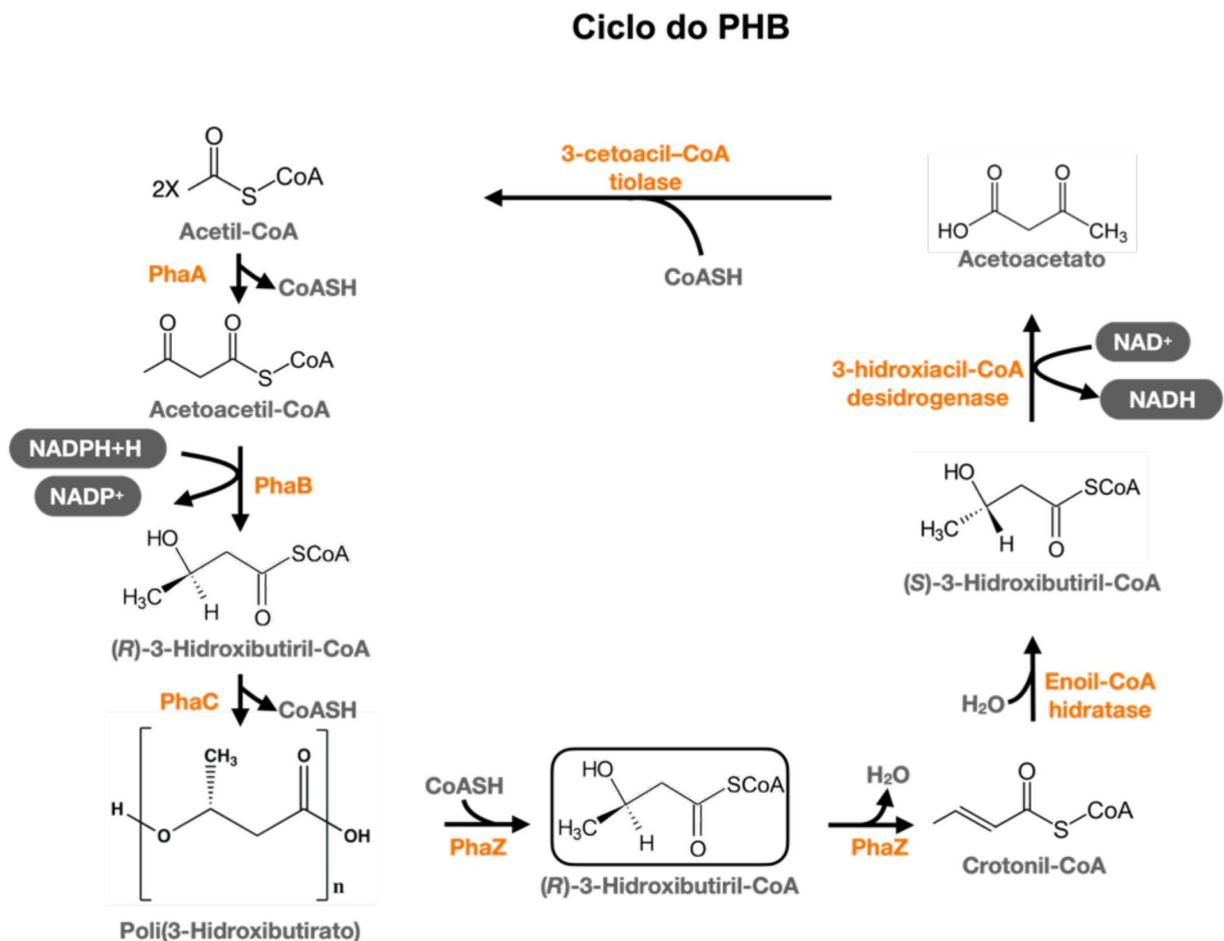


Figura 2. Via metabólica do PHB (Ciclo do PHB). De acordo com o modelo, duas moléculas de acetil-CoA são condensadas pela enzima PhaA em acetoacetyl-CoA. Em seguida, PhaB reduz o acetoacetyl-CoA em R-3-hidroxibutiril-CoA, consumindo NADPH. Na última etapa da síntese, PhaC catalisa a

síntese de PHB pela incorporação de monômeros de 3-hidroxi-butirato à cadeia do polímero. A degradação do PHB ocorre quando a enzima PhaZ cliva o PHB em (R)-3-hidroxi-butiril-CoA ((R)-3HB-CoA) por meio de uma reação tiolítica. Essa reação não libera o monômero de (R)-3HB-CoA, que permanece ligado à enzima como um intermediário da reação, culminando na formação de crotonil-CoA. Nas etapas seguintes, as reações são catalisadas por enzimas da β -oxidação. O crotonil-CoA é convertido em (S)-3-hidroxi-butiril-CoA ((S)-3HB-CoA) pela enzima multifuncional enoil-CoA hidratase. O (S)-3HB-CoA é oxidado pela enzima 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase, gerando NADH e acetoacetato. Por fim, o acetoacetato é convertido em duas moléculas de acetil-CoA em uma reação catalisada por FadA. O modelo foi proposto por Eggers *et al.*, 2013 e elaborado com base na identificação de crotonil-CoA e (S)-3-hidroxi-butiril-CoA em ensaios de mobilização de PHB por PhaZa1 de *C. necator*.

A formação dos produtos crotonil-CoA e (S)-3-hidroxi-butiril-CoA foram associados a mobilização do PHB em *C. necator*, como resultado direto da atividade catalítica de PhaZa1. Surpreendentemente, a formação desses produtos aumentou na presença de fasinias, principalmente PhaP1. Essa observação sugere uma complexidade adicional na degradação do PHB e demonstra que a interação com fasinias, embora não essencial para atividade das PHB despolimerases, é extremamente relevante (EGGERS; STEINBÜCHEL, 2013; UCHINO *et al.*, 2007).

Ao analisarmos os estudos sobre os produtos da mobilização de PHB no organismo modelo *Cupriavidus necator*, observamos que diferentes pesquisas sugeriram produtos e mecanismos catalíticos distintos para a mesma PHB despolimerase (GEBAUER; JENDROSSEK, 2006; UCHINO *et al.*, 2007). Essa discrepância ocorreu porque os primeiros artigos publicados empregavam a expressão e purificação da proteína em sistema heterólogo, independente dos grânulos de PHB (KOBAYASHI *et al.*, 2003).

Posteriormente, os métodos aplicados aos ensaios enzimáticos com PHB despolimerases foram modificados, principalmente porque notou-se a sensibilidade dos grânulos de PHB a estresses físicos e químicos. Em geral esses tipos de estresses causam a desnaturação da camada proteica que recobre os grânulos, tornando-os cristalinos. As PHB despolimerases intracelulares são sensíveis ao estado físico do grânulo e ineficazes em degradar PHB cristalino.

Assim, os ensaios enzimáticos posteriores simularam as condições naturais de mobilização de PHB, com a expressão das despolimerases em conjunto com a biogênese dos grânulos, além de métodos mais eficazes em purificar os grânulos de PHB nativos (GEBAUER; JENDROSSEK, 2006). Conseqüentemente, foi possível diferenciar os produtos associados às duas superfamílias de PHB despolimerases intracelulares que degradam PHB nativo.

A caracterização dos produtos resultantes da mobilização do polímero armazenado tem demonstrado que as PHB despolimerases podem catalisar reações que levam a diferentes produtos; Além daqueles associados à via metabólica clássica e à via complementar de *C. necator*, foi identificado que as PhaZs de *Methylobacterium extorquens*, uma bactéria promotora de crescimento vegetal em Pinus (*Pinus sylvestris*), degradam o PHB em oligômeros de 3-hidroxiacetato e oligômeros com radicais metil esterificados (ME-3HB) (KOSKIMÄKI *et al.*, 2016).

Em síntese, o estudo das PHB despolimerases tem revelado a complexidade e a diversidade dos mecanismos de mobilização do PHB. As pesquisas sobre as PHB despolimerases, desde a identificação dos seus produtos de degradação até a compreensão da sua interação com outros componentes celulares, como as fasinas, têm sido fundamentais para elucidar a regulação e a dinâmica do metabolismo do PHB. A descoberta da interação entre o metabolismo de PHB e a β -oxidação em *C. necator* e a identificação de produtos como oligômeros de 3-hidroxiacetato e oligômeros com radicais metil esterificados em *Methylobacterium extorquens*, demonstram a versatilidade dessas enzimas e a sua importância para a adaptação e sobrevivência de microrganismos em diferentes ambientes.

1.4 REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE PHB: PAPEL DO (p)ppGpp E DO SISTEMA DE FOSFOTRANSFERASES DO METABOLISMO DE NITROGÊNIO (PTS^{Ntr})

A regulação da síntese e degradação de polihidroxiacetato em bactérias tem sido amplamente investigada. Em *C. necator*, o mecanismo descrito, destaca a interação entre a resposta estrigente, mediada pela molécula sinalizadora de resposta estrigente, guanosina tetrafosfato (p)ppGpp e a modulação pós-traducional das enzimas envolvidas na síntese e degradação desse polímero. Principalmente através da fosforilação de enzimas-chave, como a PhaC1 e a PhaZa1 pela atuação do sistema de fosfotransferases do metabolismo de nitrogênio - PTS^{Ntr} (JUENGERT *et al.*, 2017; KARSTENS *et al.*, 2014).

Um estudo publicado por Brigham e cols. (2012), com *C. necator*, relacionou os níveis de (p)ppGpp ao aumento no acúmulo de PHB, evidenciando uma conexão entre a resposta estrigente e o acúmulo desse polímero. Os autores demonstram que a limitação da fonte de nitrogênio desencadeia uma remodelação nos níveis de

expressão gênica, com padrões globais de expressão de alguns genes semelhantes aqueles observados em outras espécies de bactérias sob condições de estresse. Ao induzir quimicamente a resposta ao estresse com a adição de Norvalina, houve um aumento na concentração de PHB na estirpe cultivada com essa substância, em comparação à estirpe selvagem, mesmo em altas concentrações de íons NH_4^+ (BRIGHAM *et al.*, 2012).

De forma complementar, Juengert e cols. (2017) corroboram a importância que a resposta estrigente e o (p)ppGpp exercem sob o metabolismo de PHB. Além disso, demonstraram que, em *C. necator* a ausência de (p)ppGpp faz com que o PHB sintetizado seja rapidamente degradado pela enzima PHB despolimerase PhaZa1 após a fase estacionária de crescimento. Em contraste, altas concentrações desse nucleotídeo levam ao aumento da concentração do polímero acumulado (JUENGERT *et al.*, 2017).

Em um estudo subsequente, Juengert e cols. (2018) mostraram que a regulação da síntese e da degradação de PHB em *C. necator* é controlada por mecanismos pós-traducionais que envolvem a fosforilação das enzimas PhaC1 e PhaZa1 (JUENGERT *et al.*, 2018). Esse mecanismo envolve a fosforilação de resíduos de aminoácidos, modulando a atividade enzimática. Na enzima PhaC1 os resíduos de Treonina (T11, T30, T94, T109, T191, T198, T373) e Serina (S10, S16, S149, S178, S196) encontram-se fosforilados na fase estacionária de crescimento, indicando um estado multifosforilado dessa enzima. Adicionalmente, o resíduo T373 é um dos mais relevantes para a polimerização dos monômeros do PHB, uma vez que sua mutagênese provoca uma diminuição da atividade de PhaC1 *in vitro* (JUENGERT *et al.*, 2018). Por outro lado, os sítios alvos de fosforilação mais relevantes em PhaZa1 são T26, T28 e S35, sendo que a mutagênese dos resíduos T26 e S35 reduz significativamente a mobilização de PHB em *C. necator* pelas variantes mutadas de PhaZa1.

Em *C. necator*, a resposta estrigente depende do sistema de fosfotransferases do metabolismo de nitrogênio (PTS^{Ntr}), cujos genes têm sua expressão regulada pelo fator σ^{54} . Esse sistema é composto por três enzimas, Enzima I (EI^{Ntr}), Proteína histidina (NPr) e Enzima II (EIIA^{Ntr}), que formam uma cadeia de fosforilação que funcionam em sequência. EI^{Ntr} fosforila NPr, que por sua vez fosforila EIIA^{Ntr} (KADDOR & STEINBÜCHEL, 2011; KARSTENS *et al.*, 2014).

A enzima EIIA^{Ntr} não fosforilada forma um complexo com a enzima (p)ppGpp sintase/hidrolase (SpoT1), essa interação resulta na hidrólise de (p)ppGpp, o que altera os níveis intracelulares desse nucleotídeo e conseqüentemente afeta os padrões de expressão gênica (KARSTENS *et al.*, 2014). Assim como em outras espécies de bactérias, *C. necator* possui um segundo gene com função apenas de síntese de (p)ppGpp - SpoT2, ortólogo de RelA de *E. coli*.

A deleção de EIIA^{Ntr} resulta em maiores concentrações de PHB acumulado. De acordo com o modelo proposto, esse acúmulo ocorre devido ao aumento nas concentrações de (p)ppGpp, que não é degradado devido à ausência do complexo EIIA^{Ntr}-SpoT1 (KARSTENS *et al.*, 2014). Embora um mutante simples $\Delta spoT1$ não seja viável, o duplo mutante $\Delta spoT1\Delta spoT2$ é viável, e a análise do PHB acumulado nesse mutante é significativamente inferior ao observado na estirpe selvagem. Como esse mutante não produz (p)ppGpp; uma das conseqüências é o aumento da degradação de PHB por PhaZa1, resultando em concentrações de PHB inferiores ao observado na estirpe selvagem de *C. necator* (JUENGERT *et al.*, 2017).

1.5 IMPORTÂNCIA DA SÍNTESE, ARMAZENAMENTO E MOBILIZAÇÃO DOS PHAS NA RESPOSTA BACTERIANA AO ESTRESSE

Por ser uma fonte de carbono e energia, o PHB tem função similar a outros polímeros, como glicogênio e lipídeos. Essa similaridade foi confirmada em estudos com bactérias cultivadas com PHB intracelular como única fonte de carbono (STOKES; PARSON, 1968). As estirpes que acumulam PHB geralmente demonstram maior viabilidade celular ao longo do tempo em comparação com mutantes da mesma espécie deficientes na síntese ou na mobilização do polímero (LOPEZ *et al.*, 1995). Em *Sinorhizobium meliloti*, a capacidade de mobilizar o PHB acumulado confere vantagens adaptativas significativas, promovendo o crescimento celular com aumento de até três vezes no tamanho populacional. Além disso, a sobrevivência celular é prolongada em estirpes com maiores reservas de PHB intracelular (RATCLIFF; KADAM; DENISON, 2008).

As capacidades adaptativas conferidas pelo PHB parecem está relacionadas com a capacidade de mobilizar esse recurso armazenado. A deleção de genes de PHB despolimerases em geral causa como fenótipo um maior acúmulo de PHB, isso ocorre devido a incapacidade em mobilizar o polímero. Esse fenótipo foi demonstrado

em diferentes espécies bacterianas como *Sinorhizobium meliloti*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus thuringiensis* e *Cupriavidus necator* (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003; TRAINER *et al.*, 2010). A deficiência em mobilizar o PHB causa fenótipos deletérios em mutantes *phaZ*. Tais como, menor viabilidade celular quando cultivados em meio sem carbono, menor sobrevivência quando submetidos a diferentes tipos de estresse, entre os quais, calor extremo, radiação ultravioleta e choque osmótico (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003; OBRUCA *et al.*, 2020).

Em um dos estudos publicados sobre o tema, a viabilidade celular de um mutante *phaZ* de *Sinorhizobium meliloti* foi investigada. Observou-se que o mesmo apresentou menor sobrevivência em meio de cultivo sem carbono, comparável a um mutante *phaC*, mas inferior a estirpe selvagem (TRAINER *et al.* 2010). Isso sugere que o PHB mobilizado pela estirpe selvagem contribuiu para a sua maior sobrevivência, embora os autores não tenham quantificado o polímero ao final do experimento.

Diversas evidências indicam que o 3-Hidroxi-butirato (3-HB), produto da degradação do polihidroxi-butirato, desempenha um papel crucial na sobrevivência bacteriana sob condições adversas. Em *C. necator*, os monômeros de 3-HB são um importante crioprotetor, propiciando a sobrevivência bacteriana em condições de frio extremo (OBRUCA *et al.*, 2016).

Além da proteção contra o frio, a capacidade de mobilizar PHB também auxilia na sobrevivência bacteriana diante de choque térmico. Em *H. seropedicae*, mutantes com diferentes deleções de genes do metabolismo de PHB foram analisados quanto à sobrevivência ao choque térmico. Os mutantes incapazes de sintetizar PHB ($\Delta phaC1$) ou de armazená-lo ($\Delta phaP1\Delta phaP2$) mostraram-se mais suscetíveis ao choque térmico em comparação com a estirpe selvagem (SmR1). Curiosamente, um mutante que acumula PHB, mas não consegue degradá-lo ($\Delta phaZ1\Delta phaZ2$), também foi mais suscetível ao choque térmico do que SmR1. Essa observação evidencia a importância das PHB despolimerases para a sobrevivência de *H. seropedicae* em condições de calor extremo (ALVES *et al.*, 2020).

A análise do PHB armazenado após o choque térmico reforça essa conclusão. A estirpe selvagem exibiu uma redução de 30% no PHB armazenado após o choque térmico, enquanto o mutante $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ não apresentou alteração nos níveis de PHB armazenado. Além disso, foi demonstrado a formação de 3-HB na estirpe SmR1, após o choque térmico, resultante da mobilização do PHB.

A função termoprotetiva do 3-hidroxi-butirato foi confirmada pela adição exógena desses monômeros, que melhorou a sobrevivência dos mutantes deficientes em sintetizar ou mobilizar o PHB; também reduziu a agregação de proteínas induzida pelo choque térmico (ALVES *et al.*, 2020).

A degradação de polihidroxicanoatos e a concomitante geração de seus monômeros parecem auxiliar o metabolismo celular, particularmente a síntese de (g)ppGpp. Em *Pseudomonas oleovorans*, a análise de sobrevivência da estirpe selvagem em comparação a um mutante $\Delta phaZ$ sob estresse induzido por etanol e choque térmico, demonstrou que a estirpe selvagem apresentou maior sobrevivência. Ao investigar a relação entre a degradação de PHA e o acúmulo de nucleotídeos, incluindo o (p)ppGpp, os autores determinaram que a degradação de PHA estava associada ao aumento nos níveis de ATP e (p)ppGpp, sugerindo que o PHA pode ser utilizado para a síntese de nucleotídeos em condições de estresse. Este estudo destaca a importância do PHA na sobrevivência e resistência bacteriana em ambientes naturais, sugerindo um mecanismo adicional pelo qual os PHAs conferem essa vantagem (RUIZ *et al.*, 2001).

Recentemente, duas espécies bacterianas produtoras de PHAs, comuns em habitats árticos, *Acidovorax* sp. A1169 e *Collimonas* sp. A219, foram analisadas quanto ao papel dos polihidroxicanoatos (PHAs) na adaptação dessas bactérias psicrófilas a condições de estresse. Utilizando mutantes $\Delta phaC$ (incapazes de sintetizar PHAs) e $\Delta phaZ$ (incapazes de degradar PHAs), os autores avaliaram a resistência das estirpes a diferentes agentes estressores, como ciclos de congelamento-descongelamento, radiação UV, choque térmico, estresse oxidativo, estresse osmótico e acidez. As estirpes selvagens, com metabolismo de PHA funcional, apresentaram maior sobrevivência aos ciclos de congelamento-descongelamento, característico dos habitats polares. Surpreendentemente, as estirpes $\Delta phaC$ mostraram maior sobrevivência aos demais agentes estressores, sugerindo que o desequilíbrio causado pela falta de PHAs pode ter induzido uma resposta ao estresse permanente em toda a célula, fazendo com que resistissem mais à outros agentes estressores. Os mutantes $\Delta phaZ$ apresentaram maior sobrevivência à radiação UV, indicando que a presença de grânulos de PHA nas células bacterianas, mesmo biologicamente inacessíveis, confere algum benefício. De forma geral isso sugere que a capacidade de mobilizar PHA, embora importante, os grânulos em si também contribuem para a sobrevivência dessas bactérias (GRZESIAK *et al.*, 2024).

A capacidade de acumular e mobilizar PHB, particularmente por meio da atividade de PHB despolimerases, demonstra o papel essencial dessas proteínas na adaptação e sobrevivência bacteriana a diversas condições de estresse. A importância do PHB e seus metabólitos, como o 3-hidroxi-butirato, ultrapassa a mera função de reserva de carbono, conferindo proteção contra frio, calor, radiação e outros desafios ambientais. Isso ressalta a necessidade de pesquisas adicionais para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes ao PHB e as PHB despolimerases.

1.6 METABOLISMO DE PHB EM *H. seropedicae*

Algumas bactérias produtoras de PHB apresentam características relevantes em outras áreas. Um exemplo são as bactérias fixadoras de nitrogênio, que possuem interesse econômico devido à interação com plantas de relevância agrícola. Entre as espécies estudadas está *Herbaspirillum seropedicae*, uma bactéria gram-negativa classificada na classe β -proteobactérias. Essa espécie estabelece associação endofítica com gramíneas, promovendo o crescimento vegetal (BALSANELLI *et al.*, 2016; PANKIEVICZ *et al.*, 2016; PEDROSA *et al.*, 2011; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003). Essa bactéria tem entre 0,6 a 0,7 μm , sua morfologia é vibrióide com formato de bastonete (BALDANI *et al.*, 1986). O genoma de *H. seropedicae* SmR1 foi sequenciado, anotado e está disponível no banco de dados NCBI, com registro no GenBank: CP002039 (PEDROSA *et al.*, 2011).

O genoma de *H. seropedicae* possui 13 genes relacionados ao metabolismo de PHB. Dentre os genes da via biossintética, foram identificados dois que codificam β -cetoacil-CoA tiolase (*phaA1* e *phaA2*), dois que codificam acetoacetyl-CoA redutase (*phaB1* e *phaB2*) e três genes que codificam PHB sintases (*phaC1*, *phaC2* e *phaC3*). Entre os genes associados à mobilização de PHB, foram identificados duas PHB despolimerases, *phaZ1* e *phaZ2*. Além dos genes diretamente relacionados com o ciclo do PHB, o genoma de *Herbaspirillum* possui genes relacionados à manutenção e estabilidade dos grânulos dentro da célula, como os dois genes que codificam fasinias (*phaP1* e *phaP2*) e um gene com função regulatória, *phbF* (também designado por *phaR*). A identificação desses genes foi possível após o sequenciamento do genoma de *H. seropedicae* SmR1 (PEDROSA *et al.*, 2011). Informações adicionais sobre os genes do metabolismo de PHB estão descritas na Tabela 1. Vários estudos posteriores caracterizaram a função desses genes no metabolismo de PHB.

TABELA 1 – GENES DO METABOLISMO DE PHB EM *H. seropedicae*

Gene	Nome	Locus Tag ²	Tamanho (bp)	Referências
<i>phaA1</i>	β-cetoacil-CoA tiolase 1	HSERO_RS01265	1197	-
<i>phaA2</i>	β-cetoacil-CoA tiolase 2	HSERO_RS01180	1176	-
<i>phaB1</i>	Acetoacetil-CoA redutase 1	HSERO_RS15035	741	-
<i>phaB2</i>	Acetoacetil-CoA redutase 2	HSERO_RS16605	762	-
<i>phaC1</i>	PHB sintase 1	HSERO_RS15040	1767	TIRAPELLE <i>et al.</i> , 2013
<i>phaC2</i>	PHB sintase 2	HSERO_RS12020	1773	-
<i>phaC3</i>	PHB sintase 3	HSERO_RS01310	1131	-
<i>phaP1</i>	fasina 1	HSERO_RS08150	564	ALVES <i>et al.</i> , 2016
<i>phaP2</i>	fasina 2	HSERO_RS23810	570	ALVES <i>et al.</i> , 2016
<i>phaR</i>	repressor transcricional	HSERO_RS15030	567	KADOWAKI <i>et al.</i> , 2011
<i>phaZ1</i>	PHB despolimerase 1	HSERO_RS08080	1236	ALVES <i>et al.</i> , 2020
<i>phaZ2</i>	PHB despolimerase 2	HSERO_RS03195	1227	ALVES <i>et al.</i> , 2020

O primeiro estudo sobre o metabolismo de PHB em *Herbaspirillum seropedicae* foi realizado com as estirpes Z67, Z69 e Z78 (CATALAN *et al.*, 2007). Todas as estirpes produziram PHB quando cultivadas em meio mínimo com glucose. A análise da concentração do polímero armazenado mostrou que a estirpe Z69 acumulou 36% do peso seco em polihidroxibutirato, quando cultivada em glucose. Por outro lado, quando foi usado ácido nonanóico como fonte de carbono, as estirpes sintetizaram o copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato). Adicionalmente, a atividade das enzimas PhaA e PhaB foi confirmada em extratos celulares (CATALAN *et al.*, 2007).

As maiores concentrações de PHB foram quantificadas em *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 ou em mutantes derivados dessa estirpe. Ao avaliar o impacto de diferentes fontes de carbono na produção de PHB, Sacomboio *et al.*, (2017) demonstraram que a concentração máxima em SmR1 foi de aproximadamente 40%, mas apenas quando cultivada em xilose com alta relação carbono/nitrogênio (30mM de xilose, 5 mM de NH₄Cl). Por outro lado, não houve diferença na concentração de PHB em SmR1 cultivada em glucose ou frutose, com máximo de 30% do peso seco, valor semelhante ao da estirpe Z69 (CATALAN *et al.*, 2007). No mesmo estudo, os autores avaliaram o potencial de acúmulo de PHB em um mutante *ΔntrC*. Curiosamente, observaram concentrações de PHB maiores nesse mutante do que na

² Locus Tag (etiqueta de locus) é um identificador único atribuído a um gene dentro de um genoma. Ele serve como um rótulo consistente para esse gene específico, independentemente da espécie ou banco de dados. Isso permite uma fácil localização e referenciamento.

estirpe selvagem, com as mesmas fontes de carbono, atingindo valores entre 50% e 60% do peso seco.

A síntese de PHB em *H. seropedicae* ocorre através de PhaC1, pois as demais sintases não participam da síntese do polímero nas condições de crescimento avaliadas até o momento. A deleção do gene *phaC1* resultou em perda de produção de PHB (TIRAPELLE *et al.*, 2013). Estudos subsequentes mostraram que o mutante $\Delta phaC1$ apresenta alterações fisiológicas que podem afetar a aptidão dessa estirpe, como maiores níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), redução na expressão das proteínas FnR e desequilíbrio do balanço redox. As proteínas FnR são fatores transcricionais com uma importância fundamental no metabolismo energético, principalmente porque a redução de expressão dos genes que codificam proteínas FnR tem um efeito negativo em cascata, com impacto negativo na expressão de citocromos C, proteínas da cadeia transportadora de elétrons. Em última instância, isso limita a síntese de ATP. O crescimento de $\Delta phaC1$ também é limitado em condições de baixa oxigenação, como demonstrado por Batista *et al.*, (2018). A análise das concentrações de ATP revelou uma redução de 2,3 vezes em relação à estirpe selvagem. As alterações no balanço redox mostraram uma relação duas vezes maior de NADPH/NADP⁺ e três vezes maior de NADH/NAD⁺, sugerindo que o PHB pode desempenhar um papel importante na manutenção do equilíbrio redox celular, consumindo o excedente de NADPH e NADH (BATISTA *et al.*, 2018).

As fasinas são proteínas que recobrem os grânulos de PHB dentro da célula. No genoma de *H. seropedicae* há dois genes que codificam fasinas (*phaP1* e *phaP2*). A análise da composição proteica dos grânulos revelou que a maioria consiste na fasina PhaP1 (TIRAPELLE *et al.*, 2013). Embora PhaP2 também seja encontrada associada aos grânulos de PHB, seus níveis são muito baixos. No entanto, quando o gene *phaP1* é deletado, PhaP2 é expresso sendo capaz de substituir PhaP1, permitindo que a bactéria mantenha a capacidade de acumular grânulos de PHB (ALVES *et al.*, 2016). A capacidade de PhaP2 de manter a produção de PHB é inferior à de PhaP1, uma vez que há uma redução de aproximadamente 50% no acúmulo do polímero. Isso demonstra que PhaP2 pode ter um papel secundário no metabolismo de PHB em *Herbaspirillum*, sob cultivo em altas concentrações de NH₄Cl. Por outro lado, a expressão de *phaP2* é fortemente induzido em condições de limitação de amônio (BONATO *et al.*, 2024). O papel desempenhado pelas duas fasinas na manutenção dos grânulos em cultivo com limitação de nitrogênio ainda não está

esclarecido, mas sabe-se que elas são fundamentais para o acúmulo de PHB, como evidenciado pelo fato de o duplo mutante $\Delta phaP1\Delta phaP2$ não produzir o polímero (ALVES *et al.*, 2016).

A expressão dos genes *phaP1*, *phaP2* e *phaR* é regulada pela proteína repressora PhaR. Essa proteína se liga a sequências consenso, ricas em nucleotídeos TGC, localizadas na região promotora desses e de outros genes do metabolismo de PHB. O consenso determinado é formado pelas bases TG[N]TGC[N]3GCAA, onde N refere-se a qualquer um dos quatro nucleotídeos (KADOWAKI *et al.*, 2011). Além da afinidade por essas sequências, PhaR também é encontrada associada aos grânulos de PHB (TIRAPELLE *et al.*, 2013). Isso sugere que PhaR de *Herbaspirillum* possui um mecanismo de ação semelhante ao de proteínas homólogas de outros organismos, como *Paracoccus denitrificans*, onde o modelo de regulação foi proposto (MAEHARA *et al.*, 2002). De acordo com o modelo, quando o PHB é sintetizado, PhaR se liga a oligômeros e moléculas de PHB, desligando-se do DNA e passando a interagir com o PHB, permitindo a desrepressão dos genes previamente reprimidos. Adicionalmente, PhaR também reprime a expressão do gene *phaZ1*, mas isso ocorre mais fortemente na ausência de PHB, especificamente no mutante $\Delta phaC1$ (MOTA, 2020).

O sistema PTS^{Ntr} influencia o metabolismo de PHB em *Herbaspirillum seropedicae*. Nessa bactéria, foram identificados os genes Hsero_0090, que codifica a proteína EI^{Ntr} ; Hsero_0089, codificante de NPr ; Hsero_3911, que codifica $EIIA^{Ntr}$; e Hsero_3912, responsável pela codificação de $HprK$. A análise da concentração de PHB em mutantes nos genes codificantes de EI^{Ntr} e NPr , responsáveis pela cascata de fosforilação que leva a fosforilação de $EIIA^{Ntr}$, mostrou que esses mutantes praticamente não acumulam o polímero, com concentrações de 2 e 3% do peso seco, respectivamente. Em contraste, na estirpe SmR1, a concentração foi de 10% do peso seco nas mesmas condições de cultivo (BOM, 2018; dados não publicados). Isso sugere um sistema de regulação similar ao observado em *C. necator*. Onde a não fosforilação de $EIIA^{Ntr}$ resulta em menor acúmulo de PHB, devido ao complexo estável formado por $EIIA^{Ntr}$ com $SpoT1$. Essa interação faz com que $SpoT1$ esteja permanentemente ativa, degradingando o $ppGpp$ sintetizado, uma molécula chave da resposta estrigente e do acúmulo de PHB.

Essa hipótese de regulação do metabolismo de PHB, similar ao de *C. necator* em *H. seropedicae*, exige a premissa de que a enzima $SpoT$ de *H. seropedicae* tenha a mesma função. Curiosamente, no genoma desta bactéria foram anotados os genes

Hsero_1973 (*relA*) e Hsero_2128 (*spoT*). Adicionalmente, a região promotora de *spoT* possui uma sequência promotora conservada, com sítios de ligação ao fator σ^{54} (**atggaactgaaactgct**) e ao ativador transcricional NtrC (**atcacgccgatgggtgcc**) (BONATO *et al.*, 2024). Os nucleotídeos destacados em negrito apresentam similaridade com a sequência consenso proposta por Bonato e cols. (2024).

Embora não tenha sido quantificado os níveis de (p)ppGpp em *H. seropedicae*, os dados obtidos por Bom (2018) mostram menores concentrações de PHB nos mutantes EI^{Ntr} e NPr ($\Delta ptsI$ e Δnpr , respectivamente). Isso indica que a menor concentração de PHB nestes mutantes se deve a alta atividade de degradação do polímero pela PHB despolimerase 1.

A análise de expressão de *phaZ1* utilizando a fusão transcricional *phaZ1::lacZ* mostrou que a expressão desse gene no mutante $\Delta ptsI$ é significativamente superior ao observado na estirpe SmR1. Além disso, uma abordagem proteômica comparou as proteínas expressas em condições de alta (+N) e baixa (-N) concentração de íons amônio no mutante $\Delta ptsI$ em relação a estirpe SmR1. A análise indicou que proteína PhaZ1 encontra-se diferencialmente expressa na condição -N (BOM, 2018).

Em *H. seropedicae* há dois genes codificantes de PHB despolimerases: *phaZ1* (Locus-tag: HSERO_RS08080) e *phaZ2* (Locus tag: HSERO_RS03195). As análises de comparação de sequências indicam que as PHB despolimerases de *H. seropedicae* atuam mobilizando o grânulo nativo, armazenado dentro da célula, sendo, portanto, PHB despolimerases intracelulares. Ambas as proteínas apresentam similaridade com despolimerases de outros organismos, principalmente aquelas encontradas na bactéria *C. necator* (MOTA, 2020).

O gene *phaZ1* codifica uma proteína com massa molecular de 46,6 kDa, a qual se encontra aderida a superfície dos grânulos de PHB *in vivo* (TIRAPELLE *et al.*, 2013). A deleção desse gene resultou em um mutante com maior acúmulo de PHB, conforme ensaios de quantificação por técnicas de fluorescência (MOTA, 2020; dados não publicados). Além disso, a mobilização do polímero foi lenta, indicando que a maior parte do PHB produzido permaneceu estocado na célula. Isso indica que PhaZ1 pode ser mais relevante na degradação do PHB que PhaZ2.

A importância da mobilização do PHB armazenado foi evidenciada em um estudo sobre o papel desse polímero na sobrevivência de *H. seropedicae* em resposta ao estresse térmico. A estirpe $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ não mobilizou o PHB em resposta ao

choque térmico. Nesse mutante, a incapacidade em degradar o PHB resultou em maior suscetibilidade ao calor, com sobrevivência inferior em comparação com a estirpe selvagem (SmR1), que possui ambas as despolimerases funcionais e mobilizou 75% do PHB armazenado, conforme quantificação realizada antes e depois do estresse térmico. Curiosamente, a sobrevivência do mutante $\Delta phaZ2$ foi similar à SmR1, enquanto a do mutante $\Delta phaZ1$ foi similar ao duplo mutante. Isso destaca o papel essencial de PhaZ1 na mobilização de PHB, com maior tolerância dessa bactéria a condições de estresse, como o choque térmico (ALVES *et al.*, 2020).

Além da importância na resposta bacteriana ao choque térmico, a mobilização de PHB pelas PHB despolimerases também apresenta relevância na promoção do crescimento vegetal por *H. seropedicae*. Conforme demonstrado por ALVES *et al.*, (2019), o número de raízes laterais e área total da raiz é inferior em *Setaria viridis* colonizada pelo mutante $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ em comparação com a estirpe SmR1, apesar de colonizar as raízes de forma semelhante à estirpe selvagem. Surpreendentemente, outro estudo detectou uma aptidão diferenciada de um mutante $\Delta phaZ1$ em relação ao processo de colonização em *S. viridis*. A deleção de *phaZ1* resultou em um aumento da colonização radicular quando as bactérias foram inoculadas individualmente ($\Delta phaZ1$) ou em competição com a estirpe selvagem ($\Delta phaZ1$ Vs. SmR1). A razão pela qual esse mutante possui uma capacidade de colonização radicular diferenciada ainda não está clara (DO AMARAL *et al.*, 2020).

O gene *phaZ2* de *H. seropedicae* codifica uma proteína de 45,5 kDa que apresenta 46,6% de identidade com PhaZ1. Embora o papel de PhaZ2 no metabolismo de PHB ainda não esteja totalmente elucidado, estudos de expressão gênica durante a interação planta-bactéria sugerem sua potencial função. De acordo com estes estudos a expressão de *phaZ2* ocorre nos estágios iniciais da colonização vegetal, tanto em milho quanto em trigo. Em milho, a expressão aumenta significativamente quando a bactéria está em ambiente epifítico³ ou planctônico⁴, em comparação com a bactéria em meio com alta concentração de nitrogênio - NFbHPN (BALSANELLI *et al.*, 2016). Na interação de *H. seropedicae* com trigo foi mostrado que há expressão de *phaZ2* nas bactérias em ambiente planctônico. Isso reforça os resultados de expressão obtidos com milho (PANKIEVICZ *et al.*, 2016).

³ Epifítico: Refere-se às bactérias que estão aderidas à superfície das raízes.

⁴ Planctônico: Refere-se às bactérias de vida livre que estão suspensas no meio líquido do sistema hidropônico, ou seja, não estão associadas às raízes da planta.

Desse modo, é provável que PhaZ2 esteja envolvida com a mobilização inicial de PHB durante o estabelecimento bacteriano na rizosfera. Essa fonte de energia pode ser importante para a manutenção do metabolismo celular até que as bactérias possam utilizar as fontes de carbono exudadas pela planta, conforme sugerido por Balsanelli *et al.*, (2016).

Recentemente, demonstrou-se que a expressão de *phaZ2* é dependente de NtrC, um ativador transcricional que ativa a transcrição de genes necessários para a adaptação metabólica a baixos níveis de nitrogênio (BONATO *et al.*, 2024). Essa descoberta corrobora as análises de expressão observadas durante a interação planta-bactéria, já que os meios de cultivo utilizados nesses experimentos geralmente são deficientes em fontes de nitrogênio. Essa deficiência induz a expressão de genes dependentes do fator σ^{54} , incluindo aqueles ativados por NtrC.

O metabolismo de PHB em *H. seropedicae* é um sistema complexo e finamente regulado, crucial para a sobrevivência e adaptação da bactéria. A bactéria possui um conjunto completo de genes para a síntese, armazenamento e mobilização de PHB, com as proteínas PhaC1, PhaP, PhaR e PhaZ1 desempenhando papéis principais nesses processos. Além disso, a capacidade de *H. seropedicae* utilizar o PHB como fonte de carbono e energia sob estresse, como choque térmico, destaca a importância do polímero para a sobrevivência bacteriana. As PHB despolimerases, PhaZ1 e PhaZ2, também desempenham papéis distintos na mobilização do PHB, com PhaZ1 sendo essencial para a sobrevivência sob estresse térmico e PhaZ2 potencialmente envolvida na colonização vegetal. Adicionalmente, a regulação da expressão de *phaZ2* por NtrC sugere uma ligação entre o metabolismo de nitrogênio e a mobilização do PHB. Em última instância, a compreensão do metabolismo do PHB em *H. seropedicae* pode ter implicações significativas para a agricultura, incluindo o desenvolvimento de estratégias para melhorar a promoção do crescimento vegetal e a tolerância ao estresse em culturas agrícolas.

2 JUSTIFICATIVA

O polihidroxibutirato é um composto sintetizado por *Herbaspirillum seropedicae* e está relacionado ao armazenamento de carbono e potencial redox. Essa reserva de carbono e energia pode estar envolvida com processos de resistência a diferentes tipos de estresse. Além de uma provável relação com a adaptação celular à colonização, em mecanismos que levam à interação planta-bactéria. No entanto, o

PHB isoladamente não é suficiente para explicar esses fatores e diferentes aspectos do metabolismo deste polímero estão sendo investigados, entre eles está a mobilização do polímero, foco deste projeto. PhaZ1 e PhaZ2 são as duas PHB despolimerases sintetizadas em *H. seropedicae*. Existem indicações que PhaZ1 é a responsável principal pela degradação de PHB. Entretanto, PhaZ2 também mobiliza o polímero, porém em condições celulares diferentes. Outro aspecto é que a expressão do gene *phaZ2* apresenta uma regulação diferente de *phaZ1*, sendo a expressão do gene *phaZ1* constitutiva em altos níveis de íons amônio, enquanto a expressão de *phaZ2* está sujeito a ativação transcricional envolvendo o sistema de regulação geral do metabolismo de nitrogênio, sistema Ntr, especificamente o ativador transcricional NtrC e o fator σ^{54} (RpoN) em condições limitantes de íons amônio.

Estes diferentes mecanismos de regulação da expressão dos genes *phaZ1* e *phaZ2* possivelmente sugerem funções e mecanismos diferentes para as duas despolimerases. Considerando que a degradação de PHB pode gerar diferentes produtos com relevância para diversos processos celulares, esse estudo justifica-se pela necessidade de investigar a mobilização do polímero em diferentes condições de cultivo, utilizando análises de microscopia de fluorescência e crescimento sob condições de estresse nutricional.

3 OBJETIVOS

O polihidroxibutirato é um dos principais polímeros de PHAs, com aplicações biotecnológicas potencialmente relevantes em diversas áreas industriais. Entre as aplicações mais promissoras estão a produção de bioplásticos e materiais biomédicos. Adicionalmente o metabolismo de PHB tem se mostrado relevante para as funções fisiológicas de bactérias promotoras do crescimento vegetal. Essas descobertas são recentes e investigações adicionais são necessárias, principalmente o entendimento do papel do PHB para os processos de interação planta-bactéria. As PHB despolimerases estão entre as proteínas mais relevantes do metabolismo de PHB, isso porque elas degradam o grânulo armazenado, isso resulta no fluxo de energia que potencialmente supre as células em condições ambientais desfavoráveis. Portanto, compreender o papel das PHB despolimerases pode contribuir para compreensão do papel do PHB no metabolismo bacteriano.

Esse projeto tem como objetivo avaliar a função das PHB despolimerases na bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a mobilização de PHB nos mutantes $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC);
- Analisar os grânulos de PHB nas estirpes SmR1 e nos mutantes $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ através de microscopia de fluorescência;
- Analisar a expressão dos genes *phaZ1* e *phaZ2*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos realizados neste projeto utilizaram a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e mutantes nos genes codificantes de PHB despolimerases – *phaZ1* e *phaZ2*. Os mutantes $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ foram construídos por Alves *et al.*, (2019), e cedidos pelo Prof. Dr. Marcelo Muller-Santos, coorientador desse projeto.

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, e na Alemanha, no Departamento de Mikrobiologie/Organismische Interaktionen da Universität Tübingen sob a supervisão do Prof. Dr. Karl Forchhammer.

4.1 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas a 30 °C sob agitação orbital de 120 rpm em meio líquido NFbHPN (KLASSEN *et al.*, 1999). O meio NFbHPN contém malato (37 mmol/L) como fonte de carbono, cloreto de amônio (NH₄Cl) em concentração de 20 mmol/L como fonte de nitrogênio e solução de fosfatos (K₂HPO₄ (17,8 g/L) e KH₂PO₄ (159,5 g/L)). O meio NFbHPN sólido foi preparado após a adição de ágar (15 g/L).

As principais variações do meio de cultivo NFbHPN foram:

- NFbHPLN: Diminuição da concentração de NH₄Cl para 2mM;

- NFbGHPN5: Diminuição da concentração de NH₄Cl para 5 mM e adição de glucose 25 mM como segunda fonte de carbono. Esse meio foi utilizado para aumentar a produção de PHB, conforme demonstrado Alves *et al.*, (2020) e Sacomboio *et al.*, (2017).

As estirpes de *Escherichia coli* foram cultivadas em meio líquido LB a 37°C sob agitação orbital de 120 rpm, conforme protocolo descrito por SAMBROOK *et al.* (1989). Para cultivo em meio sólido, preparou-se o meio LA, adicionando-se 15 g/L de ágar ao meio LB. Para os ensaios de expressão gênica, as estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Mínimo M9. As células de *E. coli* foram estocadas a -20 °C em glicerol 50% para preservação.

4.2 ANTIBIÓTICOS

A bactéria *H. seropedicae* possui resistência a estreptomicina. Portanto, esse antibiótico foi utilizado para manutenção de estoques e cultivo em placa de petri em concentração de 80 µg/mL. As estirpes contendo as fusões *phaZ1::lacZ* e *phaZ2::lacZ* foram cultivadas na presença simultânea dos antibióticos tetraciclina e estreptomicina (10 µg/mL e 80 µg/mL, respectivamente).

4.3 ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS

As estirpes bacterianas usadas nesse projeto; assim como as características genéticas mais relevantes estão descritas na Tabela 2.

TABELA 2 – LISTA DE ESTIRPES BACTERIANAS

Estirpes	Características	Referências
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
SmR1	Estirpe parental, Sm ^R , Nif+	SOUZA <i>et al.</i> , 2000
Δ <i>phaC1</i>	Deleção cromossômica do gene <i>phaC1</i> , Sm ^R	TIRAPELLE <i>et al.</i> , 2013
Δ <i>phaZ1</i>	Deleção cromossômica do gene <i>phaZ1</i> , Sm ^R	ALVES <i>et al.</i> , 2019
Δ <i>phaZ2</i>	Deleção cromossômica do gene <i>phaZ2</i> , Sm ^R	ALVES <i>et al.</i> , 2019
Δ <i>phaZ1Δ<i>phaZ2</i></i>	Deleção cromossômica dos genes <i>phaZ1</i> e <i>phaZ2</i> , Sm ^R	ALVES <i>et al.</i> , 2019
Δ <i>phaR</i>	Deleção cromossômica do gene <i>phaR</i> , Sm ^R	ALVES <i>et al.</i> , 2019
Δ <i>phaC1Δ<i>phaR</i></i>	Deleção cromossômica dos genes <i>phaC1</i> e <i>phaR</i> , Sm ^R	MOTA, 2020
Δ <i>rpoN</i>	Deleção cromossômica do gene <i>rpoN</i> , Sm ^R	KIM, 2016, não publicado
Δ <i>ntrC</i>	Deleção cromossômica do gene <i>ntrC</i> , Sm ^R	MOTA, 2017
<i>Escherichia coli</i>		
ET8000	<i>rbs lacZ::IS1 gyr A hutC^c_K</i> (estirpe selvagem)	MACNEIL <i>et al.</i> , 1982
NT8000	<i>rbs lacZ::IS1 gyr A hutC^c_K ntrC10::Tn5</i>	REYES <i>et al.</i> , 2001
S17.1- λ pir	<i>RP4-2(Km::Tn7, Tc::Um-1), LAMpir, ΔrecA1, ΔthiE1</i>	SIMON <i>et al.</i> , 1983
NEB10 β	ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 <i>recA1 (Str^R) Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	NEW ENGLAND BIOLABS

Os plasmídeos utilizados neste projeto estão descritos na Tabela 3 e foram utilizados em ensaios de expressão gênica.

TABELA 3 – LISTA DE PLASMÍDEOS

Plasmídeos	Características	Referência
pPW452	Tc ^R , vetor com o gene <i>lacZ</i> sem promotor.	WOODLEY <i>et al.</i> , 1996
pMP220	Tc ^R , vetor com o gene <i>lacZ</i> sem promotor. (apresenta sítio de policlonagem em orientação inversa ao pPW452)	SPAINK <i>et al.</i> , 1987
pMPZ2N1	<i>phaZ1::lacZ</i>	MOTA, 2017
pMPZ2N2	<i>phaZ2::lacZ</i>	MOTA, 2020

4.4 CURVA DE CRESCIMENTO

As estirpes SmR1, $\Delta phaC1$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$, $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ foram cultivadas durante 16 horas, ao longo desse período a DO₆₀₀ de cada cultura foi monitorada em espectrofotômetro BECKMAN DU-7400. Para obtenção dos dados as leituras foram realizadas usando cubetas com volume de 1 mL de cultura, a partir do início da fase exponencial realizou-se a diluição do volume de cultivo usado na análise. Os valores de DO₆₀₀ foram corrigidos pelo fator de diluição.

O padrão de crescimento das estirpes foi avaliado com base na equação exponencial $N = N_0 \cdot e^{-Kt}$, essa equação foi linearizada após transformação logarítmica de ambos os lados da equação, obtendo-se: $\log(N) = \log(N_0) + Kt$.

A forma linear da equação é útil, uma vez que transforma uma curva exponencial em uma linha reta, facilitando a interpretação e o ajuste dos dados ao modelo linear. Desse modo, ao transformar os dados de DO₆₀₀ em $\log(\log_{10}(DO_{600}))$, e representar graficamente em função do tempo (t), os valores da fase exponencial de crescimento formarão uma linha reta com inclinação K e intercepto $\log(N_0)$. A inclinação K indica a taxa de crescimento (coeficiente angular), quanto maior K, mais rápido o crescimento.

Para o cálculo do tempo de duplicação, foi utilizado também a forma linear, mas com a seguinte modificação $\log(2) = \log(1) + Kt$, dado que o tempo de duplicação de uma estirpe bacteriana específica sob condições definidas é o tempo necessário para que o número de células duplique. Nesse caso, N é igual a 2 e N₀ é igual a 1. Convertendo para valores de log: $0,301 = 0 + Kt$. Dividindo cada lado da

equação por K, obtemos a equação para cálculo do tempo de duplicação: $t = 0,301/K$. Para mais detalhes sobre as equações consultar STEPHENSON, 2016⁵, capítulo 3.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE PHB POR HPLC

4.5.1 Coleta e processamento das amostras

As amostras para quantificação de PHB em estirpes de *H. seropedicae* foram coletadas em diferentes períodos de crescimento: 5, 10, 12, 14, 17, 20 e 24 horas para os experimentos em meio NFbHPN, e 5, 10, 13, 17 e 24 horas para os experimentos em meio NFbHPLN. As células presentes nas amostras foram sedimentadas por centrifugação, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspendido e transferido para tubos tipo Eppendorf de 2 mL. Em seguida, as amostras foram desidratadas em câmara de vácuo (*SpeedVac*) sob agitação de 100 rpm e temperatura constante de 60 °C por 2 horas. Após a desidratação as amostras foram pesadas para obtenção do peso seco. Posteriormente, 1 mL de H₂SO₄ concentrado (18 M) foi adicionado aos tubos, que foram incubados a 100 °C por 1 hora sob agitação orbital de 300 rpm em equipamento *heat block* modelo Thermomixer R (EPPENDORF). Este tratamento é essencial para conversão do PHB em ácido crotônico. Após essa etapa, 100 µL do extrato celular foram transferidos para outro tubo contendo 900 µL de H₂SO₄ 0,014M. Os tubos foram centrifugados a 3.075 g (HETTICH UNIVERSAL 32R, modelo 1610-01-ALT) por 5 minutos para remoção de resíduos e partículas. Na etapa seguinte, 500 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo contendo 500 µL de H₂SO₄ 0,014M, e uma nova centrifugação (3.075 g/5 minutos) foi realizada para remoção de partículas remanescentes. Por fim, 400 µL do sobrenadante foram transferidos para tubo vial e utilizados para quantificação de ácido crotônico através de cromatografia líquida de alta performance, HPLC (abreviação das palavras em inglês *High Performance Liquid Chromatography*). Paralelamente, um tubo contendo 5 mg de PHB (SIGMA-ALDRICH) foi submetido às mesmas reações e usado como controle positivo. As amostras foram submetidas à corrida cromatográfica no equipamento VWR® Chromaster (HITACHI) e os dados analisados. Para mais detalhes do método ver SLEPECKY *et al.*, 1960 e LAW *et al.*, 1961.

⁵ STEPHENSON, Frank H. *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics in the Laboratory*. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2016.

4.5.2 Curva de calibração

A curva de calibração de ácido crotônico (SIGMA-ALDRICH) foi construída a partir da pesagem e diluição das amostras em H_2SO_4 0,014M. No total, foram utilizadas 5 amostras, nas concentrações de ácido crotônico: 0,125; 0,063; 0,031; 0,015; 0,008 e 0,003 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Essas amostras foram analisadas no equipamento VWR® Chromaster (HITACHI), equipado com pré-coluna e coluna de HPLC Nucleosil® C18. A fase móvel consistiu em metanol (MERCK) e tampão fosfato (pH 2,5) na proporção de 30/70 cada. A taxa de fluxo utilizada foi de 0,85 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, com volume de 5 μL injetado automaticamente a 30 °C. A detecção do ácido crotônico ocorreu em comprimento de onda UV de 210 nm.

Os valores gerados foram registrados em arquivo do tipo “.asc”, visualizados no Excel e convertidos para “.csv”. Posteriormente, foram analisados no software R (R Core Team, 2022), utilizando a interface RStudio (Rstudio Team, 2022). Os principais pacotes usados foram aqueles pertencente ao universo *tidyverse* (WICKHAM, 2017).

Através dessas análises, foram construídos os gráficos referentes aos cromatogramas, sobre os quais foi calculada a área sob a curva, AUC (*area under the curve*) de cada curva cromatográfica. Os valores de AUC foram associados às concentrações de ácido crotônico. Com esses dados foi feita uma análise de regressão linear simples, onde foi calculado a equação da reta e o valor de R^2 .

Os valores de AUC foram plotados em função das respectivas concentrações de ácido crotônico. Os gráficos da Figura 10 ilustram a construção de uma das curvas de calibração, sendo que diferentes replicatas foram analisadas e, portanto, diferentes curvas de calibração foram necessárias.

4.6 ESTIMATIVA DAS TAXAS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE PHB POR MODELO DE REGRESSÃO LINEAR

Para calcular as taxas de síntese e degradação de polihidroxibutirato nas estirpes SmR1, ΔphaC1 , ΔphaZ1 , ΔphaZ2 , $\Delta\text{phaZ1}\Delta\text{phaZ2}$, o PHB quantificado no intervalo 0 a 24 horas foi dividido em 2 períodos: 0 a 12 horas correspondendo ao período de síntese e 12 a 24 horas correspondendo ao período de degradação. Para quantificar as taxas na qual o polímero é sintetizado ou catabolizado, um modelo de

regressão linear foi empregado. O modelo assume que a mudança na quantidade do polímero ao longo do tempo segue uma relação linear, que pode ser expressa matematicamente como:

$$PHB = \beta_0 + \beta_1 \times tempo + \varepsilon$$

Na equação:

- PHB: representa o conteúdo do polímero medido em um determinado ponto no tempo.
- tempo: refere-se ao tempo de cultivo (em horas).
- β_0 : é o intercepto do modelo linear, significando o conteúdo estimado de PHB no início do período de análise (tempo 0h para síntese e 12h para degradação).
- β_1 : representa o coeficiente angular da reta, que corresponde diretamente à taxa de síntese ou degradação do PHB, ou seja, o quanto a concentração de PHB aumenta ou diminui por unidade de tempo. Um valor de β_1 negativo indica degradação do polímero, enquanto um valor positivo indica acúmulo de PHB.
- ε : termo de erro aleatório, contabiliza a variabilidade nos dados que não é explicada pelo modelo linear.

O termo ε representa o erro aleatório ou resíduo do modelo (diferença entre o valor observado e o valor previsto), que capta a variabilidade nos dados que não é explicada pelo tempo. Em outras palavras, ε inclui todos os fatores não considerados no modelo que afetam a quantidade de PHB, como variabilidade experimental, medições imprecisas ou outros fatores biológicos.

Em um contexto de modelo linear, o uso desse parâmetro torna a análise mais robusta, uma vez que reconhece que os dados experimentais podem não se ajustar perfeitamente à relação linear, e o termo ε reflete essa discrepância. O objetivo do ajuste do modelo linear é minimizar a soma dos quadrados desses resíduos ε , resultando na melhor estimativa dos parâmetros β_0 e β_1 .

4.6.1 Estimativa e interpretação dos parâmetros

Para estimar os parâmetros do modelo (β_0 e β_1), o método dos mínimos quadrados foi utilizado. Essa abordagem visa minimizar a soma das diferenças quadradas entre os valores de PHB observados e aqueles previstos pelo modelo

linear. A estimativa resultante para β_1 fornece uma medida quantitativa da taxa síntese ou de degradação do PHB, expressa na quantidade de PHB por tempo (%PHB.peso seco celular⁻¹.h⁻¹).

4.6.2 Validação do modelo e representação gráfica

A qualidade do ajuste do modelo linear foi avaliada usando o coeficiente de determinação (R^2). Essa métrica quantifica a proporção da variância nos dados de PHB que é explicada pela relação linear com o tempo. Um valor de R^2 mais alto sugere um melhor ajuste do modelo aos dados. Para avaliar visualmente o ajuste do modelo e a variabilidade nos dados, gráficos de dispersão foram gerados (valores obtidos), sobrepostos com as linhas de regressão ajustadas para cada estirpe e replicata biológica.

4.6.3 Embasamento teórico

A análise para o cálculo das taxas de síntese e degradação de PHB foi realizada utilizando um modelo de regressão linear simples, baseado na teoria de regressão linear descrita por Gotelli & Ellison (2011) (págs. 257 a 282). A equação do modelo ($PHB = \beta_0 + \beta_1 \cdot tempo + \varepsilon$) é uma adaptação da equação geral da regressão linear: $Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon_i$, onde o subscrito i indica a quantidade de replicatas.

4.7 ESTIMATIVA DAS TAXAS DE SÍNTESE DE PHB POR MODELO LOGÍSTICO

As taxas de síntese de PHB nas estirpes cultivadas em 2mM de NH_4Cl foram estimadas com base em um modelo logístico. O modelo utilizado pode ser descrito pela equação:

$$PHB(t) = \frac{PHB_{max}}{1 + e^{[-k(t-t_0)']}}$$

- $PHB(t)$: Concentração de PHB em função do tempo t . Essa variável representa a quantidade de PHB produzida pelas bactérias em um determinado tempo de cultivo.
- PHB_{max} : Concentração máxima de PHB que pode ser alcançada (capacidade de carga do sistema).

- k : Taxa de crescimento ou síntese. Esse parâmetro determina a velocidade com que a síntese de PHB se aproxima da capacidade máxima. Um valor maior de k indica uma taxa de síntese mais rápida.
- t_0 : Tempo em que a taxa de síntese é máxima. Este parâmetro representa o ponto de inflexão da curva logística, ou seja, o momento em que a produção de PHB passa de uma fase de crescimento acelerado para uma fase de desaceleração, aproximando-se da saturação.

A equação é derivada da função logística $f(x) = \frac{L}{1+e^{-k(x-x_0)}}$, onde L , k e x_0 são os três parâmetros básicos da curva logística que foram adaptados para o contexto da equação que calcula as taxas de síntese de PHB.

A estimativa dos valores associados aos parâmetros do modelo (PHB_{\max} , k , t_0) foi realizada utilizando a função `nlsLM` (*Nonlinear Least Squares Levenberg-Marquardt algorithm*), disponível no pacote R `minpack.lm` (ELZHOV *et al.*, 2023). Essa função ajusta a curva logística aos dados experimentais (%PHB) ao longo do tempo, minimizando a soma dos quadrados dos resíduos (a diferença entre os valores previstos pelo modelo e os valores observados) para encontrar os melhores valores dos parâmetros.

A qualidade do ajuste foi avaliada utilizando o pseudo R^2 de McFadden, essa métrica permite avaliar a qualidade do ajuste de modelos de regressão logística (ou outros modelos baseados em verossimilhança). Embora não seja equivalente ao R^2 de um modelo linear, o pseudo R^2 pode fornecer uma ideia da proporção da variância explicada pelo modelo logístico.

O pseudo R^2 de McFadden varia entre 0 e 1, onde: 0 indica que o modelo ajustado não tem poder explicativo em comparação ao modelo nulo e 1 indica que o modelo ajustado explica perfeitamente os dados, embora, na prática, valores exatamente iguais a 1 sejam raros.

Em geral o valor do R^2 de McFadden pode ser:

- **Baixo (< 0,2)**: Sugere que o modelo não explica bem a variação dos dados. No entanto, mesmo valores baixos podem ser aceitáveis em modelos complexos ou quando os dados são ruidosos.
- **Moderado (0,2 - 0,4)**: Indica um ajuste razoável. O modelo está capturando uma parte significativa da variação nos dados.

- **Alto (> 0,4):** Indica um bom ajuste, sugerindo que o modelo explica uma grande parte da variação dos dados. Valores muito altos podem indicar que o modelo é bem adequado, mas também é importante verificar se há um super ajuste (*overfitting*).

4.8 QUANTIFICAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS

A quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi realizada com as estirpes SmR1, $\Delta phaC1$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ após 12 horas de cultivo nos meios NFbHPN e NFbHPLN, e após 10 horas de cultivo no meio NFbGHPN5.

Para cada estirpe, 100 μ L foram coletados e diluídos em 900 μ L de meio NFb sem carbono e sem nitrogênio. A partir desta diluição, foram realizadas diluições seriadas. Cada diluição foi plaqueada em triplicata, totalizando 3 gotas de 10 μ L cada. Essas gotas foram plaqueadas em placa de petri com meio NFbHPN. Após 24 horas de crescimento, o número de colônias foi contabilizado, e a quantidade de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) calculada. Os resultados foram transformados em Log_{10} e plotados em gráficos do tipo boxplot ou gráfico de linhas e pontos.

4.9 ENSAIOS DE ATIVIDADE METABÓLICA COM CLORETO DE TRIFENILTETRAZOLIO (TTC)

Os ensaios com o corante cloreto de trifeniltetrazolio (TTC) foram realizados em placas de petri com as estirpes SmR1, $\Delta phaC1$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$. Para isso, foram adicionados 0,0025% do corante ao meio de cultivo, conforme metodologia descrita por BOCHNERI & SAVAGEAU, 1977.

As estirpes foram cultivadas por 72 horas, e a formação do corante formazan nas colônias foi avaliado durante esse período, como indicador do fluxo de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons. Registros fotográficos das placas de petri ou de colônias isoladas foram realizados nos intervalos de 48 e 72 horas.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas realizadas consistiram em análise de variância (ANOVA) de um fator ou ANOVA de Welch (realizada quando os dados não

apresentaram homogeneidade de variâncias). Os dados de UFC ou DO_{600} , transformados em \log_{10} , foram avaliados quanto aos pressupostos do ANOVA: normalidade dos dados, homogeneidade de variâncias (homoscedasticidade) e ausência de valores extremos (*outliers*).

A normalidade dos dados por grupo foi verificada pelo Teste de Shapiro-Wilk, e a homoscedasticidade pelo Teste de Levene.

A verificação de *outliers* foi realizada utilizando o método IQR (YANG; RAHARDJA; FRÄNTI, 2019), baseado na seguinte equação:

$[(Q1 - 1,5 * IQR), (Q3 + 1,5 * IQR)]$. onde,

Q1 – representa o primeiro quartil dos dados;

Q3 – terceiro quartil;

IQR – Intervalo Inter-Quartil, é a diferença entre Q1-Q3 ($IQR = Q3 - Q1$).

Os limites inferior e superior para identificação de *outliers* foram calculados pelas fórmulas:

Limite inferior: $(Q1 - 1,5 * IQR)$;

Limite superior: $(Q3 + 1,5 * IQR)$.

Valores fora desses limites foram considerados *outliers*.

Ao realizar a ANOVA, o resultado obtido indica apenas se há ou não diferenças significativas entre os grupos, para diferenciar qual ou quais grupos de dados possuem médias estatisticamente significativas é necessário usar um teste *post-hoc*. Nas análises realizadas nesse projeto foi usado o Tukey HSD ou Games-Howell para ANOVA de Welch.

4.11 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As análises de microscopia de fluorescência foram conduzidas em células cultivadas em meio líquido ou a partir de colônias obtidas de meio sólido. O objetivo principal dessas análises foi visualizar os grânulos de polihidroxibutirato dentro das células, utilizando o fluoróforo Bodipy (MERCK) para coloração.

Antes da adição do corante, as células provenientes de meio líquido foram centrifugadas a 12.298 g. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas

em 1 mL de tampão TBAC (Tampão PBSA pH 7,2 (Tabela 4), com 1 mM de ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) e 0.01% de Tween 20) contendo 50% de etanol absoluto (ALVES *et al.*, 2017). Em seguida, 1 μ L de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazas-indacene (BODIPY) (1 mg/mL) foi adicionado à suspensão de células, e mantidas à temperatura ambiente por 5 minutos.

TABELA 4 – TAMPÃO 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

Após este período, as células foram novamente centrifugadas a 12.298 g por 1 minuto, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em tampão PBSA (Tabela 4). Posteriormente, 10 μ L da solução de células coradas foram depositados em lâmina de microscopia contendo uma fina camada de agarose 1%. As amostras foram cobertas com lamínula e analisadas em microscópio de fluorescência Leica DM5500 B com iluminador Leica CTR 5500. A aquisição de imagens foi efetuada com câmera integrada Leica DFC 360 FX e os ajustes de configuração foram feitos no software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (4.0). As lâminas de microscopia com uma fina camada de agarose foram preparadas previamente. Uma solução de agarose 1% em H₂O Milli-Q foi aquecida para solubilização da agarose. Em seguida, 250 μ L foram aplicados sobre cada lâmina e cuidadosamente espalhados. Após geleificação, as lâminas com agarose foram mantidas em recipiente fechado por 72 horas para desidratação.

4.12 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE IMAGENS DE MICROSCOPIA

Os arquivos de microscopia obtidos, no formato “.lif”, continham a sobreposição de três imagens resultantes de registro fotográfico multicanal: contraste de fase, campo claro e fluorescência. Essas três imagens foram separadas em imagens individuais através do software Fiji (SCHINDELIN *et al.*, 2012).

As imagens de contraste de fase, por apresentarem menos ruído de fundo, permitiram a separação e contagem automática das células bacterianas. Para isso, foi

usado o módulo de extensão (*plugin*) *Cell Counter* no software ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012), conforme protocolo de O'Brien *et al.*, (2016).

As imagens de fluorescência, contendo registro dos grânulos de PHB, foram convertidas para o formato 8 bits. Isso possibilitou o isolamento e a contagem dos grânulos, e para cada grânulo foram coletadas informações sobre área (em pixels quadrados) e densidade de pixels. A contagem e as informações de tamanho dos grânulos foram obtidas com o *plugin Cell Counter* no software ImageJ.

Os dados foram plotados em gráficos de dispersão (*jitterplot*). Adicionalmente, a quantidade de grânulos de PHB em cada imagem foi dividida pela quantidade de células na imagem de contraste de fase correspondente (proveniente do mesmo arquivo ".lif"), onde é possível sobrepor os canais de fluorescência (registro de grânulos de PHB) e células (contraste de fase). Essa proporção grânulo/célula foi utilizada para comparar de forma arbitrária a quantidade de PHB entre as diferentes estirpes de *H. seropedicae*.

4.13 ENSAIOS DE ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE

A análise da expressão dos genes *phaZ1* e *phaZ2* foi realizada por meio de fusões plasmidiais das regiões promotoras com o gene repórter *lacZ*. Previamente, as estirpes de *H. seropedicae* alvo da análise foram transformadas com os plasmídeos contendo as fusões *phaZ1::lacZ* ou *phaZ2::lacZ* por conjugação bacteriana. Posteriormente, as estirpes foram cultivadas a 30°C com rotação orbital de 120 rpm em meio NFbHPN ou NFbHPLN, suplementado com antibióticos apropriados.

A atividade de β -galactosidase foi determinada utilizando o ensaio descrito por Miller (1972). O sistema de reação para a medição da atividade de β -galactosidase continha 900 μ L de tampão Z, 30 μ L de clorofórmio e 100 μ L de cultura líquida. O sistema de reação foi mantido em banho-maria a 30°C, e a reação foi iniciada pela adição de 200 μ L de 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo – ONPG, 4 mg/L (SIGMA). A reação foi interrompida pela adição de 500 μ L de Na₂CO₃ (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 foram coletados para determinação da absorbância do o-nitrofenol (ONP) formado, a 420 e 550 nm.

Para determinação da atividade específica de β -galactosidase foi realizado a dosagem de proteínas (BRADFORD, 1976), nas estirpes analisadas e a construção

de uma curva de calibração de ONP. Isso permitiu expressar o nível de expressão dos genes em nmol de ONP formado por mg de proteína por tempo em minutos (nmol de ONP.(min.mg proteína)⁻¹).

As análises de expressão em *E. coli* (ET8000 e NT8000) foram determinadas utilizando metodologia similar, suprimindo apenas a dosagem de proteínas. Os resultados obtidos foram expressos em Unidades Miller.

4.14 TÉCNICAS DE BIOLOGICA MOLECULAR

4.14.1 Extração de RNA e RT-PCR

A extração de RNA foi realizada com base no protocolo TRIzol® Max™ Bacterial RNA Isolation Kit⁶ (AMBION). As principais etapas estão descritas a seguir. As estirpes foram cultivadas por 7 horas a 30°C, sob agitação orbital a 120 rpm. Nesse período, as culturas atingiram a fase exponencial de crescimento, quando foram coletados 14 mL de cada cultura, transferidos para tubos Falcon e centrifugados por 5 minutos a 4°C, a 3.075 g. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi ressuspenso e transferido para tubos Eppendorf de 2 mL, aos quais foram adicionados 1 mL de Reagente TRIzol® (INVITROGEN). Em seguida, os tubos foram vortexados por 15 segundos e mantidos a 95°C por 5 minutos. Posteriormente, os tubos foram resfriados em banho de gelo por 5 minutos, seguidos de mais um ciclo a 95°C por 5 minutos. Após esse período, a solução de células lisadas foi mantida à temperatura ambiente por 5 minutos.

Na etapa seguinte foi realizada a separação de fases. Inicialmente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio previamente resfriado, os tubos foram homogeneizados manualmente por inversão intensa por 15 segundos e, em seguida, mantidos à temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. Após esse tempo, foram centrifugados a 17.117 g por 15 minutos a 4°C. A centrifugação separou a mistura em três fases: uma fase inferior vermelha, composta por fenol-clorofórmio, uma fase intermediária e uma fase aquosa incolor contendo RNA, com volume aproximado de 400 µL.

A precipitação do RNA foi realizada transferindo a fase superior aquosa (≅ 400 µL) para tubos eppendorf de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 500 µL de

⁶Disponível em: <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizolmax_man.pdf>

isopropanol gelado para precipitação do RNA, seguido de homogeneização por inversão manual. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, centrifugadas a 17.117 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* contendo RNA foi ressuscitado após adição de 1 mL de etanol 75%, seguido de vortex. As amostras foram centrifugadas a 6.917 g rpm por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. Os tubos foram mantidos abertos em banho de gelo até que o excesso de etanol evaporasse. Após esse período, o RNA foi ressuscitado em 50 µL de H₂O Milli-Q (*RNase-free*).

Para estimar a concentração de RNA, um volume de 1 µL foi diluído em 4 µL de H₂O mili-Q, e, a partir dessa diluição, foi realizada a quantificação dos RNAs totais usando o equipamento NanoPhotometer® N50 (IMPLEN). A qualidade do RNA nas amostras foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%.

Na etapa seguinte, as amostras foram tratadas com DNase I para remover o DNA genômico, utilizando o kit DNase I Amplification Grade (SIGMA-ALDRICH #AMPD-1KT), conforme as especificações do fabricante. Após a reação enzimática, a enzima foi inativada a 70°C por 10 minutos. Depois do tratamento enzimático, as amostras foram precipitadas com etanol 70% e, após a secagem, ressuscitadas em 30 µL de H₂O Milli-Q (*RNase-free*). Novamente, as concentrações de RNA em cada tubo foram verificadas no espectrofotômetro Nanodrop e a qualidade dos RNAs foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%, para observação das bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos 16S e 23S.

A verificação da ausência de DNA genômico remanescente foi realizada através de reações de PCR, usando 1 µL de cada amostra como DNA molde (*template*) e oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para amplificação de um fragmento de DNA do gene *rrsA* (Tabela 7). Como controle positivo, foi utilizado DNA genômico de *H. seropedicae* SmR1 (30 ng/µL).

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada com o kit Promega One Step RT-PCR, de acordo com as especificações do fabricante. Para cada amostra, foi preparado um tubo com 10 µL de volume total contendo os RNAs purificados na concentração de 100 ng/µL. Cada tubo foi submetido a um ciclo de desnaturação a 70°C por 10 minutos em termociclador Labcycler (SENSOQUEST).

Imediatamente após o ciclo de desnaturação, 5 µL de cada amostra foram transferidos para novos tubos contendo os reagentes do kit Promega One Step RT-

PCR (Tabela 5). O volume restante (5 μL) foi usado como controle negativo em uma reação similar, mas sem a enzima AMV RT (HC). Os tubos foram então submetidos a síntese de cDNA, conforme tempo e temperaturas indicadas na Tabela 6.

TABELA 5 – REAGENTES DO KIT PROMEGA ONE STEP RT-PCR PARA SÍNTESE DE cDNA

Reagentes	Volume (μL)
H ₂ O <i>nuclease free</i>	4,8
Rev. Trans 10X Buffer	2
25 mM MgCl ₂	4
dNTPs	0,2
Random primers	1
Rec. RNAasin	0,5
AMV RT (HC)	0,7
Amostra de RNA (100 ng/ μL)	5

TABELA 6 – TEMPERATURA E TEMPO DAS REAÇÕES DE SÍNTESE DE cDNA

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
4	10
42	60
95	5
4	∞

Após a reação, foram adicionados 30 μL de H₂O mili-Q a cada tubo. Esse cDNA foi utilizado nas reações de PCR semi-quantitativa.

4.14.2 Reações de PCR e oligonucleotídeos iniciadores

As reações de PCR foram realizadas utilizando DNA genômico purificado ou colônias bacterianas como molde. Para as reações com a DNA polimerase PfuX7, um sistema de reação de 20 μL foi montado, contendo 1 μL de cDNA, 0,5 pmol/ μL de cada primer, 0,2 mmol/L de dNTPs, tampão de reação X7, 2,5 mmol/L de MgCl₂ e 0,2 μL de PfuX7 DNA Polimerase (NORHOLM, 2010). As condições de amplificação foram de: 25 a 30 ciclos com desnaturação a 96 °C por 20 segundos, anelamento dos primers a uma temperatura específica para cada par por 15-20 segundos e extensão a 72°C por um tempo variável de acordo com o tamanho do fragmento a ser amplificado.

As reações de PCR semi-quantitativa foram realizadas utilizando o kit Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEW ENGLAND BIOLABS), seguindo as recomendações do fabricante. Os primers utilizados nessas reações foram projetados com a ferramenta PrimerQuest™ (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES - IDT) e suas

sequências estão listadas na Tabela 7. A Figura 3 ilustra o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados por cada par de primer.

Os fragmentos amplificados foram submetidos a 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) e corante Midori Green (NIPPON Genetics EUROPE, #MG04), conforme especificações do fabricante. Em alguns casos, os géis foram posteriormente corados com brometo de etídeo. Os resultados obtidos foram registrados em imagem utilizando transiluminador de luz ultravioleta com sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

TABELA 7 – PRIMERS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR SEMI-QUANTITATIVA

Identificação	Sequência	Referência
rrsA_Fw	5'-TCGGAATTACTGGGCGTAAAG-3'	Este projeto
rrsA_Rev	5'-GACCATGTCAAGGGTAGGTAAG-3'	Este projeto
phaZ1_Fw	5'-GCGTTCATCTGCATGACTA-3'	Este projeto
phaZ1_Rev	5'-TCGTAGAACTTGCGGTGTTC-3'	Este projeto
phaZ2_Fw	5'-CAGTCACATCATCGACTTCCTC-3'	Este projeto
phaZ2_Rev	5'-ATGGTGCAGGCGCATATAG-3'	Este projeto

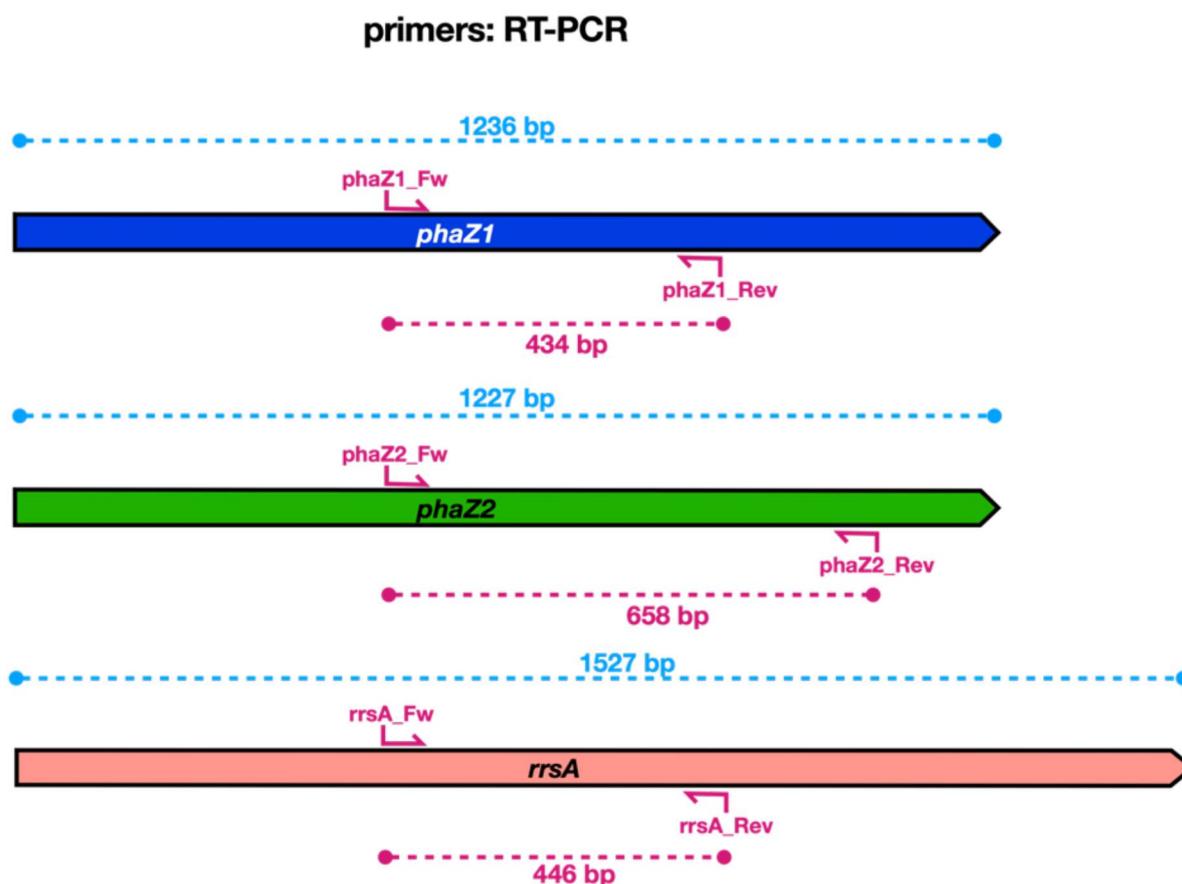


Figura 3. Ilustração do tamanho dos fragmentos de DNA dos genes amplificados nas reações de PCR semi-quantitativa, usando como molde cDNA de reações de RT-PCR. O tamanho total de cada gene

em pares de bases (bp) está indicado em azul. O tamanho dos fragmentos amplificados nas reações estão indicados em rosa.

4.15 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

As células de *Escherichia coli* foram preparadas de acordo com a metodologia de CHAN *et al.*, (2013) e estocadas em alíquotas de 100 µL em tubos tipo Eppendorf estéreis a -80 °C. Para transformação bacteriana, utilizou-se 3 µL de amostra com concentração de DNA entre 25 e 50 ng/µL que foi misturado com a suspensão de células quimiocompetentes e incubado por 30 minutos em banho de gelo, seguido de incubação por 30 segundos a 42°C e resfriamento por 2 minutos em gelo. Em seguida, 900 µL de meio LB foram adicionados e a suspensão incubada por 60 minutos em estufa a 37 °C para recuperação das células. Após esse período, 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.

4.16 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

As sequências das proteínas de PHB despolimerases foram alinhadas com software MEGA-X (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms*) com o algoritmo MUSCLE (*Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) (KUMAR *et al.*, 2018). O resultado do alinhamento foi exportado em formato FASTA e submetido ao software BoxShade para gerar a imagem correspondente.

Informações adicionais foram sobrepostas à imagem do alinhamento, incluindo os os resíduos de aminoácidos do sítio ativo e informações estruturais das proteínas. As informações estruturais foram preditas com o programa PROMALS3D (PEI *et al.*, 2008).

As estruturas proteicas das despolimerases foram geradas com o programa AlphaFold (JUMPER *et al.*, 2021).Essas estruturas, exportadas em formato PDB, foram analisadas com o software Pymol (SCHRÖDINGER & DELANO, 2020).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES *IN SILICO* DAS PROTEÍNAS PHAZ1 E PHAZ2 DE *H. seropedicae* SmR1

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 possui dois genes, *phaZ1* e *phaZ2*, que codificam PHB despolimerases intracelulares. As sequências de aminoácidos correspondentes, com 411 e 408 resíduos respectivamente, estão depositadas no banco de dados NCBI, identificadas com os números de acesso ADJ63135 (PhaZ1) e ADJ62158 (PhaZ2) (PEDROSA *et al.*, 2011). As sequências de PhaZ1 e PhaZ2 foram analisadas na base de dados InterPro (InterPro 97.0, disponível em <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), que realiza uma análise funcional por comparação com proteínas similares em outros bancos de dados. Essa ferramenta realiza o agrupamento das sequências em famílias de proteínas similares, identifica os domínios conservados e possíveis sítios catalíticos relevantes.

A análise *in silico* demonstrou que as proteínas PhaZ1 e PhaZ2 pertencem à família das polihidroxialcanoato despolimerases (IPR010915) devido à presença de um domínio conservado *PHB de-polymerase C-terminal* ou *PHB_depo_C* (IPR009656), (Figura 4). Esse domínio está presente em PhaZs intracelulares que degradam os grânulos nativos de PHB em 3-Hidroxi-butirato e seus oligômeros (KNOLL *et al.*, 2009).

Além disso, as sequências das PHB despolimerases de *H. seropedicae* apresentam homologia com a superfamília das α/β hidrolases (IPR029058). Essa superfamília engloba um grande número de proteínas com origens filogenéticas e atividades catalíticas distintas, mas que preservam certas características estruturais, como o núcleo formado por α -hélices ou folhas- β ao invés de um barril. Essas enzimas também conservam o arranjo dos resíduos de aminoácidos catalíticos, geralmente três resíduos, sustentados por alças, que é a característica estrutural mais bem conservada nessa superfamília. Essa conservação sugere que essa característica seja plesiomórfica.

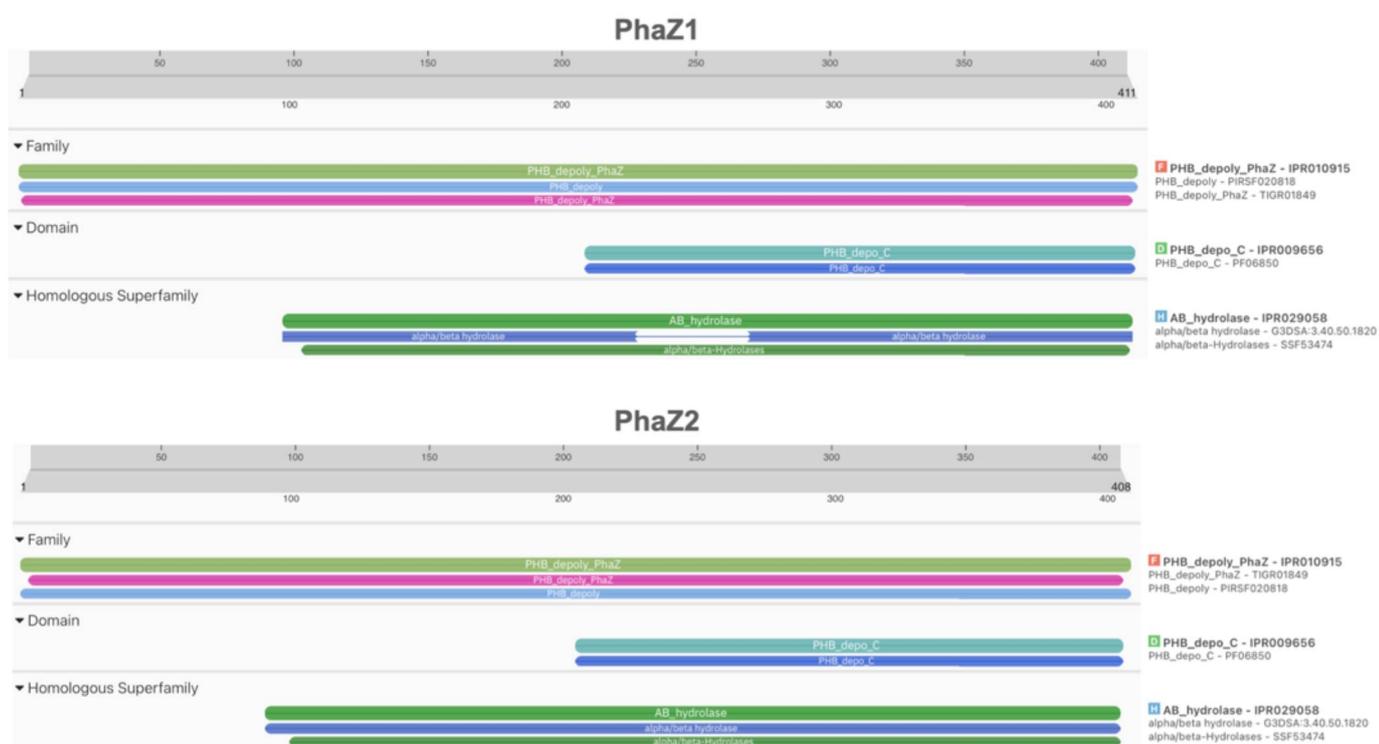


Figura 4. Análise das sequências de aminoácidos das proteínas PhaZ1 e PhaZ2 de *H. seropedicae* SmR1. A análise foi feita com a ferramenta web InterPro após submissão da sequência de cada proteína no campo de busca em formato FASTA. As PHB despolimerases de *H. seropedicae* foram agrupadas na família das PHB despolimerases (IPR010915), ocorrendo em ambas o domínio conservado PHB despolimerase C-terminal (IPR009656) e a classificação na superfamília das α/β hidrolases (IPR029058).

Uma análise filogenética, utilizando sequências de aminoácidos, demonstrou que, entre as diversas PHB despolimerases caracterizadas, as proteínas PhaZ1 e PhaZ2 são mais similares às proteínas PhaZa1 e PhaZa2 de *C. necator* (MOTA, 2020, dados não publicados). O alinhamento revelou que 65% dos resíduos de aminoácidos de PhaZ1 são idênticos aos de PhaZa1 (WP_011614907). Similarmente, PhaZ2 compartilha 60% de identidade com PhaZa2 (WP_010813770). Entre si, PhaZ1 e PhaZ2 apresentam 46,6% de identidade, um valor inferior ao observado entre proteínas de organismos distintos. Essas características podem ser visualizadas no alinhamento das sequências de aminoácidos dessas proteínas, ilustrado na Figura 5.

Essa comparação é relevante, uma vez que *Cupriavidus necator* é um organismo modelo no estudo do metabolismo de polihidroxialcanoatos, incluindo o PHB. Adicionalmente, a maioria dos artigos publicados sobre a mobilização de PHB nativo foram realizados com essa bactéria (ABE; KOBAYASHI; SAITO, 2005; BRIGHAM *et al.*, 2012; EGGERS; STEINBÜCHEL, 2013; HANDRICK; REINHARDT; JENDROSSEK, 2000; KOBAYASHI *et al.*, 2003; KOBAYASHI; SAITO, 2003;

SAEGUSA *et al.*, 2001; SZNAJDER *et al.*, 2014; UCHINO; SAITO; JENDROSSEK, 2008; YORK *et al.*, 2003).

No alinhamento da Figura 5, a tríade catalítica associada à degradação de PHB foi destacada na cor verde. Essa tríade, formada pelos resíduos de aminoácidos Cisteína (C), Histidina (H) e Aspartato (D) é idêntica em todas as sequências e constitui uma das características das PHB despolimerases intracelulares. A deleção ou substituição de qualquer um desses resíduos resulta na perda da atividade de mobilização de PHB (KNOLL *et al.*, 2009; KOBAYASHI; SAITO, 2003).

O primeiro resíduo da tríade, uma cisteína, permite classificar as despolimerases de *H. seropedicae* no grupo das scl-PHB despolimerases sem “*lipase box*”, SF2. Esse grupo engloba proteínas com tríade modificada, na qual a serina foi substituída por cisteína. A tríade com serina é uma característica ancestral presente num segundo grupo de scl-PHB despolimerases e nas PHA despolimerases extracelulares (KNOLL *et al.*, 2009).

Em *C. necator*, os resíduos de Treonina (T26, T28) e Serina (S35) de PhaZa1 são alvos de fosforilação, e a mutagênese dos sítios T26 e/ou S35 afeta a atividade de mobilização de PHB. Ao comparar as posições desses resíduos com a sequência proteica de PhaZ1 de *H. seropedicae*, esses resíduos não são conservados. Apesar de não ocorrer nas mesmas posições, isso não descarta um mecanismo de regulação pós-traducional similar em PhaZ1.

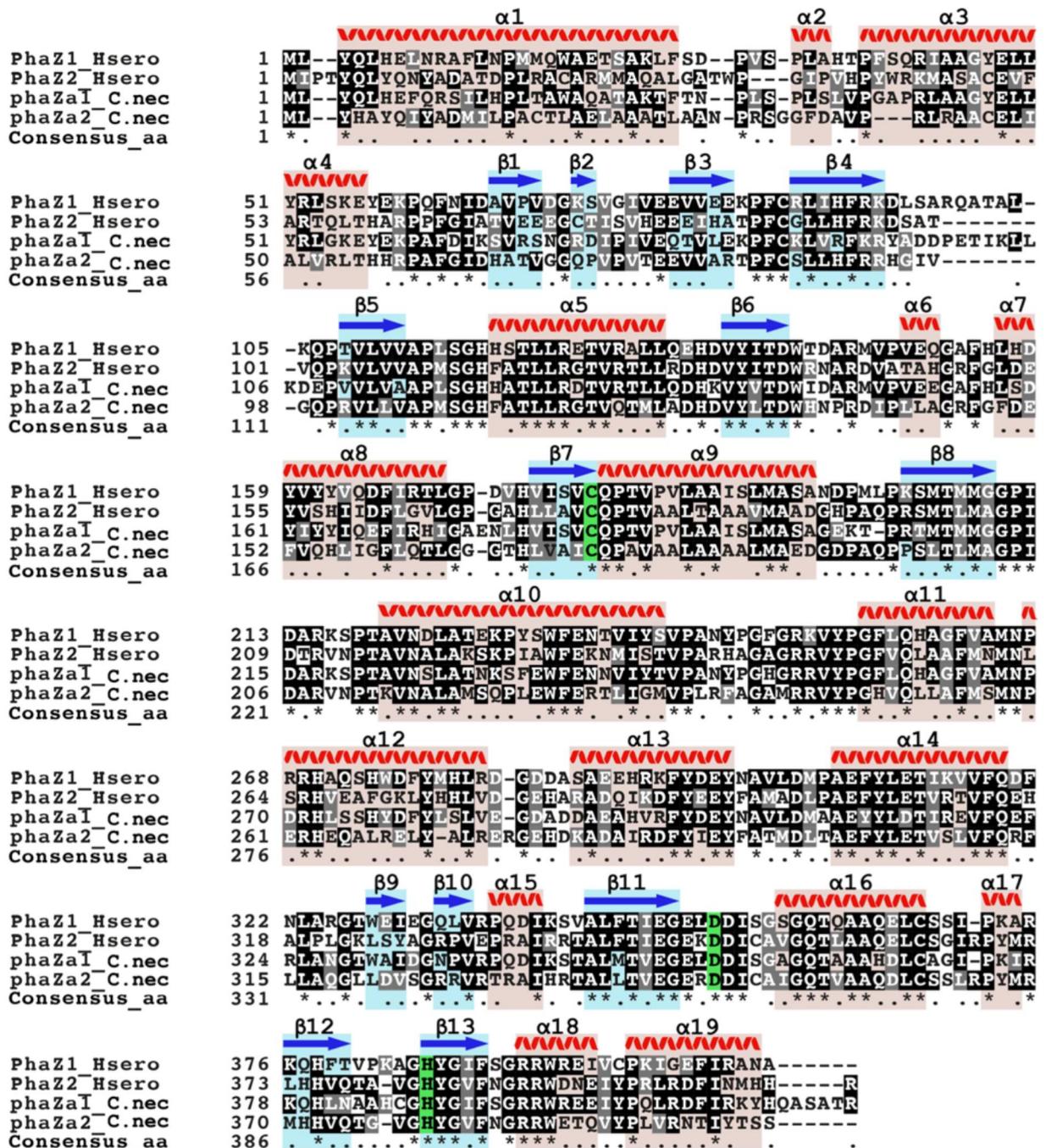


Figura 5. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas PhaZ1 (PhaZ1_Hsero) e PhaZ2 (PhaZ2_Hsero) de *H. seropedicae*, e PhaZa1 (PhaZa1_C.nec) e PhaZa2 (PhaZa2_C.nec) de *C. necator*. A tríade catalítica, formada pelos resíduos de Cisteína (C), Histidina (H) e Aspartato (D), está destacada em verde. Resíduos de aminoácidos idênticos estão destacados em preto e resíduos similares em cinza. O consenso está simbolizado com um (*) quando os resíduos são conservados nas quatro seqüências e por um ponto (.) quando são similares. O alinhamento foi gerado utilizando o algoritmo MUSCLE, implementado no software MEGA-X. As informações sobre a estrutura tridimensional conservada, obtidas pela análise com o software PROMALS3D, estão sobrepostas ao alinhamento: α -hélices em vermelho e folhas β em azul.

A análise comparativa das seqüências das PHB despolimerases de *Cupriavidus necator* e *Herbaspirillum seropedicae*, ambas espécies de β -

Proteobacteria, revelou uma notável similaridade, indicando que a semelhança observada entre os resíduos de aminoácidos pode se estender à estrutura tridimensional das proteínas. Para aprofundar essa investigação, as sequências foram submetidas à análise no software PROMALS3D (PEI; KIM; GRISHIN, 2008). Os resultados confirmaram a conservação das estruturas secundárias entre as proteínas, com a identificação de 13 prováveis folhas β (destacadas em azul na Figura 5) e 19 prováveis α -hélices (destacadas em vermelho).

As análises de conservação estrutural realizadas com o programa PROMALS3D revelaram que as estruturas tridimensionais das PHB despolimerases de *H. seropedicae* são conservadas entre si e também em relação às proteínas homólogas de *C. necator*. Com o objetivo de aprofundar essa análise, a estrutura tridimensional das mesmas proteínas foi predita utilizando o programa AlphaFold (JUMPER *et al.*, 2021). Essa ferramenta utiliza a sequência de aminoácidos para prever a estrutura da proteína, fornecendo uma análise estatística com a estimativa de confiança por resíduo de aminoácido no modelo, chamada de pLDDT. Valores de pLDDT acima de 90 indicam alta precisão do modelo e são adequados para análises detalhadas, como a identificação de sítios catalíticos ou modelagem de ligantes; valores entre 70 e 90 são considerados bem modelados, porém menos confiáveis, enquanto regiões com valores entre 50 e 70 representam modelos estruturais de baixa confiança e devem ser interpretados com cautela.

Os modelos estruturais das despolimerases analisadas apresentaram alta confiabilidade, com a maior parte das proteínas exibindo pontuação superior a 90 na escala pLDDT (Figura 6). As estruturas de PhaZ1 e PhaZa1 apresentaram pequenas regiões de enovelamento com baixa confiabilidade, especificamente uma região de α -hélice indicada em laranja e algumas regiões em amarelo. As demais regiões apresentaram alta confiabilidade nos modelos gerados, assim como nos modelos obtidos com PhaZ2 e PhaZa2. Curiosamente, as regiões menos confiáveis de PhaZ1 e PhaZa1 correspondem a regiões de alta confiança (pLDDT entre 70 e 90) em estruturas similares nos modelos de PhaZ2 e PhaZa2. Essa comparação sugere que, apesar da baixa confiabilidade em alguns pontos, o enovelamento nessas regiões pode ser similar em todas as proteínas. A alta confiabilidade geral dos modelos permitiu análises mais aprofundadas, como a identificação a nível tridimensional da posição da tríade catalítica (Figura 7).

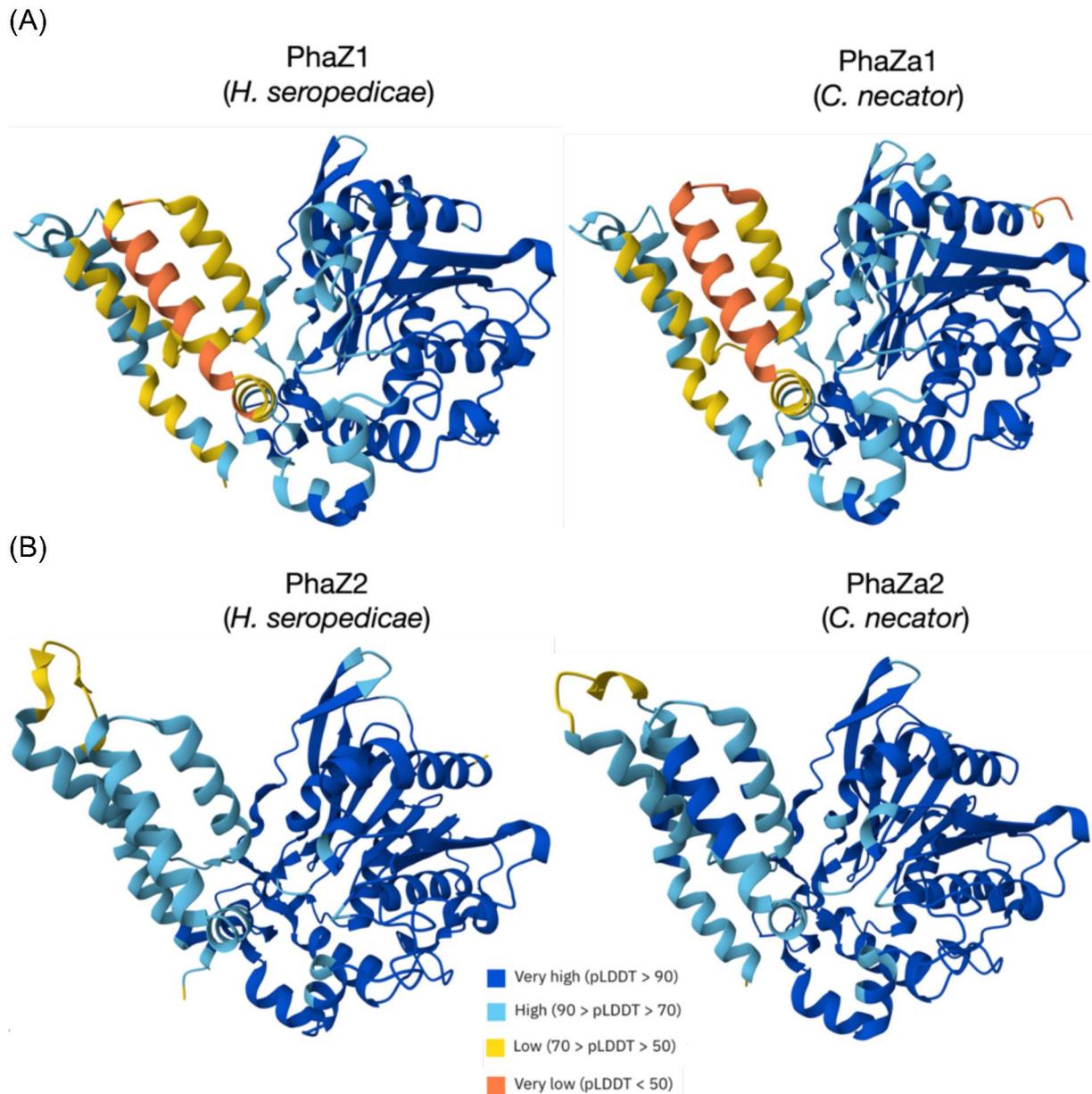


Figura 6. Predição da estrutura tridimensional das proteínas PhaZ1 e PhaZ2 de *H. seropedicae* e PhaZa1 e PhaZa2 de *C. necator*. Os modelos foram gerados pelo programa AlphaFold a partir da sequência de aminoácidos. A escala de cores representa a confiança no modelo (pLDDT), conforme indicado na legenda. Em azul escuro, regiões na estrutura modeladas com alta acurácia (pLDDT superior a 90), em azul claro regiões com pLDDT entre 90 e 70, em amarelo as regiões com pLDDT entre 70 e 50 e em laranja as regiões com pLDDT inferior a 50. A baixa confiabilidade (laranja/amarelo) em algumas α -hélices, principalmente na extremidade N-terminal de PhaZ1 e PhaZa1 (Painel A), contrasta com *uma melhor* confiabilidade (azul *claro*) observada nas mesmas regiões em PhaZ2 e PhaZa2 (Painel B).

As análises mais detalhadas do modelo foram realizadas com o software Pymol (SCHRÖDINGER & DELANO, 2020), utilizando as estruturas previstas pelo AlphaFold. A Figura 7 ilustra as estruturas de PhaZ1 (vermelho) e PhaZ2 (azul), com destaque para os resíduos da tríade catalítica: Cisteína (Cys), Histidina (His) e

Aspartato (Asp), representados em verde (PhaZ1) e amarelo (PhaZ2), respectivamente, no formato de bastão (*stick*).

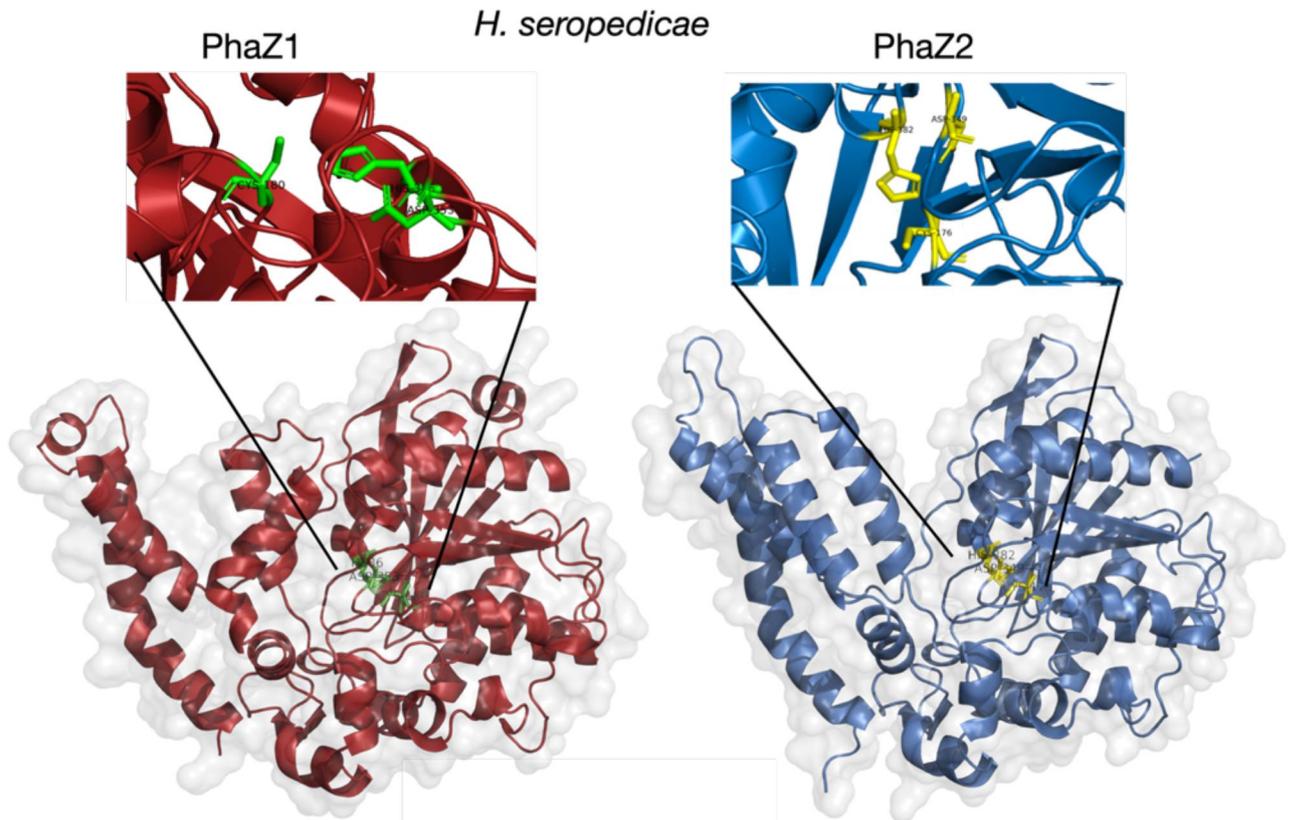
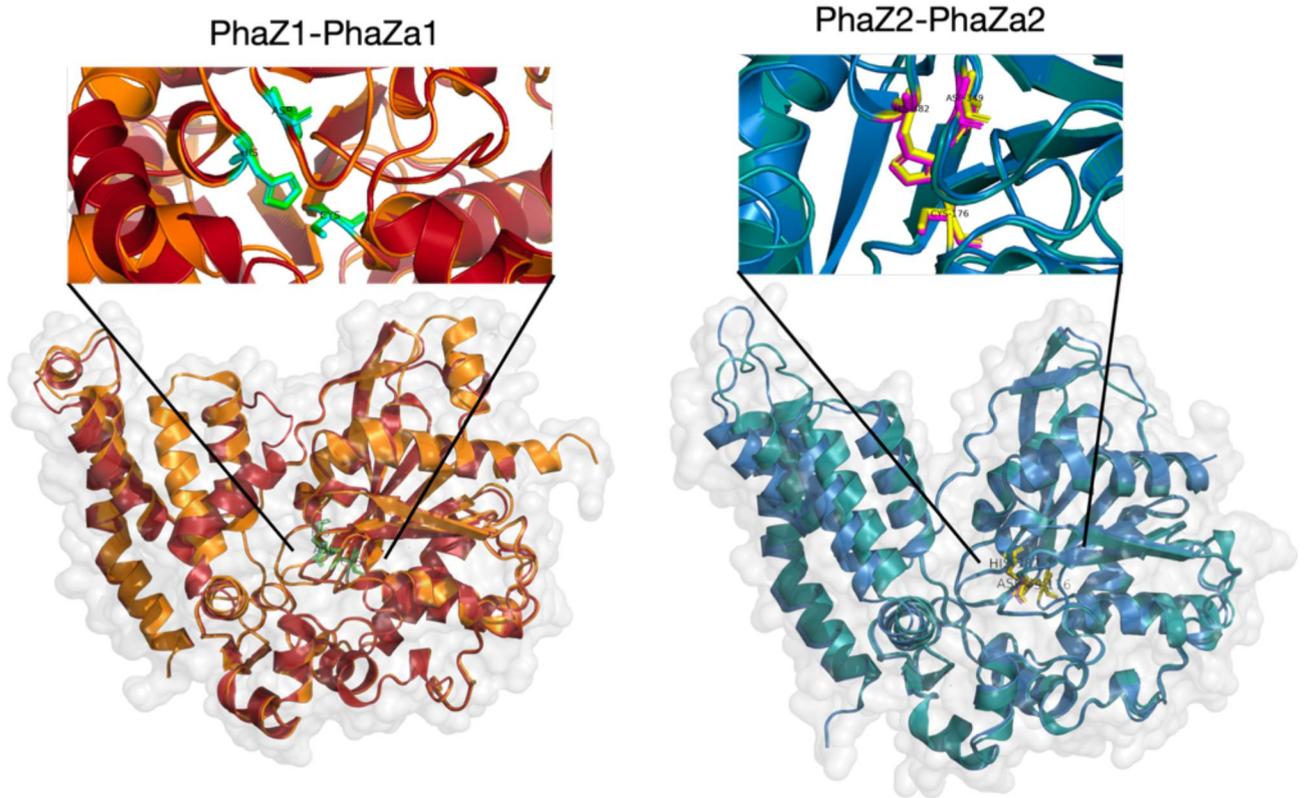


Figura 7. Estruturas terciárias das proteínas PhaZ1 e PhaZ2 de *H. seropedicae* SmR1. A tríade catalítica, formada pelos resíduos de Cisteína (Cys), Histidina (His) e Aspartato (Asp), está destacada em verde (PhaZ1) e amarelo (PhaZ2), representada no formato de bastão (*stick*). Em PhaZ1, a tríade ocorre nas posições 180 (Cys-180), 386 (His-386) e 353 (Asp-353). Em PhaZ2, os mesmos resíduos localizam-se nas posições 176 (Cys-176), 382 (His-382) e 349 (Asp-349). As estruturas foram preditas utilizando o programa AlphaFold e a formatação de cores e destaque das tríades catalíticas foram realizadas no software Pymol.

Mutações sitio-dirigidas realizadas em um ou mais resíduos de aminoácidos dos sítios catalíticos das PHB despolimerases de *C. necator* inativam estas enzimas, sugerindo que tais aminoácidos são essenciais para a hidrólise do polímero (KOBAYASHI; SAITO, 2003). O alinhamento das estruturas proteicas de PhaZ1 com PhaZa1, de PhaZ2 com PhaZa2 e PhaZ1 com PhaZ2 revela uma sobreposição da tríade catalítica, conforme indicado na Figura 8. Este resultado sugere que a tríade deve desempenhar funções similares nas diferentes proteínas.

(A)



(B)

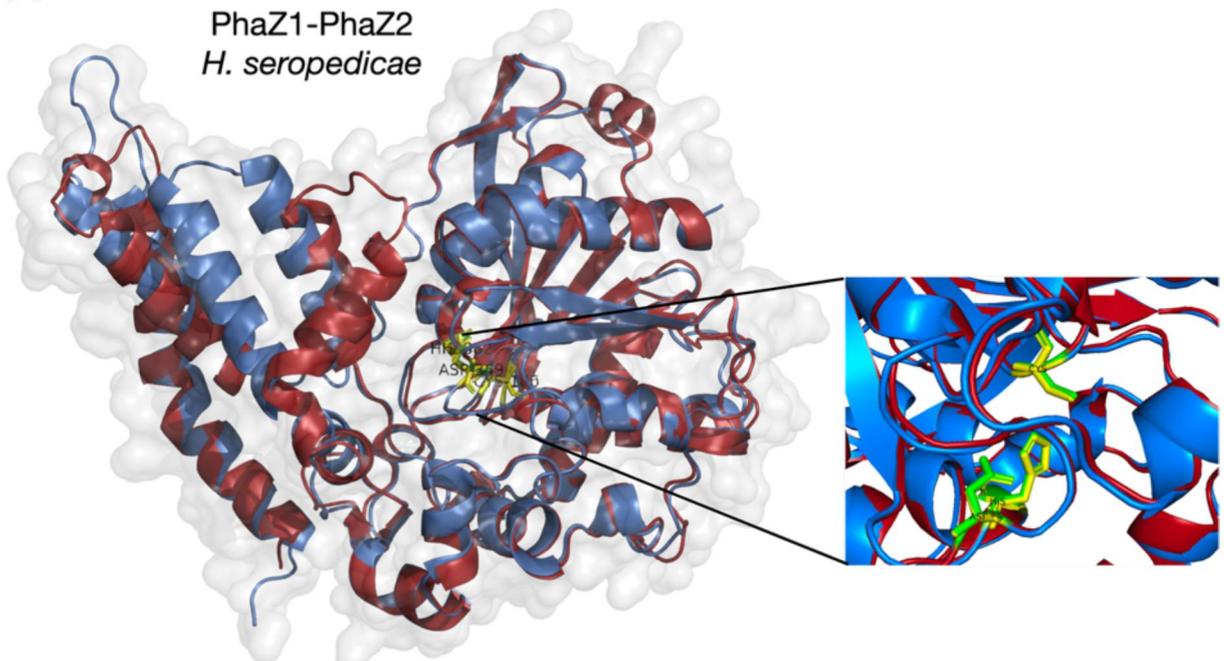


Figura 8. Alinhamento das estruturas terciárias das PHB despolimerases de *C. necator* e *H. seropedicae*. (A) Alinhamento de PhaZ1 (*H. seropedicae*) com PhaZa1 (*C. necator*) e de PhaZ2 (*H. seropedicae*) com PhaZa2 (*C. necator*). (B) Alinhamento das PHB despolimerases de *H. seropedicae* (PhaZ1 e PhaZ2). As estruturas das diferentes despolimerases estão representadas em cores distintas: PhaZ1 (vermelho), PhaZa1 (laranja), PhaZ2 (azul) e PhaZa2 (ciano). A sobreposição estrutural e da tríade catalítica é evidente no alinhamento das proteínas. A tríade catalítica está destacada em cores diferentes para cada proteína: verde (PhaZ1), azul (PhaZa1), amarelo (PhaZ2) e magenta (PhaZa2) (detalhes nos quadros ampliados). O alinhamento das estruturas e a edição das cores foram realizadas com o programa PyMOL.

Como revelado acima, a análise *in silico* das estruturas das PhaZs revelou alta similaridade entre elas, incluindo a conservação do sítio catalítico. Contudo, é importante considerar que as PHB despolimerases interagem fortemente com os grânulos de PHB, o que pode resultar em mudanças conformacionais na estrutura predita devido ao sinergismo grânulo-proteína. Além disso, há evidências de que as PHB despolimerases podem formar oligômeros e interagir com outras proteínas do metabolismo de PHB, principalmente diferentes tipos de fasinias e PhaR (PFEIFFER; JENDROSSEK, 2011). Estudos independentes confirmaram essas análises, demonstrando que as fasinias podem modular a atividade das PHB despolimerases, como observado com PhaZa1 (UCHINO *et al.*, 2007). Desse modo é provável que a estrutura dessas proteínas deve ser bastante flexível, com a conformação variando de acordo com o tipo de interação estabelecida, seja proteína-proteína ou grânulo-proteína.

5.2 PERFIL DE CRESCIMENTO

O padrão de crescimento bacteriano é um parâmetro fundamental na avaliação do metabolismo celular. A taxa de crescimento reflete a capacidade de multiplicação em um ambiente ou meio de cultivo específico, sendo um indicador da aptidão microbiana. Vários genes desempenham funções primordiais à sobrevivência, com os produtos gênicos atuando em vias metabólicas essenciais, divisão celular e outras funções biológicas vitais. A deleção ou modificação desses genes pode afetar o crescimento, resultando em estirpes com perfil de crescimento alterado em comparação com a estirpe selvagem. Desse modo, a comparação do crescimento de mutantes com a estirpe selvagem é fundamental para entender se a deleção afetou a capacidade de crescimento (MAHARJAN *et al.*, 2015; JIN *et al.*, 2012).

Para análise do perfil de crescimento, as estirpes SmR1, $\Delta phaC1$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$, $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ foram cultivadas por 15 horas em meio NFbHPN, com registro das medidas de densidade óptica a 600 nanômetros (DO_{600}) ao longo do tempo. Os valores de DO_{600} obtidos foram plotados no gráfico da Figura 9A. A taxa de crescimento foi determinada após transformação dos dados em \log_{10} e o isolamento dos valores correspondentes à fase de crescimento exponencial (Figura 9B). Uma análise de regressão linear foi realizada para cada estirpe, e os coeficientes angulares, representando à taxa de crescimento específica (representado como K),

foram extraídos. Com base nesses valores, o tempo de duplicação foi calculado. Os dados obtidos estão sumarizados na Tabela 8.

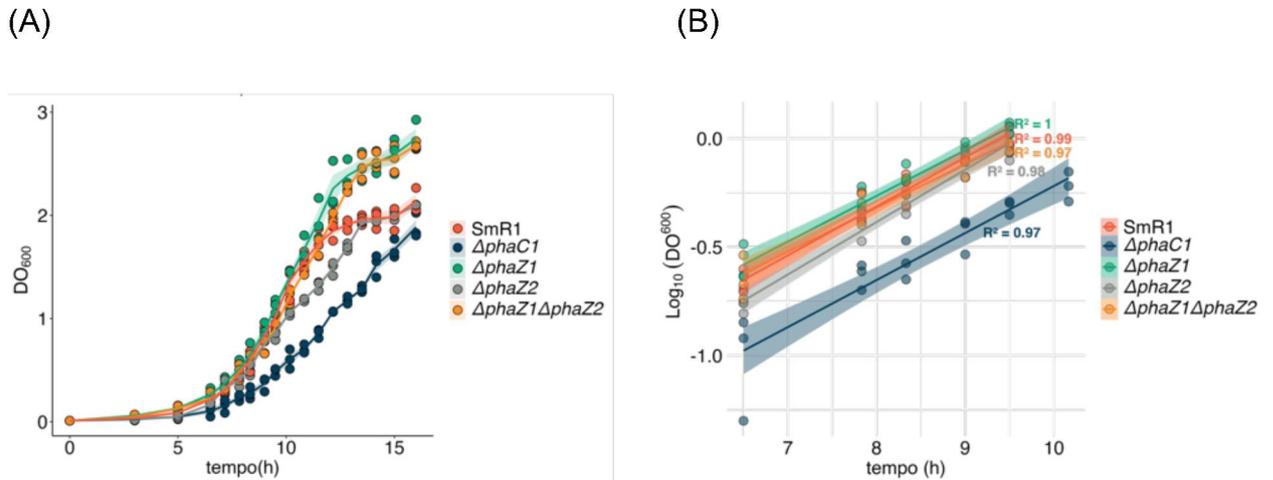


Figura 9. Perfis de crescimento das estirpes de *H. seropedicae*. O gráfico (A) contém as leituras de densidade óptica em função do tempo. Em (B) os valores de DO_{600} foram transformados em \log_{10} e correspondem a fase exponencial de crescimento, plotados em função do tempo. Para cada estirpe foi realizado a análise de regressão linear, os valores do coeficiente angular (K) foram calculados, e correspondem a taxa de crescimento. Os valores dos coeficientes de correlação (R^2) estão indicados no gráfico, conforme o padrão de cores utilizado para cada estirpe. Os pontos plotados em (A) e (B) representam os valores de cada replicata biológica ($n=3$), o desvio padrão entre as amostras está representado em (A) por uma região sombreada em torno da linha que representa a média amostral. A região sombreada no gráfico B indica o intervalo de confiança (IC) de 95% da linha de tendência. Um IC estreito significa maior precisão na estimativa, enquanto um IC mais largo indica maior incerteza.

A taxa de crescimento entre as estirpes foi similar, sendo de $0,23 \text{ h}^{-1}$ na estirpe SmR1 com tempo de duplicação de 1,3 horas. No mutante $\Delta phaC1$ esse valor foi de $0,22 \text{ h}^{-1}$, praticamente idêntico aos mutantes com deleção das PHB despolimerases, onde foram observadas taxas de crescimento de 0,21, 0,24 e 0,2 nas estirpes $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ respectivamente (Tabela 8).

As taxas de crescimento das estirpes mutantes foram comparadas à taxa de crescimento da estirpe SmR1 por meio da análise de variância (ANOVA). Precedendo a análise, os dados foram submetidos à verificação dos pressupostos da ANOVA, demonstrando normalidade, homogeneidade das variâncias e ausência de valores extremos (*outliers*). Ao comparar essas médias na análise de variância, observou-se que essas diferenças não são estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Em resumo, a análise do perfil de crescimento das estirpes de *H. seropedicae* demonstrou que a deleção dos genes *phaC1*, *phaZ1* e *phaZ2* não resultou em alterações significativas na taxa de crescimento específica em comparação à estirpe selvagem SmR1. Contudo, um ponto interessante foi observado ao final da fase

estacionária de crescimento: as estirpes $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ apresentaram densidades ópticas maiores que as demais estirpes. A maior DO_{600} apresentada não implica necessariamente em um maior número de células, mas pode estar relacionada com a maior quantidade de PHB, cujos grânulos são opticamente ativos e podem influenciar as leituras de densidade ópticas (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002).

TABELA 8 – TAXAS DE CRESCIMENTO (K) E TEMPO DE DUPLICAÇÃO EM DIFERENTES ESTIRPES DE *H. seropedicae*

Estirpe	Taxa de crescimento (K) (média \pm SD)	Tempo de duplicação (h) (média \pm SD)
SmR1	0,23 \pm 0,01	1,34 \pm 0,07
$\Delta phaC1$	0,22 \pm 0,05	1,43 \pm 0,31
$\Delta phaZ1$	0,21 \pm 0,02	1,44 \pm 0,15
$\Delta phaZ2$	0,24 \pm 0,003	1,25 \pm 0,01
$\Delta phaZ1\Delta phaZ2$	0,20 \pm 0,03	1,51 \pm 0,22

LEGENDA: \pm SD corresponde ao desvio padrão.

5.3 EFEITO DA DELEÇÃO DOS GENES *phaZ1* E *phaZ2* NA SÍNTESE E MOBILIZAÇÃO DE POLI- β -HIDROXIBUTIRADO EM *H. seropedicae*

5.3.1 Curva padrão de ácido crotônico

A quantificação de PHB em amostras de *H. seropedicae* foi realizada com base no perfil cromatográfico de amostras conhecidas, as quais foram utilizadas para construção de uma curva de calibração, com base na área sob a curva, conforme descrito em Materiais e Métodos, tópico 4.5.2.

Os cromatogramas correspondentes às concentrações utilizadas para a construção da curva de calibração estão plotados no gráfico da Figura 10A. Os valores de unidades de mili-absorbância (unidade arbitrária) foram plotados em função do tempo de retenção (minutos). Amostras com concentrações mais elevadas de ácido crotônico geram curvas cromatográficas com áreas maiores e picos mais altos. Para cada curva, foi calculada a área do pico (AUC) e está diretamente relacionada à concentração de ácido crotônico. Os valores obtidos foram plotados em relação à respectiva concentração de ácido crotônico, conforme ilustrado na Figura 10B. A partir desse gráfico, foi realizada uma análise de regressão linear; o valor de R^2 e a equação da reta estão mostrados no gráfico. A equação foi utilizada para converter valores de AUC em concentrações de ácido crotônico desconhecidas nas amostras de *H.*

seropedicae. Dessa forma, os gráficos da Figura 10 demonstram como a curva de calibração é obtida para cada replicata biológica na quantificação de PHB por HPLC.

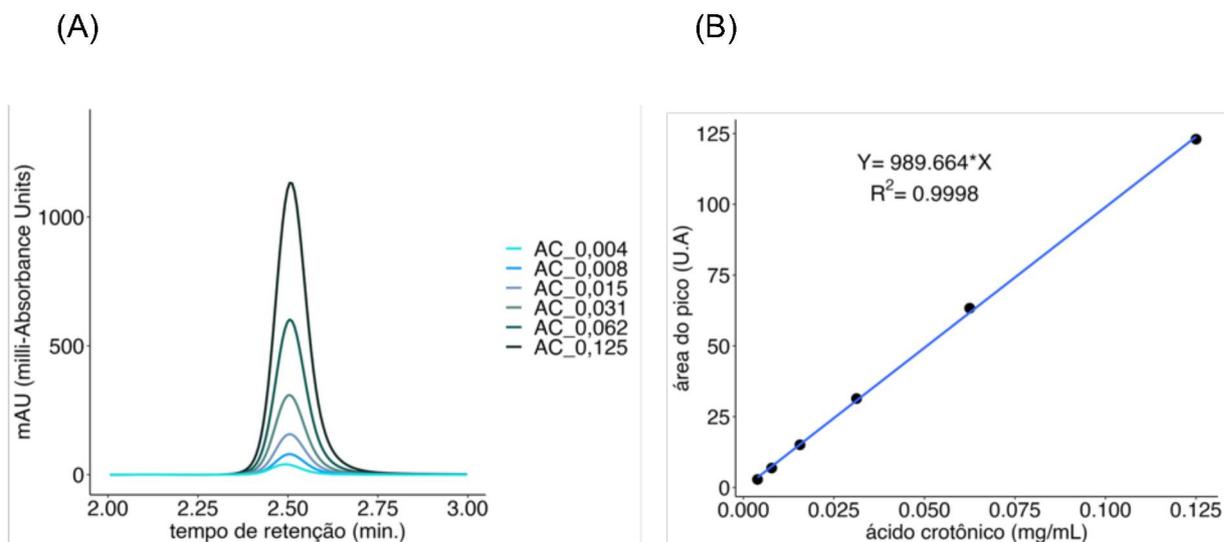


Figura 10. Curva de calibração do ácido crotonico. (A) cromatogramas sobrepostos, mostrando os picos correspondentes às amostras com diferentes concentrações de ácido crotonico. O eixo X representa o tempo de retenção (em minutos), e o eixo Y representa a absorvância em miliunidades (mAU), medida no comprimento de onda de 210 nm. (B) gráfico da área área sob a curva (AUC) de cada pico cromatográfico em função da concentração de ácido crotonico ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). A linha representa a regressão linear dos dados, com a equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2) indicados.

5.3.2 Efeito da alta concentração de íons amônio sobre a síntese e mobilização de Poli- β -Hidroxi-butirado em *H. seropedicae*.

As estirpes SmR1, ΔphaC1 , ΔphaZ1 , ΔphaZ2 , $\Delta\text{phaZ1}\Delta\text{phaZ2}$ foram cultivadas em meio NFbHPN (NH_4Cl 20 mmol/L) por 24 horas. Nesse período, o crescimento foi monitorado através de leituras da densidade óptica a 600 nm, além de coleta periódica de amostras para quantificação de PHB por HPLC. Em relação ao crescimento, nota-se um padrão inicial bastante homogêneo. No entanto, após 10 horas de cultivo, o mutante $\Delta\text{phaZ1}\Delta\text{phaZ2}$ apresentou uma densidade óptica consistentemente superior às demais estirpes, permanecendo assim até o final do experimento. Essa característica também ocorre com ΔphaZ1 , em que se observa uma DO_{600} maior que SmR1, ΔphaC1 e ΔphaZ2 , mas inferior aos valores de densidade óptica do duplo mutante. Ao final (24 h), a diferença de DO_{600} entre SmR1 e $\Delta\text{phaZ1}\Delta\text{phaZ2}$ foi de 0,3, enquanto entre ΔphaZ1 e $\Delta\text{phaZ1}\Delta\text{phaZ2}$ foi de 0,15, o mesmo valor observado entre SmR1 e ΔphaZ1 (Figura 11 A).

Esses resultados sugerem que a deleção de *phaZ1* pode impactar a densidade óptica em experimentos onde as estirpes são cultivadas por períodos superiores a 12 horas. Essa observação é corroborada pelos experimentos da curva de crescimento (Figura 9A) onde $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ apresentaram um padrão idêntico entre 10 e 16 horas. Uma possível explicação é que esses mutantes acumulam PHB, cujos grânulos, por serem opticamente ativos, podem interferir nas leituras de densidade óptica. Esse fator será explorado mais adiante neste estudo.

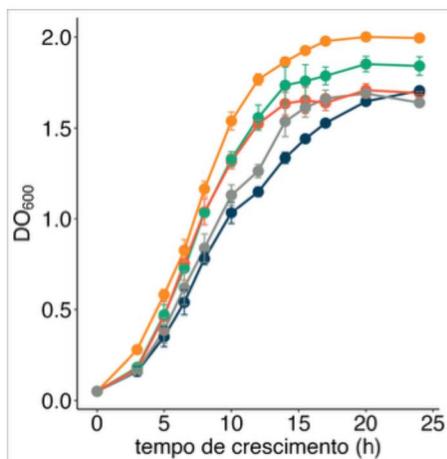
A síntese e a mobilização de polihidroxibutirato em *H. seropedicae* foram analisadas na estirpe selvagem SmR1 e em mutantes dos genes *phaC1*, *phaZ1*, *phaZ2* e no duplo mutante $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$. O estudo teve um foco particular no processo de degradação, uma vez que os mutantes utilizados estão relacionados à mobilização de PHB. As amostras para quantificação de PHB foram coletadas nos períodos de crescimento correspondente a 5, 10, 12, 14, 17, 20 e 24 horas de crescimento. Essas amostras foram processadas, conforme descrito em Materiais e Métodos (tópico 4.5.1) e, em seguida, analisadas por HPLC.

A técnica de quantificação do polímero por HPLC em *H. seropedicae* mostrou-se bastante robusta, sendo possível detectá-lo mesmo nas fases iniciais de cultivo. Na estirpe SmR1, o polímero foi quantificado após 5 horas de cultivo, com concentração de 9% do peso seco em miligramas (mg); essa quantidade aumentou e atingiu o máximo depois de 12 horas, com concentração de 21% do peso seco (Figura 11B). A quantificação da taxa de síntese de PHB nessa estirpe foi calculada no intervalo de 0 a 12 horas de cultivo e foi estimada em 1,86 (%PHB.h⁻¹), de acordo com um modelo linear (Tabela 9). Esse modelo se mostrou o mais adequado, obtendo-se um R² de 1. Em comparação com análise utilizando um modelo de decaimento exponencial (não mostrado), o modelo linear se mostrou novamente o mais adequado.

O período que compreende a degradação foi definido como aquele em que, após atingir a quantidade máxima, a concentração de PHB começa a diminuir ao longo do tempo. Na estirpe SmR1, isso foi verificado após 14 horas de cultivo, quando a análise mostrou uma queda de aproximadamente 4% no PHB acumulado. Ao associar essas informações à fase de crescimento, observamos que, quando a concentração de PHB foi máxima, a DO₆₀₀ foi de 1,5, indicando o início da fase estacionária. A diminuição do polímero armazenado duas horas depois sugere que a estirpe SmR1 inicia a mobilização do polímero em fase tardia do crescimento, possivelmente entre o meio e o final da fase estacionária. Análises posteriores revelaram que a degradação

do PHB acumulado prosseguiu ininterruptamente, resultando em uma concentração de 3,5% do peso seco após 24 horas. A estimativa da taxa de degradação em SmR1 foi realizada no intervalo de 12 a 24 horas, compreendendo um tempo total de 12 horas de análise. Para facilitar a análise, o período de 12 a 24 horas foi redefinido, onde 12 horas passou a ser considerado o tempo 0 e 24 horas passou a ser 12 horas (Figura 12B). A média entre as taxas de degradação de três replicatas biológicas analisadas foi de $-1,5$ (%PHB.h⁻¹, Tabela 10). A taxa de degradação é negativa porque representa uma diminuição na quantidade de PHB ao longo do tempo. Em um modelo linear, a taxa de degradação é calculada como a inclinação da linha de regressão que relaciona a quantidade de PHB ao tempo.

(A)



(B)

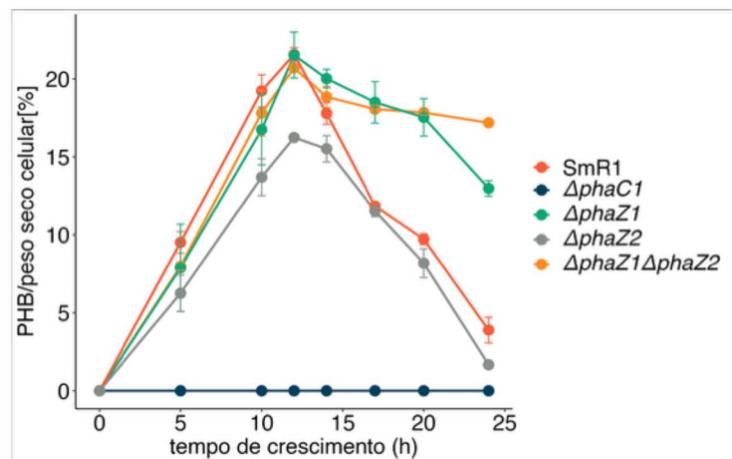


Figura 11. Padrão de crescimento (A) e quantificação de PHB em estirpes de *H. seropedicae* (B). As estirpes SmR1, $\Delta phaC1$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ foram cultivadas por 24 horas em meio NFbHPN. O crescimento durante esse período foi monitorado através de leituras da DO_{600} , conforme indicado no gráfico (A). A quantificação de PHB realizada ao longo do tempo (B) está representada como porcentagem de PHB em relação ao peso seco celular (miligramas). A barra de erros refere-se ao desvio padrão entre as replicatas. As estirpes foram cultivadas por 24 horas em meio NFbHPN sob agitação orbital de 120 rpm. As leituras de DO_{600} foram realizadas em cubetas com 1 mL de cultivo em espectrofotômetro Thermo Helios Alpha UV/Vis. As concentrações de PHB foram determinadas por HPLC em equipamento VWR® Chromaster (HITACHI).

(A)

(B)

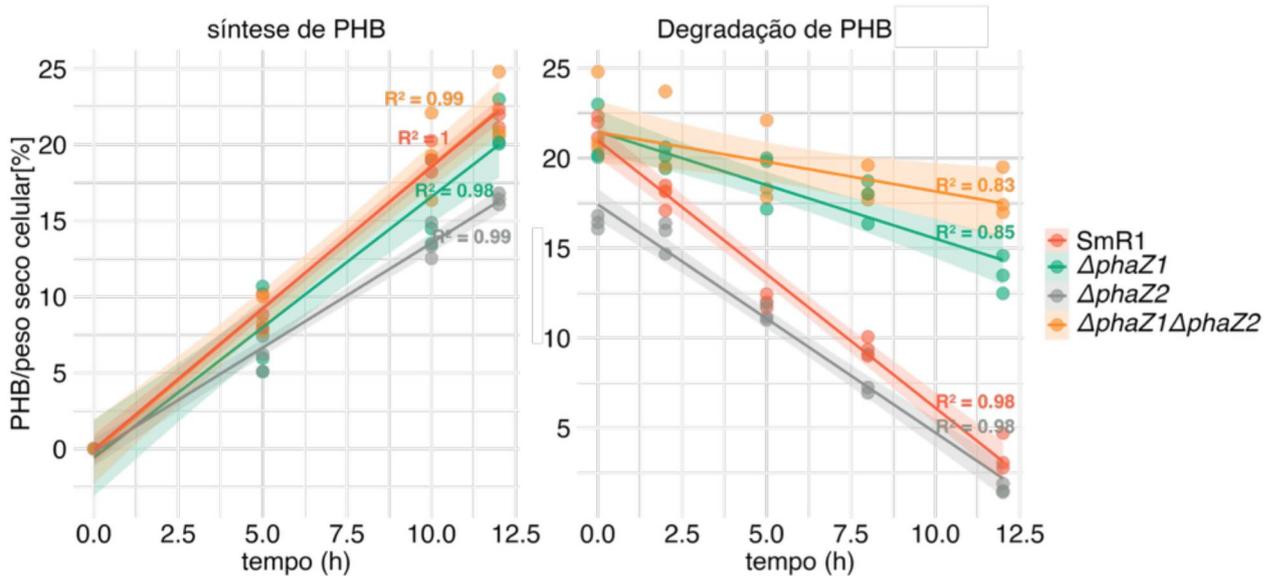


Figura 12. Análise de regressão linear para estimativa das taxas de síntese e degradação de PHB. Nesta análise, um modelo de regressão linear foi utilizado para ajustar linhas de tendência aos dados de cada estirpe. Os pontos no gráfico representam as medições individuais de PHB em cada intervalo de tempo e replicata biológica ($n = 3$). As linhas coloridas mostram as regressões lineares ajustadas, representando a tendência média de síntese (A) ou degradação (B). As áreas sombreadas ao redor das linhas de tendência indicam os intervalos de confiança (IC) de 95%, ou seja, mostra a variabilidade associada a estimativa de cada linha de tendência.

TABELA 9 – *p*-VALUE E TAXAS DE SÍNTESE DE PHB EM ESTIRPES DE *H. seropedicae*

estirpe	taxa de síntese de PHB (média \pm desvio padrão)	Valor de <i>p</i> (comparado com SmR1)
SmR1	1,86 \pm 0,07	-
Δ phaZ1	1,72 \pm 0,15	0,62
Δ phaZ2	1,38 \pm 0,02	0,01*
Δ phaZ1 Δ phaZ2	1,88 \pm 0,22	0,99

LEGENDA: Teste Tukey HSD, realizado após ANOVA, com comparação de médias e nível de confiança simultâneo de 95%. Significância estatística referentes aos valores de *p*: * $p < 0,05$.

TABELA 10 – *p*-VALUE E TAXAS DE DEGRADAÇÃO DE PHB EM ESTIRPES DE *H. seropedicae*

estirpe	taxa de degradação de PHB (média \pm desvio padrão)	Valor de <i>p</i> (comparado com SmR1)
SmR1	-1,49 \pm 0,12	-
Δ phaZ1	-0,59 \pm 0,17	0,0008 ***
Δ phaZ2	-1,27 \pm 0,10	0,26
Δ phaZ1 Δ phaZ2	-0,33 \pm 0,13	2,4 $\times 10^{-5}$ ***

LEGENDA: Teste Tukey HSD, realizado após ANOVA, com comparação de médias e nível de confiança simultâneo de 95%. Significância estatística referentes aos valores de *p*: *** $p < 0,001$.

As concentrações de PHB obtidas na estirpe SmR1 estão em conformidade com as análises realizadas por Tirapelle *et al.*, (2013) com essa mesma estirpe. No artigo publicado, a quantificação de PHB na estirpe SmR1 foi feita através de cromatografia gasosa, diferente do método usado nesse projeto. Apesar das diferenças metodológicas, os valores obtidos foram similares: 3% após 6 horas de

cultivo, 18% em 10 horas e 0% do peso seco após 24 horas. É importante ressaltar que, no referido trabalho, não houve quantificação do polímero no intervalo de tempo entre 10 a 24 horas. Assim, as quantificações de PHB realizadas em intervalos de tempo menores, permitiram uma melhor compreensão do processo de degradação do PHB na estirpe selvagem.

A comparação da síntese de PHB nos mutantes $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$, em relação a estirpe SmR1, demonstra um padrão bastante similar, com diferenças menos acentuadas. Esses mutantes apresentam taxas de síntese similares a SmR1, sendo 1,7 em $\Delta phaZ1$ e 1,9 no duplo mutante (Tabela 9). A variação que pode ser destacada foi aquela relacionada com a estirpe $\Delta phaZ2$, onde se nota uma menor quantidade de PHB acumulado após 12 horas de cultivo, correspondendo a 16% do peso seco celular. Esse valor também foi inferior em relação a $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$, com uma concentração de 21 e 22% do peso seco, respectivamente. Isso sugere que a ausência da PHB despolimerase 2 está associada a uma diminuição no acúmulo de PHB. É possível que esse efeito seja ainda mais evidente em condições de cultivo que favorecem a produção de grandes quantidades de PHB, como aquelas em que há limitação de NH_4Cl .

Ao comparar a taxa de síntese de $\Delta phaZ2$ com SmR1 (1,86), notamos que esse mutante apresenta um menor valor (1,38). Esse valor apresenta significância estatística em comparação de médias (ANOVA e teste Tukey, $p = 0,01$), conforme indicado na Tabela 9. Entretanto, as taxas de síntese foram estimadas com base em uma quantidade limitada de dados, com apenas 3 pontos nas fases de crescimento onde há síntese do polímero (intervalo 5 a 12 horas). Desse modo, a interpretação das taxas de síntese deve ser feita com cautela.

As análises de mobilização de PHB nos mutantes, em comparação à SmR1, demonstram variações acentuadas. No mutante $\Delta phaZ1$, a degradação é fortemente impactada, de modo que entre 12 e 20 horas de cultivo, a diminuição na quantidade do polímero foi de apenas 3,4%, enquanto em SmR1, no mesmo período, a redução foi de 12,3%. Uma diminuição maior só foi observada entre 20 e 24 horas, com uma redução de 4%, caindo de 17,7% para 13,5% do peso seco (Figura 11).

No mutante $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$, o PHB acumulado atingiu 22% do peso seco em 12 horas de cultivo e permaneceu praticamente estável, com uma concentração de 18% após 24 horas. Considerando possíveis variações experimentais, pode-se inferir

que a mobilização de PHB nessa estirpe é praticamente nula. Em contraste, o padrão de mobilização de PHB no mutante $\Delta phaZ2$ foi similar ao da estirpe SmR1, principalmente porque quase todo o PHB acumulado foi degradado entre 12 horas e 24 horas, com redução de 16% para 1,6% do peso seco nesse intervalo. Embora tenha sido similar, a taxa de degradação no mutante $\Delta phaZ2$ foi levemente inferior em comparação com a estirpe selvagem, não sendo significativo em relação a SmR1 na análise estatística.

A comparação das taxas de degradação entre as estirpes (Tabela 10) revela uma tendência de diminuição da quantidade de PHB ao longo do tempo, indicando a degradação do polímero. As linhas de tendência (linhas coloridas, Figura 12) com inclinação descendente confirmam essa observação. No entanto, a inclinação das linhas varia entre as estirpes, sugerindo diferentes taxas de degradação. De fato, essa hipótese foi confirmada: a estirpe SmR1 apresenta a maior taxa de degradação (-1,5), seguida por $\Delta phaZ2$ (-1,3). Já nos mutantes com deleção de *phaZ1*, as taxas são menores, indicando uma degradação mais lenta, sendo de -0,6 em $\Delta phaZ1$ e de -0,3 no mutante $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$. A análise estatística por meio de ANOVA e teste de Tukey confirmou que as diferenças nas taxas de degradação são significativas entre SmR1 e os mutantes $\Delta phaZ1$ ($p = 0,0008$) e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ ($p = 2,4 \times 10^{-5}$). Por outro lado, não há diferença significativa entre SmR1 e $\Delta phaZ2$ ($p = 0,26$), indicando que PhaZ1 é a principal enzima envolvida na degradação do PHB.

As análises de quantificação de PHB por HPLC foram corroboradas por microscopia de fluorescência, conforme análise realizada nas três fases de crescimento: exponencial, estacionária e declínio ou morte (Figura 13). As estirpes foram coradas com o fluóforo Bodipy, que se liga especificamente aos grânulos de PHB. Consequentemente, emitem fluorescência na cor verde quando excitados em um comprimento de onda de 493 nm, com a emissão ocorrendo em 503 nm.

Na estirpe SmR1, o PHB é sintetizado e se acumula ao longo da fase exponencial. Isso é demonstrado nas análises de microscopia pela variação no tamanho e quantidade de grânulos de PHB entre as fases de crescimento. Na fase estacionária, as células apresentam grânulos maiores e mais uniformes em comparação com a fase exponencial. Na fase de declínio, a quantidade por célula diminui, com os grânulos remanescentes sendo relativamente menores. Um padrão similar é observado na estirpe $\Delta phaZ2$. Por outro lado, nos mutantes $\Delta phaZ1$ e

$\Delta phaZ1\Delta phaZ2$, os grânulos na fase de declínio são maiores que SmR1 e $\Delta phaZ2$, uma vez que ocupam quase todo o espaço intracelular. A estirpe $\Delta phaC1$ não produz PHB e foi usada como controle negativo, demonstrando a ausência de grânulos de PHB.

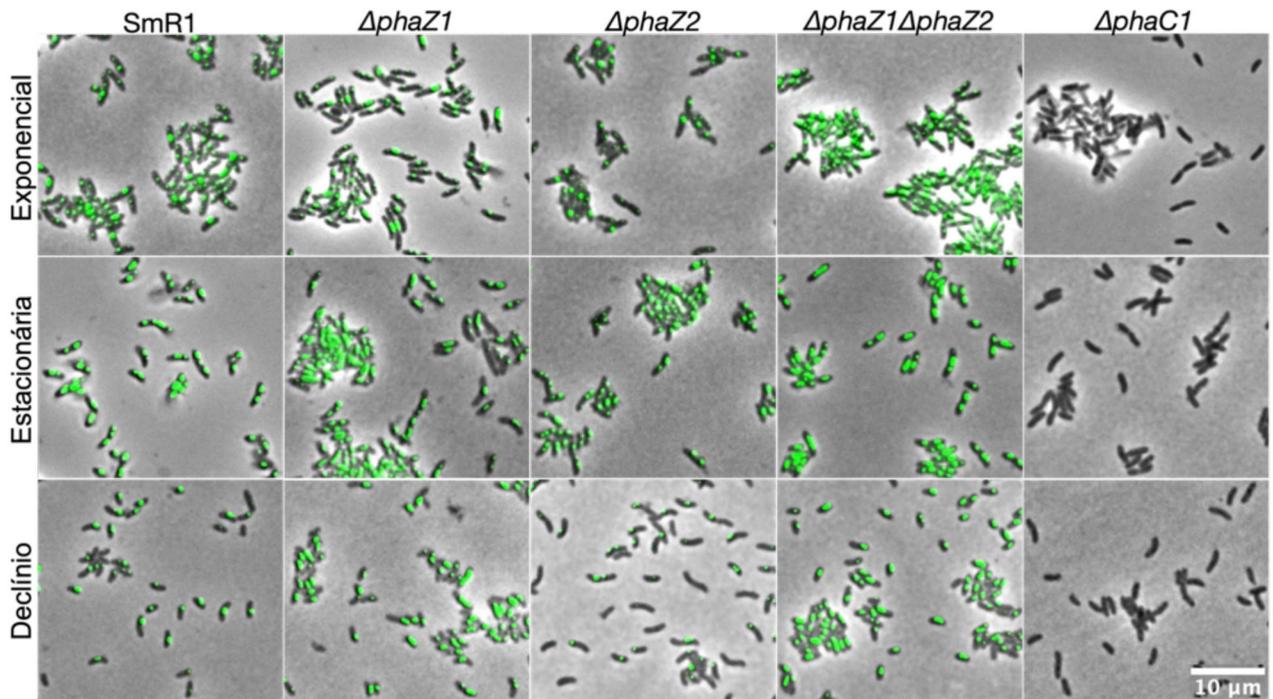


Figura 13. Microscopia de fluorescência de grânulos de PHB em estirpes de *H. seropedicae*. A análise foi realizada em três fases de crescimento: exponencial (6 horas de cultivo), estacionária (10 horas) e declínio (15 horas de cultivo). A visualização dos grânulos de PHB foi realizada após o tratamento das células com o fluóforo BODIPY e análise por microscopia de fluorescência. Para cada estirpe, foram processadas quatro imagens, registradas após análise das amostras em microscópio Leica DM5500 B com o iluminador Leica CTR 5500. A aquisição de imagens foi feita com câmera integrada Leica DFC 360 FX e os ajustes de configuração com software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (4.0). As imagens obtidas foram analisadas com software Fiji. A barra de escala com 10 μm está indicada na imagem.

Em síntese, os resultados de mobilização de PHB sob cultivo com 20mM de NH_4Cl indicam que, nessas condições, PhaZ1 é a principal PHB despolimerase de *H. seropedicae*. Essa proteína atua degradando o polímero acumulado após 12 horas de cultivo, ou quando atinge o final da fase exponencial de crescimento. Observa-se que essa mobilização parece ser contínua, conforme observado no intervalo de 12 a 24 horas de cultivo nas estirpes SmR1 e $\Delta phaZ2$.

Em relação a degradação de PHB por PhaZ2, os dados sugerem que a degradação é mais lenta em comparação à PhaZ1. Embora, a taxa de mobilização de PHB por PhaZ2, observada no mutante $\Delta phaZ1$ seja superior aquela observada no duplo mutante $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$, a análise estatística não demonstrou variação significativa entre essas estirpes.

As estirpes $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ apresentaram DO_{600} ligeiramente mais alta que as demais estirpes após 12 horas de cultivo. Essa característica pode estar associada à maior quantidade de PHB nas células desses mutantes, pois há evidências de que o PHB pode interferir na densidade óptica, conforme observado em *Burkholderia thailandensis* e *C. necator* (MARTINEZ; DÉZIEL, 2020; SLANINOVA *et al.*, 2018).

Em todos os experimentos, a estirpe $\Delta phaC1$ foi utilizada como controle negativo uma vez que não produz PHB (BATISTA *et al.*, 2018; TIRAPELLE *et al.*, 2013). A taxa de crescimento dessa estirpe é similar às demais durante a fase exponencial de crescimento, mas após esse período, a DO_{600} observada foi menor, principalmente no intervalo de tempo de 12 a 17 horas de cultivo. Essa distinção na DO_{600} de $\Delta phaC1$ coincide com o período em que as demais estirpes acumularam PHB. Ao comparar com as estirpes $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ que mantiveram uma alta quantidade de PHB intracelular, notamos que a DO_{600} de $\Delta phaC1$ foi sempre menor após a fase exponencial de crescimento. Isso reforça a necessidade de investigar se o PHB acumulado interfere na DO_{600} em *H. seropedicae*.

Desse modo, o padrão de mobilização de PHB nas estirpes de *H. seropedicae* está de acordo com experimentos de quantificação de PHB já realizados por citometria de fluxo (MOTA, 2020). Entretanto, a técnica usada anteriormente apresentava limitações, sendo as principais a impossibilidade em analisar quantitativamente o polímero presente nas células e o fato de o fluoróforo usado (vermelho Nilo) ligar-se inespecificamente a outras moléculas além do PHB, como lipídeos neutros (ALVES *et al.*, 2017). Consequentemente, mesmo estirpes que não produzem polihidroxibutirato, como $\Delta phaC1$, apresentam fluorescência. Além disso, as tentativas de analisar a fluorescência do vermelho Nilo em células cultivadas por longos períodos mostraram-se inviáveis, principalmente devido à presença de grandes quantidades de partículas (*debris*) que interferiam nas análises. Todas essas limitações foram superadas pelas quantificações do PHB por HPLC nas mesmas estirpes.

5.3.3 Efeito da concentração limitante de íons amônio sobre a síntese e mobilização de Poli- β -Hidroxi-butirato em *H. seropedicae*.

Em *H. seropedicae*, a síntese de PHB é maximizada quando a bactéria é cultivada em meio NFbHPLN (HPLN, abreviação de *High Phosphate Low nitrogen*). Esse meio contém malato 37 mmol/L, solução de fosfatos (K_2HPO_4 (17,8 g/L) e KH_2PO_4 (159,5 g/L) e 2 mmol/L de NH_4Cl como fonte de nitrogênio. Apesar do crescimento ser limitado nesse meio, a alta relação carbono-nitrogênio (C/N) favorece o direcionamento do excesso de carbono para vias metabólicas que levam ao acúmulo de polihidroxi-butirato.

As estirpes SmR1, $\Delta phaC1$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ foram cultivadas em meio NFbHPLN por 24 horas. A análise do crescimento mostrou que não houve diferenças notáveis na densidade óptica nas primeiras 5 horas de cultivo, mas isso mudou nas 19 horas subsequentes. Na estirpe SmR1, a DO_{600} atingiu 0,5 em 5 horas de cultivo, após 10 horas a densidade óptica foi de 0,8 e chegou a 0,95 em 24 horas (Figura 14). Esse padrão de crescimento foi similar no mutante $\Delta phaZ1$, mas não nas estirpes com deleção de *phaZ2* ($\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$). Apesar da densidade óptica ter atingido 0,5 após 5 horas, ela não aumentou tanto quanto SmR1 e $\Delta phaZ1$. Após 10 horas, o valor observado foi de 0,6 em $\Delta phaZ2$ e 0,7 em $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$. Esses valores permaneceram constantes até 24 horas de cultivo.

No mutante $\Delta phaC1$, a densidade óptica foi menor em comparação com as outras estirpes. Após 5 horas de crescimento, a DO_{600} atingiu 0,4 e se manteve praticamente estável até o final do cultivo, quando foi registrada uma DO_{600} de 0,37. Isso representa uma diferença de quase 0,6 em relação à SmR1 e $\Delta phaZ1$ após 24 horas de cultivo e de cerca de 0,4 em comparação com $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$. Essa variabilidade é diferente da condição de cultivo em 20 mM de NH_4Cl , onde a DO_{600} não apresenta grandes diferenças.

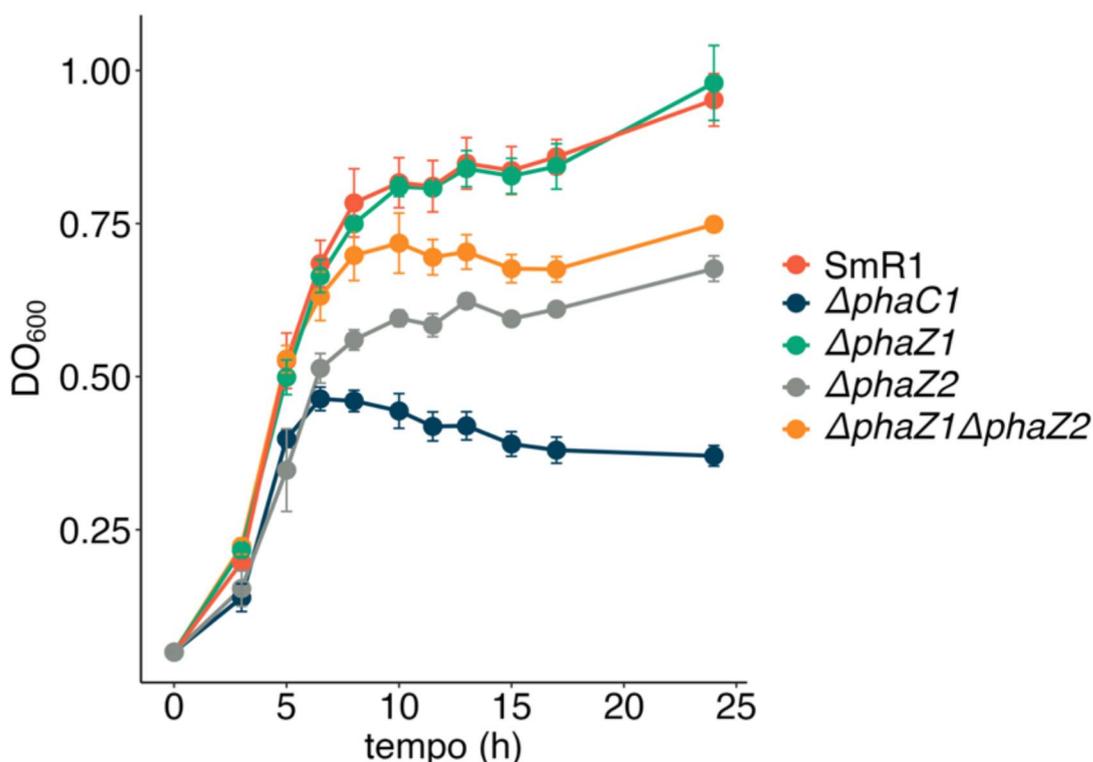


Figura 14. Padrão de crescimento de estirpes de *H. seropedicae* em cultivo com limitação de NH_4Cl . O gráfico apresenta os valores de DO_{600} obtidos durante o cultivo por 24 horas. Observe que a densidade óptica é similar entre as estirpes nas primeiras 10 horas de cultivo. Após esse período, os valores de DO_{600} de SmR1 e $\Delta phaZ1$ aumentam progressivamente com valores similares. Em contraste $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ possuem valores menores que SmR1, mas superior ao mutante $\Delta phaC1$. Os valores plotados correspondem à média de 3 experimentos independentes, com a barra de erros indicando o desvio padrão. As estirpes foram cultivadas em meio NFbHPLN sob agitação orbital de 120 rpm. As leituras de DO_{600} foram realizadas em cubetas de 1 mL em espectrofotômetro Thermo Helios Alpha UV/Vis.

A determinação do PHB acumulado foi essencial para a compreensão do padrão de densidade óptica das estirpes cultivadas em 2 mM de NH_4Cl . As estirpes com maiores densidades ópticas, SmR1 e $\Delta phaZ1$, foram as que mais acumularam PHB, atingindo 45% e 44% do peso seco, respectivamente. Nos mutantes $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$, a quantidade de PHB acumulado foi menor, com 30% e 32% do peso seco, respectivamente (Figura 15A).

Comparando os gráficos de DO_{600} e de quantificação de PHB, notamos um padrão: as estirpes com maiores concentrações de PHB também apresentaram maior DO_{600} . As estirpes com menor concentração intracelular do polímero apresentaram densidade ópticas com valores intermediários. O mutante $\Delta phaC1$, incapaz de sintetizar PHB, apresentou a menor densidade óptica. Esses resultados reforçam que o PHB acumulado pode interferir na DO_{600} das estirpes de *H. seropedicae*.

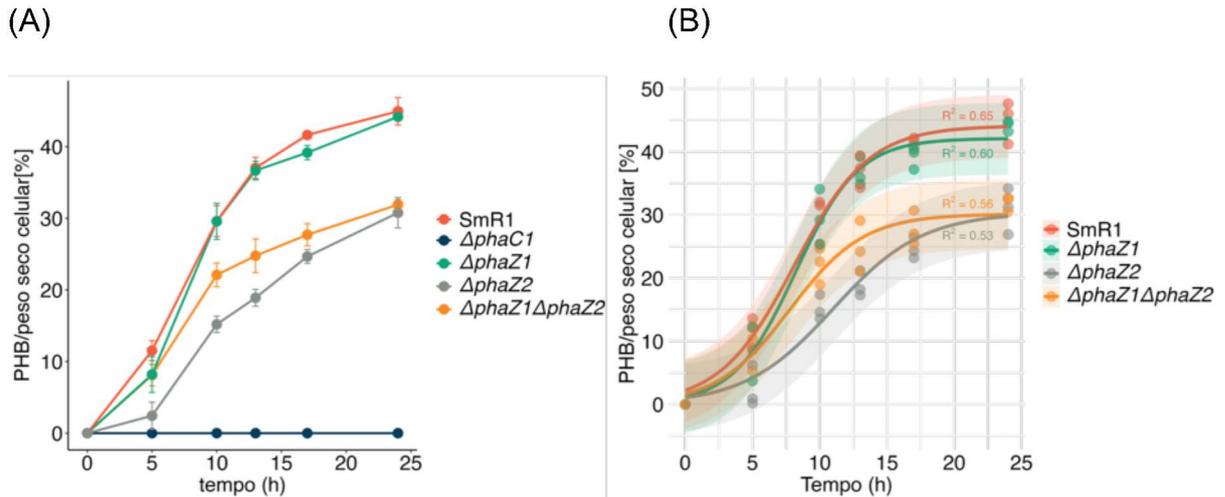


Figura 15. Quantificação e modelagem do acúmulo de PHB em estirpes de *H. seropedicae* cultivadas com limitação de NH_4Cl . Em (A), concentrações de PHB (% PHB em relação ao peso seco celular) em função do tempo. A estirpe SmR1 e o mutante $\Delta phaZ1$ possuem as maiores concentrações de PHB, diferente dos mutantes com deleção de *phaZ2* que acumulam menores quantidades do polímero. Em (B), curvas de ajuste do modelo logístico aos dados experimentais (pontos), com a qualidade do ajuste descrita pelo pseudo R^2 (R^2 de MacFadden) e as regiões sombreadas ao redor das linhas de ajuste indicando os intervalos de confiança de 95%. Os valores plotados correspondem à média de 3 experimentos independentes, com as barras de erro representando o desvio padrão. As estirpes foram cultivadas em meio NFbHPLN sob agitação orbital de 120 rpm por 24 horas.

O modelo linear se mostrou adequado para calcular as taxas de síntese de PHB nas estirpes cultivadas em meio NFbHPN, mas não para estimar as taxas das mesmas estirpes cultivadas em meio NFbHPLN (ver comparação em Anexos, tópico 8.1). As taxas de síntese de PHB foram estimadas com base na função logística. Esse modelo é comumente utilizado para descrever fenômenos de crescimento que inicialmente crescem exponencialmente, mas que depois se estabilizam ao atingir um limite máximo. A equação logística adaptada para estimar as taxas de síntese de PHB é:

$$PHB(t) = \frac{PHB_{max}}{1 + e^{-k(t-t_0)}}$$

Para verificar se os dados experimentais se ajustavam a equação, foi utilizado o algoritmo *nlsLM* (*nonlinear least squares Levenberg-Marquardt*) do pacote de análises *minpack.lm* desenvolvido para o software R (ELZHOV *et al.*, 2023). Esse algoritmo estima os valores para os três parâmetros da equação (PHB_{max} , k e t_0) com base nos dados experimentais. Essa estimativa de valores para os parâmetros minimiza a soma dos quadrados dos resíduos, ou seja, seleciona os valores que minimizam a soma da diferença entre os valores experimentais e os valores ajustados

pelo algoritmo. Assim, o algoritmo modela valores, que são utilizados na equação para ajustar curvas aos dados experimentais. Essa é uma etapa dinâmica que envolve iteração, refinamento e convergência, uma vez que o algoritmo modela várias curvas de ajuste aos dados experimentais, os valores que geram uma curva que melhor minimizar os resíduos quadrados será apresentada como a curva de ajuste aos dados experimentais.

A modelagem de valores e a respectiva aplicação desses valores na equação do crescimento logístico, gerou curvas com um bom ajuste aos dados experimentais (Figura 15B). Isso permitiu descrever através de uma equação matemática os dados obtidos nos experimentos de quantificação de PHB sob condições de cultivo com limitação de NH_4Cl . Além disso permitiu estimar os valores para os parâmetros da equação, sendo um dos parâmetros a taxa de síntese de PHB (k). O parâmetro t_0 não representa o tempo inicial, mas o ponto no tempo em que a concentração de PHB atinge metade da capacidade de carga. Este ponto coincide com o ponto de inflexão na curva de acúmulo de PHB. No ponto de inflexão, a taxa de síntese de PHB muda de aceleração para desaceleração. Portanto, t_0 fornece informações valiosas sobre o momento dessa mudança crítica na dinâmica de acúmulo de PHB, oferecendo *insights* sobre o momento do tempo de cultivo em que o acúmulo de PHB sofre influência de restrições ambientais/nutricionais.

As curvas de ajuste apresentaram um comportamento similar aos dados experimentais de quantificação de PHB, refletindo o comportamento biológico observado e permitindo a estimativa dos valores referente as taxas de síntese (Tabela 11). As estirpes de *H. seropedicae* cultivadas sob condições de limitação de nitrogênio exibiram taxas de síntese de PHB distintas. Na estirpe SmR1 a taxa de síntese foi de 0,38. As demais estirpes, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$, exibiram taxas, com valores de 0,45, 0,32 e 0,36, respectivamente.

TABELA 11 – PARÂMETROS DA EQUAÇÃO DA FUNÇÃO LOGÍSTICA PARA ESTIMAR AS TAXAS DE SÍNTESE DE PHB EM ESTIRPES DE *H. seropedicae* CULTIVADAS EM 2 mM DE NH_4Cl

estirpe	PHB _{max}	k	t ₀ *
SmR1	44,4 ± 1,8	0,38 ± 0,06	8,2 ± 0,8
$\Delta phaZ1$	42,1 ± 0,4	0,45 ± 0,06	8,2 ± 0,7
$\Delta phaZ2$	30,7 ± 2,7	0,32 ± 0,07	11,1 ± 1,0
$\Delta phaZ1\Delta phaZ2$	30,6 ± 1,0	0,36 ± 0,07	8,0 ± 0,9

LEGENDA: *t₀ - tempo em que a taxa de síntese de PHB é máxima, ou o ponto de inflexão da curva logística.

A análise dos parâmetros de acúmulo de PHB revelou diferenças marcantes entre a estirpe selvagem (SmR1) e os mutantes ($\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$, $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$). A capacidade máxima de acúmulo é inferior em $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$, com as concentrações atingindo cerca de 31% do peso seco (ver PHB_{max} , Tabela 11). Por outro lado, $\Delta phaZ1$ apresentou valores mais próximos à SmR1, em termos da concentração máxima de PHB. Em relação as taxas de síntese de PHB, esta foi maior em $\Delta phaZ1$, indicando uma aceleração na síntese de PHB, enquanto $\Delta phaZ2$ teve a menor taxa e um atraso no tempo para atingir o ponto de inflexão (t_0), demonstrando uma deficiência na dinâmica de síntese de PHB. Desse modo, essa análise indica que a deleção de *phaZ2* foi a mais prejudicial ao acúmulo de PHB, enquanto *phaZ1* demonstrou impacto mínimo, sugerindo que sob cultivo com limitação de NH_4^+ *phaZ2* desempenha um papel importante para o metabolismo de PHB.

A análise dos parâmetros da equação logística das estirpes cultivadas com limitação de NH_4^+ indicou que a deleção de *phaZ2* afeta o acúmulo de PHB. Resultados de expressão gênica previamente publicados demonstraram que essas condições favorecem a expressão de *phaZ2* (BONATO *et al.*, 2024). Desse modo, essa análise complementa esse estudo, mostrando que o metabolismo de PHB é um fator fisiológico diretamente afetado pela expressão diferencial desse gene.

A evidência de que PhaZ2 é necessária para otimização do acúmulo de PHB em *H. seropedicae* contraria os principais estudos publicados envolvendo a deleção de PHB despolimerases. Em geral, quando deletados esses genes causam efeitos nulos ou resultam em maior acúmulo do polímero devido a ausência de degradação (BRIGHAM *et al.*, 2012; KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003; TRAINER *et al.* 2010). Esse papel de PhaZ2 no acúmulo de PHB abre perspectivas em relação a novas funções de PHB despolimerases, possivelmente funções estruturais ou regulatórias.

Em condições de cultivo com baixa concentração de íons NH_4^+ as estirpes acumularam concentrações de PHB superiores ao observado sob cultivo com 20 mM de NH_4Cl . A limitação da fonte de nitrogênio é um dos fatores que desencadeia a resposta estrigente, conforme observado em outras espécies bacterianas como *E. coli*, *C. necator* e *Azotobacter vinelandii* (BROWN *et al.*, 2014; BRIGHAM *et al.*, 2012, JUENGERT *et al.*, 2017; ORTIZ-VASCO *et al.*, 2024). Nessas espécies o acúmulo de (p)ppGpp resultante da resposta estrigente está associado com maiores

concentrações de PHB acumulado. Desse modo, é possível que os mesmo mecanismos operem em *H. seropedicae*, principalmente porque o gene *spoT* possui sequências conservadas de ligação ao fator σ^{54} e ao ativador transcricional NtrC.

5.4 OS GRÂNULOS DE PHB INTERFEREM NA DO₆₀₀ DOS CULTIVOS DE *H. seropedicae*.

As estirpes de *H. seropedicae* cultivadas em baixa concentração de NH₄Cl apresentaram uma grande diferença na densidade óptica, com os maiores valores associados às estirpes que acumulam maiores concentrações de PHB. Essas observações apontam para um provável efeito dos grânulos de PHB sobre a densidade óptica. Os grânulos de PHB são opticamente ativos. Esse fenômeno é comum à diversas espécies bacterianas que acumulam esse polímero, conforme já demonstrado para *C. necator*, *Burkholderia thailandensis* e *Alcaligenes eutrophus* N9A (PEDRÓS-ALIÓ *et al.*, 1985; MARTINEZ; DÉZIEL, 2020; SLANINOVA *et al.*, 2018). Em *A. eutrophus* N9A a relação entre o aumento do volume celular (μm^3) e o aumento da concentração de PHB é linear. Com as células triplicando de volume conforme atingem altas concentrações de PHB intracelular (75% do peso seco), PEDRÓS-ALIÓ *et al.*, 1985.

Recentemente, Slaninova *et al.*, (2017) demonstraram que a propriedade óptica dos grânulos de PHB, ou seja, o espalhamento da luz pode ter uma função biológica relevante. Nessa estirpe, os grânulos de PHB dispersam a radiação ultravioleta, proporcionando um efeito protetor contra os raios UV para as células bacterianas. Essa propriedade de dispersar os raios UV reduz os níveis de espécies reativas de oxigênio, protegendo os componentes celulares dos efeitos danosos desses compostos.

Aparentemente, em *H. seropedicae* os grânulos de PHB podem causar o mesmo efeito de dispersão de luz com as estirpes que acumulam maiores concentrações de PHB, apresentando maior densidade óptica. Desse modo, a diferença entre a DO₆₀₀ do mutante ΔphaC1 e das demais estirpes pode não ser devido ao número de células, mas sim uma consequência da interferência do PHB armazenado.

Para verificar essa hipótese foi determinado o número de unidades formadoras de colônias (UFC) nas estirpes SmR1, ΔphaC1 , ΔphaZ1 , ΔphaZ2 e

$\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ sob cultivo em NFbHPN (20 mM de NH_4Cl) e em NFbHPLN (20 mM de NH_4Cl). A quantidade de UFCs foi determinada após 12 horas de cultivo. Para isso, foram coletados 100 μL de cada cultura em ambas as condições de cultivo; esse volume foi usado para realização de diluição seriada. As diluições foram plaqueadas em triplicata, totalizando 3 gotas com volume de 10 μL cada. Essas gotas foram plaqueadas em meio NFbHPN sólido em placa de Petri. Após o crescimento o número de colônias foi contabilizado, seguido do cálculo da quantidade de UFCs/mL, cujos valores foram transformados em Log_{10} .

Ao analisar a densidade óptica das estirpes ao final do experimento, observamos que, quando a concentração de NH_4Cl é alta, a DO_{600} é mais uniforme. No SmR1 e nos mutantes $\Delta phaC1$ e $\Delta phaZ2$ esse valor foi de aproximadamente 1,7; porém, foi levemente superior nos mutantes $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$, com valores atingindo 1,9. Em contraste, a densidade óptica das estirpes cultivadas em meio NFbHPLN é mais heterogênea, sendo possível distinguir maiores valores de DO_{600} no SmR1 e $\Delta phaZ1$, com média próxima de 0,8. Nos mutantes $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ os valores são intermediários, com média de 0,6. Por último, a DO_{600} mais baixa foi observada no mutante $\Delta phaC1$, onde o valor médio foi de 0,4 (Figura 16A).

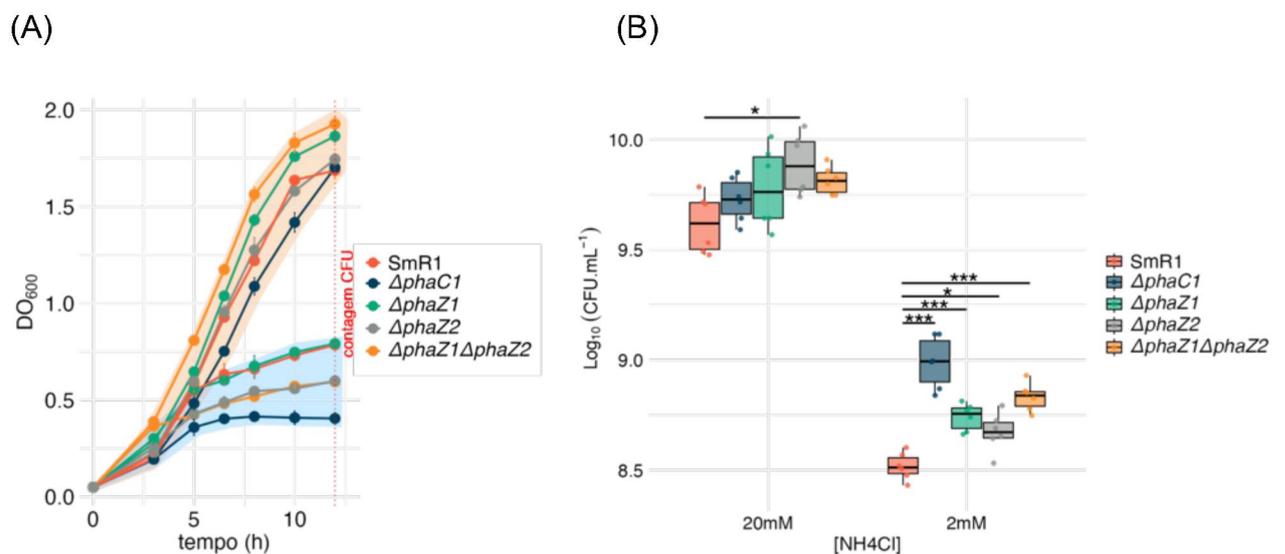


Figura 16. Padrão de crescimento e contagem de colônias de estirpes de *H. seropedicae* cultivadas em meio NFb-malato com 2 e 20 mM NH_4Cl . Em (A), comparação da densidade óptica das estirpes cultivadas por 12 horas, em destaque na cor laranja as estirpes cultivadas em 20 mM de NH_4Cl e em azul as mesmas estirpes cultivadas em 2 mM NH_4Cl . Em (B), número de UFC obtida (log_{10}) nos cultivos em 2 e 20 mM NH_4Cl , após 12 horas de cultivo. Os asteriscos acima dos *boxplots* indicam a significância estatística na comparação das médias do teste Tukey HSD entre SmR1 e as demais estirpes, sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os dados analisados referem-se a média de três replicatas independentes. As estirpes foram cultivadas sob agitação orbital de 120 rpm. As leituras de DO_{600} foram

realizadas em cubetas de 1 mL em espectrofotômetro Thermo Helios Alpha UV/Vis. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via, e a comparação múltipla das médias pelo teste post-hoc Tukey HSD. Os pressupostos da análise estatística foram confirmados através dos testes de Shapiro-Wilk (normalidade dos dados), teste de Bartlett (homocedasticidade) e ausência de *outliers* (método IQR).

TABELA 12 – QUANTIFICAÇÃO DE UFC EM ESTIRPES DE *H. seropedicae*.

Estirpes	20 mM de NH ₄ Cl		Valor de <i>p</i> (comparado com SmR1)	2 mM de NH ₄ Cl		Valor de <i>p</i> (comparado com SmR1)
	UFC.mL ⁻¹	Log ₁₀ UFC		UFC.mL ⁻¹	Log ₁₀ UFC	
SmR1	4,3E+09	9,63	-	3,3E+08	8,52	-
<i>ΔphaC1</i>	5,5E+09	9,74	0,60	1,0E+09	9,00	3,1E-09***
<i>ΔphaZ1</i>	6,5E+09	9,81	0,23	5,6E+08	8,75	0,0006***
<i>ΔphaZ2</i>	8,0E+09	9,90	0,01*	4,8E+08	8,68	0,02*
<i>ΔphaZ1ΔphaZ2</i>	6,6E+09	9,82	0,10	6,8E+08	8,83	5,0E-06***

LEGENDA: O cultivo foi realizado em meio NFbHPN (20 mM de NH₄Cl) e meio NFbHPLN (2 mM de NH₄Cl). O número de UFC.mL⁻¹ está indicado na tabela, assim como o valor transformado em Log₁₀. Os dados correspondem a média de três replicatas independentes.

Significância estatística referentes aos valores de *p*: * *p*<0.05, ** *p*<0.01 e *** *p*<0.001.

Ao analisar a viabilidade celular da população bacteriana cultivada no meio NFbHPN, observamos que, assim como a densidade óptica, os valores são semelhantes entre as estirpes, exceto pela diferença observada entre SmR1 e *ΔphaZ2*. Nessas estirpes foram observados 4,3E+09 (9,6 em Log₁₀) e 8,0E+09 (9,9 em Log₁₀) CFU.mL⁻¹, respectivamente. A contagem de UFC nos mutantes *ΔphaC1*, *ΔphaZ1* e *ΔphaZ1ΔphaZ2* resultou em UFC similares. Os valores foram de 5,5E+09 (9,7) em *ΔphaC1*, de 6,5E+09 (9,8) em *ΔphaZ1* e de 6,6E+09 (9,82) *ΔphaZ1ΔphaZ2*. Essas estirpes apresentaram maior quantidade de células viáveis que a estirpe SmR1; entretanto, é necessário verificar se a variação observada é significativa. As médias de células viáveis quantificadas em NFbHPN estão descritos na Tabela 12.

A análise estatística (ANOVA) dos dados de UFC obtidos do cultivo em NFbHPN indicou diferença estatística significativa entre os valores médios de UFC. Ao comparar as estirpes entre si através do teste de Tukey HSD foi demonstrado que os valores de UFC são significativamente diferentes apenas entre as estirpes SmR1 e *ΔphaZ2*. Em contraste, nos demais grupos as diferenças não são significativas (Anexos, tópico 7.2, Tabela 1). Essa análise reforça a hipótese de que as diferenças de densidade óptica observadas nas estirpes *ΔphaZ1* e *ΔphaZ1ΔphaZ2*, em relação as demais, nas fases tardia de crescimento, é resultante da interferência dos grânulos de PHB sobre as leituras de DO₆₀₀, uma vez que não há diferenças no número de UFCs.

Os resultados obtidos nos cultivos em meio com 2 mM de NH_4Cl indicam uma densidade óptica similar nas estirpes bacterianas SmR1 e ΔphaZ1 , atingindo uma densidade óptica de 0,8 após 12 horas de cultivo. As estirpes ΔphaZ2 e $\Delta\text{phaZ1}\Delta\text{phaZ2}$ também demonstraram um padrão semelhante, com uma DO_{600} de 0,6 no mesmo período. A estirpe mutante ΔphaC1 exibiu uma DO_{600} menor, alcançando apenas 0,4. Isso representa uma diferença de quase o dobro entre ΔphaC1 e as estirpes SmR1 e ΔphaZ1 .

Ao determinar o número de UFC no mutante ΔphaC1 , notamos o maior número de unidades formadoras de colônias, $1,0\text{E}+09$ (9,0), representando uma diferença de $6,70\text{E}+08$ UFC.mL⁻¹ a mais que na estirpe SmR1, onde foram quantificadas $3,3\text{E}+08$ UFC.mL⁻¹ (8,5). O número de UFC calculada no mutante ΔphaZ1 também foi menor que em ΔphaC1 , com um valor médio de $4,8\text{E}+08$ (8,8). O mesmo ocorreu com os mutantes ΔphaZ2 ($4,8\text{E}+08$ ou 8,7) e $\Delta\text{phaZ1}\Delta\text{phaZ2}$ ($6,8\text{E}+08$ ou 8,8), conforme indicado na Tabela 12 e na Figura 16B.

Apesar do mutante ΔphaC1 possuir densidade óptica menor, há um maior número de UFCs. Sendo esse valor superior aos valores das estirpes SmR1, ΔphaZ1 , ΔphaZ2 e $\Delta\text{phaZ1}\Delta\text{phaZ2}$. Essa diferença pode ser explicada pela maior concentração de polihidroxibutirato armazenado nessas estirpes, que pode estar superestimando o crescimento. Essa interferência é maior quando as bactérias são cultivadas em meio com limitações de fontes de nitrogênio, onde há maior acúmulo de PHB. Isso porque a alta relação carbono/nitrogênio em condições limitantes de NH_4^+ leva a um maior acúmulo do carbono excedente em PHB. Nestas condições a concentração do polímero se aproxima de 50% do peso seco celular em SmR1.

A análise ANOVA evidenciou que as médias apresentam diferenças estatisticamente significativas, sendo que a estirpe selvagem apresentou o menor número de UFCs, valor estatisticamente diferente das demais estirpes (Figura 16B). Portanto, apesar de ter uma DO_{600} maior, essa estirpe possui menor número de UFCs. Isso demonstra que a maior densidade óptica é resultante da interferência dos grânulos de PHB. A mesma explicação é plausível para a discrepância entre UFC e densidade óptica no mutante ΔphaC1 , ou seja, apesar de ter uma maior quantidade de UFC a DO_{600} é menor. Isso ocorre porque esta estirpe não produz PHB, logo, não há grânulos de PHB causando interferência na densidade óptica.

5.5 ENSAIO DE REDUÇÃO DE TETRAZÓLIO POR BACTÉRIAS CULTIVADAS EM MEIO SÓLIDO

Em *H. seropedicae* e outras bactérias a síntese de PHB é uma forma de estocar o excedente energético (acetil-CoA e NAD(P)H). Essa energia armazenada em condições ambientais onde há alta relação carbono/nitrogênio, pode ser mobilizada sob condições ambientais adversas, principalmente ausência de carbono ou fatores associados a condições que causam estresse. Considerando que o PHB é uma forma de estocar carbono e potencial redutor, espera-se que essa energia seja direcionada para a cadeia transportadora de elétrons possibilitando o fluxo de elétrons e a geração de ATP através da fosforilação oxidativa.

Um composto utilizado para avaliar o metabolismo energético através da intensidade do fluxo de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons é o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (BOCHNERI; SAVAGEAU, 1977; HATZINGER *et al.*, 2003; TACHON *et al.*, 2009).

Para avaliar a importância do PHB como fonte energética, as estirpes foram cultivadas em placa de petri contendo meio NFbHPN sólido com 0,0025% de TTC. Esse composto, incolor e carregado positivamente, adquire coloração avermelhada ao ser reduzido. A redução enzimática ocorre dentro da célula, onde os elétrons fluem do NADH para o acceptor TTC, um processo mediado por desidrogenases da cadeia transportadora de elétrons (RICH *et al.*, 2001; TACHON *et al.*, 2009). Como resultado da atividade dessas enzimas, o TTC é reduzido a 1,3,5 trifenilformazana (TPF ou formazan), que precipita dentro das células formando cristais insolúveis (BOCHNERI; SAVAGEAU, 1977), detalhes na Figura 17.

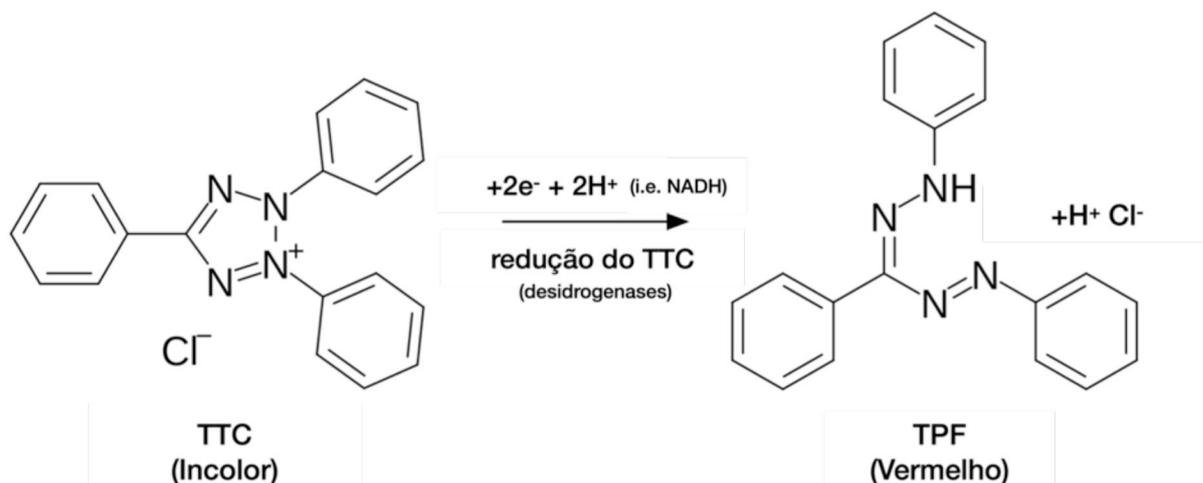


Figura 17. Reação de redução do Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 1,3,5 trifenilformazana (TPF). O TTC (incolor) é convertido em TPF (vermelho) após a redução por desidrogenases da cadeia transportadora de elétrons. Adaptado de Bochner e Savageau, (1977).

A formação de formazana nas estirpes cultivadas em placas com TTC ocorre de forma distinta: observa-se ausência de coloração no mutante $\Delta phaC1$ e em mutantes do gene $phaZ1$. Por outro lado, a estirpe selvagem e o mutante $\Delta phaZ2$ reduziram o corante no mesmo tempo de cultivo (Figura 18). Esses fenótipos sugerem que as estirpes apresentam variações no fluxo de energia pela cadeia transportadora de elétrons, provavelmente devido a diferentes taxas de mobilização do PHB.

A coloração mais intensa em SmR1 e $\Delta phaZ2$ é um indicativo de que o PHB está sendo mobilizado através de PhaZ1. A energia resultante da degradação flui por vias metabólicas (ciclo do ácido cítrico e β -oxidação), gerando equivalentes redutores (NADH) que são oxidados na cadeia transportadora de elétrons. O maior fluxo de elétrons em SmR1 e $\Delta phaZ2$ causa a redução do TTC a formazana pelas desidrogenases da cadeia respiratória. Por outro lado, os mutantes $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ produzem o polímero, mas a degradação é ausente ou muito lenta. Consequentemente, essas estirpes demoram mais tempo para reduzir o corante.

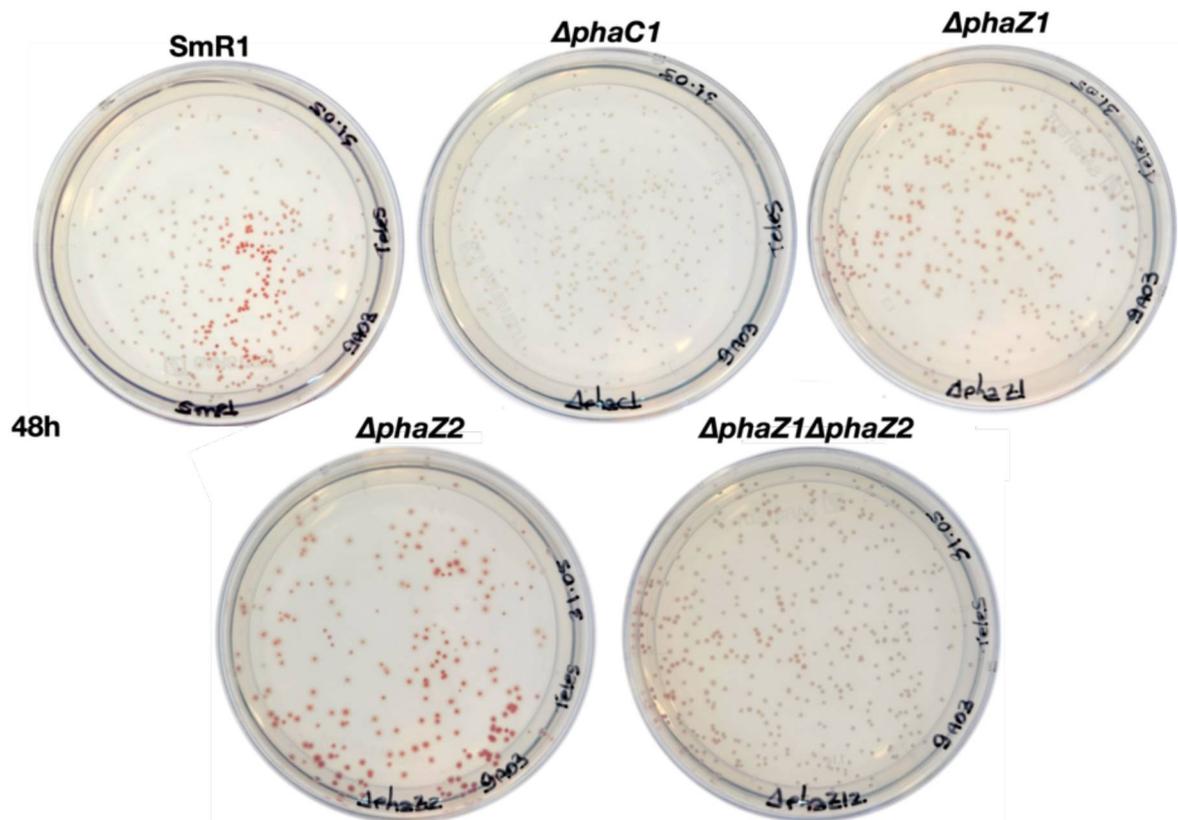
A ausência de coloração no mutante $\Delta phaC1$ pode ser explicada pela ausência de PHB. Sob condições de limitação de O_2 , essa estirpe apresenta efeitos fisiológicos adversos, como desequilíbrio do balanço redox, altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS, abreviação de *reactive oxygen species*), sendo mais que o dobro em relação à SmR1. Além disso, $\Delta phaC1$ possui menor viabilidade celular na presença de uma fonte exógena de ROS em comparação com a estirpe selvagem (BATISTA *et al.*, 2018).

Os maiores níveis de ROS em $\Delta phaC1$ podem estar associados a uma maior razão NADH/NAD⁺ e NADPH/NADP⁺, cerca de duas e três vezes maior comparada à estirpe SmR1, respectivamente (BATISTA *et al.*, 2018). De acordo com os autores, esse mutante possui menor expressão dos fatores transcricionais Fnr. Por sua vez, esse distúrbio resulta em alterações na expressão de vários genes, um dos grupos de genes afetados são os citocromos tipo c associados à cadeia transportadora de elétrons. O possível desequilíbrio na cadeia respiratória, decorrente dessa alteração pode ser responsável pela geração de ROS, em função da atividade dos complexos I e III. Esse desequilíbrio na cadeia respiratória é suportado pela menor concentração de ATP no mutante $\Delta phaC1$, sendo 2,3 vezes menor que no SmR1 (BATISTA *et al.*, 2018).

É importante notar que, embora a maior concentração de NADPH geralmente esteja associada à defesa contra ROS, devido ao seu papel na reciclagem de glutathione, essa relação não se confirma neste caso específico. A menor expressão de FnR e o consequente desequilíbrio na cadeia respiratória parecem sobrepor o efeito protetor do NADPH, apesar dos níveis de expressão três vezes mais alto do gene *btuE* (HSERO_RS19005, glutathione peroxidase) e *trxB1* and (HSERO_RS17495, tioredoxina redutase) (BATISTA *et al.*, 2018).

As alterações fisiológicas desse mutante estão de acordo com os resultados observado nos ensaios de TTC, uma vez que distúrbios na cadeia transportadora de elétrons levam a uma menor deposição de formazan (Figura 18). Com o objetivo de confirmar se as colônias acumulam PHB quando cultivadas em placas, as estirpes SmR1, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ foram cultivadas em placas de petri em meio NFbHPN, sem o corante. Após 48 horas de cultivo, as colônias foram raspadas da placa, coradas com o fluoróforo Bodipy e analisadas através de microscopia de fluorescência para analisar o PHB armazenado.

(A)



(B)

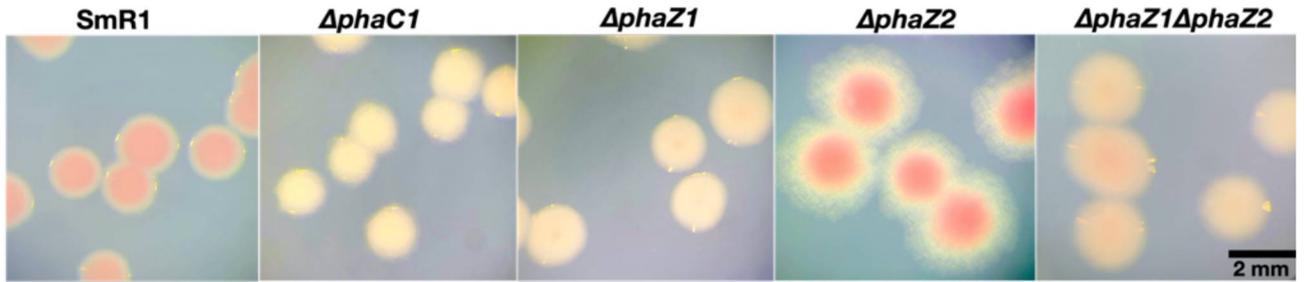
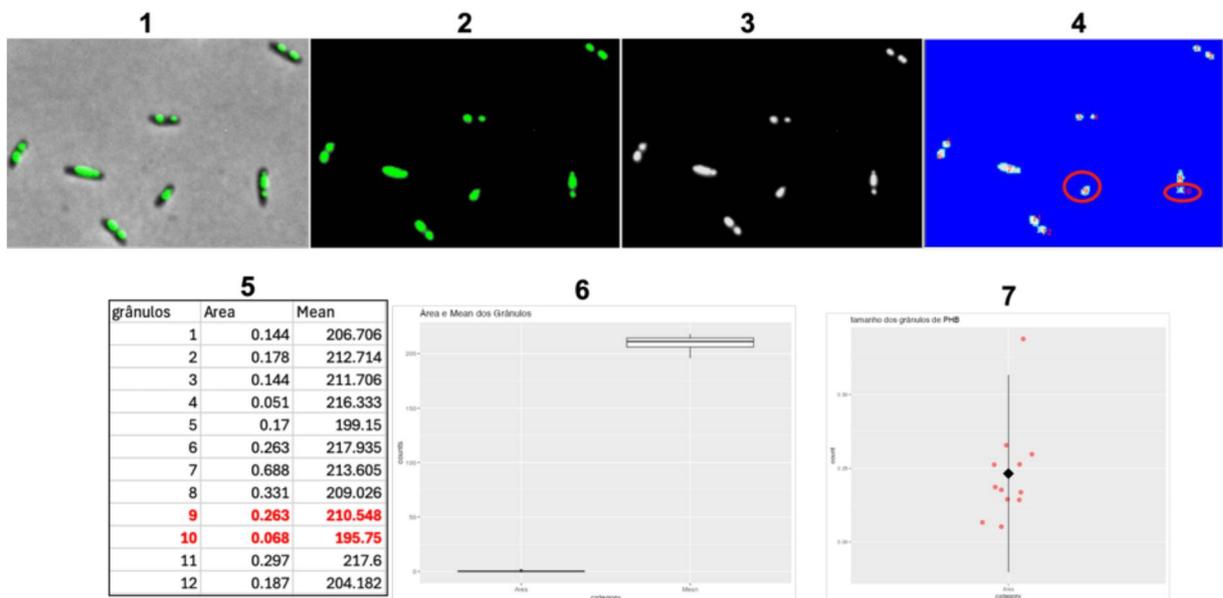


Figura 18. Placas de petri com colônias de estirpes de *H. seropedicae* cultivadas em meio com TTC. As estirpes foram cultivadas por 48 horas em meio sólido NFbHPN com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). As placas com colônias vermelhas indicam que o TTC foi reduzido a 1,3,5 trifenilformazan (TPF ou formazan). Isso foi observado em colônias de SmR1 e $\Delta phaZ2$, conforme indicado também nas colônias ampliadas por lupa nas imagens do painel (B). A redução do corante foi menor em $\Delta phaZ1$ e no duplo mutante $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$, mas ausente em colônias de $\Delta phaC1$. As colônias foram fotografadas com microscópio estereoscópio Leica MZ125 com iluminador LCD Leica KL1500. O cultivo foi realizado em câmara climatizada com temperatura controlada de 30°C.

Para avaliar o tamanho e a quantidade dos grânulos de polihidroxibutirato em estirpes de *H. seropedicae*, foram analisadas bactérias a partir de colônias bacterianas, consistindo na obtenção de três imagens de microscopia para cada estirpe. Em cada imagem, determinou-se o total de células, bem como a quantidade e a área ocupada por cada célula e grânulo de PHB associado a elas, conforme metodologia descrita na Figura 19, painel (A e B).

(A)



(B)

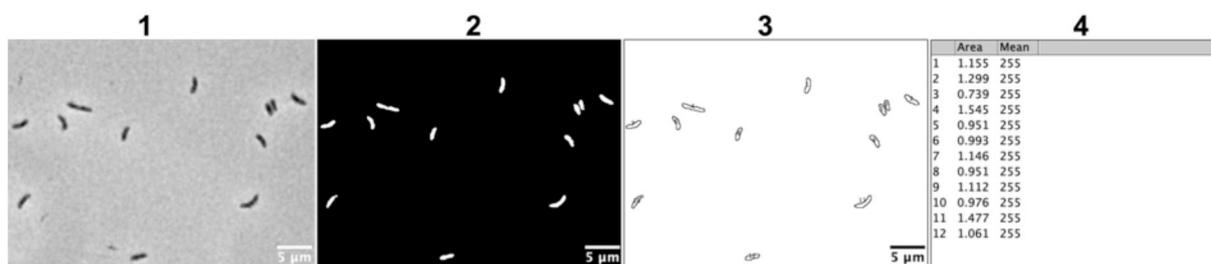


Figura 19. Ilustração do método de análise dos grânulos de PHB (painel A) e células bacterianas (painel B) em imagens de microscopia. A imagem de microscopia em (A1) é dividida, separando-se o canal de fluorescência, contendo apenas os dados sobre os grânulos de PHB, mostrado em (A2), a seguir essa imagem é convertida para o formato binário (A3), em seguida, os grânulos são analisados como partículas, conforme indicado em (A4). As informações sobre cada grânulo são dadas como a área, medida em unidades de pixels quadrados e a média (*mean*) representando a intensidade média dos pixels ocupando cada grânulo, conforme indicado em (A5). Em (A6), os dados são analisados, removendo-se valores extremos (*outliers*), através de análise *boxplot*. Por último, após remoção de *outliers* os valores individuais e a média são plotados em um gráfico de dispersão, ilustrado em (A7). Os círculos vermelhos em (A4), indicam grânulos de PHB 9 e 10 com diferentes tamanhos, conforme destacado nas medições em (A5). No painel (B), as análises das células bacterianas foram realizadas de forma similar onde a imagem de microscopia em (B1), foi convertida para o formato binário (B2), as células bacterianas são destacadas contra um fundo preto. A imagem (B3) mostra a borda das células detectadas após a segmentação das partículas brancas. A partir dessa imagem foi realizada a análise das partículas em relação a quantidade, área e média (B4). A área é medida em unidades de pixels quadrados e a média (*mean*) representa a intensidade média dos pixels ocupando cada célula. A aquisição de imagens foi realizada com câmera integrada Leica DFC 360 FX e ajustes de configuração com software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (4.0). As imagens obtidas foram analisadas com software Fiji.

O número de células e de grânulos de PHB foi obtido após análise das imagens de microscopia. Desse modo, as imagens de microscopia em formato *lif*, foram separadas em dois arquivos *png*, um contendo a imagem de contraste de fase, com as células, e a segunda contendo a fluorescência dos grânulos de PHB, que foram previamente corados com BODIPY (Figura 19). Após essa divisão, os arquivos com as imagens *png* foram transformados em 8 bits e convertidas em formato binário (preto e branco), seguido do contorno das partículas brancas (células ou grânulos de PHB). Essas partículas foram automaticamente contadas e, para cada uma, foram obtidas a área (em pixels quadrados) e a intensidade média dos pixels dentro de cada partícula.

No total foram analisadas 35.141 partículas (células e grânulos de PHB), a partir das estirpes cultivadas em placa em meio NFbHPN. Desse valor, 15,8% (5.557)

corresponde a SmR1. Ao analisar SmR1 de forma independente (5.557= 100%), notamos que, das 5.557 células analisadas, 2,1% contém grânulos de PHB, o restante são células sem grânulos de PHB em seu interior (97,9%), Figura 20A. Esse padrão foi similar na estirpe $\Delta phaZ2$, das 4.154 partículas analisadas (11,8% do total), apenas 68 eram grânulos de PHB (1,6%), as demais, assim como SmR1, eram células sem grânulos de PHB (98,4%).

Diferente de SmR1 e $\Delta phaZ2$, as estirpes com deleção de *phaZ1* apresentaram um número muito maior de grânulos de PHB. No mutante $\Delta phaZ1$ foram analisadas 5.166 células com um número de 7.266 grânulos de PHB (12.432 - 35,4% do total). Da mesma forma, o mutante $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ apresentou níveis altos de grânulos de PHB por célula, entre as 5.974 células analisadas foram observados 7024 grânulos de PHB (12.998 – 37% do total).

Os grânulos contabilizados em uma dada estirpe foram divididos pelo número de células analisadas na mesma estirpe. Essa proporção foi utilizada como um indicador arbitrário da quantidade de PHB por célula (Figura 20B). Essa proporção possui limitações, como a sobreposição de um ou mais grânulos em algumas células. Esses erros foram minimizados com a exclusão das contagens que apresentaram área e intensidade de pixels muito acima da média (*outliers*).

(A)

(B)

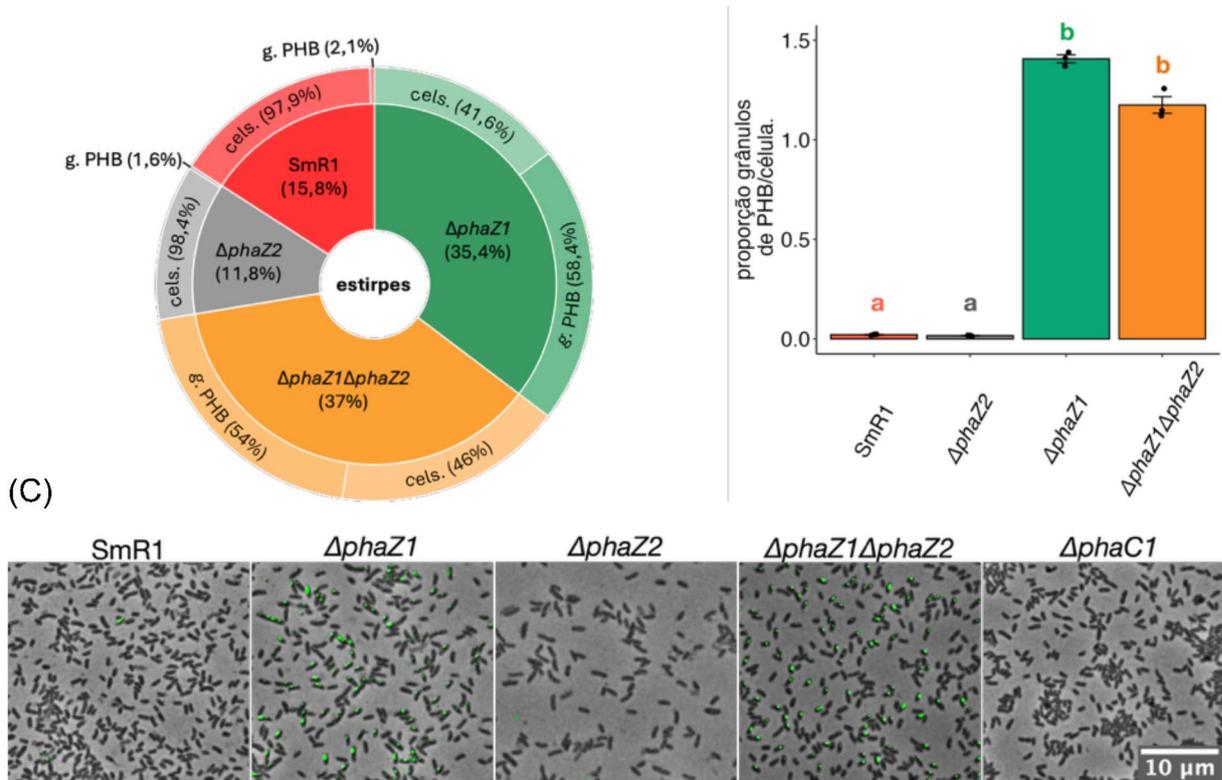


Figura 20. Análise dos grânulos de PHB acumulado por célula em estirpes de *H. seropedicae* através de microscopia de fluorescência. Em (A), gráfico tipo *Pie-Donut* com as porcentagens de partículas (grânulos de PHB e células bacterianas) analisadas por estirpe. Em (B) proporção de grânulos de PHB por célula para cada estirpe de *H. seropedicae*. As letras acima de cada barra, indicam se há ou não significância estatística na comparação das médias (Games-Howell), diferenças significativas foram representadas por letras diferentes, médias não significativas por letras iguais. Em (C) recorte de imagens de microscopia de uma das replicatas analisadas. Os pontos verdes fluorescentes indicam os grânulos de PHB. A estirpe $\Delta phaC1$ não produz PHB e foi usada como controle negativo. As análises de microscopia foram feitas em colônias cultivadas por 48 horas em placas de petri com meio NFbHPN, correspondendo a 3 replicatas; A visualização dos grânulos de PHB foi feita após tratamento das células com o flúoróforo BODIPY e análise por microscopia de fluorescência. Para cada estirpe foram processadas 3 imagens, estas foram obtidas após análise das amostras em microscópio Leica DM5500 B com o iluminador Leica CTR 5500. A aquisição de imagens foi realizada com câmera integrada Leica DFC 360 FX e ajustes de configuração com software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (4.0). As imagens obtidas foram analisadas com software Fiji e ImageJ.

A análise das células da estirpe selvagem e do mutante $\Delta phaZ2$ demonstrou que apenas uma pequena quantidade de células continham grânulos de PHB após 48 horas de crescimento. A proporção de grânulos por células foi de 0,021 no SmR1 e 0,016 no $\Delta phaZ2$ (Figura 20B). Por outro lado, nos mutantes $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$, a quantidade de grânulos foi muito superior, com uma média de 1,4 e 1,2 grânulos de PHB por célula, respectivamente. Isso sugere que essas estirpes não conseguem mobilizar o PHB sintetizado sob condições de cultivo em placa; portanto, ocorre o acúmulo na forma de grânulos. Em contraste, no SmR1, assim como no mutante $\Delta phaZ2$, o PHB sintetizado parece ser degradado por PhaZ1, como consequência, a maioria das células não apresentam grânulos.

A comparação de médias através da ANOVA de um fator não foi possível, uma vez que os dados violaram o critério de heterocedasticidade (homogeneidade das variâncias). Entretanto, como os dados não violaram o teste de normalidade por grupos (Shapiro-Wilk), foi possível comparar as médias através da ANOVA de Welch (WELCH, 1951). A ANOVA de Welch é uma alternativa robusta à ANOVA tradicional, utilizada quando a suposição de homogeneidade de variâncias é violada. Nesse teste, os graus de liberdade são ajustados para levar em consideração a desigualdade de variâncias. Da mesma forma que a ANOVA tradicional, o resultado não demonstra em quais grupos há diferenças significativas. Para isso é necessário um teste *post hoc* alternativo, como o teste de Games-Howell.

A estatística ANOVA de Welch demonstrou que há diferenças significativas entre os grupos, na análise dos dados de proporção de grânulos de PHB/célula. Através do teste de Games-Howell foi constatado que as variações significativas ocorrem entre SmR1- $\Delta phaZ1$ ($p < 0,001$), SmR1- $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ ($p = 0,002$), $\Delta phaZ1-\Delta phaZ2$ ($p < 0,001$) e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2-\Delta phaZ2$ ($p = 0,002$). Assim, as diferenças entre SmR1- $\Delta phaZ2$ ($p = 0,27$) e $\Delta phaZ1-\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ ($p = 0,05$) não são significativas. Novamente isso realça a importância de PhaZ1 para degradação de PHB nas estirpes SmR1 e $\Delta phaZ2$. Em contraste, sua ausência nos mutantes $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ causa o acúmulo de PHB, sendo essa a principal “variável” que contribui para as diferenças estatísticas observadas. Os dados referente aos testes realizados encontram-se em Anexos, item 8.3.

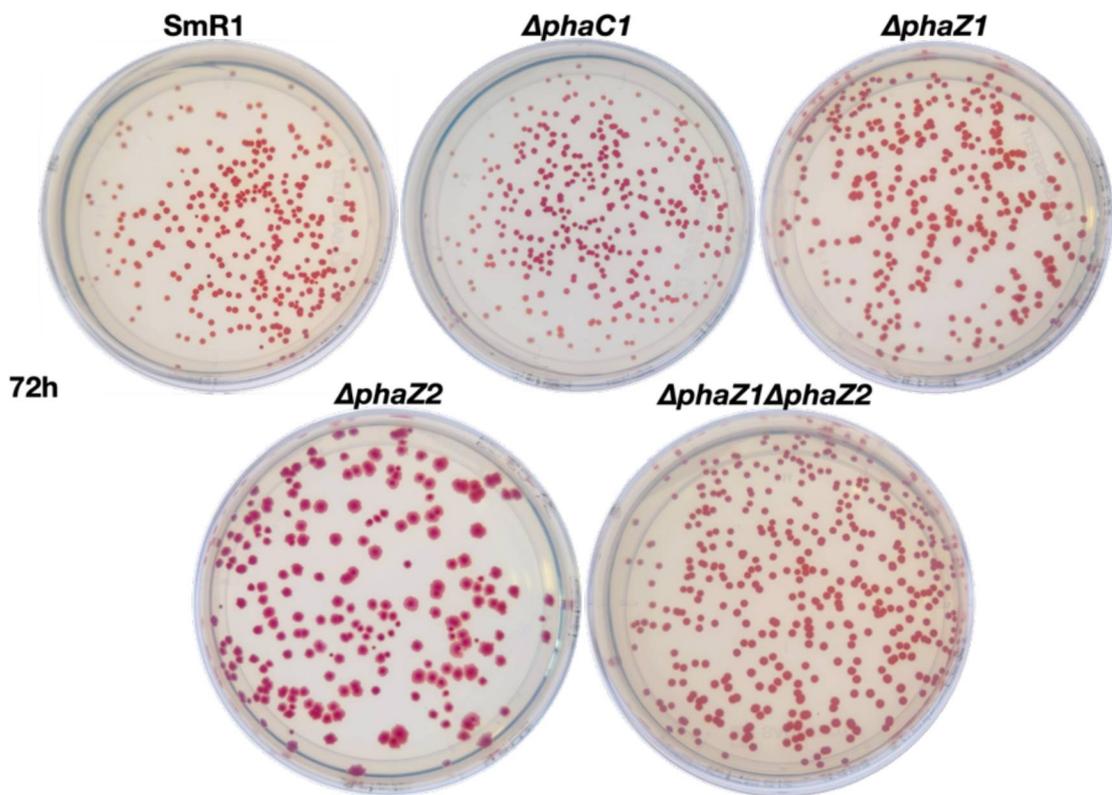
Em síntese, os resultados dos ensaios de TTC, em conjunto com as análises de microscopia, corroboram que o PHB acumulado em *H. seropedicae* funciona como uma importante fonte energética. A mobilização do polímero direciona carbono para vias metabólicas e equivalentes redutores (NADH) para a cadeia transportadora de elétrons. Essa hipótese é amplamente aceita para diversas bactérias e foi sugerida para *H. seropedicae* encontrando suporte em artigo publicado por Batista *et al.*, (2018), e nesse trabalho nos ensaios em placa com meio NFbHPN suplementado com o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio.

Desse modo, foi demonstrado que as células das estirpes $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$, que mantêm o PHB em seu interior, demoram mais tempo para adquirir a coloração típica em função da redução do corante TTC. Diferentemente delas, as células das estirpes SmR1 e $\Delta phaZ2$, que degradam PHB, tendem a adquirir

a coloração muito mais rápido. O fluxo de elétrons do PHB para a cadeia transportadora de elétrons também é corroborado pela ausência de coloração no mutante $\Delta phaC1$, que não produz o polímero, apresentando os efeitos mais visíveis da pouca redução do TTC a formazana.

A deposição do corante formazana é cumulativa e não é totalmente dependente do PHB que é degradado, uma vez que outras fontes de energia são metabolizadas pelas células, isso pode ser observado com todas as colônias apresentando coloração vermelha após 72 horas, sendo que a maior intensidade de cor ocorreu no mutante $\Delta phaZ2$ (Figura 21).

(A)



(B)



Figura 21. Painel (A): Placas de petri com colônias de estirpes de *H. seropedicae* cultivadas em meio com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio - TTC. As estirpes foram cultivadas por 72 horas em meio sólido NFbHPN com TTC. As colônias vermelhas indicam que o corante foi reduzido a 1,3,5 trifetilformazan (TPF ou formazana). Em (B) colônias observadas em lupa através de microscópio estereoscópio Leica MZ125 com iluminador LCD Leica KL1500.

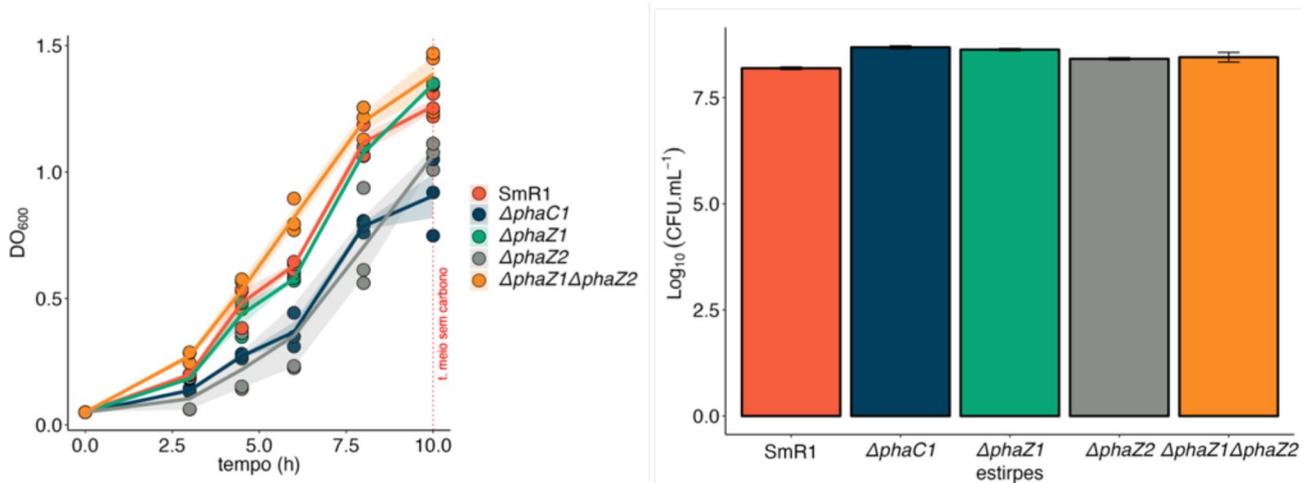
5.6 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA BACTERIANA SOB CONDIÇÕES DE CULTIVO EM MEIO SEM CARBONO

Os ensaios com TTC indicam que o PHB é rapidamente mobilizado sob condições de cultivo em placa de petri. Adicionalmente as estirpes com mutações dos genes *phaZ1* e *phaC1* apresentaram menor redução do corante; isso sugere que o PHB não mobilizado ou não sintetizado nesses mutantes permanece como uma fonte de energia indisponível ao metabolismo. Portanto a incapacidade de mobilizar o polímero armazenado pode ter impacto negativo sobre a sobrevivência em condições de escassez de carbono. A fim de verificar essa hipótese, foi realizado o cultivo das estirpes por 10 horas em condições que favorecem o acúmulo de PHB, seguido por cultivo em meio NFb sem carbono.

Inicialmente as estirpes SmR1, $\Delta phaC1$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ foram cultivadas por 10 horas em um meio que favorece o crescimento celular e acúmulo de PHB. Tal condição consiste em meio líquido NFb-malato com 5 mM de NH_4Cl e 25 mM de glucose (NFbHPLNG5) (ALVES *et al.*, 2020; SACOMBOIO *et al.*, 2017). Em tal condição o acúmulo de polihidroxibutirato pode chegar a 30% do peso seco celular ao final da fase exponencial de crescimento. Após 10 horas de cultivo foi determinado o tamanho da população bacteriana através de diluição seriada e contagem das colônias crescidas ($\log_{10}UFC.mL^{-1}$). Além disso, as células foram avaliadas em relação ao PHB produzido através de microscopia de fluorescência. A curva de crescimento das 10 horas iniciais, a população bacteriana viável e as imagens de microscopia podem ser visualizadas na Figura 22.

(A)

(B)



(C)

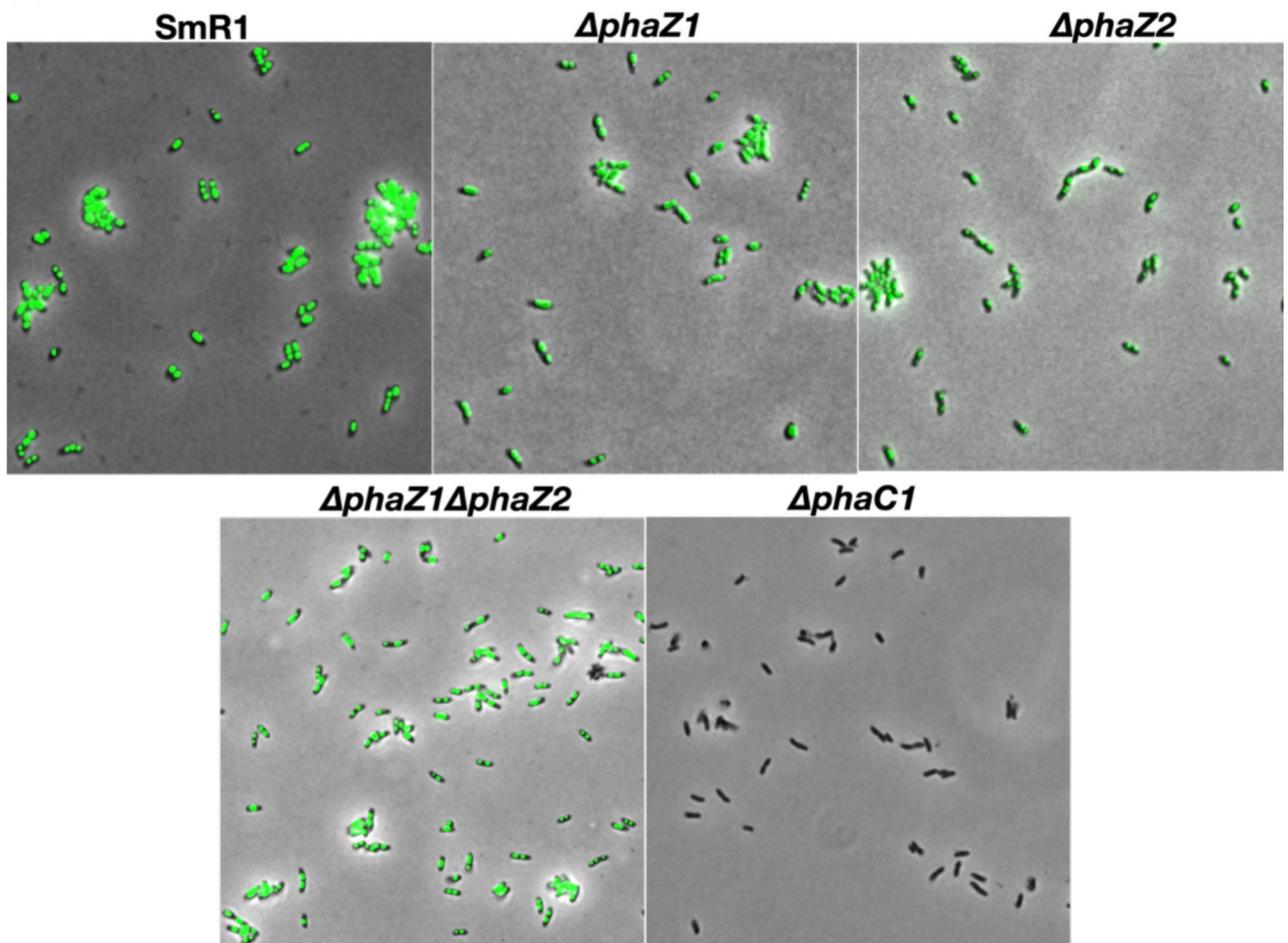


Figura 22. Perfil de crescimento e microscopia de fluorescência de *H. seropedicae* SmR1, $\Delta phaC1$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ em meio NFbHPLNG5. O crescimento celular foi acompanhado através de medições da DO₆₀₀, apresentando um padrão similar na maioria das estirpes, gráfico (A). O registro da quantidade de unidades formadoras de colônias (\log_{10} UFC.mL⁻¹), foi realizado após 10 horas de cultivo, conforme indicado em (B). Em (C), imagens de microscopia de fluorescência, demonstrando a presença de grânulos de PHB em SmR1, $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$. No gráfico (A) a linha representa a média de 3 experimentos independentes com o valor de cada replicata representado pelos pontos. O desvio padrão está indicado pelas sombras coloridas sobre a linha da média amostral. A linha tracejada vermelha indica o tempo em que foi realizado a coleta de amostras para as análises de microscopia e contagem de colônias. Em (B) as barras representam a média de 3 replicatas biológicas independentes

com o desvio padrão indicado pelas barras de erro. Em (C) imagens de microscopia de fluorescência de uma das replicatas analisadas após tratamento com o fluoróforo BODIPY. A visualização dos grânulos foi feita em microscópio Leica DM5500 B com o iluminador Leica CTR 5500. A aquisição de imagens foi feita com câmera integrada Leica DFC 360 FX e ajustes de configuração com software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (4.0). As imagens obtidas foram processadas com software Fiji.

De maneira geral o crescimento das bactérias foi uniforme, conforme indicado pela contagem de UFCs e DO_{600} . No SmR1 a DO_{600} média foi de 1,26 após 10 horas; As estirpes $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ tiveram os maiores valores com 1,35 e 1,39, respectivamente. Nos mutantes $\Delta phaC1$ e $\Delta phaZ2$ foi observado os menores valores com 0,91 e 1, respectivamente. Ainda que a diferença de densidade ótica tenha sido alta entre $\Delta phaC1$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$, isso não representou variação na viabilidade celular. A quantidade de unidades formadoras de colônias transformadas em \log_{10} variou entre 8,2 e 8,7; sendo maior no mutante $\Delta phaC1$ (8,68) e menor em SmR1 (8,19). Essas observações enfatizam a influência do PHB acumulado sobre a densidade ótica. Isso ficou mais claro depois de analisar as imagens de microscopia, onde as estirpes que acumulam o polímero exibiram grânulos que ocupam quase todo o espaço intracelular (Figura 22C).

A população bacteriana, o PHB armazenado e o crescimento depois de 10 horas foram considerados como tempo 0, ou seja, antes da transferência das células para o meio sem carbono; Antes de serem transferidas as células foram separadas por centrifugação (2.362 g), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resuspendido e lavado duas vezes com NFb-sais (meio NFb sem carbono e sem fonte de nitrogênio). Imediatamente foi feita a mudança das células para meio NFbSCHPN (meio NFb sem carbono, contendo solução de fosfatos e 20 mM de NH_4Cl).

As amostras para as análises de microscopia foram coletadas antes (tempo 0, Figura 22) e durante o cultivo em meio sem carbono, especificamente nos tempos de cultivo correspondentes a 20, 45, 85 e 110 horas. Como forma de observar os grânulos de PHB ao longo do tempo, foram analisadas imagens de microscopia de cada replicata biológica. Essas imagens foram analisadas com os softwares Fiji e ImageJ, onde foi usado o módulo de extensão (*plugin*) *Cell Counter* para contagem de células e grânulos de PHB. Os dados obtidos foram: número de células, de grânulos de PHB e o tamanho desses grânulos. Os grânulos contabilizados em uma determinada imagem foi dividido pelo número de células nessa mesma imagem e usado como indicador arbitrário da quantidade de PHB.

No total foram analisadas 30.955 células com um total de 17.149 grânulos de PHB associados a elas. No SmR1 assim como nos mutantes $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ2$ a maioria dos grânulos são observados apenas no tempo 0, ou seja, antes da transferência das células para o meio sem carbono. Nas células analisadas depois de 20 horas de cultivo há uma diminuição dos grânulos de PHB. Essa redução é similar no SmR1 e $\Delta phaZ2$, menor no $\Delta phaZ1$ e praticamente nula no mutante $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$.

As 914 células do SmR1, obtidas das imagens de amostras coletadas no tempo 0 apresentaram um total de 1.099 grânulos de PHB. Isso corresponde a 67% do total avaliado. Quando calculado a proporção média de grânulos por células entre as replicatas o valor é superior a 1 grânulo por célula, conforme indicado no gráfico de barras da Figura 23C. Em geral esses grânulos ocupam quase todo o espaço intracelular, apesar da proporção ser superior a 1 grânulo por célula, essa distribuição não é uniforme, uma vez que podem ser observados células, com 2 ou três grânulos de PHB. Além disso, há sobreposição da fluorescência entre dois ou mais grânulos em algumas células. Esses grânulos sobrepostos são contabilizados como um único grânulo. Apesar das limitações, essa abordagem mostrou-se adequada, sendo possível diferenciar quando houve mobilização do PHB ao longo tempo.

Ao analisar os grânulos da estirpe SmR1 depois de 20 horas de cultivo, nota-se uma redução elevada: 102 grânulos contabilizados em 2.851 células. Quando calculado a proporção média grânulo-célula entre as replicatas, o valor foi de 0,04, ou seja, muito inferior à proporção obtida no tempo 0 (1,4). Isso sugere que o PHB foi consumido nesse período (Figuras 23C e 23D).

Em síntese a proporção de grânulos por célula permanece estável e muito baixa no intervalo de 20 a 110 horas de cultivo, sendo praticamente irrelevante se considerarmos o alto número de células analisadas.

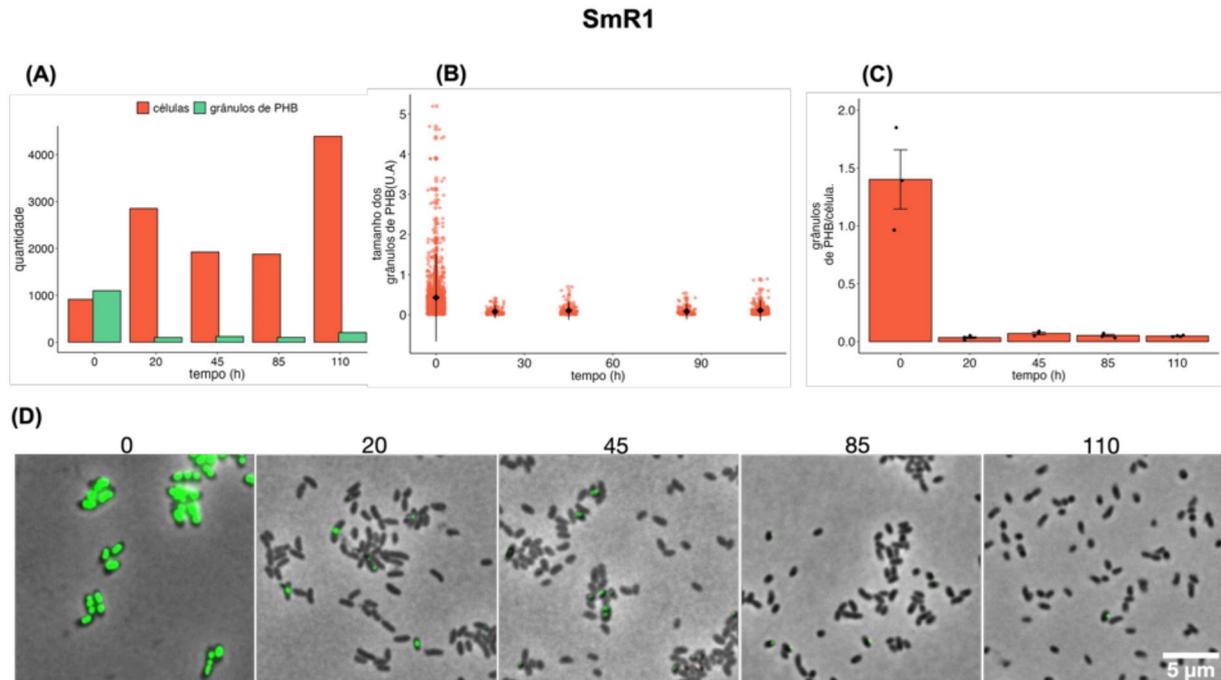


Figura 23. Análises dos grânulos de PHB em imagens de microscopia de fluorescência de *H. seropedicae* SmR1. No gráfico (A), total de células e grânulos de PHB contabilizados em imagens de microscopia de fluorescência, antes da transferência para o meio sem carbono (tempo 0) e durante o cultivo em meio sem carbono (tempo 20 a 110 horas). Em (B) gráfico com as médias do tamanho dos grânulos de PHB observados antes e durante o cultivo em meio NFbSCHPN. A quantidade de grânulos diminui com o tempo, conforme indicado pela menor quantidade de pontos e pela proporção grânulos de PHB por célula no gráfico de barras (B), cada ponto (●) nesse gráfico caracteriza o valor de uma replicata biológica, a barra identifica a média e a barra de erros o desvio padrão. Em (D) imagens de microscopia de células da estirpe SmR1. Em 0 mostrando células com grânulos de PHB verde fluorescente, antes do cultivo em meio NFbSCHPN. Entre 20 e 110 horas de cultivo em meio sem carbono a quantidade dos grânulos diminui sugerindo que foram degradados. O tamanho dos grânulos plotado no gráfico (B) possui unidade arbitrária (U.A) e representa a área em pixels quadrados ocupado por um determinado grânulo (área fluorescente). Desse modo, cada ponto (●) representa um grânulo de PHB contabilizado e seu respectivo valor arbitrário. O símbolo (◆) identifica o tamanho médio desses grânulos e a barra de erros o desvio padrão.

A análise dos grânulos de PHB nas imagens de microscopia de $\Delta phaZ2$ mostrou similaridades com o SmR1. Foi observado uma grande quantidade de grânulos no tempo 0 (1.008 ou 62% do total) e diminuição na quantidade de grânulos após 20 horas de cultivo. Entretanto, a proporção de grânulos por célula foi maior, tanto no tempo 0 quanto após 20 horas em meio sem carbono; no tempo 0 a proporção média foi de 1,9 grânulos de PHB por célula, levemente superior ao SmR1 (1,4); após 20 horas a proporção foi de 0,4 (Figura 24C). Nos tempos restantes essa proporção se aproximou de zero com valores ainda mais baixos que o SmR1. Isso indica um comportamento bastante similar a estirpe selvagem em termos da mobilização do PHB acumulado. As imagens de microscopia de $\Delta phaZ2$ e os gráficos resultante da análise dos grânulos podem ser visualizados na Figura 24.

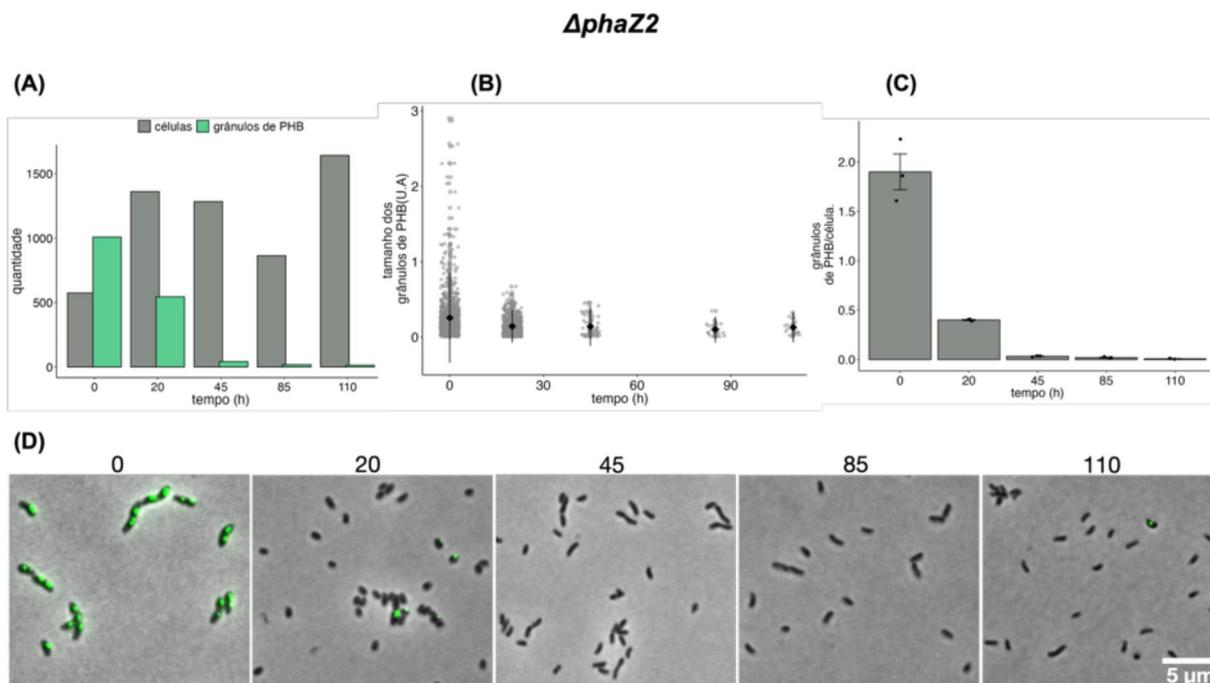


Figura 24. Análises dos grânulos de PHB em células de *ΔphaZ2* obtidas a partir de imagens de microscopia de fluorescência. No gráfico (A) está indicado a quantidade de células e grânulos de PHB quantificados em imagens de microscopia de fluorescência, antes da transferência para o meio sem carbono (tempo 0) e durante o cultivo em meio sem carbono (tempo 20 a 110 horas). No gráfico (B) foi plotado o tamanho de cada grânulo (•), a média (♦) e a variação no tamanho dos grânulos está indicada pelo desvio padrão (barras de erro). A proporção de grânulos de PHB por célula está indicado em (C). Em (D) imagens de microscopia de células de *ΔphaZ2*. Os grânulos de PHB estão destacados como pontos verdes fluorescentes devido a coloração com o fluoróforo BODIPY.

O mutante *ΔphaZ1* se diferencia das estirpes selvagem e *ΔphaZ2* devido a ocorrência de grânulos de PHB, mesmo após 110 horas de cultivo. Nas 7.660 células analisadas foram quantificados 5.521 grânulos de PHB (Figura 25A). A proporção grânulos-célula indicou que mesmo na ausência de PhaZ1 o PHB pode ser mobilizado por PhaZ2, uma vez que houve uma diminuição na proporção grânulo-célula, sendo 1,64 no tempo 0 e caindo para 0,47 após 85 horas. Essa proporção se mantém estável entre 85 e 110 horas (Figura 25C). A estabilidade na quantidade de grânulos por célula entre 85 e 110 horas sugere que após 85 horas de cultivo a despolimerase PhaZ2 não degrada mais o polímero.

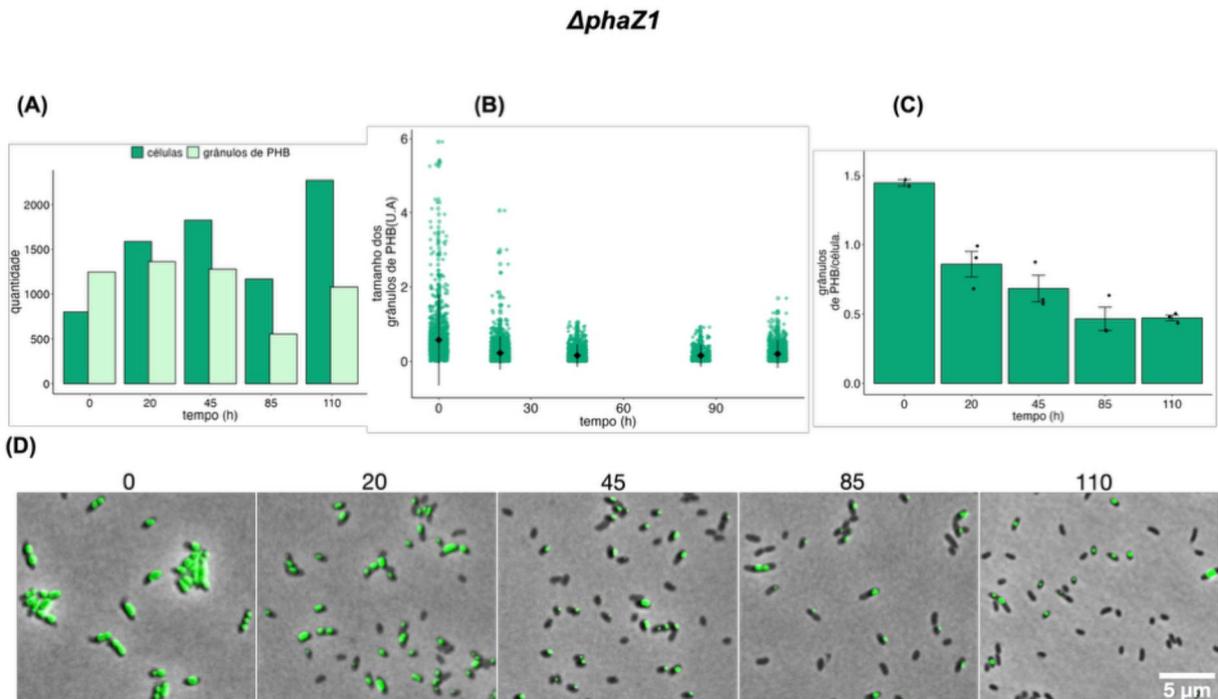


Figura 25. Análise dos grânulos de PHB em imagens de microscopia de fluorescência da estirpe *ΔphaZ1*. No gráfico (A), as barras indicam o total de células e grânulos de PHB quantificados. Em (B) tamanho médio dos grânulos que foram contabilizados, o símbolo (◆) representa a média, as barras de erro o desvio padrão. Os pontos (●) indicam a quantidade e o tamanho grânulos analisados. A proporção grânulo-célula varia ao longo do tempo conforme indicado em (C), os pontos (●) caracterizam o valor de cada replicata biológica, as barras indicam o erro amostral (desvio padrão). Em (D) imagens de microscopia de células do mutante *ΔphaZ1*. Os grânulos de PHB estão destacados como pontos verdes fluorescentes.

No duplo mutante *ΔphaZ1ΔphaZ2* foram analisadas 5.652 células com um total de 8.367 grânulos de PHB durante o período 0 a 110 horas de cultivo (Figura 26A). Em todos os períodos de tempo foram contabilizados maior quantidade de grânulos do que o número de células analisadas, isso gerou uma proporção grânulo-célula praticamente estável (1,4 grânulos de PHB/célula). Nessa estirpe quase não há alterações dessa proporção durante todo o período de cultivo (Figura 26C). Isso sugere que não há mobilização do PHB acumulado. Embora essa estirpe não tenha as PHB despolimerases, os grânulos parecem sofrer alterações de tamanho devido as novas condições de cultivo (Figuras 26B e 26D).

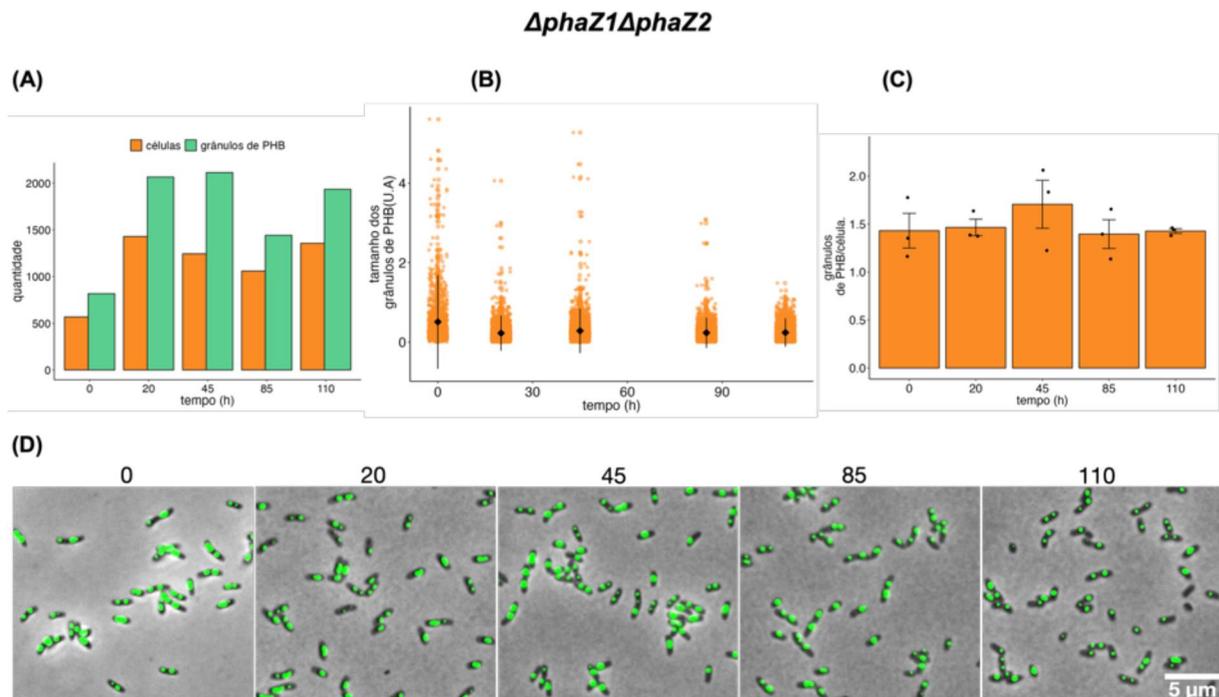


Figura 26. Análises dos grânulos de PHB em imagens de microscopia de fluorescência do mutante *ΔphaZ1ΔphaZ2*. Em (A), as barras indicam o total de células e grânulos de PHB quantificados. No gráfico (B) está plotado o tamanho de cada grânulo analisado indicado pelos pontos (●) e o tamanho médio (◆) de todos os pontos analisados, as barras de erro correspondem ao desvio padrão. A proporção de grânulos de PHB por célula permanece estável durante todo o cultivo em meio sem carbono, indicado em (C). Em (D) imagens de microscopia de fluorescência das células de *ΔphaZ1ΔphaZ2* mostrando os grânulos de PHB verde fluorescente dentro da célula.

Ao sobrepor as médias dos tamanhos dos grânulos de PHB nas estirpes, notamos que, em geral são maiores quando as estirpes são cultivadas em condições de acúmulo de PHB, mas que, ao serem transferidas para o meio sem carbono, o tamanho dos grânulos diminuiu consideravelmente (Figura 27). Essa diminuição de tamanho sugere que o PHB é degradado a partir de cadeias poliméricas externas, que são encurtadas, e como consequência há uma diminuição do tamanho dos grânulos.

Ao analisar cada estirpe individualmente, verifica-se que, no início na estirpe SmR1, período entre 0 e 20 horas, há uma diminuição mais acentuada e rápida no tamanho dos grânulos. Os grânulos remanescentes possuem tamanho médio similar no restante do tempo (período 20 a 110 horas). No mutante *ΔphaZ1*, a diminuição de tamanho não é tão alta no início (0 a 20 horas), mas, após esse período, diminuem rapidamente de tamanho (20 a 45 horas); as análises dos grânulos nos tempos restantes indicam que o tamanho se estabiliza. O mutante *ΔphaZ2* distingue-se das demais estirpes por apresentar os menores grânulos de PHB no tempo 0, mas diminuem de tamanho após 20 horas de cultivo em meio sem carbono, indicando

degradação por PhaZ1. Curiosamente, no duplo mutante, os grânulos de PHB diminuem de tamanho após a transferência para o meio sem carbono, mas ao longo do tempo de cultivo nessa condição, não se observa mais alterações de tamanho.

A imagem (27B) complementa a análise do gráfico, mostrando os grânulos nas diferentes estirpes durante o tempo 0 (T0) e 20 horas (T20). Nas imagens do tempo inicial (T0), é possível observar grânulos maiores em SmR1, $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ em comparação ao mutante $\Delta phaZ2$. Nas imagens do tempo final (T20), observa-se uma diminuição no tamanho dos grânulos, mas permanecem maiores nos mutantes com deleção de *phaZ1*, corroborando os resultados apresentados no gráfico.

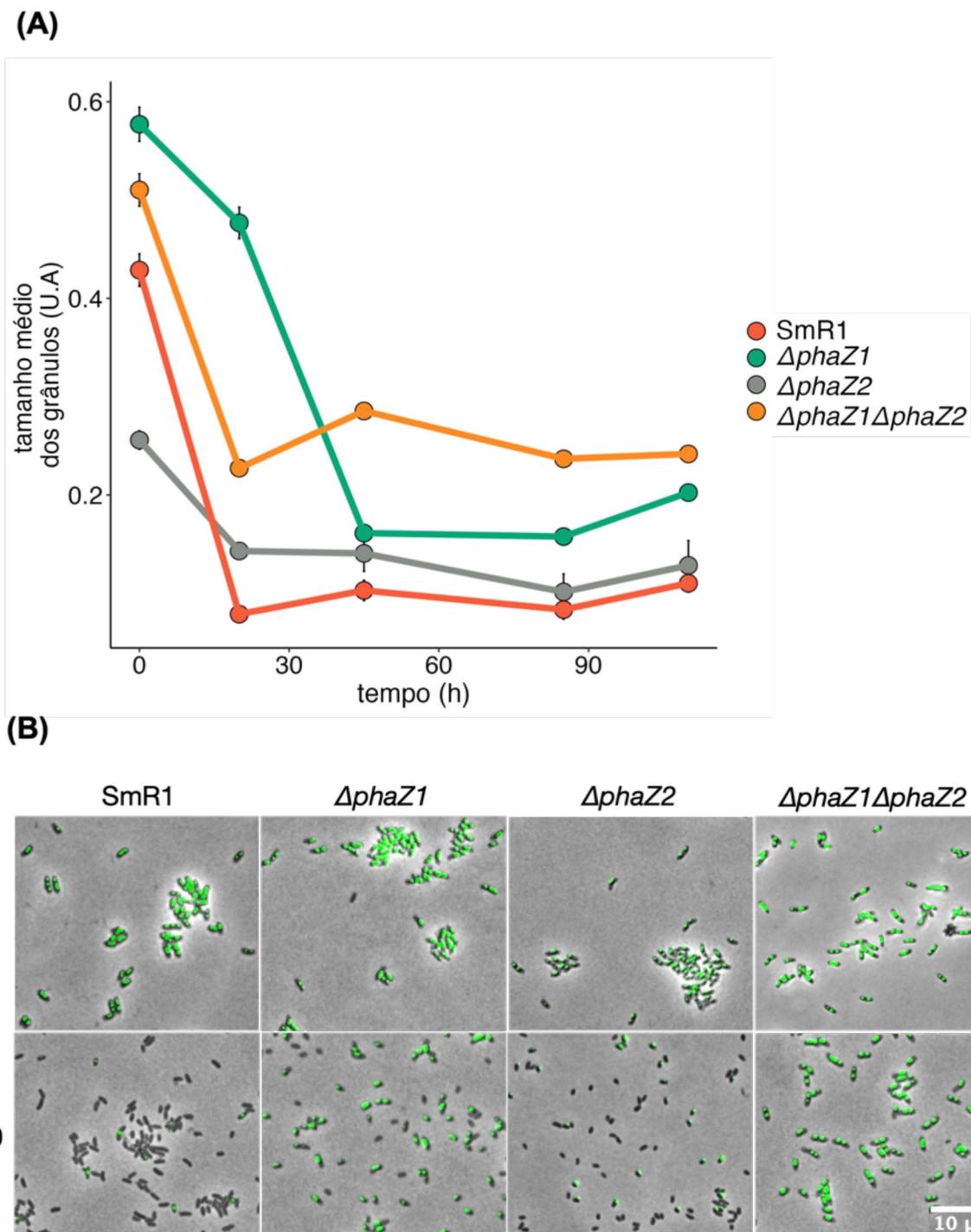


Figura 27. Análise do tamanho médio dos grânulos de PHB de estirpes de *H. seropedicae*. Em (A), gráfico com o tamanho médio de grânulos de PHB em células bacterianas analisadas a partir de imagens de microscopia de fluorescência. Os dados plotados correspondem média dos grânulos analisados com software Fiji. As barras de erro correspondem ao desvio padrão entre os tamanhos dos grânulos de PHB. Os dados foram obtidos a partir de imagens de estirpes de *H. seropedicae* cultivadas antes (T0) e em meio sem carbono por 110 horas, no painel (B) está ilustrado imagens das estirpes no tempo 0 e após 20 horas (T20) de cultivo em meio se carbono.

A proporção grânulo de PHB por célula, obtido a partir das imagens de microscopia, foi usada como um indicador da mobilização de PHB. Essa análise

indicou degradação de PHB nas estirpes SmR1, $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ2$, mas não no duplo mutante $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$. Esse padrão de mobilização é similar ao observado nas análises através de HPLC. Além disso, nas estirpes onde houve diminuição na proporção de grânulos de PHB por célula houve também maior diminuição na DO_{600} (Figura 28A). Considerando que o PHB interfere nas leituras de densidade óptica, esse é mais um indicativo de que o PHB foi mobilizado de forma total em SmR1 e $\Delta phaZ2$, parcialmente em $\Delta phaZ1$, mas não em $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$. O gráfico com a proporção grânulo-célula, comparando todas as estirpes, está plotado no gráfico da Figura 28B. Esse perfil de mobilização está em conformidade com as análises de degradação de PHB através de HPLC e corrobora o papel principal da despolimerase PhaZ1 na mobilização do polímero em *H. seropedicae*, já observado em meio NFbHPN e agora nesse ensaio realizado em meio sem carbono. Por outro lado, a despolimerase PhaZ2 parece ocupar um papel secundário nesse processo, indicando que o processo de mobilização de PHB através dessa enzima é muito mais lento.

Em conjunto com as análises de microscopia, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹) nas mesmas estirpes (Figura 28C). A contagem de colônias viáveis teve como objetivo verificar se a mobilização do PHB acumulado é capaz de influenciar a sobrevivência bacteriana. No SmR1 o valor médio de células viáveis após 20 horas de cultivo em meio sem carbono foi de 1,2E+09 (9,1 em log₁₀). Esse valor permaneceu relativamente constante até 45 horas. A partir de então foi observado um declínio que atingiu 7,0E+08 (8,8) em 60 horas. Esse declínio continuou e atingiu 1,4E+08 (8,2) em 110 horas. Se considerarmos a diferença entre o número de células viáveis entre 20 e 110 horas, concluímos que houve morte celular nesse intervalo de tempo. Ao comparar com o mutante $\Delta phaZ1$, observamos um padrão similar. Nesse mutante foi contabilizado o valor de 1,5E+09 (9,1) após 20 horas e em 110 horas a média foi igual ao selvagem.

Os demais mutantes apresentaram padrão de sobrevivência que diferiu em relação a SmR1 e $\Delta phaZ1$. No mutante $\Delta phaZ2$ o valor de UFC foi de 7,8E+08 (8,9) depois de 20 horas. As análises posteriores mostraram que a viabilidade celular diminuiu constantemente até 85 horas, onde o valor chegou a 1,9E+06 (6,3). O padrão de morte celular dessa estirpe se assemelha ao observado na estirpe $\Delta phaC1$; onde o valor de UFC era de 9,7E+08 (9,0) nas primeiras 20 horas, quando então a viabilidade celular caiu para 8,7E+05 (5,9) depois de 85 horas de cultivo. Na média

esse valor é menor que o observado em $\Delta phaZ2$. Na estirpe $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ também houve perda de viabilidade celular no período 20 a 110 horas de cultivo. Por outro lado, não foi tão acentuada quanto ao observado em $\Delta phaC1$ e $\Delta phaZ2$. Nesse mutante a média era de $1,1E+09$ (9,0) em 20 horas e diminuiu para $9,4E+06$ (7,0) depois de 110 horas de cultivo.

Ao associar a viabilidade celular com as estirpes que produzem e degradam PHB, nota-se que o SmR1 e o mutante $\Delta phaZ1$ se beneficiam da mobilização do polímero acumulado, uma vez que a sobrevivência das células em meio sem carbono é maior que a observada no mutante $\Delta phaC1$ e no duplo mutante que não é capaz de degradar o PHB. Por outro lado, o mutante $\Delta phaZ2$ não tem a sobrevivência favorecida pela mobilização do PHB acumulado, curiosamente esse mutante tem sobrevivência muito baixa em meio sem carbono. Embora seja capaz de degradar o PHB armazenado, a sobrevivência bacteriana é similar à observada no mutante que não produz PHB. Esse fenótipo sugere que a deleção de *phaZ2* provoca efeitos deletérios sobre a fisiologia bacteriana. Outros fenótipos que podem ter efeito negativo sobre o metabolismo bacteriano nessa estirpe foram o menor acúmulo de PHB. Em conjunto essas observações sugerem que o papel de PhaZ2 pode ser mais relevante que a simples mobilização de PHB.

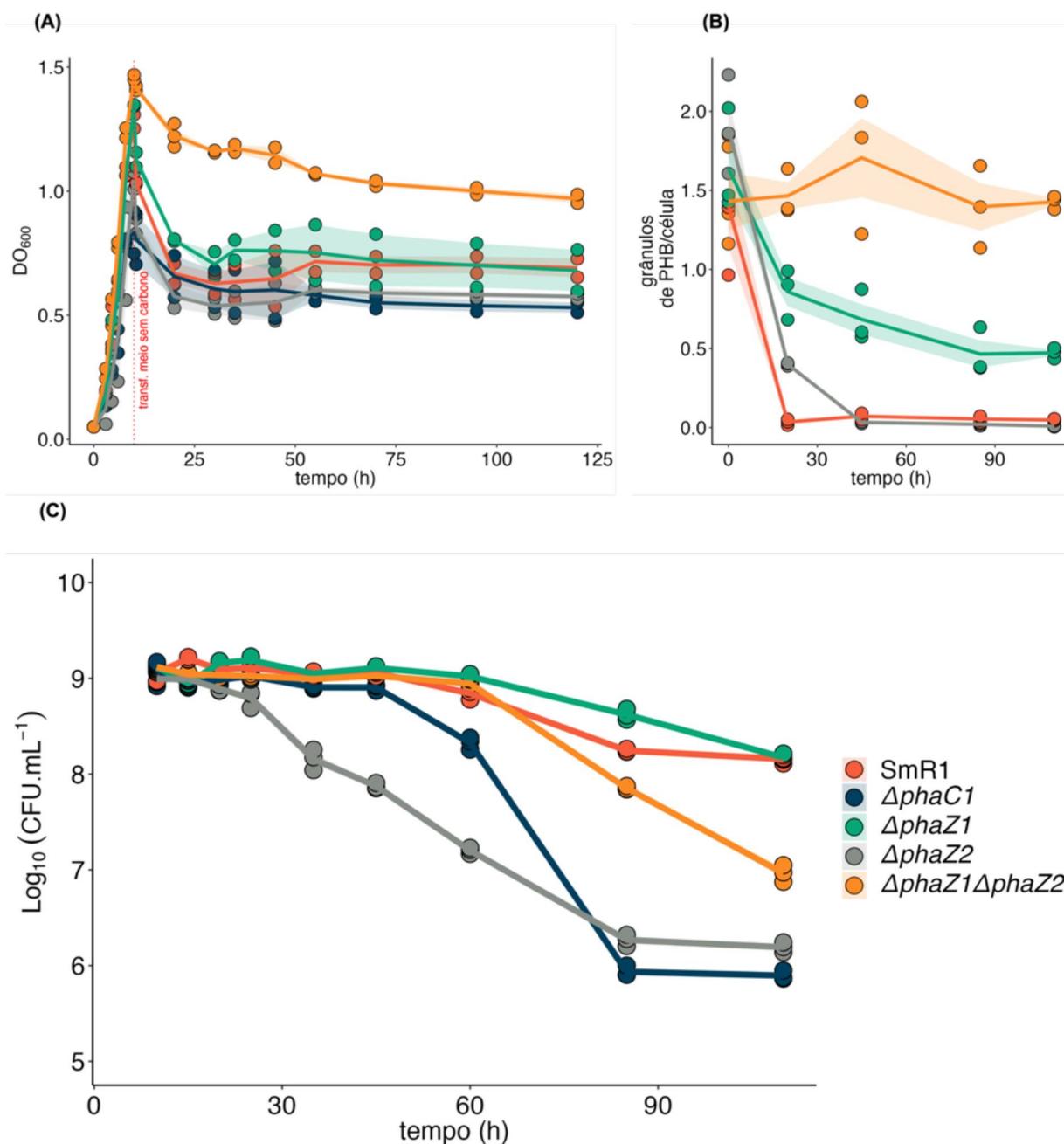


Figura 28. Análise da mobilização de PHB e sobrevivência celular em meio de cultivo sem carbono. Em (A), DO₆₀₀ das estirpes antes e depois da transferência para o meio NFbSCHPN, conforme indicado pela linha vermelha tracejada. No gráfico (B), é mostrado que a proporção de grânulos de PHB por célula diminui ao longo do tempo de cultivo em meio sem carbono. Em (C) unidades formadoras de colônias (\log_{10} UFC.mL⁻¹) entre 10 e 110 horas de cultivo. Nos gráficos plotados, a média está indicada pelas linhas com dados de três replicatas independentes. O valor de cada replicata foi plotado e está indicado pelos pontos. O desvio padrão está indicado pelas sombras coloridas sobre a linha que representa a média.

5.7 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS NH₄⁺ SOBRE A EXPRESSÃO DO GENE *phaZ1* EM *H. seropedicae*

A análise de expressão e regulação do gene *phaZ1* foi realizada utilizando um plasmídeo com uma fusão transcricional ao gene repórter *lacZ* (*phaZ1::lacZ*), o plasmídeo foi previamente construído por Mota (2017). Esta construção apresenta uma sequência de 520 pares de bases (pb) da região promotora de *phaZ1* clonada no vetor pPW452 (SPAINK *et al.*, 1987).

Para a realização dos ensaios de expressão gênica, o plasmídeo foi transformado na estirpe S17.1- λ pir de *Escherichia coli*, e em seguida foi realizado a conjugação bacteriana com as estirpes SmR1, Δ *phaC1*, Δ *phaZ1*, Δ *phaZ2* e Δ *phaZ1\Delta**phaZ2* de *H. seropedicae*. Após a obtenção dos transconjugantes, foram realizados os ensaios de β -galactosidase.

No ensaio inicial, as estirpes com a fusão *phaZ1::lacZ* ou com o vetor controle (sem sequência promotora clonada) foram cultivadas por 16 horas em meio NFbHPN. O resultado obtido indica uma forte expressão de *phaZ1* no SmR1 em comparação com o vetor sem promotor (Figura 29). Ao comparar a expressão de *phaZ1* no SmR1 com as demais estirpes, fica evidente que no mutante Δ *phaC1*, a expressão está reprimida, uma vez que foi significativamente menor ($p = 0,01$, ANOVA de Welch com *post hoc* Games-Howell), uma vez que a média de SmR1 foi de 1.588 de atividade específica (nmol de ONP.(min.mg proteína)⁻¹) e no Δ *phaC1* de apenas 625.

A análise estatística utilizando os valores de atividade específica de *phaZ1::lacZ* nas estirpes SmR1, Δ *phaZ1*, Δ *phaZ2* e Δ *phaZ1\Delta**phaZ2* não demonstrou diferenças significativas. Contudo, a diferença foi significativa na comparação dos valores de SmR1 com Δ *phaC1*, o mesmo foi observado nos mutantes codificantes das PHB despolimerases, em que a expressão de *phaZ1::lacZ* foi significativamente diferente da expressão em Δ *phaC1*, detalhes em Anexos, tópico 8.4.1.

Em conjunto, essas observações nos permitem inferir que a deleção desse gene não interfere na própria expressão, da mesma forma a deleção de *phaZ2* também não afeta a expressão de *phaZ1*. Contudo, a ausência de síntese de PHB, devido a deleção de *phaC1*, leva a repressão da expressão desse gene.

(A)

(B)

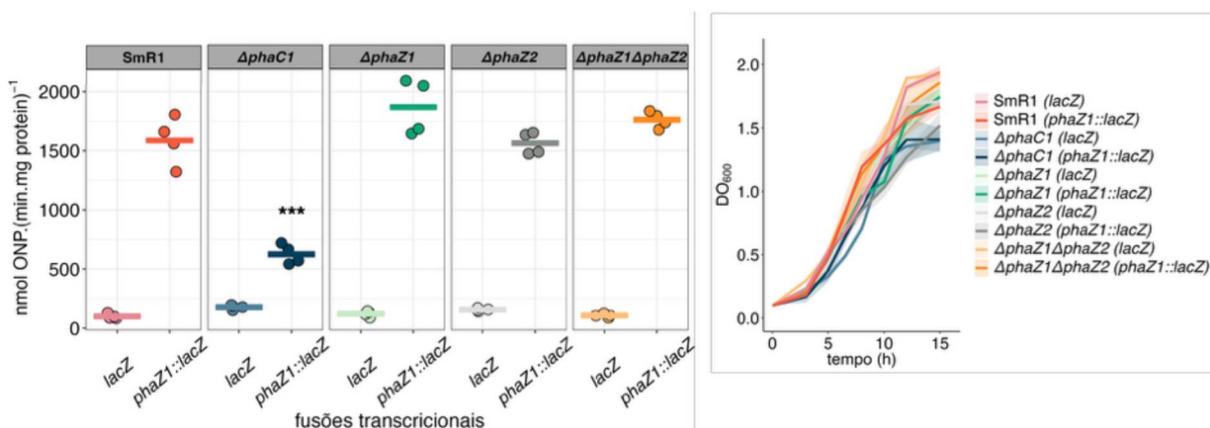


Figura 29. Análise da expressão do gene *phaZ1* através de ensaio de atividade de β-galactosidase em estirpes de *H. seropedicae*. Em (A) são apresentadas as atividades de beta-galactosidase das estirpes transformadas com o plasmídeo com a fusão *phaZ1::lacZ* ou com o plasmídeo controle. Em (B), crescimento das estirpes representado pela DO₆₀₀ em função do tempo. As linhas representam a média de duas replicatas biológicas com o desvio padrão representado pelas sombras coloridas sobre as linhas. As estirpes foram cultivadas por 16 horas a 30 °C sob agitação a 120 rpm em NFbHPN. Os asteriscos (***) indicam a significância estatística na comparação de médias através de análise de variância de Welch e teste *post hoc* de Games-Howell, com $p= 0,01$ (SmR1 - Δ*phaC1*), $p= 0,008$ (Δ*phaZ1* - Δ*phaC1*) e $p<0,001$ (Δ*phaZ2* - Δ*phaC1* e Δ*phaZ1*Δ*phaZ2* - Δ*phaC1*).

A região promotora de *phaZ1* possui duas sequências consensos conservadas, sendo relevante para a expressão desse gene, a sequência de ligação ao fator σ^{70} , com nucleotídeos conservados na posição -35 e -10 (Figura 30). A segunda sequência consenso, corresponde a um sítio de ligação da proteína PhaR, um repressor transcricional de genes do metabolismo de PHB (MAEHARA *et al.*, 2002). Kadowaki *et al.*, (2011) demonstraram *in vitro* que a proteína PhaR de *Herbaspirillum* é capaz de se ligar a sequências específicas presentes em quase todos os genes do metabolismo de PHB em *H. seropedicae*. Contudo, as evidências de regulação gênica *in vivo* por PhaR são restritas aos genes codificantes de fasinas, *phaP1* e *phaP2* (ALVES *et al.*, 2016; KADOWAKI *et al.*, 2011).

(A)

(B)



Figura 30. Ilustração da região promotora do gene *phaZ1*. Em (A), na cor laranja, está destacado o final da sequência codificante (CDS) do gene *trxB* e em verde a CDS de *phaZ1*. Na região intergênica foram identificados duas sequências consensos: em vermelho a sequência σ^{70} e em azul a sequência de ligação da proteína PhaR. Note que a sequência de ligação de PhaR sobrepõe o sítio σ^{70} e está presente na fita de DNA complementar, em roxo está destacado provável sequência de ligação ao ribossomo - RBS. Em (B), sequência consenso de ligação da proteína PhaR determinada por Kadowaki e cols. (2011).

Com o objetivo de verificar se PhaR é capaz de regular a expressão de *phaZ1*, foi realizado a conjugação entre a estirpe S17.1- λ pir contendo o plasmídeo com a fusão *phaZ1::lacZ* e as estirpes Δ *phaR* e Δ *phaC1* Δ *phaR* de *H. seropedicae*. Após a obtenção dos transconjugantes foi realizado o ensaio de β -galactosidase com as estirpes transconjugantes SmR1 (*phaZ1::lacZ*), Δ *phaC1*(*phaZ1::lacZ*), Δ *phaR*(*phaZ1::lacZ*) e Δ *phaC1* Δ *phaR*(*phaZ1::lacZ*).

Os resultados obtidos, mais uma vez demonstraram que a expressão de *phaZ1* ocorre em SmR1 e é reprimida em Δ *phaC1*. Esse segundo experimento reforça as observações anteriores, corroborando as diferenças já observadas. A análise estatística novamente indicou diferenças significativas na comparação de médias entre SmR1 e Δ *phaC1* ($p = 0,001$).

Nos mutantes com deleção do gene *phaR* a atividade específica da fusão *phaZ1::lacZ* apresenta valores levemente superiores aqueles observados na estirpe selvagem. No mutante Δ *phaR*, a média de atividade específica de β -galactosidase foi de 1.957 e de 1.423 nmol de ONP.(min.mg.proteína.)⁻¹, no selvagem (Figura 31). Essa diferença foi significativa com um valor de $p = 0,02$. Isso, já evidencia o potencial efeito repressor da proteína PhaR, que foi confirmado pelos resultados obtidos com o duplo mutante Δ *phaC1* Δ *phaR*.

Os níveis de expressão de *phaZ1* na estirpe $\Delta phaC1\Delta phaR$ são similares aos observados em SmR1 e $\Delta phaR$. A média de atividade específica foi de 1.847 nmol de ONP.(min.mg.proteína.)⁻¹. Essa média é mais próxima da observada no $\Delta phaR$, do que na estirpe selvagem, mas estatisticamente, não representa uma diferença significativa na comparação com as duas estirpes (Tabela 13). Por outro lado, há uma diferença significativa entre a média de $\Delta phaC1$ (534) em comparação a $\Delta phaC1\Delta phaR$, com um *p-value* menor que 0,001 ($p < 0,001$).

Como forma de descartar o efeito do PHB sobre a expressão de *phaZ1*, foi demonstrando a ausência deste polímero no mutante $\Delta phaC1\Delta phaR$ através de microscopia de fluorescência (Anexos, Figura 6).

Como forma de confirmar os dados de expressão dos ensaios de β -galactosidase, foi realizada análise de expressão de *phaZ1* através de RT-PCR semi-quantitativa. As estirpes foram cultivadas por 7 horas, quando ainda se observa que estão em fase exponencial de crescimento (Figura 31D). Após esse período foi realizado a extração de RNAs e síntese de cDNA (Materiais e Métodos, tópico 4.14.1). O cDNA foi utilizado como molde em reações de PCR com primers que anelam dentro da sequência codificante de *phaZ1*, como controle interno, foram utilizados *primers* que anelam dentro da sequência do gene *rrsA*, codificante do RNA ribossomal 16S (Figura 31B).

Os resultados obtidos indicam que há expressão de *phaZ1* em todas as estirpes. Contudo, não foi possível comparar a intensidade da banda de DNA entre as estirpes, uma vez que, as reações de PCR, utilizadas para amplificação dos fragmentos foram obtidas em 30 ciclos de amplificação. Posteriormente, verificou-se que o limite ideal seria em torno de 25 ciclos, tempo em que a amplificação, nas reações de PCR aumenta de forma exponencial (Anexos, tópico 8.5).

Em conjunto, as análises de expressão do gene *phaZ1*, indicam que em altas concentrações de íons amônio, esse gene é expresso em estirpes que acumulam PHB. Por outro lado, se não ocorre acúmulo do polímero, *phaZ1* é reprimido pela proteína repressora PhaR. Supostamente, PhaR se liga a uma sequência entre as regiões -35 e -10, impedindo a ligação do fator σ^{70} , e conseqüentemente a transcrição gênica através da RNA polimerase. Além disso, as análises de expressão confirmam o padrão de degradação de PHB observado em SmR1 e no mutante $\Delta phaZ2$, onde observa-se que as taxas de degradação são superiores aquelas observadas nas estirpes com deleção desse gene, $\Delta phaZ1$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$.

A repressão de genes codificantes de PHB despolimerases por PhaR não ocorre somente em *H. seropedicae*. Em *Rhodobacter sphaeroides* FJ1, uma proteína homóloga com as mesmas características é capaz de reprimir a expressão da PHB despolimerase 1 (CHOU *et al.*, 2009). Além disso, a região promotora do gene que codifica essa despolimerase possui sequência consenso de ligação ao respectivo PhaR homólogo (CHOU; YANG, 2010). Um segundo PhaR homólogo, com provável papel repressor sobre PHB despolimerases foi descrito em *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110. Nessa bactéria, foram identificadas duas regiões promotoras de PHB despolimerases (*phaZ1* e *phaZ3*), com sequências consensos de ligação desse repressor (NISHIHATA *et al.*, 2018). Isso indica que a repressão de PHB despolimerases por PhaR é uma característica conservada evolutivamente.

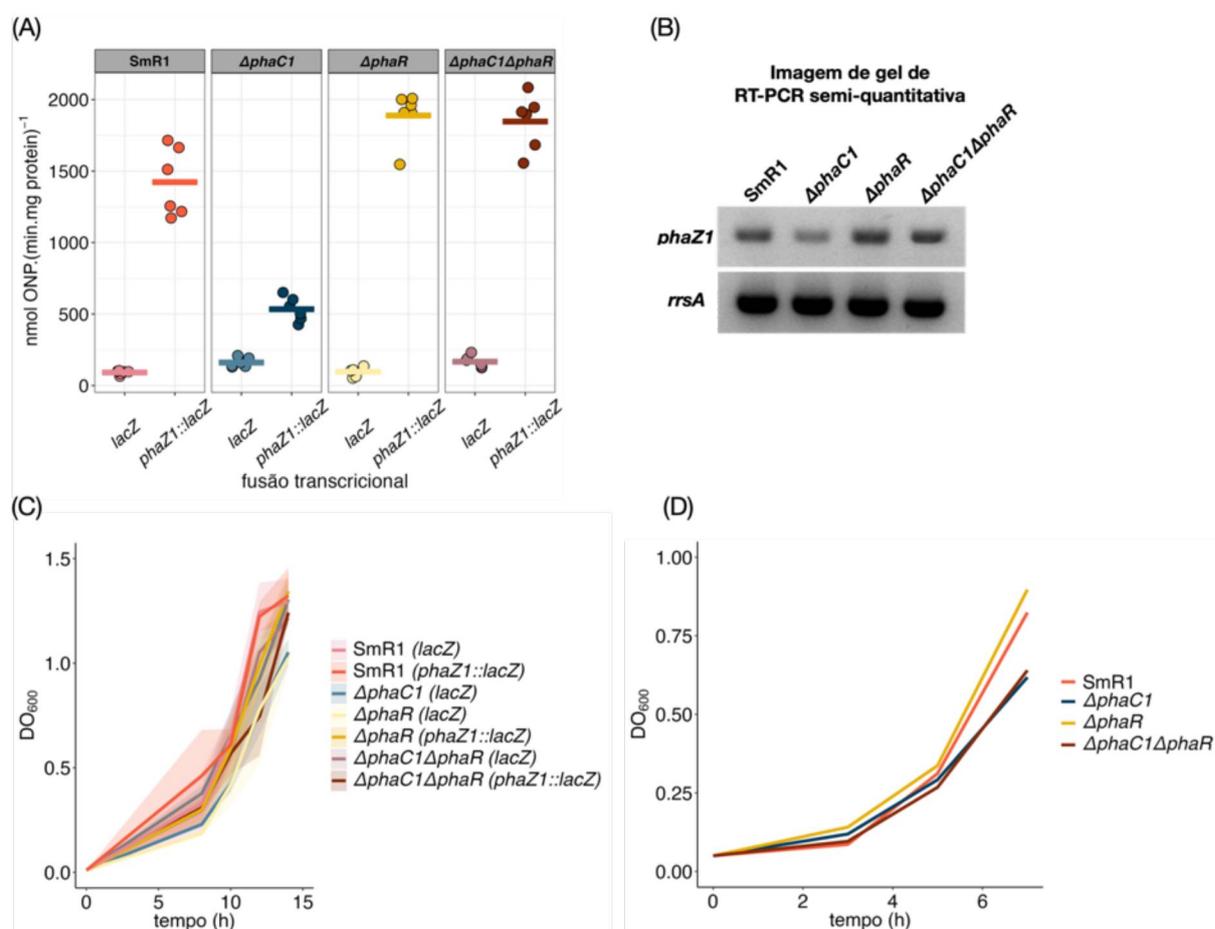


Figura 31. Análise da regulação da expressão do gene *phaZ1*. Em (A), são apresentadas as atividades de beta-galactosidase das estirpes transformadas com o plasmídeo com a fusão *phaZ1::lacZ* ou com o plasmídeo controle. A ocorrência de expressão nos mutantes foi confirmada por RT PCR semi-quantitativa, conforme indicado em (B), *rrsA* corresponde a expressão do gene codificante do RNA ribossomal 16S, que foi usado como controle interno. O padrão de crescimento (DO₆₀₀) das estirpes está indicado em (C), para os ensaios de β-galactosidase e em (D), para os experimentos de RT-PCR. As análises de β-galactosidase foram realizadas em triplicatas, com duas replicatas técnicas para cada experimento, conforme indicado em (A), com os pontos correspondendo a cada replicata e barras transversais indicando a média. As linhas em (C) correspondem a média das três replicatas biológicas

com o desvio padrão representado pelas sombras coloridas sobre as linhas. As estirpes foram cultivadas por 15 horas a 30 °C sob agitação a 120 rpm em NFbHPN. Em (D), as linhas correspondem aos valores de uma única replicata biológica.

TABELA 13 – *p*-VALUE DA COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *phaZ1::lacZ* - TESTE GAMES-HOWELL

Comparação estirpes	<i>p</i> -value
SmR1- Δ <i>phaC1</i>	0,001
SmR1- Δ <i>phaR</i>	0,023
SmR1- Δ <i>phaC1</i> Δ <i>phaR</i>	0,088
Δ <i>phaR</i> - Δ <i>phaC1</i>	<0,001
Δ <i>phaR</i> - Δ <i>phaC1</i> Δ <i>phaR</i>	0,848
Δ <i>phaC1</i> Δ <i>phaR</i> - Δ <i>phaC1</i>	<0,001

LEGENDA: Teste *post hoc* de Games-Howell, indicado quando não há igualdade de variâncias. Teste realizado com os valores de *phaZ1::lacZ* plotados no gráfico da figura 33A. A análise completa com comparação entre todos os grupos pode ser visualizada em Anexos, Tabela 16.

A expressão do gene *phaZ1*, que codifica a PHB despolimerase 1, é induzida por altas concentrações de íons NH_4^+ . Nessa condição, a enzima se liga aos grânulos de PHB, com a mobilização ocorrendo em fases tardia do crescimento (fase estacionária). No entanto, em condições de alta relação carbono-nitrogênio (C/N), não ocorre degradação do polímero. Para investigar como a expressão de *phaZ1* é regulada nessa situação, diferentes estirpes contendo uma fusão *phaZ1::lacZ* foram cultivadas em meio NFbHPLN e a atividade β -galactosidase foi determinada.

A expressão de *phaZ1* é diferente em condições limitantes de amônio. A análise na estirpe SmR1 sugere que, em comparação com as estirpes cultivadas em alto amônio, a expressão diminui no SmR1, com valor mais próximo ao observado em Δ *phaC1*, a média foi de de 43,1 e 15,2, no selvagem e mutante, respectivamente (Figura 32). Embora essa diferença ainda seja significativa ($p = 0,002$), mostra que há uma tendência de repressão da expressão desse gene em condições em que não há nitrogênio disponível para o metabolismo celular. Essa observação, também é justificada pela ausência de degradação nessas condições de cultivo.

Ao comparar a expressão de *phaZ1* no SmR1 com os mutantes Δ *phaR* e Δ *phaC1* Δ *phaR* observamos que é muito superior nos mutantes. As médias foram de 226 e 190 no Δ *phaR* e Δ *phaC1* Δ *phaR*, respectivamente. Estatisticamente, essa diferença corresponde a um valor de $p < 0,001$, na comparação de médias em teste ANOVA de Welch e *post hoc* Games-Howell (Tabela 14). Essa comparação de médias com as mesmas estirpes cultivadas em meio NFbHPN, demonstrava que, entre SmR1- Δ *phaC1* Δ *phaR* não era significativa, sendo significativa entre SmR1- Δ *phaR* ($p = 0,023$).

No geral, a expressão de *phaZ1* é menor sob cultivo com limitação de NH_4^+ , em comparação quando há altas concentrações dessa fonte de nitrogênio. Mas a distinção mais notável é que a diminuição da expressão de *phaZ1* em SmR1 é menor em relação aos mutantes com deleção da proteína repressora PhaR, isso indica que essa proteína desempenha um papel repressor em SmR1 cultivada em meio com alta relação C/N. O padrão de expressão foi confirmado por RT-PCR semi-quantitativa. A análise visual, demonstra que as bandas são menos intensas em SmR1 e ΔphaC1 em comparação com os mutantes ΔphaR e $\Delta\text{phaC1}\Delta\text{phaR}$ (Figura 32B).

O modelo de regulação da repressão por PhaR, proposto por Maehara *et al.*, (2002), sugere que as moléculas de PHB recém sintetizadas ligam-se a essa proteína, como consequência, a proteína se desliga da sequência consenso na região promotora ligando-se preferencialmente aos grânulos de PHB. Em *H. seropedicae*, esse modelo parece ser válido sob condições de cultivo em meio com altas concentrações de amônio, uma vez que foi demonstrado a ocorrência de PhaR associado aos grânulos de PHB (TIRAPELLE *et al.*, 2013). Por outro lado, quando essa bactéria é cultivada em condições limitantes de NH_4^+ , esse modelo não se ajusta as observações, porque mesmo tendo os grânulos de PHB, PhaR parece reprimir a expressão de *phaZ1*. Esse é um dado preliminar, e experimentos adicionais serão necessários ao entendimento de como PhaR reprime a expressão gênica sob condições limitantes de amônio.

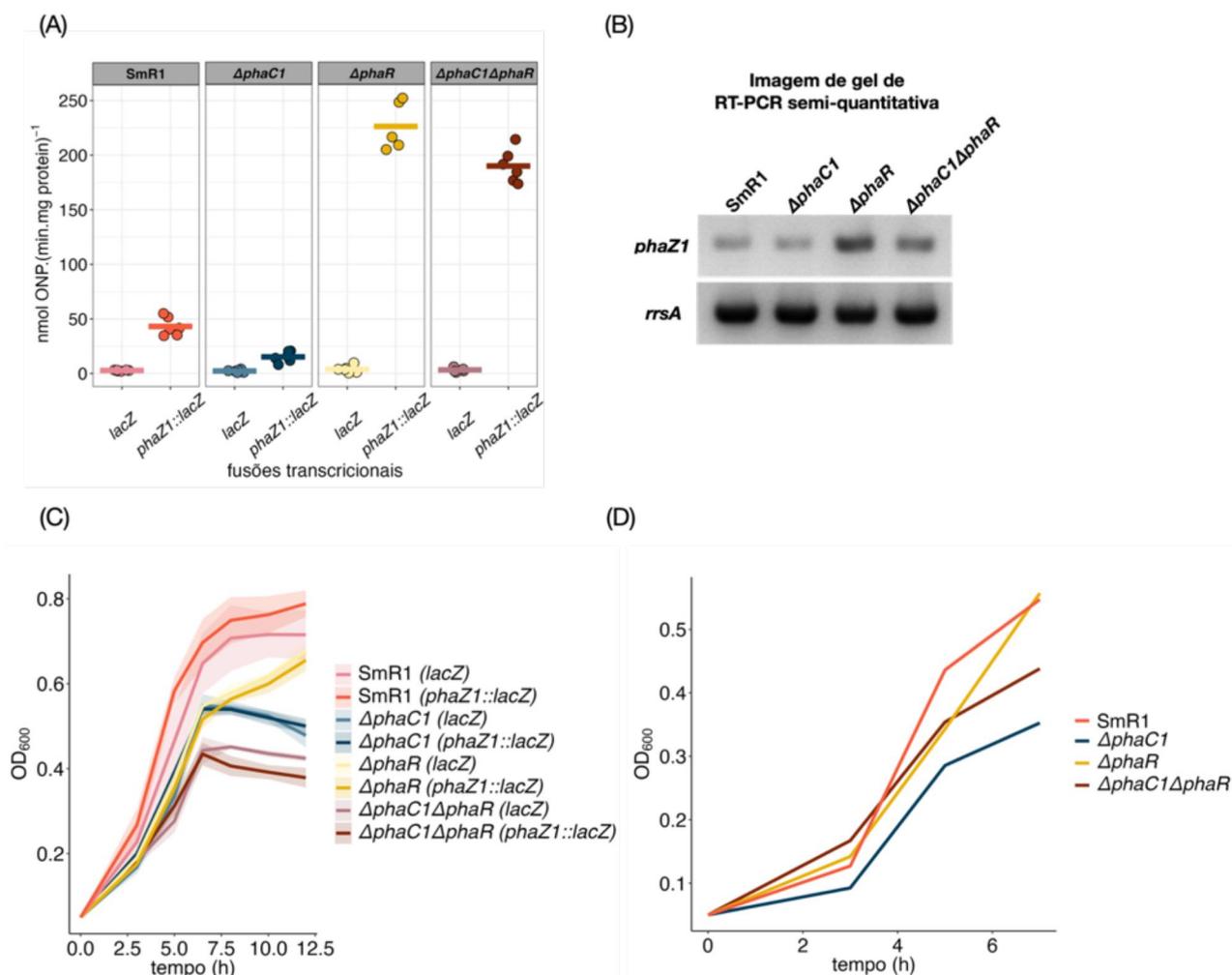


Figura 32. Regulação da expressão de *phaZ1* em condições de limitação de nitrogênio. A expressão do gene *phaZ1* sob condições de limitação de NH₄⁺ foi avaliada nas estirpes SmR1, Δ*phaC1*, Δ*phaR* e Δ*phaC1*Δ*phaR*, conforme indicado em (A), no qual são apresentadas as atividades de beta-galactosidase das estirpes transformadas com o plasmídeo com a fusão *phaZ1::lacZ* ou com o plasmídeo controle. O padrão de expressão observado no ensaio de β-galactosidase foi confirmado através de RT-PCR semi-quantitativa (B), note que, as bandas de SmR1 e Δ*phaC1* são menos intensas em comparação a Δ*phaR* e Δ*phaC1*Δ*phaR*. Em (C) e (D) padrão de crescimento das estirpes nos ensaios de β-galactosidase e RT-PCR, respectivamente. Em ambos os experimentos as estirpes foram cultivadas em meio NFbHPLN, com tempo de cultivo de 12 horas em (C) e de 7 horas em (D). As análises de β-galactosidase foram realizadas em triplicatas, com duas replicatas técnicas para cada experimento, conforme indicado em (A), com os pontos correspondente as replicatas e as barras transversais indicando a média. As linhas em (C) correspondem a média das três replicatas biológicas com o desvio padrão representado pelas sombras coloridas sobre as linhas. Em (D), as linhas correspondem aos valores de uma única replicata biológica.

TABELA 14 – *p*-VALUE DA COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *phaZ1::lacZ* - TESTE GAMES-HOWELL

Comparação estirpes	<i>p</i> -value
SmR1-Δ <i>phaC1</i>	0,002
SmR1-Δ <i>phaR</i>	<0,001
SmR1-Δ <i>phaC1</i> Δ <i>phaR</i>	<0,001
Δ <i>phaR</i> -Δ <i>phaC1</i>	<0,001
Δ <i>phaR</i> -Δ <i>phaC1</i> Δ <i>phaR</i>	0,168
Δ <i>phaC1</i> Δ <i>phaR</i> -Δ <i>phaC1</i>	<0,001

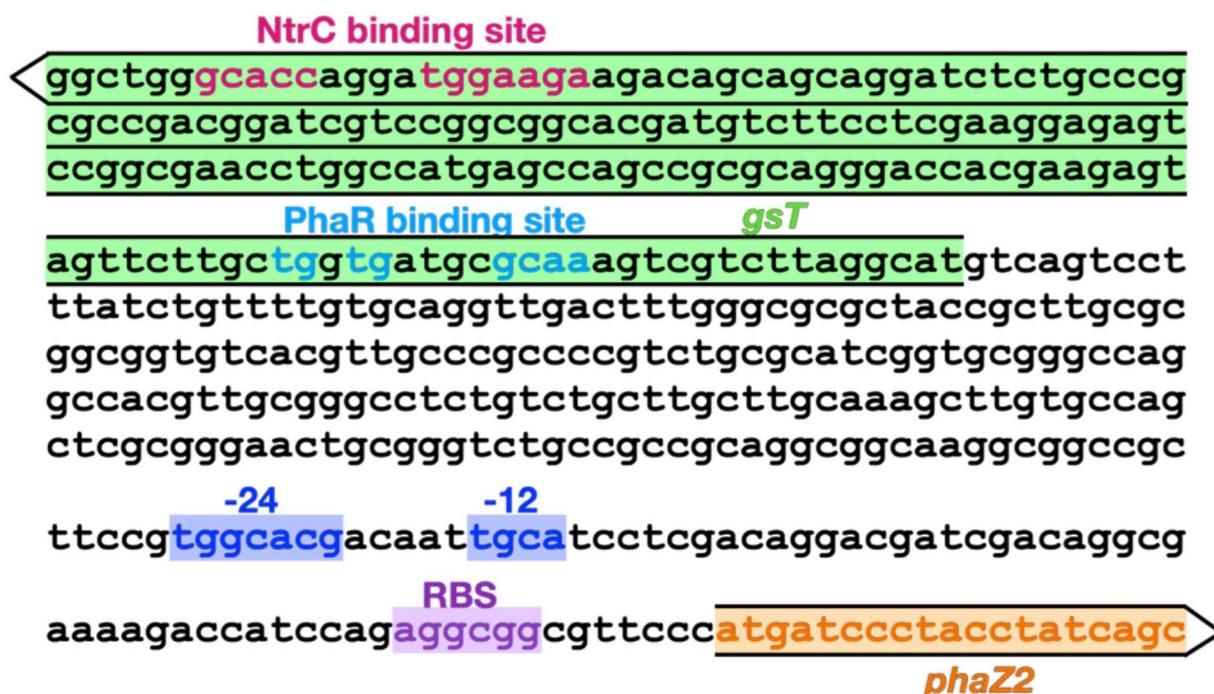
LEGENDA: Teste *post hoc* de Games-Howell, indicado quando não há igualdade de variâncias. Teste

realizado com os valores de *phaZ1::lacZ* plotados no gráfico da Figura 32. A análise completa com comparação entre todos os grupos pode ser visualizada em Anexos, Tabela 21.

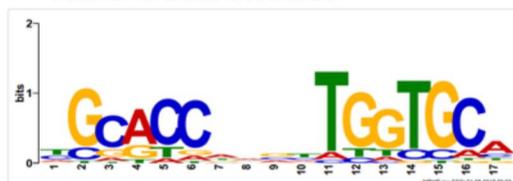
5.8 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO LIMITANTE DE ÍONS NH_4^+ SOBRE A EXPRESSÃO DO GENE *phaZ2* EM *H. seropedicae*

A expressão de *phaZ2* foi previamente analisada por Mota (2020), no qual foi demonstrado que a expressão desse gene ocorre em condições limitantes de íons NH_4^+ . Os dados foram obtidos a partir de ensaios de β -galactosidase com uma fusão transcricional *phaZ2::lacZ*, no vetor pMP220 (SPAINK *et al.*, 1987), e foram corroborados por análises da região promotora com a identificação das sequências consensos de ligação ao fator σ^{54} e do ativador transcricional NtrC, conforme ilustrado na Figura 33. Adicionalmente foi identificada a ocorrência de uma sequência de ligação a proteína repressora PhaR. Entretanto, ainda não foi analisado se PhaR é capaz de reprimir a expressão de *phaZ2*.

Região promotora de *phaZ2*



NtrC consensus:



σ^{54} consensus:

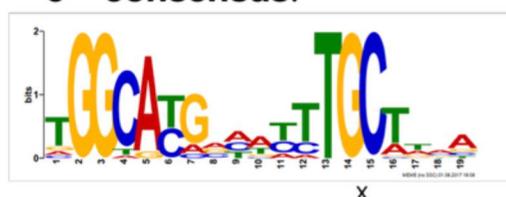


Figura 33. Região promotora de *phaZ2*. A expressão de *phaZ2* ocorre sob condições de limitação de íons NH_4^+ , esses experimentos são suportados pela ocorrência de um fator σ^{54} conservado (-24, -12), destacado em azul, e também por uma sequência de ligação ao ativador transcricional NtrC, destacado em rosa. Além dessas duas sequências há um suposto sítio de ligação a proteína repressora PhaR. Os consensos de ligação a NtrC e RpoN em *Herbaspirillum* foram determinados por Bonatto *et al.*, 2024, conforme indicados na imagem.

Para avaliar a capacidade de PhaR em reprimir a expressão de *phaZ2*, as estirpes SmR1, $\Delta phaC1$, $\Delta phaR$ e $\Delta phaC1\Delta phaR$ foram transformadas com a fusão *phaZ2::lacZ*. As estirpes transformadas foram cultivadas em paralelo nos meios NFbHPN e NFbHPLN.

O padrão de atividade de β -galactosidase obtido sugere que não há expressão de *phaZ2* em meio NFbHPN (20 mM de NH_4Cl) nas estirpes analisadas. Como tendência geral, observa-se um aumento da expressão em 14 horas de cultivo em todas as estirpes. Contudo, o plasmídeo sem promotor, possui um vazamento de expressão proporcional, desse modo, o controle negativo não permite inferir se há expressão de *phaZ2* em fase tardia de crescimento. Embora, o vetor utilizado não pareça ser o ideal, a ausência de expressão foi confirmada por RT-PCR semi-quantitativa, sugerindo que, a expressão de *phaZ2* não ocorre em condições onde há uma alta disponibilidade de NH_4Cl (Figura 34B).

Em contraste, o ensaio de β -galactosidase realizado em meio NFbHPLN (2 mM NH_4Cl) demonstrou que a expressão de *phaZ2* aumenta progressivamente, conforme avaliado entre 11 e 14 horas de cultivo. Apesar da concentração de nitrogênio no meio não ter sido quantificada, a ausência de crescimento sugere fortemente que as células encontram-se sob limitação de nitrogênio (Figura 34C, painel 2 mM de NH_4Cl). O aumento progressivo da expressão ocorre com todas as estirpes, sendo mais acentuado nas estirpes com deleção de *phaC1*, $\Delta phaC1$ e $\Delta phaC1\Delta phaR$. Embora tenha sido realizado apenas um experimento, com duas replicatas técnicas, o padrão de expressão foi confirmado através de RT-PCR semi-quantitativa (Figura 34C). Na imagem de gel de agarose, após eletroforese, observa-se que uma maior intensidade das bandas de $\Delta phaC1$ e $\Delta phaC1\Delta phaR$, em comparação à SmR1 e $\Delta phaR$. De maneira geral, nessas condições a proteína PhaR não reprime a expressão de *phaZ2*.

Ao comparar o efeito repressor de PhaR sobre o gene *phaZ1* com *phaZ2* em condições de limitação de NH_4^+ , fica evidente, que PhaR não apresenta o mesmo efeito sobre *phaZ2*. Enquanto *phaZ1* é reprimido no mutante $\Delta phaC1$, com *phaZ2* a

expressão parece aumentar. O aumento da expressão desse gene no mutante $\Delta phaC1$ foi confirmado por Teixeira (2015) ao comparar o transcriptoma da estirpe SmR1 com esse mutante. Ainda não está claro os fatores que levam ao aumento da expressão dessa PHB despolimerase em um mutante que não produz PHB.

Com o objetivo de confirmar que a expressão de *phaZ2* é dependente dos fatores transcricionais RpoN e NtrC, analisamos através de RT-PCR semi-quantitativa a expressão de *phaZ2* nos mutantes $\Delta ntrC$ e $\Delta rpoN$ (Figura 35). De fato, a expressão desse gene não foi detectada nesses mutantes, enquanto que há expressão de *phaZ1* (controle positivo). Esse dado, se soma a uma série de evidências de estudos anteriores, que demonstram que a expressão de *phaZ2* ocorre sob condições onde a bactéria está privada de fontes de nitrogênio. Curiosamente, a maioria desses estudos foram realizados durante ensaios de interação planta-bactéria. Em ordem cronológica, o primeiro estudo, evidenciou a expressão diferencial de *phaZ2* em *Herbaspirillum* colonizando trigo (BALSANELLI *et al.*, 2016). Posteriormente, Balsanelli *et al.*, (2016) demonstraram que a expressão de *phaZ2* também aumenta nas células de *H. seropedicae* colonizando milho. Alves *et al.*, (2019), observaram a expressão de *phaZ2* dentro dos tecidos radiculares de *Setaria viridis* através de um fusão da *phaZ2::gfp*. Por último, Bonato. *et al.*, 2024, demonstraram que a expressão de *phaZ2*, depende de NtrC, confirmando assim os resultados obtidos nesse estudo.

A expressão de *phaZ2* sob controle do sistema NTR em conjunto com a mobilização de PHB observado no mutante $\Delta phaZ1$ evidenciam um ponto de correlação dos metabolismos de carbono e nitrogênio. Adicionalmente, em condições de fixação de nitrogênio, *H. seropedicae* mobiliza o PHB rapidamente, provavelmente para fornecer carbono e energia, necessários à assimilação de amônio (Marcelo Muller-Santos, comunicação pessoal). Essa provável importância das PHB despolimerases na fixação de nitrogênio foi confirmada experimentalmente de maneira preliminar (Anexos, Figura 8). Entretanto requer experimentos adicionais para confirmar os resultados.

(A)

(B)

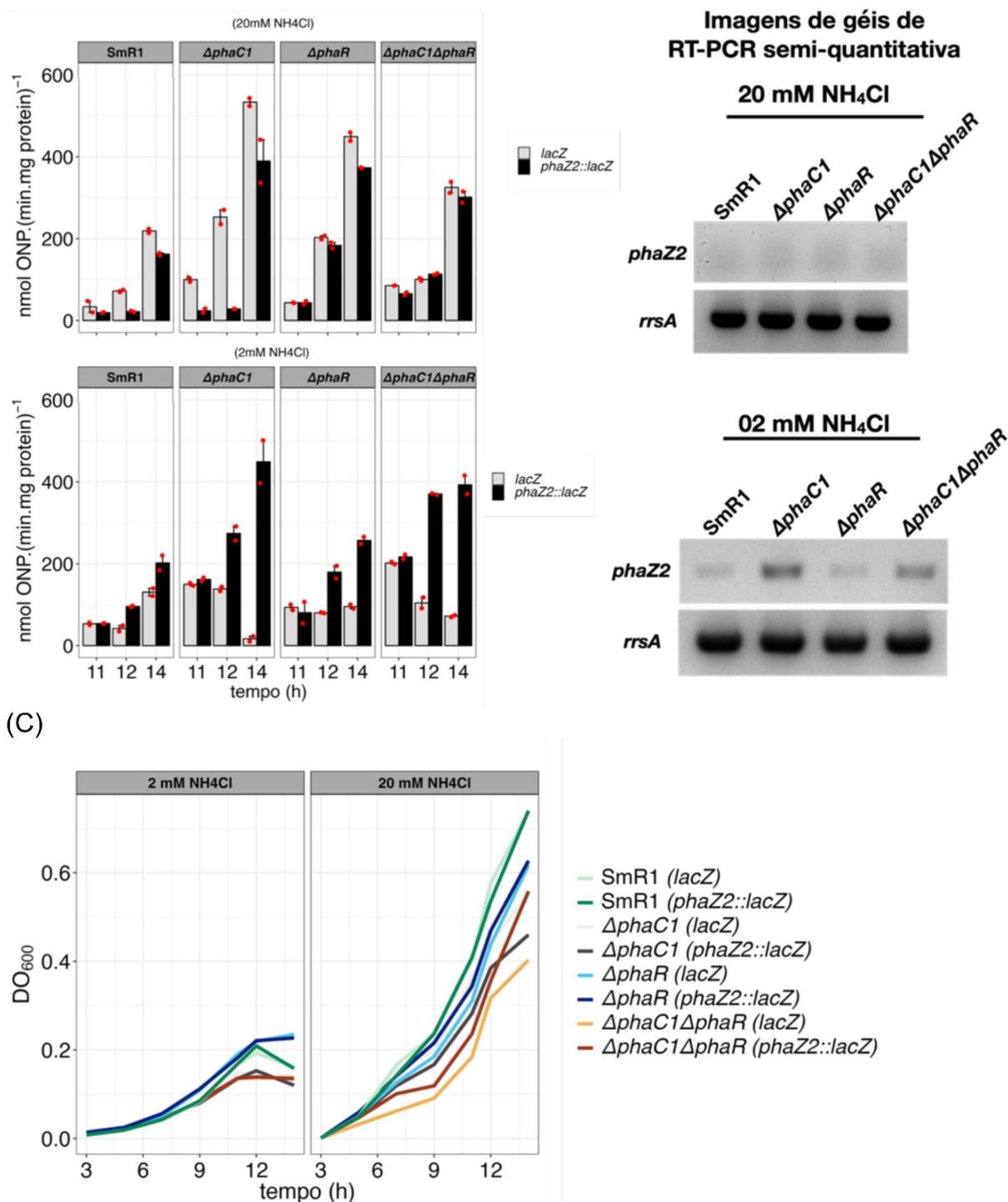


Figura 34. Efeito da deleção dos genes *phaC1* e *phaR* sobre a expressão de *phaZ2*. A expressão de *phaZ2* foi avaliada através da atividade específica de β-galactosidase usando uma fusão *phaZ2::lacZ* (A) nas estirpes SmR1, Δ*phaC1*, Δ*phaR* e Δ*phaC1*Δ*phaR*. Os dados indicam que há expressão somente nas estirpes cultivadas em meio NFbHPLN (2 mM NH₄Cl), após 12 horas de cultivo, período em que o crescimento cessa devido a ausência de íons NH₄⁺. O padrão de expressão de *phaZ2::lacZ* foi confirmado através de RT-PCR semi-quantitativa, conforme imagens de géis de eletroforese dos produtos de PCR com cDNA das estirpes SmR1, Δ*phaC1*, Δ*phaR* e Δ*phaC1*Δ*phaR*, no qual não se observa fragmentos amplificados nos cultivos em meio NFbHPN, mas os fragmentos estão presentes em todas as estirpes cultivadas em meio NFbHPLN, com bandas de diferentes intensidades, sendo menos intensas em SmR1 e Δ*phaR* e mais intensa nos mutantes Δ*phaC1* e Δ*phaC1*Δ*phaR*, sugerindo que a expressão pode ser maior nestas duas últimas. O padrão de crescimento das estirpes cultivadas para os experimentos de RT-PCR corresponde aquele da Figura 32D. O crescimento das estirpes cultivadas nos ensaios de β-galactosidase, em meio NFbHPN e NFbHPLN estão ilustrados no painel

C. Os dados de β -galactosidase correspondem a média de um único experimento realizado em duplicata (pontos vermelhos).

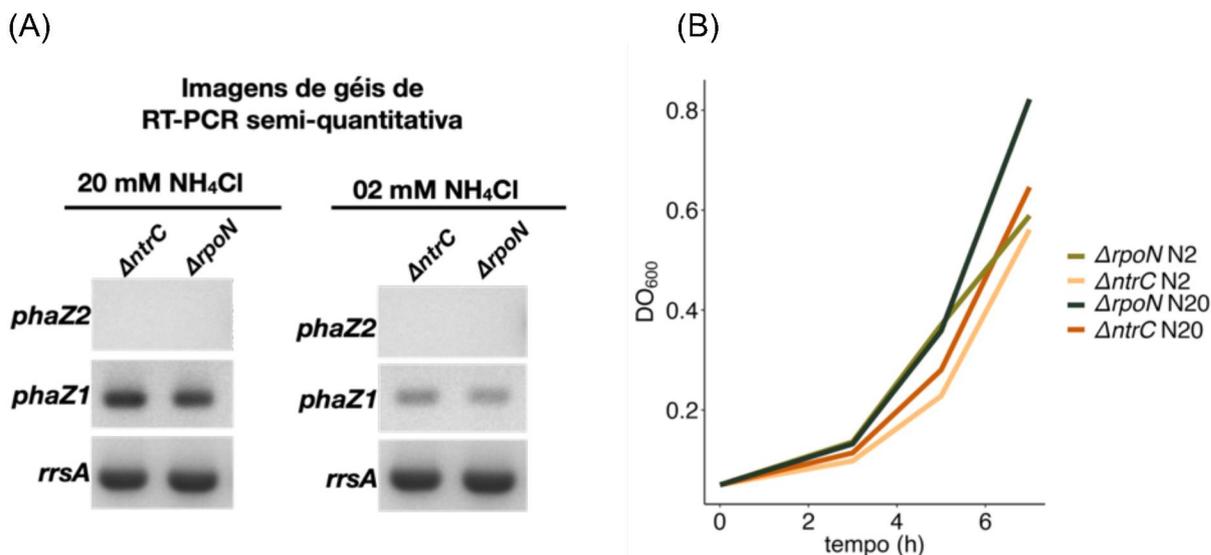


Figura 35. RT-PCR semi-quantitativa utilizando cDNA das estirpes $\Delta rpoN$ e ΔnrC . A reação de PCR utilizando cDNA das estirpes $\Delta rpoN$ e ΔnrC demonstrou que não há amplificação de fragmento de DNA relacionado ao gene *phaZ2*, tanto em condições de cultivo com alta (20 mM) e baixa (2 mM) concentração de NH₄Cl. Por outro lado, a amplificação ocorre com o controle positivo *phaZ1*, nas duas condições. *rrsA* corresponde a um fragmento do gene 16S usado como controle interno nas reações de RT-PCR semi-quantitativa. Em (B), padrão de crescimento das estirpes cultivadas em meio NFbHPN (N20) e meio NFbHPLN (N2).

Nesse projeto foram analisados os mutantes dos genes *phaZ1* e *phaZ2* com o objetivo de analisar a expressão gênica e o papel das proteínas PhaZ1 e PhaZ2 na mobilização de polihidroxibutirato. A análise de mutantes de PHB despolimerases demonstrou que a despolimerase PhaZ1 é a principal enzima envolvida na degradação do PHB, especialmente em presença de altas concentrações de amônio, enquanto a PhaZ2 desempenha um papel secundário, mais evidente em condições de limitação de nitrogênio. A análise da expressão de *phaZ1* e *phaZ2* indica que esses genes são regulados de forma independente, respondendo a sinais específicos, como a presença de amônio para PhaZ1 e a limitação de nitrogênio para PhaZ2, sugerindo um mecanismo adaptativo que favorece a sobrevivência bacteriana e a eficiência na utilização de recursos sob condições de estresse (escassez de carbono).

Além disso, as características estruturais e funcionais dos grânulos de PHB demonstram que esses polímeros desempenham um papel protetor, além de armazenar carbono e energia. A interferência dos grânulos na densidade óptica das culturas sugere que o PHB pode atuar como um dispersor de radiação ultravioleta, como observado em outras bactérias. Esses achados contribuem para uma melhor

compreensão do papel do PHB no metabolismo de *Herbaspirillum seropedicae*, evidenciando suas funções fisiológicas na proteção contra estresses ambientais.

6 CONCLUSÕES

- As proteínas PhaZ1 e PhaZ2 de *H. seropedicae* apresentam alta similaridade estrutural e funcional com as proteínas homólogas de *C. necator*, evidenciando a conservação evolutiva dessas PHB despolimerases. A identificação da tríade catalítica comum e a similaridade das estruturas tridimensionais sugerem que essas enzimas podem desempenhar funções similares no metabolismo de PHB em ambas as bactérias.
- A PHB despolimerase 1 (PhaZ1) foi identificada como a principal enzima responsável pela degradação do PHB em *Herbaspirillum seropedicae*, especialmente em condições de alta concentração de amônio. Sua atividade contínua, a partir da fase estacionária, foi crucial para a mobilização eficiente do PHB.
- A função de PhaZ2 na degradação do PHB não está totalmente esclarecida, os resultados sugerem que ela desempenha um papel secundário, possivelmente contribuindo para a manutenção dos grânulos de PHB e apresentando impacto na viabilidade celular em condições de estresse nutricional.
- Os grânulos de PHB apresentaram interferência na densidade óptica (DO₆₀₀) das estirpes, indicando que o PHB pode influenciar as medições de crescimento bacteriano, especialmente sob cultivo com limitação de íons NH₄⁺.
- A mobilização do PHB em condições de ausência de carbono demonstrou ser um importante mecanismo adaptativo para a sobrevivência de *H. seropedicae* SmR1, mostrando o papel desse polímero em situações de ausência de carbono.
- A expressão dos genes *phaZ1* e *phaZ2* é regulada de forma independente, com *phaZ1* sendo expresso na presença de altas concentrações de amônio e *phaZ2* em condições de limitação de nitrogênio. Essa regulação diferenciada demonstra que cada despolimerase responde a sinais específicos do ambiente, garantindo a mobilização de PHB de acordo com as necessidades metabólicas da bactéria.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABE, T.; KOBAYASHI, T.; SAITO, T. Properties of a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase with high specific activity (PhaZd) in *Wautersia eutropha* H16. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 20, p. 6982–6990, 2005.

ALVES, L. P. S.; ALMEIDA, A. T.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F. O.; DE SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; MULLER-SANTOS, 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.; PAIXÃO SANTANA-FILHO, A.; LANZI SASSAKI, G.; DE OLIVEIRA PEDROSA, F.; MALTEMPI DE SOUZA, E.; SATIE CHUBATSU, L.; MÜLLER-SANTOS, M. 3-Hydroxybutyrate Derived from Poly-3-Hydroxybutyrate Mobilization Alleviates Protein Aggregation in Heat-Stressed *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n.16, 2020.

ALVES, L. P. S.; PEDROSA, F. de O.; TEIXEIRA, C. S.; GAVÍDIA, M. P.; DO AMARAL, F. P.; BOM, M. T.; STACEY, G.; HOLTHMAN, F.; MÜLLER-SANTOS, M.; KIM, D.; MALTEMPI DE SOUZA, E.; CHUBATSU, L. S. 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.

ALVES, L. P. S.; TEIXEIRA, C. S.; TIRAPELLE, E. F.; DONATTI, L.; PEDROSA, F. D. O.; CHUBATSU, L. S.; MÜLLER-SANTOS, M.; MÜLLER-SANTOS, M. Backup Expression of the PhaP2 Phasin Compensates for *phaP1* Deletion in *Herbaspirillum seropedicae*, Maintaining Fitness and PHB Accumulation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 739, p. 1–13, 2016.

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.; DOBEREINER, D. J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.

BALSANELLI, E.; TADRA-SFEIR, M. Z.; FAORO, H.; PANKIEVICZ, V. C. S.; DE BAURA, V. A.; PEDROSA, F. O.; DE SOUZA, E. M.; 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.

BARUAH, N.; HAAJANEN, R.; RAHMAN, M. T.; PIRTTILÄ, A. M.; KOSKIMÄKI, J. J. Biosynthesis of polyhydroxybutyrate by *Methylobacterium extorquens* DSM13060 is essential for intracellular colonization in plant endosymbiosis. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, 2024.

BATISTA, M. B.; TEIXEIRA, C. S.; SFEIR, M. Z. T.; ALVES, L. P. S.; VALDAMERI, G.; PEDROSA, F. D. O.; SASSAKI, G. L.; STEFFENS, M. B. R.; DE SOUZA, E. M.; DIXON, R.; MÜLLER-SANTOS, M. PHB biosynthesis counteracts redox stress in *Herbaspirillum seropedicae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 472, p. 1–12, 2018.

BOCHNERI, B. R.; SAVAGEAU, M. A. Generalized Indicator Plate for Genetic, Metabolic, and Taxonomic Studies with Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 434-444, 1977.

BOM, M. A. T. **Estudo do sistema de fosfotransferases (PTS) no controle do metabolismo de polihidroxibutirato em *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2018. (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.

BONATO, P.; CAMILIOS-NETO, D.; TADRA-SFEIR, M. Z.; MOTA, F. J. T.; MULLER-SANTOS, M.; WASSEM, R.; DE SOUZA, E. M.; DE OLIVEIRA PEDROSA, F.; CHUBATSU, L. S. The role of NtrC in the adaptation of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 to nitrogen limitation and to nitrate. **Archives of Microbiology**, v. 206, n. 7, 2024.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRIGHAM, C. J.; REIMER, E. N.; RHA, C. K.; 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.; SPETH, D. R.; RHA, C.; SINSKEY, A. J. Whole-Genome microarray and gene deletion studies reveal regulation of the Polyhydroxyalkanoate production cycle by the stringent response in *Ralstonia Eutropha* H16. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 22, p. 8033-8044, 2012.

BROWN, D. R.; BARTON, G.; PAN, Z.; BUCK, M.; WIGNESHWERARAJ, S. Nitrogen stress response and stringent response are coupled in *Escherichia Coli*. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, 2014.

CAI, S.; CAI, L.; ZHAO, D.; LIU, G.; HAN, J.; ZHOU, J.; XIANG, H. A Novel DNA-binding protein, PhaR, plays a central role in the regulation of Polyhydroxyalkanoate accumulation and granule formation in the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 373-385, 2015.

CATALAN, 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.

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.

SCHRÖDINGER L, DELANO W. **PyMOL**. 2020. Disponível em: <<http://www.pymol.org/pymol>>

COSTA, S. S.; MIRANDA, A. L.; DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; DRUZIAN, J. I. Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs) — A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 536–547, 2019.

DIETRICH, K.; DUMONT, M. J.; DEL RIO, L. F.; ORSAT, V. Producing PHAs in the bioeconomy — Towards a sustainable bioplastic. **Sustainable Production and Consumption**, v. 9, p. 58–70, 2017.

DO AMARAL, F. P.; TULESKI, T. R.; PANKIEVICZ, V. C. S.; MELNYK, R. A.; ARKIN, A. P.; GRIFFITTS, J.; TADRA-SFEIR, M. Z.; MALTEMPI DE SOUZA, E.; DEUTSCHBAUER, A.; MONTEIRO, R. A.; STACEYA, G. Diverse bacterial genes modulate plant root association by beneficial bacteria. **mBio**, v. 11, n. 6, p. 1–15, 2020.

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.

ELZHOV T. V.; MULLEN K. M.; SPIESS A.; BOLKER B. **minpack.lm: R Interface to the Levenberg-Marquardt Nonlinear Least-Squares Algorithm Found in MINPACK, Plus Support for Bounds**. R package version 1.2-4, 2023. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=minpack.lm>>.

FERNANDES, J. G.; CORREIA, D. M.; BOTELHO, G.; PADRÃO, J.; DOURADO, F.; RIBEIRO, C.; LANCEROS-MÉNDEZ, S.; SENCADAS, V. PHB-PEO electrospun fiber membranes containing chlorhexidine for drug delivery applications. **Polymer Testing**, v. 34, p. 64–71, 2014.

GEBAUER, B.; JENDROSSEK, D. Assay of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase activity and product determination. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 6094–6100, 2006.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, Use, and Fate of All Plastics Ever Made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, 2017.

GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **Princípios de estatística em ecologia**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 527 p.

GRZESIAK, J.; ROGALA, M. M.; GAWOR, J.; KOUŘILOVÁ, X.; OBRUČA, S. Polyhydroxyalkanoate involvement in stress-survival of two psychrophilic bacterial strains from the High Arctic. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, 2024.

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.

HANDRICK, R.; REINHARDT, S.; KIMMIG, P.; JENDROSSEK, D. The “intracellular” poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 21, p. 7243–7253, 2004.

HANDRICK, R.; REINHARDT, S.; SCHULTHEISS, D.; REICHART, T.; SCHÜLER, D.; JENDROSSEK, V.; JENDROSSEK, D. Unraveling the Function of the *Rhodospirillum rubrum* Activator of

Polyhydroxybutyrate (PHB) Degradation: The Activator Is a PHB-Granule-Bound Protein (Phasin). **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 8, p. 2466–2475, 2004.

HATZINGER, P. B.; PALMER, P.; SMITH, R. L.; PEÑARRIETA, C. T.; YOSHINARI, T. Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 47–58, 2003.

HISANO, T.; KASUYA, K. I.; TEZUKA, Y.; ISHII, N.; KOBAYASHI, T.; SHIRAKI, M.; OROUDJEV, E.; HANSMA, H.; IWATA, T.; DOI, Y.; SAITO, T.; MIKI, K. The crystal structure of polyhydroxybutyrate depolymerase from *Penicillium funiculosum* provides insights into the recognition and degradation of biopolyesters. **Journal of Molecular Biology**, v. 356, n. 4, p. 993–1004, 2006.

HOKAMURA, A.; FUJINO, K.; ISODA, Y.; ARIZONO, K.; SHIRATSUCHI, H.; MATSUSAKI, H. Characterization and identification of the proteins bound to two types of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas* SP. 61-3. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 79, n. 8, p. 1369–1377, 2015.

JENDROSSEK, D. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 10, p. 3195–3202, 2009.

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.

JIANG, N.; WANG, M.; SONG, L.; YU, D.; ZHOU, S.; LI, Y.; LI, H.; HAN, X. Polyhydroxybutyrate production by recombinant *Escherichia coli* based on genes related to synthesis pathway of PHB from *Massilia* sp. UMI-21. **Microbial Cell Factories**, v. 22, n. 1, 2023.

JIN, D. J.; CAGLIERO, C.; ZHOU, Y. N. Growth rate regulation in *Escherichia Coli*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 269–287, 2012.

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; *et al.* Highly accurate protein structure prediction with alphafold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021.

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, 2018.

JUENGERT, J. R.; BORISOVA, M.; MAYER, C.; WOLZ, C.; BRIGHAM, C. J.; SINSKEY, A. J.; JENDROSSEK, D. Absence of ppGpp leads to increased mobilization of intermediately accumulated Poly(3-Hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha* H16. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 13, 2017.

KADDOR, C.; VOIGT, B.; HECKER, M.; STEINBÜCHEL, A. Impact of the core components of the phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system, HPr and EI, on differential protein

expression in *Ralstonia eutropha* H16. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 7, p. 3624–3636, 2012.

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.; MÜLLER-SANTOS, M.; REGO, F. G.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; STEFFENS, M. B. Identification and characterization of PhbF: A DNA binding protein with regulatory role in the PHB metabolism of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, 2011.

KARSTENS, K.; ZSCHIEDRICH, C. P.; BOWIEN, B.; STÜLKE, J.; GORKE, B. Phosphotransferase protein EIIA^{Ntr} interacts with SpoT, a key enzyme of the stringent response, in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology**, v. 160, n. 4, p. 711–722, 2014.

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 634–644, 2010.

KELLY, F. J.; FUSSELL, J. C. Toxicity of airborne particles - established evidence, knowledge gaps and emerging areas of importance: Topical aspects of particle toxicity. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 378, n. 2183, 2020.

KIM, E. J.; KIM, K. J. Crystal structure and biochemical characterization of PhaA from *Ralstonia eutropha*, a polyhydroxyalkanoate-producing bacterium. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 452, n. 1, p. 124–129, 2014.

KIM, J.; CHANG, J. H.; KIM, E. J.; KIM, K. J. Crystal structure of (R)-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase PhaB from *Ralstonia eutropha*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 443, n. 3, p. 783–788, 17 jan. 2014.

KING, A. P.; ECKERSLEY, R. J. Inferential Statistics IV: Choosing a Hypothesis Test. **Statistics for Biomedical Engineers and Scientists**, p. 147–171, 2019

KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; 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.

KOBAYASHI, T.; SAITO, T. Catalytic Triad of Intracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase (PhaZ1) in *Ralstonia eutropha* H16. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 5, p.487-92, 2003.

KOBAYASHI, T.; SHIRAKI, M.; ABE, T.; SUGIYAMA, A.; SAITO, T. Purification and properties of an intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase (PhaZ2) in *Ralstonia eutropha* H16 and its

identification as a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 12, p. 3485–3490, 2003.

KOLLER, M.; MARŠÁLEK, L.; DE SOUSA DIAS, M. M.; BRAUNEGG, G. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. **New Biotechnology**, v. 37, p. 24–38, 2017.

KOSKIMÄKI, J. J.; KAJULA, M.; HOKKANEN, J.; IHANTOLA, E. L.; KIM, J. H.; HAUTAJÄRVI, H.; HANKALA, E.; SUOKAS, M.; POHJANEN, J.; PODOLICH, O.; KOZYROVSKA, N.; TURPEINEN, A.; PÄÄKKÖNEN, M.; MATTILA, S.; CAMPBELL, B. C.; PIRTTILÄ, A. M. Methyl-esterified 3-hydroxybutyrate oligomers protect bacteria from hydroxyl radicals. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 5, p. 332–338, 2016.

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.

LAW, J.; SLEPECKY, R. A. Assay of Poly- β -Hydroxybutyric acid. **Journal of Bacteriology**, v. 82, n. 1, p. 33–36, 1961.

LOPEZ, N. I.; FLOCCARI, M. E.; STEINBUCHER, A.; GARCIA, F.; MONDEZ, B. S. Effect of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) content on the starvation-survival of bacteria in natural waters. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 16, n. 2, p. 95–101, 1995.

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.

LE MEUR, S.; ZINN, M.; EGLI, T.; THÖNY-MEYER, L.; REN, Q. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by sequential feeding of xylose and octanoic acid in engineered *Pseudomonas putida* KT2440. **BMC Biotechnology**, v. 12, n. 1, 2012.

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

LENZ, R. W.; MARCHESSAULT, R. H. Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. **Biomacromolecules**, v.6, n. 1, p. 1–8, 2005.

LIDSTROM, M. E.; KOROTKOVA, N.; CHISTOSERDOVA, L.; KUKSA, V. Poly-Hydroxybutyrate Biosynthesis in the Facultative Methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1: Identification and Mutation of *gap11*, *gap20*, and *phaR*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 1750–1758, 2002.

LING, Y.; WONG, H. H.; THOMAS, C. J.; WILLIAMS, D. R. G.; MIDDELBERG, A. P. J. Pilot-scale extraction of PHB from recombinant *E. coli* by homogenization and centrifugation. **Bioseparation**, v. 7, p. 9–15, 1997.

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.

MAESTRO, B.; SANZ, J. M. Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p.1323-1337, 2017.

MAHARJAN, R.; FERENCI, T. Mutational signatures indicative of environmental stress in Bacteria. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 2, p. 380–391, 2015.

MALINICH, E. A.; BAUER, C. E. Transcriptome analysis of *Azospirillum Brasilense* vegetative and cyst states reveals large-scale alterations in metabolic and replicative gene expression. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 8, 2018.

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

MARFELLA, R.; PRATTICHIZZO, F.; SARDU, C.; FULGENZI, G.; GRACIOTTI, L.; SPADONI, T.; D'ONOFRIO, N.; SCISCIOLA, L.; LA GROTTA, R.; FRIGÉ, C.; PELLEGRINI, V.; MUNICINÒ, M.; SINISCALCHI, M.; SPINETTI, F.; VIGLIOTTI, G.; VECCHIONE, C.; CARRIZZO, A.; ACCARINO, G.; SQUILLANTE, A.; SPAZIANO, G.; MIRRA, D.; ESPOSITO, R.; ALTIERI, S.; FALCO, G.; FENTI, A.; GALOPPO, S.; CANZANO, S.; SASSO, F. C.; MATAACCHIONE, G.; OLIVIERI, F.; FERRARACCIO, F.; PANARESE, I.; PAOLISSO, P.; BARBATO, E.; LUBRITTO, C.; BALESTRIERI, M. L.; MAURO, C.; CABALLERO, A. E.; RAJAGOPALAN, S.; CERIELLO, A.; D'AGOSTINO, B.; IOVINO, P.; PAOLISSO, G. Microplastics and Nanoplastics in Atheromas and Cardiovascular Events. **The New England Journal of Medicine**, v. 390, n. 10, p. 900–910, 2024.

MARTINEZ, S.; DÉZIEL, E. Changes in polyhydroxyalkanoate granule accumulation make optical density measurement an unreliable method for estimating bacterial growth in *Burkholderia thailandensis*. **Can. J. Microbiol.**, v. 66, n. 3, p. 256-262, 2020.

MCCOOL, G. J.; CANNON, M. C. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 14, p. 4235–4243, 2001.

MICHALAK, M.; MAREK, A. A.; ZAWADIAK, J.; KAWALEC, M.; KURCOK, P. Synthesis of PHB-based carrier for drug delivery systems with pH-controlled release. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 12, p. 4149–4156, 2013.

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

MOTA, F. J. T. **Caracterização dos genes *phaZ1* e *phaZ2* e mobilização de polihidroxi butirato em *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2020. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica. Universidade Federal do Paraná.

MOŽEJKO-CIESIELSKA, J.; KIEWISZ, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? **Microbiological Research**, v. 192, p. 271-282, 2016.

NISHIHATA, S.; KONDO, T.; TANAKA, K.; ISHIKAWA, S.; TAKENAKA, S.; KANG, C. M.; YOSHIDA, K. I. *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 PhaR functions for pleiotropic regulation of cellular processes besides PHB accumulation. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, 2018.

NOJIRI, M.; SAITO, T. Structure and Function of Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 22, p. 6965–6970, 1997.

NORHOLM, M. H. H. A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. **BMC Biotechnology**, v. 10, n. 1, 2010.

O'BRIEN, J.; HAYDER, H.; PENG, C. Automated quantification and analysis of cell counting procedures using imagej plugins. **Journal of Visualized Experiments**, n. 117, 2016.

OBRUCA, S.; SEDLACEK, P.; KRZYZANEK, V.; MRAVEC, F. Accumulation of Poly(3-hydroxybutyrate) Helps Bacterial Cells to Survive Freezing. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157778, 2016.

OBRUCA, S.; SEDLACEK, P.; SLANINOVA, E.; FRITZ, I.; DAFFERT, C.; MEIXNER, K.; SEDRLOVA, Z.; KOLLER, M. Novel unexpected functions of PHA granules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 11, p. 4795–4810, 2020.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2-4, p. 131–139, 1992.

ORTIZ-VASCO, C. C.; MORENO, S.; NAVARRO, L. A. Q.; RODRÍGUEZ, J. B. R.; ESPÍN, G. The stringent response regulates the Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) synthesis in *Azotobacter Vinelandii*. **PLoS ONE**, v. 19, n. 4, 2024.

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.

PARLANE, N. A.; GRAGE, K.; MIFUNE, J.; BASARABA, R. J.; WEDLOCK, D. N.; REHM, B. H. A.; BUDDLE, B. M. Vaccines displaying mycobacterial proteins on biopolyester beads stimulate cellular immunity and induce protection against tuberculosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 1, p. 37–44, 2012.

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.; OSAKU, C. A.; PETZL-ERLER, M. L.; TEREZI, H.; VIEIRA, L. G. E.; STEFFENS, M. B. R.; WEISS, V. A.; PEREIRA, L. F. P.; ALMEIDA, M. I. M.; ALVES, L. R.; MARIN, A.; ARAUJO, L. M.; BALSANELLI, E.; BAURA, V. A.; CHUBATSU, L. S.; FAORO, H.; FAVETTI, A.; FRIEDERMANN, G.; GLIENKE, C.; KARP, S.; KAVA-CORDEIRO, V.; RAITTZ, R. T.; RAMOS, H. J. O.; RIBEIRO, E. M. S. F.; RIGO, L. U.; ROCHA, S. N.; SCHWAB, S.; SILVA, A. G.; SOUZA, E. M.; TADRA-SFEIR, M. Z.; TORRES, R. A.; DABUL, A. N. G.; SOARES, M. A. M.; GASQUES, L. S.; GIMENES, C. C. T.; VALLE, J. S.; CIFERRI, R. R.; CORREA, L. C.; MURACE, N. K.; PAMPHILE, J. A.; PATUSSI, E. V.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A.; ROCHA, C. L. M. S. C.; ARANTES, O. M. N.; FURLANETO, M. C.; GODOY, L. P.; OLIVEIRA, C. E. C.; SATORI, D.; VILAS-BOAS, L. A.; WATANABE, M. A. E.; DAMBROS, B. P.; GUERRA, M. P.; MATHIONI, S. M.; SANTOS, K. L.; STEINDEL, M.; VERNAL, J.; BARCELLOS, F. G.; CAMPO, R. J.; CHUEIRE, L. M. O.; NICOLÁS, M. F.; PEREIRA-FERRARI, L.; DA CONCEIÇÃO SILVA, J. L.; GIOPPO, N. M. R.; MARGARIDO, V. P.; MENCK-SOARES, M. A.; PINTO, F. G. S.; DE SIMÃO, R. C. G.; TAKAHASHI, E. K.; YATES, M. G.; SOUZA, E. M. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLOS Genetics**, v. 7, n. 5, 2011.

PEDRÓS-ALIÓ, C.; MAS, J.; GUERRERO, R. The influence of poly-p-hydroxybutyrate accumulation on cell volume and buoyant density in *Alcaligenes eutrophus*. **Archives of Microbiology**, v. 143, p. 178–184, 1985.

PEI, J.; KIM, B. H.; GRISHIN, N. V. PROMALS3D: A tool for multiple protein sequence and structure alignments. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 7, p. 2295–2300, 2008.

PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. Interaction between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins as revealed by two-hybrid analysis and identification of a new phasin in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology**, v. 157, n. 10, p. 2795–2807, 2011.

PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. PhaM Is the Physiological Activator of Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 555–563, 2014.

PIEPER-FURST, U.; MADKOUR, M. H.; MAYER, F.; STEINBUCHHEL, A. Purification and Characterization of a 14-Kilodalton Protein That Is Bound to the Surface of Polyhydroxyalkanoic Acid Granules in *Rhodococcus ruber*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 14, p. 4328–4337, 1994.

PO, M.; MADKOUR, M. H.; MAYER, F.; STEINBUCHHEL, A. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology**, v. 148, n. 8, 2002.

POLI, A.; DONATO, P. D.; ABBAMONDI, G. R.; NICOLAUS, B. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by Archaea. **Archaea**, v. 2011, p. 1–13, 2011.

PÖTTER, M.; STEINBUCHHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: Impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. **Biomacromolecules**, v.6, n. 2, p. 552–560, 2005.

R Core Team (2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.

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, 2013.

RATCLIFF, W. C.; KADAM, S. V.; DENISON, R. F. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) supports survival and reproduction in starving *rhizobia*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 65, n. 3, p. 391–399, 2008.

RIAZ, S.; RHEE, K. Y.; PARK, S. J. Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Biopolymers for biofuel and biorefineries. **Polymers**, v.13, n. 2, p. 253, 2021.

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.

RICH, P. R.; MISCHIS, L. A.; PURTON, S.; WISKICH, J. T. The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, n. 2, p. 181–187, 2001.

RILLIG, M. C.; LEHMANN, A. Microplastic in terrestrial ecosystems Research shifts from ecotoxicology to ecosystem effects and Earth system feedbacks. **Science**, v. 368, n. 6498, p. 1430–1431, 2020.

RILLIG, M. C.; LEHMANN, A.; DE SOUZA MACHADO, A. A.; YANG, G. Microplastic effects on plants. **New Phytologist**, v. 223, n. 3, p. 1066-1070, 2019.

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.

RUIZ, J. A.; LÓPEZ, N. I.; FERNÁNDEZ, R. O.; MÉNDEZ, B. S. Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 225–230, 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.

SACOMBOIO, E. N. M.; KIM, E. Y. S.; CORREA, H. L. R.; BONATO, P.; PEDROSA, F. D. O.; DE SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; MÜLLER-SANTOS, M. The transcriptional regulator NtrC controls glucose-6-phosphate dehydrogenase expression and polyhydroxybutyrate synthesis through NADPH availability in *Herbaspirillum seropedicae*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

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.

SAYYED, R. Z.; WANI, S. J.; ALYOUSEF, A. A.; ALQASIM, A.; SYED, A.; EL-ENSHASY, H. A. Purification and kinetics of the PHB depolymerase of *Microbacterium paraoxydans* RZS6 isolated from a dumping yard. **PLOS ONE**, v. 14, n. 6, 1 jun. 2019.

SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E.; et al. Fiji: an open-source Platform for biological-image Analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–82, 2012.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. **Bio/Technology**, v. 1, n. 9, p. 784–791, 1983.

SINGH, A. K.; MALLICK, N. Enhanced production of SCL-LCL-PHA co-polymer by sludge-isolated *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 350–357, 2008.

SLANINOVA, E.; SEDLACEK, P.; MRAVEC, F.; MULLEROVA, L.; SAMEK, O.; KOLLER, M.; HESKO, O.; KUCERA, D.; MAROVA, I.; OBRUCA, S. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 4, p. 1923–1931, 2018.

SLATER, S.; HOUMIEL, K. L.; TRAN, M.; MITSKY, T. A.; TAYLOR, N. B.; PADGETTE, S. R.; GRUYS, K. J. Multiple-Ketothiolases Mediate Poly(-Hydroxyalkanoate) Copolymer Synthesis in *Ralstonia eutropha*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 8, p.1979–87, 1998.

SLEPECKY, R. A.; LAW, J. H. A rapid spectrophotometric assay of alpha, beta-unsaturated acids and beta-hydroxy acids. **Analytical Chemistry**, v. 32, n. 12, p. 1697–1699, 1960.

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.

STEINBUCHER, A.; STEINBUCHER, A. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 219–228, 1995.

STOKES, J. L.; PARSON, W. L. Role of poly-p-hydroxybutyrate in survival of *Sphaerotilus discophorus* during starvation. **Canadian Journal of Microbiology**, v.14, n. 7. 1968.

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

SZNAJDER, A.; PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 5, p. 1847–1858, 2015.

TACHON, S.; MICHELON, D.; CHAMBELLON, E.; CANTONNET, M.; MEZANGE, C.; HENNO, L.; CACHON, R.; YVON, M. Experimental conditions affect the site of tetrazolium violet reduction in the electron transport chain of *Lactococcus lactis*. **Microbiology**, v. 155, n. 9, p. 2941–2948, 2009.

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.

TANIKKUL, P.; SULLIVAN, G. L.; SARP, S.; PISUTPAISAL, N. Biosynthesis of medium chain length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) from palm oil. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 2, 2020.

TEIXEIRA, C. S. **Regulação da Expressão de Polihidroxicanoato 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, n. 92, 2010.

TRIPATHI, L.; WU, L. P.; CHEN, J.; CHEN, G. Q. Synthesis of Diblock copolymer poly-3-hydroxybutyrate -block-poly-3-hydroxyhexanoate [PHB-b-PHHx] by a β -oxidation weakened *Pseudomonas putida* KT2442. **Microbial cell factories**, v. 11, 2012.

TSENG, C. L.; CHEN, H. J.; SHAW, G. C. Identification and characterization of the *Bacillus thuringiensis* phaZ gene, encoding new intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 21, p. 7592–7599, 2006.

UCHINO, K.; SAITO, T.; GEBAUER, B.; JENDROSSEK, D. Isolated poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme A (CoA) and degradation of PHB to acetyl-CoA. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 8250–8256, 2007.

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.

VERLINDEN, R. A. J.; HILL, D. J.; KENWARD, M. A.; WILLIAMS, C. D.; RADECKA, I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 6, p. 1437–1449, 2007.

WELCH, B. On the Comparison of Several Mean Values: An Alternative Approach. **Biometrika**, v. 38, n. 3/4, p. 330-336, 1951.

WILLIS L. B.; WALKER G. C. The *phbC* (poly-beta-hydroxybutyrate synthase) gene of *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti* and characterization of *phbC* mutants. **Canadian journal of microbiology**, v. 44, n. 6, p. 554-564, 1998.

Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan LD, François R, Grolemond G, Hayes A, Henry L, Hester J, Kuhn M, Pedersen TL, Miller E, Bache SM, Müller K, Ooms J, Robinson D, Seidel DP, Spinu V, Takahashi K, Vaughan D, Wilke C, Woo K, Yutani H. “Welcome to the tidyverse.” **Journal of Open Source Software**, v. 4, n. 43, p.1686, 2019.

WITTENBORN, E. C.; JOST, M.; WEI, Y.; STUBBE, J. A.; DRENNAN, C. L. Structure of the catalytic domain of the class I polyhydroxybutyrate synthase from *Cupriavidus necator*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 48, p. 25264–25277, 2016.

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.

YAMADA, M.; TAKAHASHI, S.; OKAHATA, Y.; DOI, Y.; NUMATA, K. Monitoring and kinetic analysis of the molecular interactions by which a repressor protein, PhaR, binds to target DNAs and poly[(R)-3-hydroxybutyrate]. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 6, 2013.

YAMASHITA, K.; YAMADA, M.; NUMATA, K.; TAGUCHI, S. Nonspecific hydrophobic interactions of a repressor protein, PhaR, with poly[(R)-3-hydroxybutyrate] film studied with a quartz crystal microbalance. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 8, p. 2449–2454, 2006.

YANG, J.; RAHARDJA, S.; FRÄNTI, P. Outlier detection: How to threshold outlier scores? **Proceedings of the International Conference on Artificial Intelligence, Information Processing and Cloud Computing**, n. 37, p. 1-6, 2019.

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

8 ANEXOS

8.1 COMPARAÇÃO DOS MODELOS LINEAR E LOGÍSTICO NO CÁLCULO DAS TAXAS DE SÍNTESE DE PHB EM ESTIRPES DE *H. seropedicae* CULTIVADAS SOB LIMITAÇÃO DE NH₄Cl

O taxas de síntese de PHB das estirpes SmR1, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ1$ foram estimadas usando dois modelos matemáticos: o modelo linear e o logístico. Após as estimativas foram realizadas as análises que permitiram a escolha do modelo que melhor se ajustava aos dados experimentais. As análises comparativas foram: Erro Quadrático Médio da Raiz – RMSE (*Root Mean Square Error*) e gráfico com o quadrado dos resíduos (Figura 1).

O Erro Quadrático Médio da Raiz, é usado para avaliar a qualidade de ajuste de um modelo de previsão. Essa análise fornece uma medida do erro médio entre os valores previstos pelo modelo e os valores experimentais obtidos. A escolha do modelo com melhor ajuste é aquele que apresenta os menores valores de RMSE, ou seja, com erros de previsão menores em média. Desse modo, um valor baixo de RMSE sugere que o modelo está fazendo previsões mais precisas. Na tabela abaixo, o modelo que apresentou os menores valores de RMSE para o cálculo das taxas de síntese de PHB, foram aqueles relacionados ao modelo logístico.

QUADRO 1 - COMPARAÇÃO ENTRE MODELOS MATEMÁTICOS PARA ESTIMATIVA DAS TAXAS DE SÍNTESE DE PHB EM ESTIRPES DE *H. seropedicae*.

Estirpe	taxa de síntese de PHB (linear)	taxa de síntese de PHB (logístico)	RMSE (modelo linear)	RMSE (modelo logístico)
SmR1	1,99	0,38	5,63	2,33
$\Delta phaZ1$	1,98	0,45	5,99	2,64
$\Delta phaZ2$	1,40	0,32	2,93	2,47
$\Delta phaZ1\Delta phaZ2$	1,37	0,36	4,10	2,55

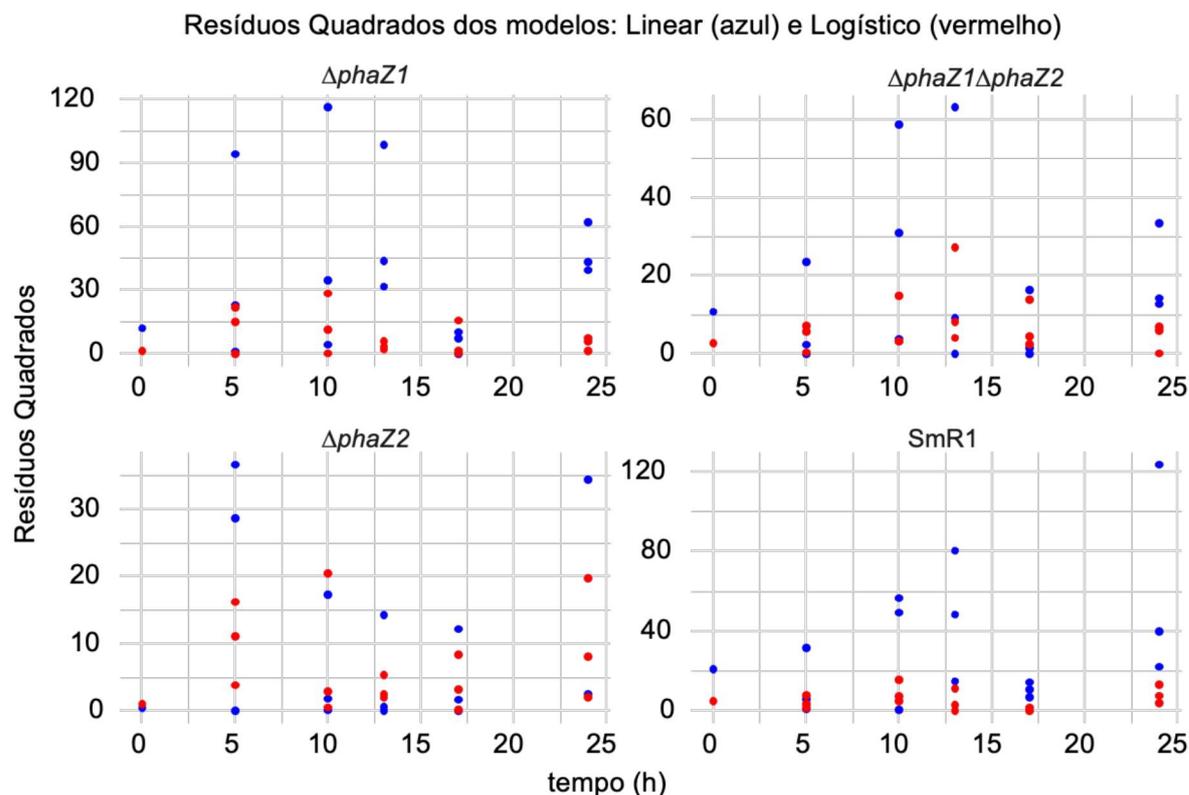


Figura 1. comparação dos resíduos quadrados associados a análise de estimativas das taxas de síntese de PHB em estirpes de *H. seropedicae* cultivadas em meio NFbHPLN. O gráfico mostra o quadrado dos resíduos ao longo do tempo demonstrando que os resíduos com menores valores e distribuição mais uniforme são aqueles relacionados ao modelo logístico (pontos vermelhos). Em contraste, os resíduos quadrados do modelo linear (azul) mostram variações maiores e valores maiores que os resíduos quadrados do modelo logístico.

8.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DE UFC DE ESTIRPES CULTIVADAS EM MEIO NFbHPN E NFbHPLN

TABELA 1 – *p*-VALUE DA COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DE MÉDIAS (TESTE TUKEY HSD) COM UFC DE ESTIRPES CULTIVADAS EM MEIO NFbHPN E NFbHPLN

Estirpes	20 mM de NH ₄ Cl	2 mM de NH ₄ Cl
	<i>p adj.</i>	<i>p adj.</i>
SmR1- <i>ΔphaC1</i>	0,597	3,1E-09 ***
SmR1- <i>ΔphaZ1</i>	0,228	0,00063 ***
SmR1- <i>ΔphaZ2</i>	0,012 *	0,022 *
SmR1- <i>ΔphaZ1ΔphaZ2</i>	0,099	5,0E-06 ***
<i>ΔphaZ1-ΔphaC1</i>	0,955	0,00018 ***
<i>ΔphaZ2-ΔphaC1</i>	0,243	4,8E-06 ***
<i>ΔphaZ2-ΔphaZ1</i>	0,619	0,604
<i>ΔphaZ2-ΔphaZ1ΔphaZ2</i>	0,866	0,0185 *
<i>ΔphaZ1ΔphaZ2-ΔphaC1</i>	0,779	0,021 *
<i>ΔphaZ1ΔphaZ2-ΔphaZ1</i>	0,991	0,328

LEGENDA: Teste Tukey HSD de comparação de médias com nível de confiança simultâneo de 95%. Significância estatística referentes aos valores de *p adj.* (*pval*): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. *p adj.* – estatística *q* do Teste de Tukey, aqui referida como um *p*-valor ajustado (*pval*).

8.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DE PROPORÇÃO PHB/CÉLULA

TABELA 2 – PROPORÇÃO PHB/CÉLULA DE ESTIRPES DE *H. seropedicae* CULTIVADAS EM PLACAS DE MEIO NFbHPN

Estirpe	Proporção PHB/Célula	Replicata
SmR1	0,024	1
SmR1	0,018	2
SmR1	0,023	3
$\Delta phaZ1$	1,439	1
$\Delta phaZ1$	1,370	2
$\Delta phaZ1$	1,409	3
$\Delta phaZ2$	0,018	1
$\Delta phaZ2$	0,013	2
$\Delta phaZ2$	0,018	3
$\Delta phaZ1\Delta phaZ2$	1,121	1
$\Delta phaZ1\Delta phaZ2$	1,147	2
$\Delta phaZ1\Delta phaZ2$	1,257	3

TABELA 3 – TESTE DE NORMALIDADE DE SHAPIRO-WILK REALIZADO COM OS DADOS DA TABELA 2

Estirpes	Estatística W	p-value
$\Delta phaZ1$	0,9915	0,8237
$\Delta phaZ1\Delta phaZ2$	0,8866	0,3440
$\Delta phaZ2$	0,8679	0,2895
SmR1	0,8633	0,2766

TABELA 4 – TESTE DE LEVENE REALIZADO COM OS DADOS DA TABELA 2

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Estatística F	p-value
Grupos (estirpes)	3	7,0642	0,01226*
Resíduos	8		

LEGENDA: O *p-value* (0,01226) é menor que o nível de significância usual de 0,05. Portanto, rejeitamos a hipótese nula de que as variâncias são iguais.

Significância estatística referente ao *p-value*: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

8.3.1 Teste de outliers: método *boxplot*

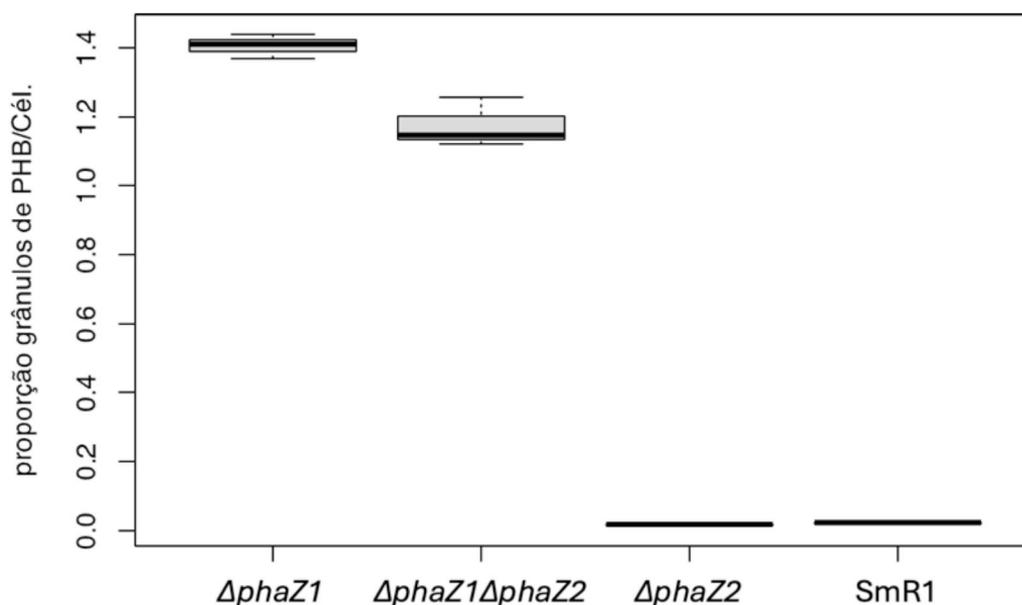


Figura 2. Análise de *outliers* pelo método boxplot sobre os dados de proporção PHB/célula em estirpes de *H. seropedicae*. Não foram observados *outliers*, de acordo com a análise que identifica valores no limite superior ($Q3 + 1,5 * IQR$) ou inferior ($Q1 - 1,5 * IQR$). Q1, corresponde a primeiro quartil, Q3, terceiro quartil e IQR - intervalo interquartil. Os dados utilizados para construção do gráfico, correspondem aqueles informados na Tabela 2.

TABELA 5 – ANOVA DE WELCH DE UM FATOR

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Estatística F	p-value
Entre Grupos (estirpes)	3	1380,2	1,745e-06
Dentro dos grupos	4,0001	-	-

LEGENDA: Análise de Variância de um Fator (ANOVA) realizada sem assumir a igualdade de variâncias (heterocedasticidade). Essa análise tem como objetivo verificar se existe uma diferença significativa entre as médias dos dados de proporção PHB/célula de estirpes de *H. seropedicae*. O *p-value* indica que há significância estatística.

TABELA 6 – TESTE POST HOC DE GAMES-HOWELL

Comparação estirpes	Dif. média	IC 95% [inf,sup]	t	gl	p-value
$\Delta phaZ1\Delta phaZ2 - \Delta phaZ1$	-0,23	[-0,46; 0,00]	2,88	5,00	0,049
$\Delta phaZ2 - \Delta phaZ1$	-1,39	[-1,53; -1,25]	68,97	2,02	< 0,001
SmR1 - $\Delta phaZ1$	-1,38	[-1,52; -1,25]	68,69	2,03	< 0,001
$\Delta phaZ2 - \Delta phaZ1\Delta phaZ2$	-1,16	[-1,45; -0,87]	27,75	2,01	0,002
SmR1 - $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$	-1,15	[-1,44; -0,87]	27,63	2,01	0,002
SmR1 - $\Delta phaZ2$	0,00	[0,00; 0,01]	2,17	3,97	0,273

LEGENDA: Teste pos hoc de Games-Howell, indicado quando não há igualdade de variâncias. Teste realizado para diferenciar a significância estatística entre os grupos do teste ANOVA de Welch da Tabela 5.

Dif. média = Diferença média entre os grupos comparados, IC 95% [inf;sup] = Limites inferior e superior do intervalo de confiança para a diferença média., t = estatística t para a comparação entre os grupos, gl = graus de liberdade usados no cálculo da estatística t, *p-value* = valor de p ajustado para a comparação entre os grupos. *p-value* < 0,05 indicam diferenças estatisticamente significativas.

8.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA DE *phaZ1* E *phaZ2*

8.4.1 Análise estatística da expressão de *phaZ1* nas estirpes

SmR1, Δ *phaC1*, Δ *phaZ1*, Δ *phaZ2*, Δ *phaZ1* Δ *phaZ2*

TABELA 7 – RESULTADOS DE ATIVIDADE ESPECÍFICA DE β -GALACTOSIDASE EM ESTIRPES DE *H. seropedicae* CULTIVADAS EM MEIO NFbHPN.

Estirpe	Fusão transcricional	Ativ. espec. de β -gal.	Replicatas
SmR1	<i>lacZ</i>	83,68	1
SmR1	<i>lacZ</i>	130,97	2
SmR1	<i>lacZ</i>	97,19	3
SmR1	<i>lacZ</i>	87,19	4
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	1805,66	1
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	1662,39	2
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	1559,92	3
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	1322,38	4
Δ <i>phaC1</i>	<i>lacZ</i>	151,02	1
Δ <i>phaC1</i>	<i>lacZ</i>	196,49	2
Δ <i>phaC1</i>	<i>lacZ</i>	187,06	3
Δ <i>phaC1</i>	<i>lacZ</i>	178,54	4
Δ <i>phaC1</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	542,22	1
Δ <i>phaC1</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	570,91	2
Δ <i>phaC1</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	666,88	3
Δ <i>phaC1</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	720,07	4
Δ <i>phaZ1</i>	<i>lacZ</i>	134,53	1
Δ <i>phaZ1</i>	<i>lacZ</i>	144,46	2
Δ <i>phaZ1</i>	<i>lacZ</i>	88,78	3
Δ <i>phaZ1</i>	<i>lacZ</i>	119,46	4
Δ <i>phaZ1</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	1686,71	1
Δ <i>phaZ1</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	1646,91	2
Δ <i>phaZ1</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	2091,77	3
Δ <i>phaZ1</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	2049,47	4
Δ <i>phaZ2</i>	<i>lacZ</i>	172,24	1
Δ <i>phaZ2</i>	<i>lacZ</i>	152,86	2
Δ <i>phaZ2</i>	<i>lacZ</i>	158,00	3
Δ <i>phaZ2</i>	<i>lacZ</i>	141,23	4
Δ <i>phaZ2</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	1653,61	1
Δ <i>phaZ2</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	1636,24	2
Δ <i>phaZ2</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	1490,23	3
Δ <i>phaZ2</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	1475,16	4
Δ <i>phaZ1</i> Δ <i>phaZ2</i>	<i>lacZ</i>	106,55	1
Δ <i>phaZ1</i> Δ <i>phaZ2</i>	<i>lacZ</i>	88,62	2
Δ <i>phaZ1</i> Δ <i>phaZ2</i>	<i>lacZ</i>	108,39	3
Δ <i>phaZ1</i> Δ <i>phaZ2</i>	<i>lacZ</i>	126,14	4
Δ <i>phaZ1</i> Δ <i>phaZ2</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	1739,66	1
Δ <i>phaZ1</i> Δ <i>phaZ2</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	1679,01	2
Δ <i>phaZ1</i> Δ <i>phaZ2</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	1795,88	3
Δ <i>phaZ1</i> Δ <i>phaZ2</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	1835,87	4

TABELA 8 – TESTE DE NORMALIDADE DE SHAPIRO-WILK REALIZADO COM OS DADOS DA TABELA 7

Estirpe	Fusão transcricional	Estatística W	p-value
SmR1	<i>lacZ</i>	0,8353	0,1821
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	0,9813	0,9097
Δ <i>phaC1</i>	<i>lacZ</i>	0,9265	0,5737
Δ <i>phaC1</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	0,9284	0,5848
Δ <i>phaZ1</i>	<i>lacZ</i>	0,9383	0,6437
Δ <i>phaZ1</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	0,8134	0,1286
Δ <i>phaZ2</i>	<i>lacZ</i>	0,9912	0,9636
Δ <i>phaZ2</i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	0,8121	0,1258
Δ <i>phaZ2</i>	<i>lacZ</i>	0,9650	0,8102
Δ <i>phaZ1Δ<i>phaZ2</i></i>	<i>phaZ1::lacZ</i>	0,9811	0,9086

TABELA 9 – TESTE DE LEVENE REALIZADO COM OS DADOS DA TABELA 7

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Estatística F	p-value
Grupos (estirpes)	9	11,176	2,047e-07 ***
Resíduos	30		

LEGENDA: O *p-value* (2,047e-07) é menor que o nível de significância usual de 0,05. Portanto, rejeitamos a hipótese nula de que as variâncias são iguais.

Significância estatística referente ao *p-value*: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

8.4.2 Teste de outliers: método *boxplot*

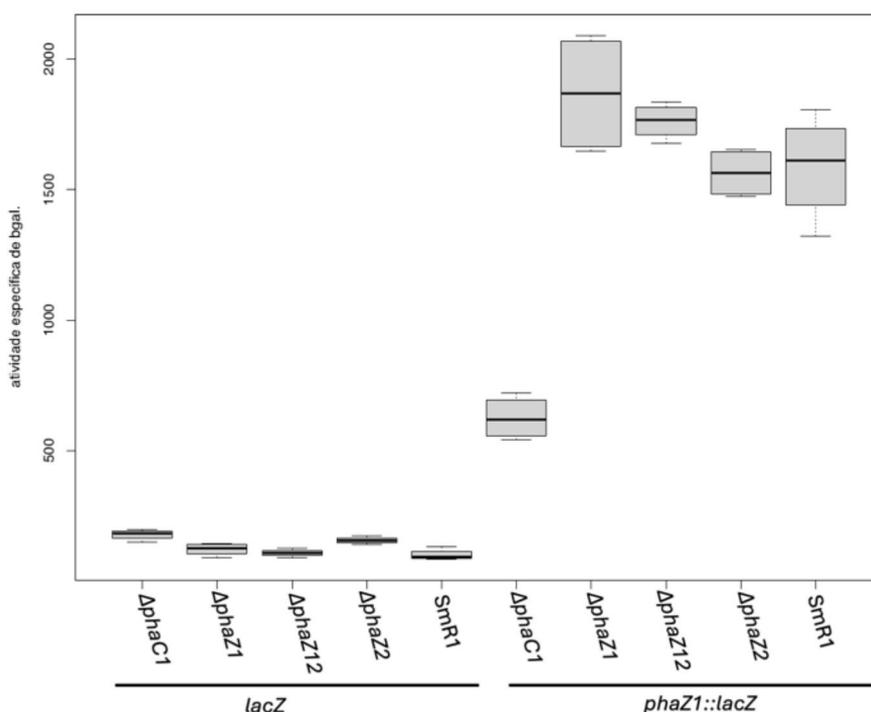


Figura 3. Análise de *outliers* pelo método *boxplot* sobre os dados de β -galactosidase em estirpes de *H. seropedicae*. Não foram observados *outliers*, de acordo com a análise que identifica valores no limite superior ($Q3 + 1,5 * IQR$) ou inferior ($Q1 - 1,5 * IQR$). Q1, corresponde a primeiro quartil, Q3, terceiro quartil e IQR - intervalo interquartil. Os dados utilizados para construção do gráfico, correspondem aqueles informados na Tabela 7.

TABELA 10 – ANOVA DE WELCH DE UM FATOR

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Estatística F	p-value
-------------------	--------------------	---------------	---------

Entre Grupos (estirpes)	9,000	285,32	1,282e-12
Dentro dos grupos	12,027	-	-

LEGENDA: Análise de Variância de um Fator (ANOVA) realizada sem assumir a igualdade de variâncias (heterocedasticidade). Essa análise tem como objetivo verificar se existe uma diferença significativa entre as médias dos dados expressão gênica (β -galactosidase) de estirpes de *H. seropedicae* (Tabela 7). O *p-value* indica que há significância estatística.

TABELA 11 – TESTE POST HOC DE GAMES-HOWELL

Comparação	Dif. média	IC 95% [inf;sup]	t	gl	p-value
$\Delta phaZ1(lacZ)-\Delta phaC1(lacZ)$	-56,48	[-129,31; 16,35]	3,62	5,74	0,137
$\Delta phaZ12(lacZ)-\Delta phaC1(lacZ)$	-70,85	[-129,21; -12,49]	5,69	5,67	0,021
$\Delta phaZ2(lacZ)-\Delta phaC1(lacZ)$	-22,19	[-79,25; 34,88]	1,89	5,18	0,679
$SmR1(lacZ)-\Delta phaC1(lacZ)$	-78,52	[-145,67; -11,36]	5,39	5,94	0,025
$\Delta phaC1(phaZ1)-\Delta phaC1(lacZ)$	446,75	[183,09; 710,40]	10,58	3,33	0,010
$\Delta phaZ1(phaZ1)-\Delta phaC1(lacZ)$	1690,44	[912,03; 2468,85]	14,38	3,04	0,005
$\Delta phaZ12(phaZ1)-\Delta phaC1(lacZ)$	1584,33	[1370,81; 1797,85]	44,68	3,49	<0,001
$\Delta phaZ2(phaZ1)-\Delta phaC1(lacZ)$	1385,54	[1082,85; 1688,22]	28,82	3,26	0,001
$SmR1(phaZ1)-\Delta phaC1(lacZ)$	1409,31	[734,83; 2083,80]	13,79	3,06	0,006
$\Delta phaZ12(lacZ)-\Delta phaZ1(lacZ)$	-14,37	[-84,99; 56,25]	1,00	5,006	0,979
$\Delta phaZ2(lacZ)-\Delta phaZ1(lacZ)$	34,29	[-36,67; 105,25]	2,50	4,56	0,433
$SmR1(lacZ)-\Delta phaZ1(lacZ)$	-22,04	[-97,01; 52,93]	1,36	5,92	0,904
$\Delta phaC1(phaZ1)-phaZ1(lacZ)$	503,22	[244,91; 761,54]	11,66	3,51	0,006
$\Delta phaZ1(phaZ1)-\Delta phaZ1(lacZ)$	1746,92	[971,37; 2522,47]	14,83	3,06	0,005
$\Delta phaZ12(phaZ1)-\Delta phaZ1(lacZ)$	1640,81	[1432,45; 1849,17]	45,28	3,75	<0,001
$\Delta phaZ2(phaZ1)-\Delta phaZ1(lacZ)$	1442,01	[1144,56; 1739,47]	29,67	3,48	<0,001
$SmR1(phaZ1)-\Delta phaZ1(lacZ)$	1465,79	[794,53; 2137,05]	14,38	3,09	0,005
$\Delta phaZ2(lacZ)-\Delta phaZ12(lacZ)$	48,66	[2,21; 95,12]	4,86	5,82	0,041
$SmR1(lacZ)-\Delta phaZ12(lacZ)$	-7,67	[-70,94; 55,61]	0,58	5,41	1,000
$\Delta phaC1(phaZ1)-\Delta phaZ12(lacZ)$	517,59	[249,34; 785,85]	12,29	3,21	0,007
$\Delta phaZ1(phaZ1)-\Delta phaZ12(lacZ)$	1761,29	[980,77; 2541,81]	15,00	3,03	0,005
$\Delta phaZ12(phaZ1)-\Delta phaZ12(lacZ)$	1655,18	[1436,82; 1873,53]	47,30	3,30	<0,001
$\Delta phaZ2(phaZ1)-\Delta phaZ12(lacZ)$	1456,38	[1149,37; 1763,39]	30,54	3,16	0,001
$SmR1(phaZ1)-\Delta phaZ12(lacZ)$	1480,16	[803,27; 2157,05]	14,51	3,03	0,005
$SmR1(lacZ)-\Delta phaZ2(lacZ)$	-56,33	[-119,88; 6,42]	4,48	4,89	0,075
$\Delta phaC1(phaZ1)-\Delta phaZ2(lacZ)$	468,93	[198,28; 739,58]	11,19	3,14	0,010
$\Delta phaZ1(phaZ1)-\Delta phaZ2(lacZ)$	1712,62	[931,10; 2494,15]	14,59	3,02	0,005
$\Delta phaZ12(phaZ1)-\Delta phaZ2(lacZ)$	1606,51	[1385,51; 1827,52]	46,24	3,21	<0,001
$\Delta phaZ2(phaZ1)-\Delta phaZ2(lacZ)$	1407,72	[1098,51; 1716,94]	29,63	3,11	0,001
$SmR1(phaZ1)-\Delta phaZ2(lacZ)$	1431,50	[753,46; 2109,54]	14,04	3,02	0,006
$\Delta phaC1(phaZ1)-SmR1(lacZ)$	525,26	[263,86; 786,66]	12,28	3,41	0,005
$\Delta phaZ1(phaZ1)-SmR1(lacZ)$	1768,95	[991,69; 2546,22]	15,03	3,05	0,004
$\Delta phaZ12(phaZ1)-SmR1(lacZ)$	1662,85	[1451,57; 1874,12]	46,44	3,59	<0,001
$\Delta phaZ2(phaZ1)-SmR1(lacZ)$	1464,05	[1163,55; 1764,55]	30,32	3,31	<0,001
$SmR1(phaZ1)-SmR1(lacZ)$	1487,83	[814,64; 2161,02]	14,54	3,07	0,005
$\Delta phaZ1(phaZ1)-\Delta phaC1(phaZ1)$	1243,69	[528,15; 1959,24]	10,01	3,74	0,008
$\Delta phaZ12(phaZ1)-\Delta phaC1(phaZ1)$	1137,58	[887,84; 1387,32]	21,20	5,79	<0,001
$\Delta phaZ2(phaZ1)-\Delta phaC1(phaZ1)$	938,79	[649,23; 1228,35]	14,98	5,98	<0,001
$SmR1(phaZ1)-\Delta phaC1(phaZ1)$	962,57	[351,75; 1573,39]	8,76	3,97	0,010
$\Delta phaZ12(phaZ1)-\Delta phaZ1(phaZ1)$	-106,11	[-837,62; 625,41]	0,87	3,51	0,988
$\Delta phaZ2(phaZ1)-\Delta phaZ1(phaZ1)$	-304,90	[-1009,35; 399,54]	2,41	3,94	0,475
$SmR1(phaZ1)-\Delta phaZ1(phaZ1)$	-281,13	[-998,85; 436,60]	1,81	5,88	0,717
$\Delta phaZ2(phaZ1)-\Delta phaZ12(phaZ1)$	-198,79	[-475,50; 77,92]	3,42	5,47	0,173
$SmR1(phaZ1)-\Delta phaZ12(phaZ1)$	-175,02	[-800,28; 450,25]	1,63	3,67	0,792
$SmR1(phaZ1)-\Delta phaZ2(phaZ1)$	23,78	[-578,13; 625,68]	0,21	4,23	1,000

LEGENDA: Teste *post hoc* de Games-Howell, indicado quando não há igualdade de variâncias. Teste realizado para diferenciar a significância estatística entre os grupos do teste ANOVA de Welch da Tabela 10.

As comparações destacadas em verde correspondem a significância estatística entre a expressão de *phaZ1* em SmR1, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1\Delta phaZ2$ comparado à expressão de *phaZ1* no mutante $\Delta phaC1$. Em azul, está destacado a comparação da expressão de *phaZ1* nas demais estirpes, de acordo com o valor de p não diferença estatística.

Dif. média = Diferença média entre os grupos comparados, IC 95% [inf;sup] = Limites inferior e superior do intervalo de confiança para a diferença média, t = estatística t para a comparação entre os grupos, gl = graus de liberdade usados no cálculo da estatística t, p-value = valor de p ajustado para a comparação entre os grupos. p-value < 0,05 indicam diferenças estatisticamente significativas.

8.4.3 Análise estatística da expressão de *phaZ1* nas estirpes

SmR1, $\Delta phaC1$, $\Delta phaR$, $\Delta phaC1\Delta phaR$

TABELA 12 – RESULTADOS DE ATIVIDADE ESPECÍFICA DE β -GALACTOSIDASE EM ESTIRPES DE *H. seropedicae* CULTIVADAS EM MEIO NFbHPN.

Estirpe	Fusão transcricional	Ativ. espec. de β -gal.	Replicatas
SmR1	<i>lacZ</i>	100,94	1
SmR1	<i>lacZ</i>	103,99	2
SmR1	<i>lacZ</i>	96,74	3
SmR1	<i>lacZ</i>	97,01	4
SmR1	<i>lacZ</i>	84,15	5
SmR1	<i>lacZ</i>	65,73	6
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	1664,34	1
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	1714,54	2
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	1255,75	3
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	1171,85	4
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	1217,15	5
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	1511,45	6
$\Delta phaC1$	<i>lacZ</i>	160,44	1
$\Delta phaC1$	<i>lacZ</i>	209,6	2
$\Delta phaC1$	<i>lacZ</i>	139,37	3
$\Delta phaC1$	<i>lacZ</i>	134,53	4
$\Delta phaC1$	<i>lacZ</i>	191,94	5
$\Delta phaC1$	<i>lacZ</i>	130,27	6
$\Delta phaC1$	<i>phaZ1::lacZ</i>	502,59	1
$\Delta phaC1$	<i>phaZ1::lacZ</i>	554,51	2
$\Delta phaC1$	<i>phaZ1::lacZ</i>	650,99	3
$\Delta phaC1$	<i>phaZ1::lacZ</i>	601,95	4
$\Delta phaC1$	<i>phaZ1::lacZ</i>	469,09	5
$\Delta phaC1$	<i>phaZ1::lacZ</i>	426,08	6
$\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	104,27	1
$\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	135,59	2
$\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	114,59	3
$\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	109,5	4
$\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	52,46	5
$\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	63,38	6
$\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	1906,52	1
$\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	1961,44	2
$\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	2001,06	3
$\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	2008,05	4
$\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	1908,8	5
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	124,95	1
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	177,32	2

$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	133,58	3
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	146,9	4
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	231,67	5
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	187,7	6
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	1945,99	1
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	1896,95	2
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	2083,99	3
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	1913,88	4
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	1683,58	5
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	1555,73	6

TABELA 13 – TESTE DE NORMALIDADE DE SHAPIRO-WILK REALIZADO COM OS DADOS DA TABELA 12

Estirpe	Fusão transcricional	Estatística W	p-value
SmR1	<i>lacZ</i>	0,8429	0,1379
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	0,8684	0,2198
$\Delta phaC1$	<i>lacZ</i>	0,8760	0,2510
$\Delta phaC1$	<i>phaZ1::lacZ</i>	0,9777	0,9396
$\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	0,9106	0,4403
$\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	0,8534	0,2055
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	0,9344	0,6147
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	0,9327	0,6015

TABELA 14 – TESTE DE LEVENE REALIZADO COM OS DADOS DA TABELA 12

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Estatística F	p-value
Grupos (estirpes)	7	13,537	1,015e-08 ***
Resíduos	39		

LEGENDA: O *p-value* (1,015e-08) é menor que o nível de significância usual de 0,05. Portanto, rejeitamos a hipótese nula de que as variâncias são iguais.

Significância estatística referente ao *p-value*: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

8.4.4 Teste de outliers: método *boxplot*

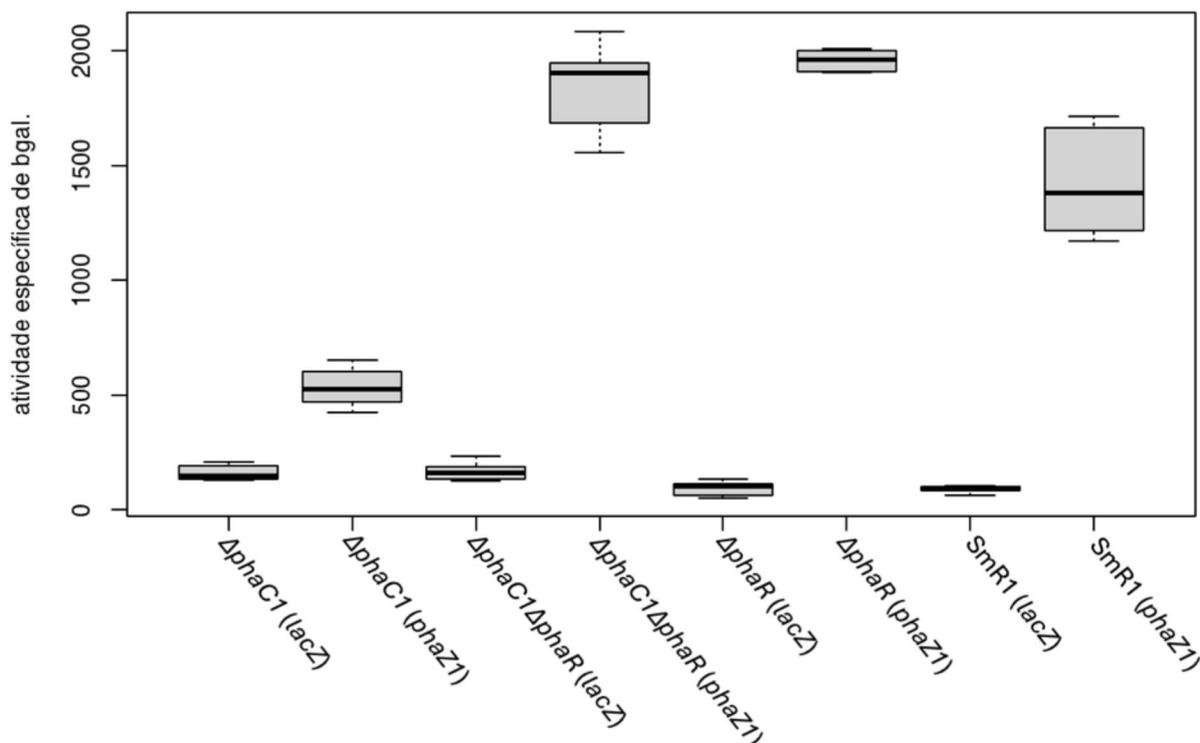


Figura 4. Análise de *outliers* pelo método boxplot sobre os dados de β -galactosidase em estirpes de *H. seropedicae*. Não foram observados *outliers*, de acordo com a análise que identifica valores no limite superior ($Q3 + 1,5 * IQR$) ou inferior ($Q1 - 1,5 * IQR$). Q1, corresponde a primeiro quartil, Q3, terceiro quartil e IQR - intervalo interquartil. Os dados utilizados para construção do gráfico, correspondem aqueles informados na Tabela 12. (*phaZ1*) – indica a fusão *phaZ1::lacZ* e (*lacZ*) – vetor pPW452 sem promotor.

TABELA 15 – ANOVA DE WELCH DE UM FATOR

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Estatística F	p-value
Entre Grupos (estirpes)	7,000	872,74	< 2,2e-16
Dentro dos grupos	15,804	-	-

LEGENDA: Análise de Variância de um Fator (ANOVA) realizada sem assumir a igualdade de variâncias (heterocedasticidade). Essa análise demonstrou que há uma diferença significativa ($p < 2,2e-16$) entre as médias dos dados expressão gênica (β -galactosidase) de estirpes de *H. seropedicae* (Tabela 12).

TABELA 16 – TESTE POST HOC DE GAMES-HOWELL

Comparação estirpes	Dif. média	IC 95% [inf;sup]	t	gl	p-value
$\Delta phaC1(phaZ1)-\Delta phaC1(lacZ)$	373,18	[217,45; 528,91]	10,09	6,49	<0,001
$\Delta phaC1R(lacZ)-\Delta phaC1(lacZ)$	6,0	[-74,01; 86,0]	0,28	9,65	1,000
$\Delta phaC1R(phaZ1)-\Delta phaC1(lacZ)$	1685,66	[1324,21; 2047,11]	21,19	5,29	<0,001
$\Delta phaR(lacZ)-\Delta phaC1(lacZ)$	-64,39	[-134,75; 5,97]	3,43	9,99	0,080
$\Delta phaR(phaZ1)-\Delta phaC1(lacZ)$	1796,15	[1690,37; 1901,93]	70,29	6,85	<0,001
$SmR1(lacZ)-\Delta phaC1(lacZ)$	-69,6	[-130,41; -8,78]	4,75	6,82	0,026
$SmR1(phaZ1)-\Delta phaC1(lacZ)$	1261,49	[811,22; 1711,76]	12,83	5,19	<0,001
$\Delta phaC1R(lacZ)-\Delta phaC1(phaZ1)$	-367,18	[-522,94; -211,42]	9,63	7,14	<0,001
$\Delta phaC1R(phaZ1)-\Delta phaC1(phaZ1)$	1312,49	[958,08; 1666,89]	15,32	6,86	<0,001
$\Delta phaR(lacZ)-\Delta phaC1(phaZ1)$	-437,57	[-593,37; -281,77]	11,88	6,41	<0,001
$\Delta phaR(phaZ1)-\Delta phaC1(phaZ1)$	1422,97	[1262,69; 1583,25]	34,95	8,16	<0,001
$SmR1(lacZ)-\Delta phaC1(phaZ1)$	-442,78	[-601,53; -284,02]	12,68	5,29	<0,001
$SmR1(phaZ1)-\Delta phaC1(phaZ1)$	888,31	[447,11; 1329,51]	8,6	6,23	0,001

$\Delta phaC1R(phaZ1)-\Delta phaC1R(lacZ)$	1679,67	[1319,58; 2039,76]	20,97	5,43	<0,001
$\Delta phaR(lacZ)-\Delta phaC1R(lacZ)$	-70,39	[-149,66; 8,88]	3,36	9,54	0,092
$\Delta phaR(phaZ1)-\Delta phaC1R(lacZ)$	1790,15	[1681,88; 1898,43]	65,86	7,81	<0,001
$SmR1(lacZ)-\Delta phaC1R(lacZ)$	-75,59	[-149,59; -1,59]	4,36	6,25	0,045
$SmR1(phaZ1)-\Delta phaC1R(lacZ)$	1255,49	[806,46; 1704,53]	12,72	5,28	<0,001
$\Delta phaR(lacZ)-\Delta phaC1R(phaZ1)$	-1750,06	[-2111,69; 1388,42]	22,01	5,28	<0,001
$\Delta phaR(phaZ1)-\Delta phaC1R(phaZ1)$	110,49	[-247,24; 468,21]	1,36	5,75	0,848
$SmR1(lacZ)-\Delta phaC1R(phaZ1)$	-1755,26	[-2119,51; -1391,01]	22,32	5,06	<0,001
$SmR1(phaZ1)-\Delta phaC1R(phaZ1)$	-424,17	[-897,7; 49,35]	3,39	9,56	0,088
$\Delta phaR(phaZ1)-\Delta phaR(lacZ)$	1860,54	[1754,93; 1966,16]	73,39	6,71	<0,001
$SmR1(lacZ)-\Delta phaR(lacZ)$	-5,2	[-64,26; 53,85]	0,36	6,92	1,000
$SmR1(phaZ1)-\Delta phaR(lacZ)$	1325,88	[875,45; 1776,31]	13,49	5,18	<0,001
$SmR1(lacZ)-\Delta phaR(phaZ1)$	-1865,75	[-1974,74; -1756,75]	82,95	4,58	<0,001
$SmR1(phaZ1)-\Delta phaR(phaZ1)$	-534,66	[-981,24; -88,08]	5,36	5,49	0,023
$SmR1(phaZ1)-SmR1(lacZ)$	1331,09	[878,44; 1783,73]	13,64	5,04	<0,001

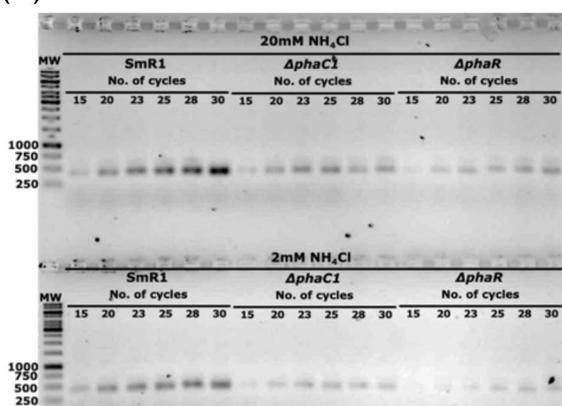
LEGENDA: Teste *post hoc* de Games-Howell, indicado quando não há igualdade de variâncias. Teste realizado para diferenciar a significância estatística entre os grupos do teste ANOVA de Welch da Tabela 15.

As comparações destacadas em verde correspondem a significância estatística da expressão de *phaZ1* entre as estirpes. Em azul, está destacado a comparação da expressão de *phaZ1* em estirpes que não apresentam significância estatística, de acordo com o valor de $p < 0,05$.

Dif. média = Diferença média entre os grupos comparados, IC 95% [inf;sup] = Limites inferior e superior do intervalo de confiança para a diferença média, t = estatística t para a comparação entre os grupos, gl = graus de liberdade usados no cálculo da estatística t, *p-value* = valor de p ajustado para a comparação entre os grupos. *p-value* < 0,05 indicam diferenças estatisticamente significativas.

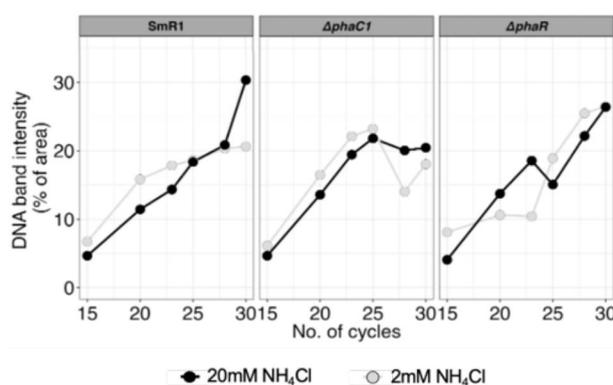
8.5 CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA DAS REAÇÕES DE PCR COM OS PRIMERS *rrsA_Fw* E *rrsA_Rev*

(A)



(C)

(B)



(D)

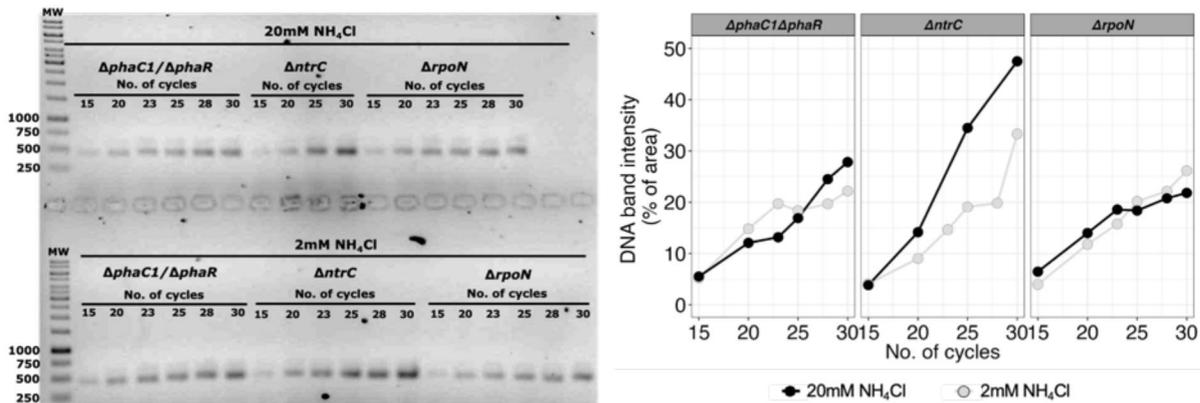


Figura 5. Cinética das reações de PCR com os *primers* *rrsA_Fw* e *rrsA_Rev*. As amostragens durante a amplificação foram realizadas entre os ciclos 15 a 30. Em (A), a fase exponencial de amplificação corresponde aquela observada entre os ciclos 15 a 25, de forma que após 30 ciclos de amplificação a intensidade das bandas já demonstram saturação, conforme ilustrado no gráfico em (B). Um padrão similar é observado em (B) e (C), exceto para a amplificação com o cDNA dos mutantes $\Delta phaC1\Delta phaR$ e $\Delta rpoN$, que apresentam saturação após 25 ciclos na condição 2 mM e 20 mM de NH₄Cl, respectivamente. As reações de PCR foram realizadas usando cDNA de estirpes de *H. seropedicae*, conforme protocolo em materiais e métodos, tópico 4.14.1. A intensidade das bandas foi medida com o software imageJ.

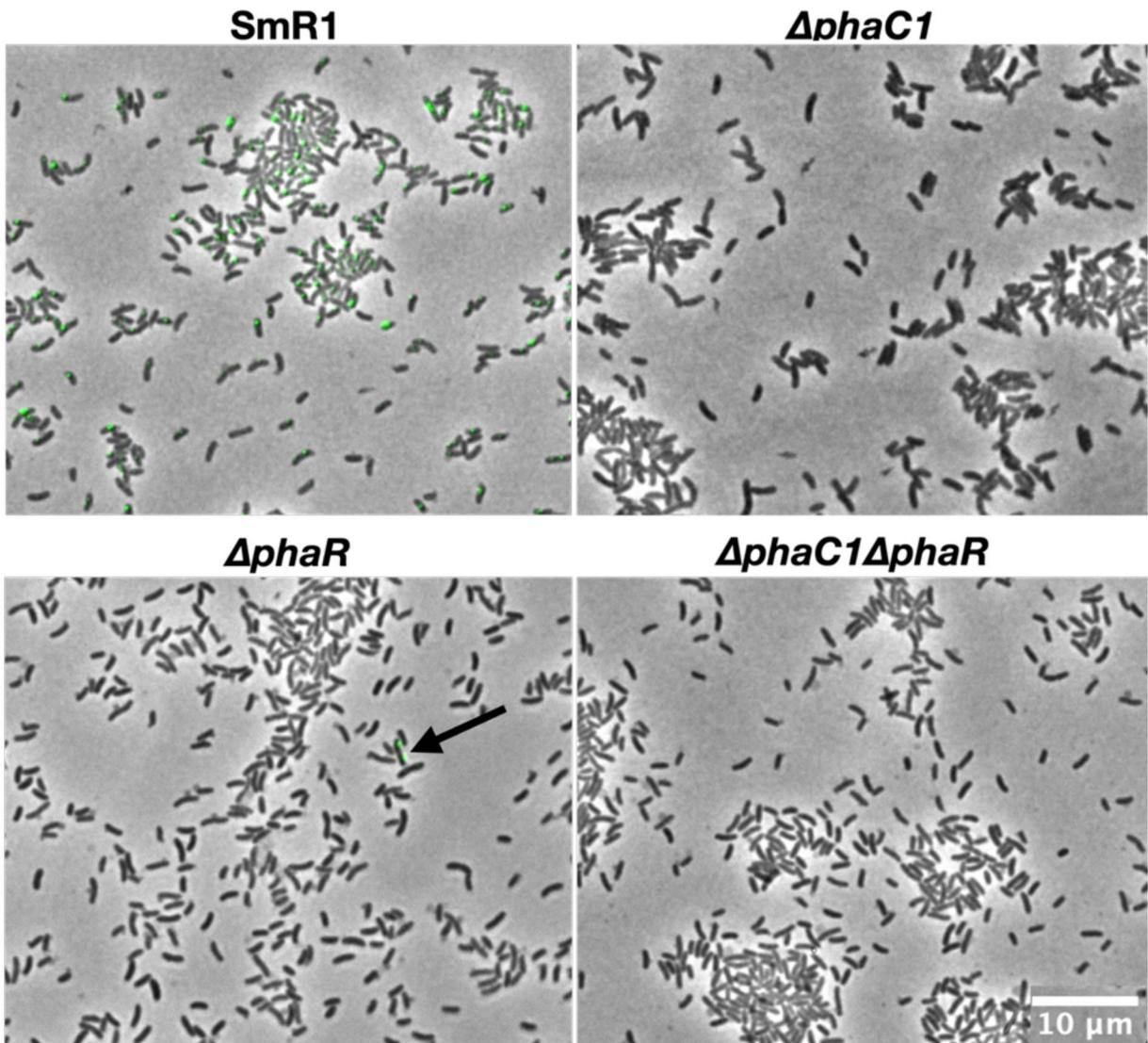


Figura 6. Imagens de microscopia de fluorescência de estirpes de *H. seropedicae*. As imagens evidenciam a presença de grânulos de PHB na estirpe SmR1 e ausência nos mutantes $\Delta phaC1$ e $\Delta phaC1\Delta phaR$. Nas condições analisadas praticamente não foram observados grânulos de PHB no mutante $\Delta phaR$, veja na imagem indicado pela seta a presença de apenas uma célula com grânulos fluorescentes. As imagens foram registradas após 14h de cultivo em meio NFbHPN. Para cada estirpe foram processadas 4 imagens, estas foram obtidas após análise das amostras em microscópio Leica DM5500 B com o iluminador Leica CTR 5500. A aquisição de imagens foi realizada com câmera integrada Leica DFC 360 FX e ajustes de configuração com software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (4.0). As imagens obtidas foram analisadas com software Fiji.

8.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA EXPRESSÃO DE *phaZ1* EM CONDIÇÕES LIMITANTES DE NH_4^+

TABELA 17 – RESULTADOS DE ATIVIDADE ESPECÍFICA DE β -GALACTOSIDASE EM ESTIRPES DE *H. seropedicae* CULTIVADAS EM MEIO NFbHPN.

Estirpe	Fusão transcricional	Ativ. espec. de β -gal.	Replicatas
SmR1	<i>lacZ</i>	2,368	1
SmR1	<i>lacZ</i>	3,229	2
SmR1	<i>lacZ</i>	2,049	3
SmR1	<i>lacZ</i>	2,755	4
SmR1	<i>lacZ</i>	3,285	5
SmR1	<i>lacZ</i>	3,119	6
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	51,705	1
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	40,641	2
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	34,628	3
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	41,544	4
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	35,310	5
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	54,985	6
$\Delta phaC1$	<i>lacZ</i>	1,082	1
$\Delta phaC1$	<i>lacZ</i>	2,590	2
$\Delta phaC1$	<i>lacZ</i>	2,186	3
$\Delta phaC1$	<i>lacZ</i>	4,158	4
$\Delta phaC1$	<i>lacZ</i>	3,003	5
$\Delta phaC1$	<i>lacZ</i>	0,772	6
$\Delta phaC1$	<i>phaZ1::lacZ</i>	11,924	1
$\Delta phaC1$	<i>phaZ1::lacZ</i>	20,760	2
$\Delta phaC1$	<i>phaZ1::lacZ</i>	14,136	3
$\Delta phaC1$	<i>phaZ1::lacZ</i>	15,905	4
$\Delta phaC1$	<i>phaZ1::lacZ</i>	8,157	5
$\Delta phaC1$	<i>phaZ1::lacZ</i>	20,432	6
$\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	4,815	1
$\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	1,189	2
$\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	0,463	3
$\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	3,674	4
$\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	3,910	5
$\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	9,780	6
$\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	248,487	1
$\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	209,199	2
$\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	205,099	3
$\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	216,570	4
$\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	252,248	5
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	2,409	1
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	4,158	2
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	4,079	3
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	6,177	4

$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	1,089	5
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	2,163	6
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	176,774	1
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	173,696	2
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	199,064	3
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	214,369	4
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	191,609	5
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	184,553	6

TABELA 18 – TESTE DE NORMALIDADE DE SHAPIRO-WILK REALIZADO COM OS DADOS DA TABELA 17

Estirpe	Fusão transcricional	Estatística W	p-value
SmR1	<i>lacZ</i>	0,9633	0,8449
SmR1	<i>phaZ1::lacZ</i>	0,9428	0,6820
$\Delta phaC1$	<i>lacZ</i>	0,9547	0,7777
$\Delta phaC1$	<i>phaZ1::lacZ</i>	0,9496	0,7369
$\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	0,9050	0,4044
$\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	0,8322	0,1445
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>lacZ</i>	0,8967	0,3547
$\Delta phaC1\Delta phaR$	<i>phaZ1::lacZ</i>	0,8866	0,3006

TABELA 19 – TESTE DE LEVENE REALIZADO COM OS DADOS DA TABELA 17

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Estatística F	p-value
Grupos (estirpes)	7	14,597	3,722e-09 ***
Resíduos	39		

LEGENDA: O *p-value* (3,722e-09) é menor que o nível de significância usual de 0,05. Portanto, rejeitamos a hipótese nula de que as variâncias são iguais.

Significância estatística referente ao *p-value*: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

8.6.1 Teste de outliers: método *boxplot*

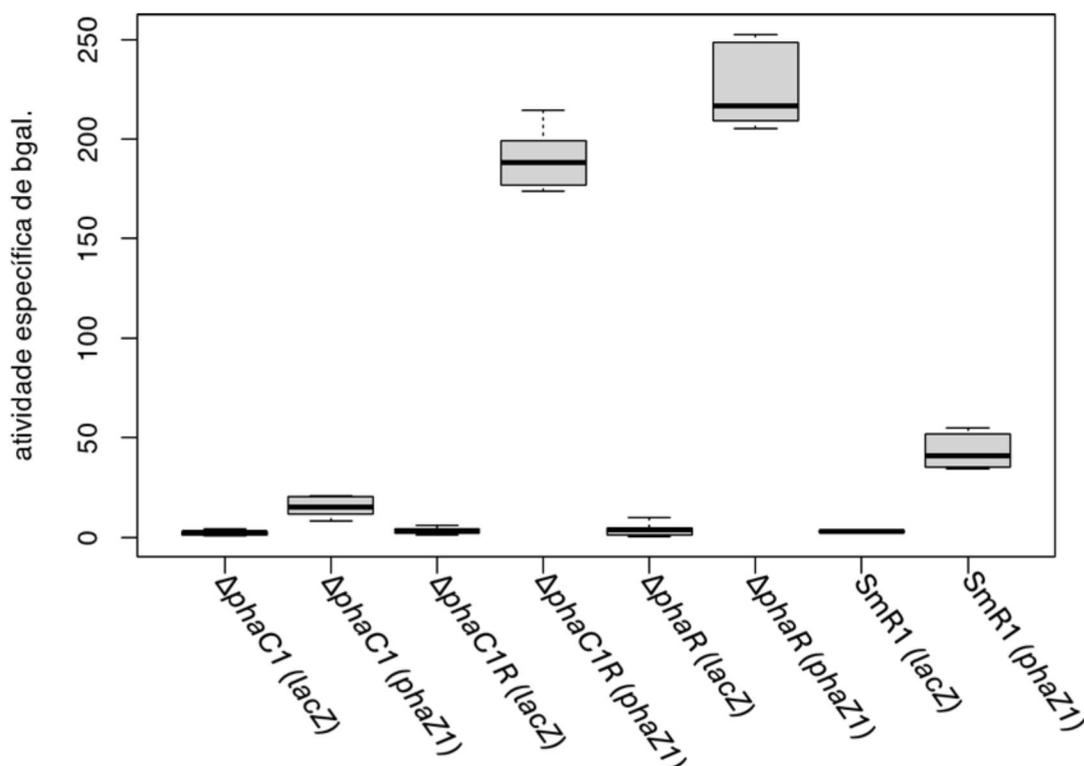


Figura 7. Análise de *outliers* pelo método boxplot sobre os dados de β -galactosidase em estirpes de *H. seropedicae*. Não foram observados *outliers*, de acordo com a análise que identifica valores no limite superior ($Q3 + 1,5 * IQR$) ou inferior ($Q1 - 1,5 * IQR$). Q1, corresponde a primeiro quartil, Q3, terceiro quartil e IQR - intervalo interquartil. Os dados utilizados para construção do gráfico, correspondem aqueles informados na Tabela 17. (*phaZ1*) – indica a fusão *phaZ1::lacZ* e (*lacZ*) – vetor pPW452 sem promotor.

TABELA 20 – ANOVA DE WELCH DE UM FATOR

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Estatística F	p-value
Entre Grupos (estirpes)	7,000	179,5	1,742e-13
Dentro dos grupos	15,256	-	-

LEGENDA: Análise de Variância de um Fator (ANOVA) realizada sem assumir a igualdade de variâncias (heterocedasticidade). Essa análise demonstrou que há uma diferença significativa ($p = 1,742e-13$) entre as médias dos dados expressão gênica (β -galactosidase) de estirpes de *H. seropedicae* (Tabela 17).

TABELA 21 – TESTE POST HOC DE GAMES-HOWELL

Comparação estirpes	Dif. média	IC 95% [inf;sup]	t	gl	p-value
$\Delta phaC1(phaZ1)-\Delta phaC1(lacZ)$	12,92	[3,77; 22,07]	6,25	5,65	0,010
$\Delta phaC1R(lacZ)-\Delta phaC1(lacZ)$	1,05	[-2,43; 4,53]	1,16	8,87	0,925
$\Delta phaC1R(phaZ1)-\Delta phaC1(lacZ)$	187,71	[158,98; 216,45]	30,23	5,07	<0,001
$\Delta phaR(lacZ)-\Delta phaC1(lacZ)$	1,67	[-4,43; 7,78]	1,16	6,41	0,920
$\Delta phaR(phaZ1)-\Delta phaC1(lacZ)$	224,02	[172,13; 275,92]	22,36	4,02	<0,001
$SmR1(lacZ)-\Delta phaC1(lacZ)$	0,50	[-1,81; 2,82]	0,91	6,58	0,974
$SmR1(phaZ1)-\Delta phaC1(lacZ)$	40,84	[24,92; 56,75]	11,72	5,22	0,001
$\Delta phaC1R(lacZ)-\Delta phaC1(phaZ1)$	-11,87	[-20,93; -2,81]	5,56	6,35	0,014
$\Delta phaC1R(phaZ1)-\Delta phaC1(phaZ1)$	174,79	[146,69; 202,89]	26,87	6,04	<0,001
$\Delta phaR(lacZ)-\Delta phaC1(phaZ1)$	-11,25	[-20,58; -1,91]	4,66	8,76	0,017
$\Delta phaR(phaZ1)-\Delta phaC1(phaZ1)$	211,10	[160,23; 261,98]	20,69	4,32	<0,001
$SmR1(lacZ)-\Delta phaC1(phaZ1)$	-12,42	[-21,70; -3,13]	6,17	5,11	0,015

SmR1(<i>phaZ1</i>)-Δ<i>phaC1</i>(<i>phaZ1</i>)	27,92	[12,16; 43,67]	7,01	8,03	0,002
Δ <i>phaC1R</i> (<i>phaZ1</i>)- Δ <i>phaC1R</i> (<i>lacZ</i>)	186,66	[158,01; 215,32]	29,95	5,14	<0,001
Δ <i>phaR</i> (<i>lacZ</i>)- Δ <i>phaC1R</i> (<i>lacZ</i>)	0,63	[-5,52; 6,77]	0,41	7,78	1,000
Δ <i>phaR</i> (<i>phaZ1</i>)- Δ <i>phaC1R</i> (<i>lacZ</i>)	222,97	[171,17; 274,78]	22,22	4,04	<0,001
SmR1(<i>lacZ</i>)- Δ <i>phaC1R</i> (<i>lacZ</i>)	-0,54	[-3,93; 2,84]	0,71	5,76	0,993
SmR1(<i>phaZ1</i>)- Δ <i>phaC1R</i> (<i>lacZ</i>)	39,79	[23,98; 55,60]	11,29	5,46	0,001
Δ <i>phaR</i> (<i>lacZ</i>)- Δ <i>phaC1R</i> (<i>phaZ1</i>)	-186,04	[-214,43; -157,65]	29,37	5,47	<0,001
Δ<i>phaR</i>(<i>phaZ1</i>)-Δ<i>phaC1R</i>(<i>phaZ1</i>)	36,31	[-12,41; 85,03]	3,09	6,84	0,168
SmR1(<i>lacZ</i>)- Δ <i>phaC1R</i> (<i>phaZ1</i>)	-187,21	[-216,00; -158,42]	30,23	5,01	<0,001
SmR1(<i>phaZ1</i>)-Δ<i>phaC1R</i>(<i>phaZ1</i>)	-146,88	[-175,07; -118,68]	20,74	7,83	<0,001
Δ <i>phaR</i> (<i>phaZ1</i>)- Δ <i>phaR</i> (<i>lacZ</i>)	222,35	[170,91; 273,79]	22,02	4,15	<0,001
SmR1(<i>lacZ</i>)- Δ <i>phaR</i> (<i>lacZ</i>)	-1,17	[-7,40; 5,06]	0,86	5,23	0,979
SmR1(<i>phaZ1</i>)- Δ <i>phaR</i> (<i>lacZ</i>)	39,16	[23,58; 54,75]	10,58	6,50	<0,001
SmR1(<i>lacZ</i>)- Δ <i>phaR</i> (<i>phaZ1</i>)	-223,52	[-275,48; -171,56]	22,34	4,00	<0,001
SmR1(<i>phaZ1</i>)-Δ<i>phaR</i>(<i>phaZ1</i>)	-183,19	[-232,66; -133,71]	17,31	4,95	<0,001
SmR1(<i>phaZ1</i>)-SmR1(<i>lacZ</i>)	40,33	[24,32; 56,35]	11,68	5,04	0,001

LEGENDA: Teste *post hoc* de Games-Howell, indicado quando não há igualdade de variâncias. Teste realizado para diferenciar a significância estatística entre os grupos do teste ANOVA de Welch da Tabela 20.

As comparações destacadas em verde correspondem a significância estatística da expressão de *phaZ1* entre as estirpes. Em azul, está destacado a comparação da expressão de *phaZ1* em estirpes que não apresentam significância estatística, de acordo com o valor de $p < 0,05$.

Dif. média = Diferença média entre os grupos comparados, IC 95% [inf;sup] = Limites inferior e superior do intervalo de confiança para a diferença média, t = estatística t para a comparação entre os grupos, gl = graus de liberdade usados no cálculo da estatística t, *p-value* = valor de *p* ajustado para a comparação entre os grupos. *p-value* < 0,05 indicam diferenças estatisticamente significativas.

8.7 ATIVIDADE DE NITROGENASE NAS ESTIRPES SmR1 Δ *phaZ1*, Δ *phaZ2* e Δ *phaZ1 Δ *phaZ2* DE *H. seropedicae**

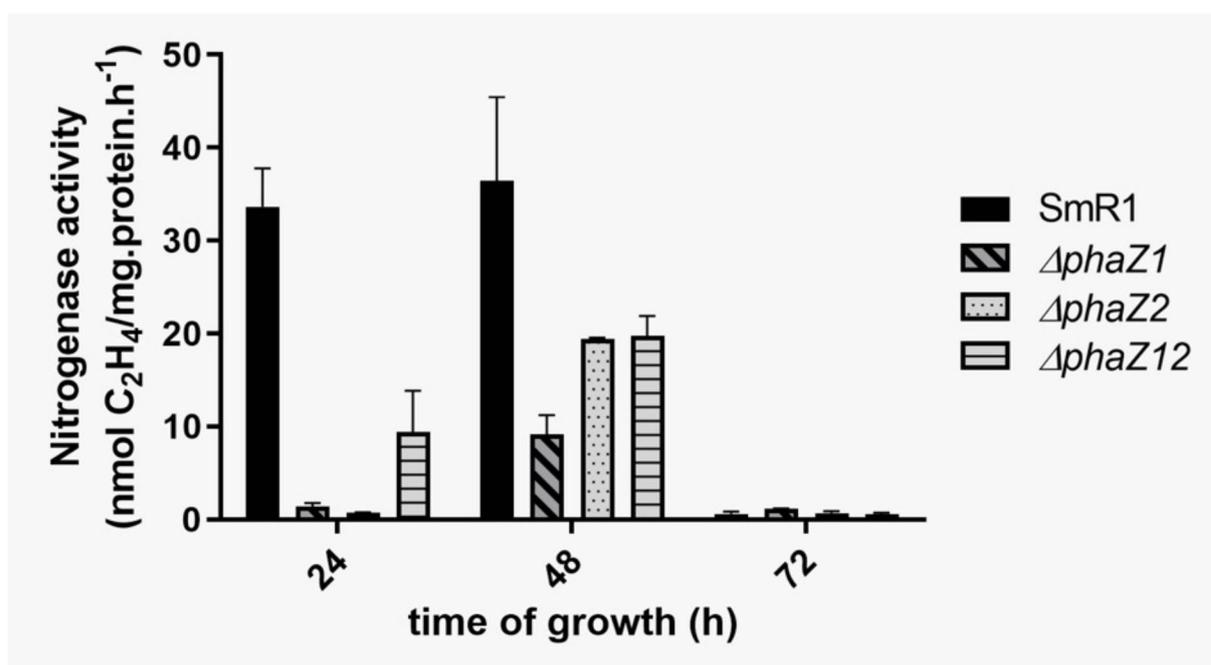


Figura 8. Atividade de nitrogenase nas estirpes Δ *phaZ1*, Δ *phaZ2* e Δ *phaZ1* Δ *phaZ2* de *H. seropedicae*. Os experimentos de determinação de atividade da nitrogenase foram realizados usando as estirpes cultivadas em meio líquido NFb-malato (frascos de 60 mL com 36 mL de meio de cultivo, baixa aeração) suplementado com 1 mM de NH₄Cl e DO₆₀₀ inicial ajustada para 0,04. O cultivo foi realizado em *shaker*

com rotação orbital de 120 rpm a 30 °C. A quantificação da atividade da nitrogenase foi realizada através do método de redução do acetileno (SCHÖLLHORN *et al.*, 1967⁷) e foi expressa em nmol de etileno por miligrama de proteína por minuto. A barra de erros corresponde ao desvio-padrão da média de um único experimento realizado em duplicatas.

⁷ SCHÖLLHORN, R.; BURRIS, R. H. Acetylene as a competitive inhibitor of N-2 fixation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 58, n. 1, p. 213–216, 1967.