

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA-PPGBIOTEC

CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA PST EM *Serratia marcescens*

MESTRANDO: MARCELO SANTOS DA SILVA

ORIENTADOR: ADOLFO JOSÉ DA MOTA (Prof. Doutor)

**MANAUS-AM
2017**

MARCELO SANTOS DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA PST EM *Serratia marcescens*

Dissertação de Mestrado,
apresentado ao Programa Multi-
institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade
Federal do Amazonas, para a
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Adolfo José da Mota

Co-orientadora: Andrea Ghelfi

**MANAUS-AM
2016**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586c Silva, Marcelo Santos
Caracterização do sistema PST em *Serratia marcescens*
/ Marcelo Santos Silva. 2017 93
f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Adolfo Jose Da Mota
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Regulon Pho. 2. Pst. 3. Fosfato. 4. *Serratia*
Marcescens. I. Mota, Adolfo Jose Da II. Universidade
Federal do Amazonas III.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, minha verdadeira força e sustento.

A minha família, que sempre foi meu porto seguro, meus exemplos e meus incentivadores. Agradeço à meu pai Antônio, minha mãe Rosângela, meus irmãos Milena e Markus, e um agradecimento em especial a minha querida tia Doralina Santos, por toda preocupação, cuidado, amor e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adolfo José da Mota, por sempre acreditar no meu trabalho e confiar em mim. Por todo incentivo, apoio, e por me oferecer todo suporte moral, técnico e científico que necessitei ao longo desses anos.

Ao Dr. Tetsuo Yamane, mentor do Projeto Fosfato, do qual faço parte, por todo incentivo ao decorrer desse trabalho, e pelo exemplo a ser seguido.

As minhas queridas amigas: Auricélia Matos, Luana Nonato e Samara Santos.

As melhores pessoas que Deus colocou na minha vida, muito obrigado por toda paciência, companheirismo e carinho. Sem vocês, jamais teria conseguido.

Aos meus estimados amigos de Laboratório, Adrianne, Nani, Rafael, Joaquim, Neto, Dani, Suelen, pelas correções em trabalho, auxílio, ajuda, dicas, sendo facilitadores do meu aprendizado e por tornarem a rotina do Laboratório mais feliz.

Aos meus amigos Thiago Barros e Andressa Barroso, amigos desde a graduação.

Ao Centro de Apoio Multidisciplinar da UFAM.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade do curso, obrigada pelo incentivo.

Ao CNPQ pelo financiamento da bolsa no decorrer do projeto.

RESUMO

O fósforo é um elemento essencial na composição das principais biomoléculas: proteínas, carboidratos, lipídeos, DNA e RNA. Entretanto, a elevada demanda desse nutriente leva à depleção de suas reservas naturais, resultando em uma possível crise mundial em um futuro não muito distante. Nesse contexto, surge a necessidade de sua reciclagem, e uma das alternativas viáveis se dá pelo uso de micro-organismos, que estocam o fósforo em grânulos polifosfato. Considerando a inestimável biodiversidade amazônica, é provável que existam micro-organismos portadores de sistemas altamente eficientes na captação e estoque de fosfato e portanto adequados para a reciclagem microbiológica do nutriente. Nesse trabalho foram coletada e isoladas 756 bactérias, dessas, 400 foram triadas pela metodologia de microdeterminação de captação do fosfato. Setenta e uma bactérias foram capazes de captar mais de 50% do fosfato disponível no meio de cultura, com destaque para *Serratia marcescens* 9rp1 que consegue captar quase a totalidade deste. A análise genômica revelou a existência de 1 operon PST completo, e outro incompleto, contendo apenas os genes que codificam para as permeases transportadoras de fosfato. A filogenia desses operons sugerem origem polifilética, ou seja, não são resultado de duplicação gênica o que pode estar influenciando na sensibilidade à percepção do nutriente e ativando toda a cascata metabólica resultante, conferindo a *S. marcescens* 9rp1 eficiência similar a *Pseudomonas aeruginosa*, geneticamente modificada para esse fim.

Palavras-chave: Regulon PHO, PST, fosfato, *Serratia marcescens*.

ABSTRACT

Phosphorus is an essential element in the composition of the biomolecules such as proteins, carbohydrates, lipids, DNA and RNA. However, the high exploitation of phosphorus leads to the depletion of its natural reserves, resulting in a possible global crisis of this element. In this context, recycling methodologies are imperative, and one of the viable alternatives is the use of microorganisms, which store phosphorus in polyphosphate granules. Considering the inestimable Amazonian biodiversity, it is probable that there are microorganisms carrying systems highly efficient in the capture and stock of phosphate and therefore suitable for its microbiological recycling. In this work, we collected and isolated 756 bacteria, from those, 400 were screened by the methodology of microdetermination of phosphate uptake. Seventy-one bacteria were efficient in phosphate uptake, especially *Serratia marcescens* (9rp1). The genomic analysis revealed the existence of, at least, three PST operons and the phylogeny of these operons suggest polyphyletic origin, *i. e.*, they do not result of gene duplication, which can influence the sensitivity to the perception of the nutrient in the environment and the whole metabolic cascade resulting.

Keywords: Regulon PHO, PST, phosphate, *Serratia marcescens*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Modelo da molécula de polifosfato pela projeção de Fisher.....	16
Figura 02: Microscopia eletrônica de transmissão de <i>Myxococcus xanthus</i> ...	17
Figura 03: Visualização de grânulos de reserva em <i>aerobacter aerogenes</i>	18
Figura 04: Perfil eletroforético de extratos de polifosfato.....	19
Figura 05: Distribuição global das jazidas exploradas como fonte de fosfatos	21
Figura 06: Países que exportam produtos fosfatados para o Brasil	21
Figura 07: Síntese do ciclo do fósforo na natureza	24
Figura 08: Sistema de transporte de fosfato inorgânico PIT.....	27
Figura 09: Sistema de transporte PST	28
Figura 10: Organização gênica do sistema PST em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Serratia marcescens</i>	29
Figura 11: Centro de projetos e estudos ambientais do Amazonas	33
Figura 12: Captação de fosfato em TGP . ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	
Figura 13: Captação de fosfato em TGP	36
Figura 14: Fosfato remanescente e crescimento bacteriano.	48
Figura 15: Crescimento microbiano em meio a enriquecido com fosfato . ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	
Figura 16: Atividade da fosfatase alcalina	50
Figura 17: Perfil eletroforético de extração de polifosfato.....	53
Figura 18: Rendimento da cultura.	54
Figura 19: Captação de fosfato..	55
Figura 20: Crescimento bacteriano e consumo de fosfato em TGP 0,5% glicose, sem glicose e variadas concentrações de glicerol.	56
Figura 21: Crescimento bacteriano e consumo de fosfato	57

Figura 22: Curva de crescimento 01.....	60
Figura 23: Curva de crescimento 02.....	61
Figura 24: Curva de crescimento 03.....	61
Figura 25: Atividade da fosfatase alcalina.	82
Figura 26: Atividade da fosfatase alcalina, para as extrações do periplasma . 83	
Figura 27: Perfil eletroforético da extração periplasmática.....	84
Figura 28: Atividade da fosfatase alcalina.	80
Figura 29: Atividade da fosfatase alcalina.	81
Figura 30: Perfil eletroforético da extração periplasmática.....	82
Figura 31: Amplificação das regiões phor, phou e psta.	84
Figura 32: Filogenia molecular do gene pstb.....	85
Figura 33: Filogenia molecular do gene pstc.....	86
Figura 34: Filogenia molecular do gene psts.....	87
Figura 35: Comparação entre os genes psta1 e psta2.....	87
Figura 37: Comparação entre os genes pstb1 e pstb2.....	87
Figura 38: Comparação entre os genes pstc1 e pstc2.....	87
Figura 39: Comparação entre os genes psts1 e psts2.....	88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Sequência dos iniciadores usados nesse trabalho	37
TABELA 2: Provas bioquímicas e fisiológicas	49
TABELA 3: Anotação gênica para <i>S. marcescens</i> 9RPT1	64
TABELA 5: Termociclagem dos primers.....	81

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1	Química do Fósforo.....	14
1.2	A presença de polifosfato em micro-organismos.....	16
1.3	Problemas globais com fósforo	19
1.3.1	A crise do Fósforo.....	19
1.3.2	O fosfato como poluente e o processo de eutrofização.....	21
1.4	Recuperação e ciclo do fósforo.....	23
1.5	Sistemas de captação de fósforo inorgânico.....	25
1.5.1	Sistema PIT	26
1.5.2	Sistema PST.....	27
1.6	Sistema PST em <i>Serratia marcescens</i>	29
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Coleta das amostras e isolamento das bactérias.....	33
4.2	Ensaio de captação de fosfato e acúmulo de polifosfato.....	34
4.2.1	Micro-organismos e meio de cultura.....	34
4.2.2	Microdeterminação de fosfato.....	34
4.3	Identificação da cepa isolada\$	35
4.3.1	Identificação molecular da cepa isolada.	35
4.3.2	Identificação fenotípica da cepa isolada	37
4.4	Determinação da atividade da fosfatase alcalina	38

4.4.2	Extração da fosfatase alcalina	40
4.5	Extração de polifosfato.....	42
4.5.1	Preparo do gel de Polifosfato 20%.	43
4.6	Otimização das condições de cultivo	43
4.7	Vantagem adaptativa no acúmulo de polisfosfato.....	44
4.8	Caracterização genética do sistema PST em <i>Serratia marcescens</i>	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Coleta e triagem quanto a capacidade de captação de fosfato	46
5.2	Consumo de fosfato.....	47
5.3	Identificação da cepa isolada.....	48
5.4	Atividade da fosfatase alcalina	50
5.4.1	Ensaio de Fosfatase Alcalina e Construção da Curva de crescimento microbiano	50
5.4.2	Extração de Polifosfato	52
5.5	Vantagem adaptativa no acúmulo de polisfosfato.....	53
6	CONCLUSÃO	71
7	REFERÊNCIAS	72
8	ANEXOS	82

INTRODUÇÃO

O fósforo é um elemento essencial na composição dos seres vivos: não se conhece organismo vivo que não utilize esse elemento. O fósforo compõe aproximadamente 1% da massa do corpo humano, participa de processos celulares (DURR et al 1979; CRAMER et al., 1994), constitui as principais biomoléculas como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos (DNA e RNA), moléculas estas responsáveis pela estrutura e função de membranas e paredes celulares (TINSLEY et al., 1995; REUSH, 1992, 1999), além de compostos orgânicos e polímeros que servem de estoque energético como ATP e polifosfato (DAIRY SCIENCE, 1999).

O polifosfato foi observado no interior de micro-organismos pela primeira vez em 1944, por JEENER e BRACHET, em células de *Myxococcus xanthus*, na forma de grânulos metacromáticos. Depois dele, reservas de polifosfatos foram encontradas nas células dos demais seres vivos: bactérias, algas, fungos, protozoários, plantas e mamíferos. A hipótese mais aceita é que os grânulos sejam usados como reserva de fosfato e energia e que são metabolizados quando em situação de escassez nutricional.

Em contexto global, há dois grandes problemas com fósforo: (1) a alta exploração desse elemento pela indústria de fertilizantes, desequilibrando o ciclo natural do elemento, (2) e o fenômeno da eutrofização. O principal uso de fósforo é para a produção de fertilizantes e especialistas apontam para uma possível crise por esgotamento das reservas naturais. O alerta foi dado há décadas, o que tem motivado centros de pesquisas em diferentes áreas e

partes do mundo a propor alternativas economicamente viáveis para seu uso e reciclagem.

O segundo grande problema ocorre quando esse elemento e altas concentrações de matéria orgânica e nitrogênio são descarregados em mananciais, sem prévio tratamento, causando um desequilíbrio no ecossistema, resultante da eutrofização.

Estratégias para contornar o problema já estão sendo exploradas, a ideia básica de todas elas é reciclar o fósforo, antes que ele se deposite no fundo oceânico, o que dificulta a sua recuperação. Ao se reciclar, naturalmente a exploração das jazidas irá diminuir e menos fosfato disponível no meio ambiente aquático, menor o risco de eutrofização.

Uma das formas de se reciclar o fósforo é com uso de micro-organismos, que naturalmente já captam esse elemento do meio circundante. Em bactérias, a entrada de fósforo é regulada por um regulon específico, o regulon PHO. Para *E. coli*, dentro desse regulon foram descritos dois sistemas de acúmulo de polifosfato: (1) o sistema PIT (Phosphate Inorganic Transport), um sistema de baixa afinidade por fosfato e de expressão constitutiva, cuja captação é facilitada por um canal transmembrana, e o (2) sistema PST (Phosphate Specific Transport), um sistema de alta afinidade por fosfato, constituído por 5 proteínas e dois reguladores que são expressos em baixas concentrações do elemento.

No presente projeto o esforço amostral permitiu selecionar alguns isolados ambientais que captam mais de 50% do fosfato disponível no meio de cultura, entre esses, um dos isolados (9rp1), identificado como *Serratia*

marcescens, destaca-se por captar praticamente todo o fosfato. Tal capacidade apontou para um sistema PST altamente eficiente o que motivou a sua caracterização genética e também um estudo filogenético. O resultado dessas abordagens revelou repetições do operon PST e de origem polifilética. O resultado da captação, obviamente é a somatória das eficiências individuais de cada operon PST, e com base nisso propomos a hipótese de sensibilidade gradual no sistema de eficiência e que esses operons sejam ligados em série a medida que o fosfato diminui no ambiente externo.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Química do Fósforo

Em 1974, o cientista e escritor Isaac Asimov disse: "*Life can multiply until all the phosphorus has gone and then there is an inexorable halt which nothing can prevent*" (ASHLEY et al., 2011). A célebre frase faz referência à importância inquestionável que o fósforo possui na vida de todos os seres vivos.

O elemento químico fósforo (P), número atômico 32, pertencente à família 5A, apresenta-se abundantemente distribuído no globo terrestre através de seus diversos compostos. O fósforo faz parte da composição das principais biomoléculas: proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos (DNA/RNA), logo, faz parte da composição de todos os seres vivos (WANNER, 1993, 1996).

O corpo humano, por exemplo, contém aproximadamente 1% em massa deste elemento. Mesmo estando em pequena concentração, o fósforo orgânico tem um papel essencial nos processos celulares de todos os seres vivos, tais

como: quelantes de íons metálico (DURR et al 1979; CRAMER et al., 1994); formação de parede celular (TINSLEY et al., 1995); formação de canais de membrana (REUSH, 1992, 1999); regulação de estresse de sobrevivência e do desenvolvimento celular (KOMBERG et al., 1999); e constituindo compostos orgânicos contendo ligações N-P que servem como reservas energéticas importantes: trifosfato de adenosina (ATP), creatina fosfato, acetilfosfato (AcP), fosfoenolpiruvato e polifosfato inorgânico (DAIRY SCIENCE, 1999).

Os ésteres fosfóricos compõem os principais responsáveis pelo armazenamento e transmissão de informação genética (os fosfodiésteres DNA e RNA) (SAEGER, 1984), e participam da estrutura de várias coenzimas (DUGAS, 1996) e anidridos fosfóricos. Além dessas funções, o elemento ainda possui aplicações biotecnológicas: na indústria de fertilizantes, ação antimicrobiana, antioxidante, aplicações como plastificantes, reagentes na preparação de polímeros organofosforados, complexantes para extração de cátions de metais pesados, inseticidas, pesticidas e compostos tóxicos utilizados em armas de guerra (YANG, 1992).

O elemento fósforo não é encontrado na natureza na sua forma livre devido a sua alta reatividade, sendo assim, a forma inorgânica mais conhecida do fósforo é em seu estado pentavalente de ortofosfato $[(PO)^{-3}_4$ ou Pi]. Esta é a forma preferencial de captação e assimilação de fósforo por bactérias, uma vez que é diretamente incorporada a monômeros fosforilados como o ATP.

A molécula de polifosfato é obtida a partir da condensação de ortofosfatos, através de ligações fosfoanídricas, onde cada grupamento apresenta geometria tetraédrica, na qual um átomo de fósforo (P) em posição central se encontra ligado covalentemente a quatro átomos de oxigênio (O),

sendo que um deles forma uma ligação dupla (P=O). A repetição dos monômeros (PO_3^-) conferem à cadeia uma carga líquida negativa (Fig. 01) (ZAGO; CHUGANI; CHAKRABARTY 1999). O polifosfato pode assumir uma forma cíclica, conhecida como metafosfato, ou permanecer linear, a forma mais abundante encontrada no interior de vários micro-organismos.

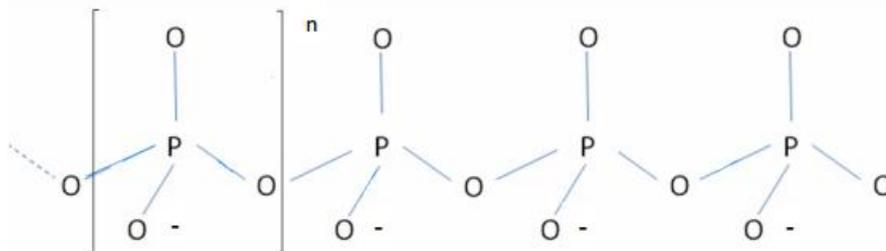


Figura 1: Modelo da molécula de polifosfato pela projeção de Fisher. Os polifosfatos são constituídos por unidades básicas (PO_3^-), onde n representa o grau de polimerização da estrutura. Fonte: (PEREIRA, 2007).

1.2 A presença de polifosfato em micro-organismos

Os micro-organismos desenvolveram uma enorme e versátil capacidade de estocar metabólitos que possam ser convertidos em energia, para fins de sobrevivência. O polifosfato é um bom exemplo dessa “reserva energética”, pois diversas espécies bacterianas são capazes de usar os grânulos de polifosfatos obtendo fosfato como fonte de energia e do próprio fosfato (BERGWITZ e JÜPPNER, 2011).

Em 1944 JEENER e BRACHET observaram que após a adição de fosfato inorgânico (P_i) às células de levedura, o resultado era acumulação maciça de um material basofílico dentro das células. Na época pensou-se que era ácido ribonucleico (RNA), mas pouco tempo depois, WIAME (1947) e SCHMIDT et al. (1954) isolaram e identificaram a substância como polifosfato

inorgânico (Pi). Com o advento da microscopia eletrônica, foi observado que a molécula estava depositada no citoplasma microbiano sob a forma de grânulos metacromáticos (HAROLD, 1966). Após uma alta taxa de captação, o fosfato é polimerizado dando origem aos polifosfatos que podem ser visualizados nas células em forma de grânulos metacromáticos. O polifosfato pode ser clivado e utilizado na via de biossíntese de ATP, principalmente em situações de estresse nutricional (Fig. 2).

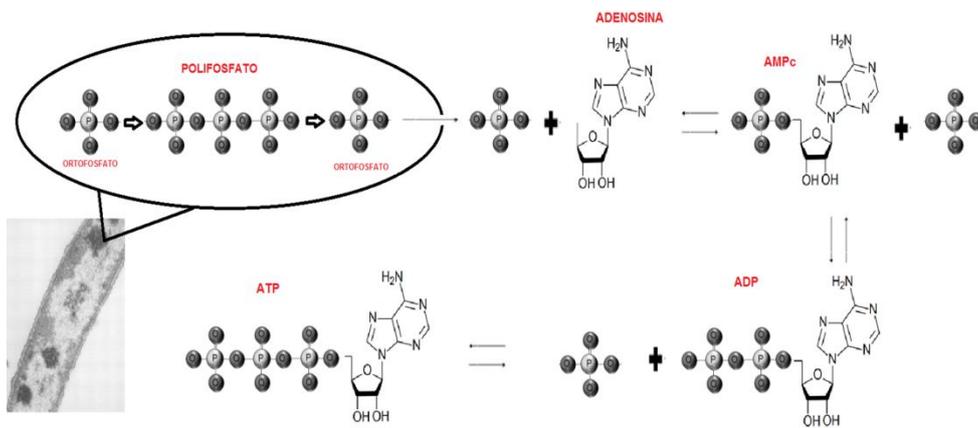


Figura 2: Microscopia eletrônica de transmissão de *Myxococcus xanthus* com grânulos metacromáticos visíveis. (Montagem feita a partir de imagens de domínio público)

Após a descoberta de JEENER e BRACHETEM (1944), grânulos de reserva de polifosfato foram encontrados nas células dos demais seres vivos: bactérias, algas, fungos, protozoários, plantas e mamíferos, em todos eles possuindo mecanismos próprios de incorporação e utilização desse elemento. Em 1954, DUGUID et. al submeteram *Aerobacter aerogenes* a variadas situações de escassez nutricional e puderam visualizar a formação de grânulos metacromáticos no interior desse micro-organismo (Fig. 03).

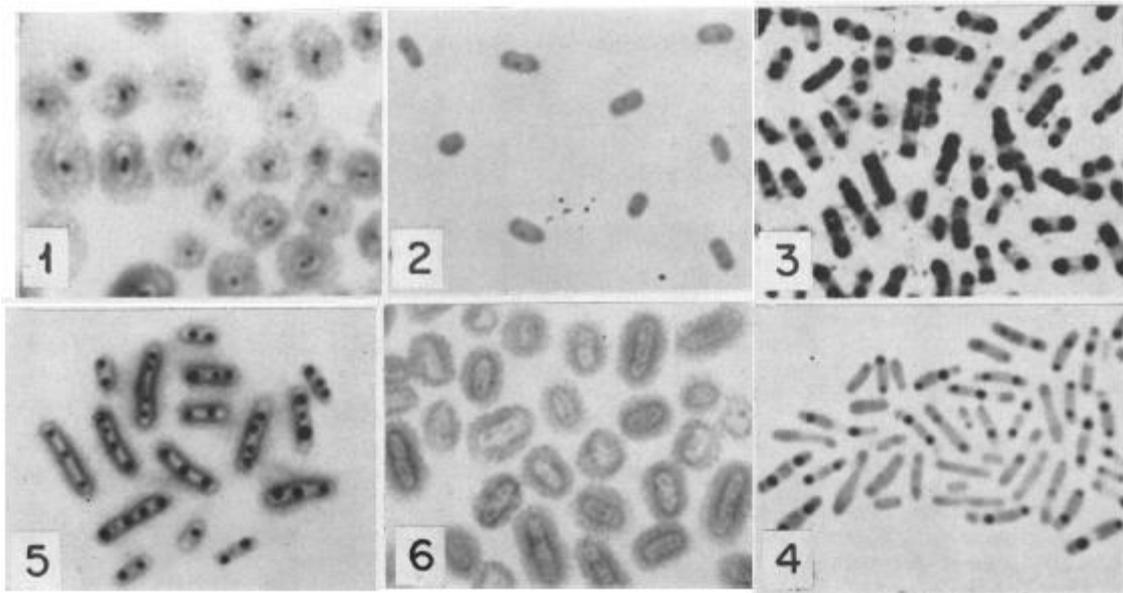


Figura 3: Visualização de grânulos de reserva em *Aerobacter aerogenes*, submetido a varias condições de escassez. Fonte: HAROLD, 1966.

Em *Myxococcus xanthus* foram encontrados reservas de polifosfato em todos os compartimentos celulares estudados, grânulos associados com inclusões de glicogênio, disperso no citoplasma, incorporado dentro do nucleóide. outros exemplos incluem o polifosfato depositado em matriz proteica de micobactérias e de *Acinetobacter johnsonii* (HAROLD, 1966).

O polifosfato pode representar até 30% da biomassa seca de células fúngicas (DEINEMA et al., 1985), que são níveis bem acima das exigências metabólicas normais de fosfatos, o que indicam um papel importante em resposta a mudanças no estado nutricional ou condições ambientais (KORNBERG et al., 1999).

O grau de polimerização de polifosfato inorgânico é determinado pela quantidade de resíduos de fosfatos, e de acordo com este parâmetro, os polifosfatos podem ser classificados com sendo de alto, médio ou baixo peso molecular, ou ainda de cadeia curta (<15 resíduos), média (entre 15 e 45

resíduos) ou longa (> 45 resíduos) (Fig. 04) (JING-FU E GUI-BIN, 2000; OHTOMO et al, 2004; LICHKO, 2006).

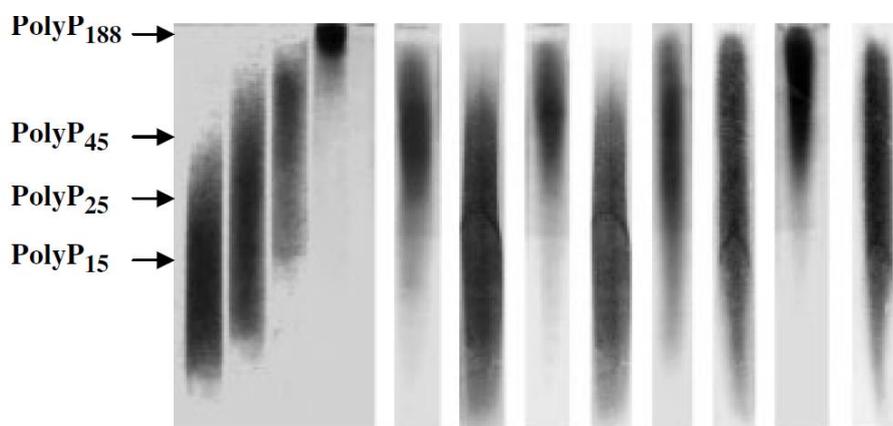


Figura 4: Perfil eletroforético de extratos de polifosfato em gel de 20% poliacrilamida. À esquerda, os números representam as posições relativas em relação ao número de resíduos polimerizados. Os três tipos de cadeia estão representadas nessa **Figura**: de alto, médio ou baixo peso molecular, de acordo com o tamanho da cadeia. Fonte: LICHKO, 2006.

1.3 Problemas globais com fósforo

1.3.1 A crise do Fósforo.

O principal uso atual de fósforo é na forma de fertilizantes, pois esse elemento é um dos três nutrientes principais e necessários para o crescimento das plantas: nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K); e, portanto, muito explorados pelas indústrias de fertilizantes.

Colheitas sucessivas na agricultura esgotam o fósforo do solo, além de outros nutrientes. Para repor as necessidades nutricionais do solo, inicia-se outro ciclo de adubação o que impulsiona o mercado de fertilizantes, entretanto contribui para que jazidas fosfáticas, a única fonte de fósforo viável no planeta, sejam cada vez mais exploradas. O crescimento populacional e a demanda por

mais alimentos aceleram a taxa de depleção de reservas de fósforo, e futuras gerações, possivelmente enfrentarão muitos problemas na obtenção deste elemento (ABELSON, 1999).

Há várias décadas, especialistas já alertam sobre uma crise desse elemento. O alerta é preocupante, principalmente porque se trata de um mineral “finito e insubstituível”, sem fósforo não há DNA e sem DNA não há vida.

De acordo com o United States Geological Survey (USGS), a estimativa (2010) de exploração economicamente viável da reserva mundial de fosfato, com a presente tecnologia, era da ordem de 16.000 Mt (megatonelada = 1 milhão de toneladas). Em 2011, foram extraídas 191 Mt de rocha fosfática. Assim, mantido o ritmo atual de consumo, as reservas de fósforo irão se esgotar num prazo de 80 anos. As jazidas se concentram nos países do Norte da África, especialmente no Marrocos, onde se encontra cerca de 40% das reservas mundiais, incluindo o Saara Ocidental e a Tunísia. A China detém 26% e os EUA, 8% (Fig. 05). O Brasil com apenas 0,4% é dependente, portanto, das importações (Fig. 06) (JASINSKI, 2012).



Figura 5: Distribuição global das jazidas exploradas como fonte de fosfatos. Fonte: JASINSKI, 2012.

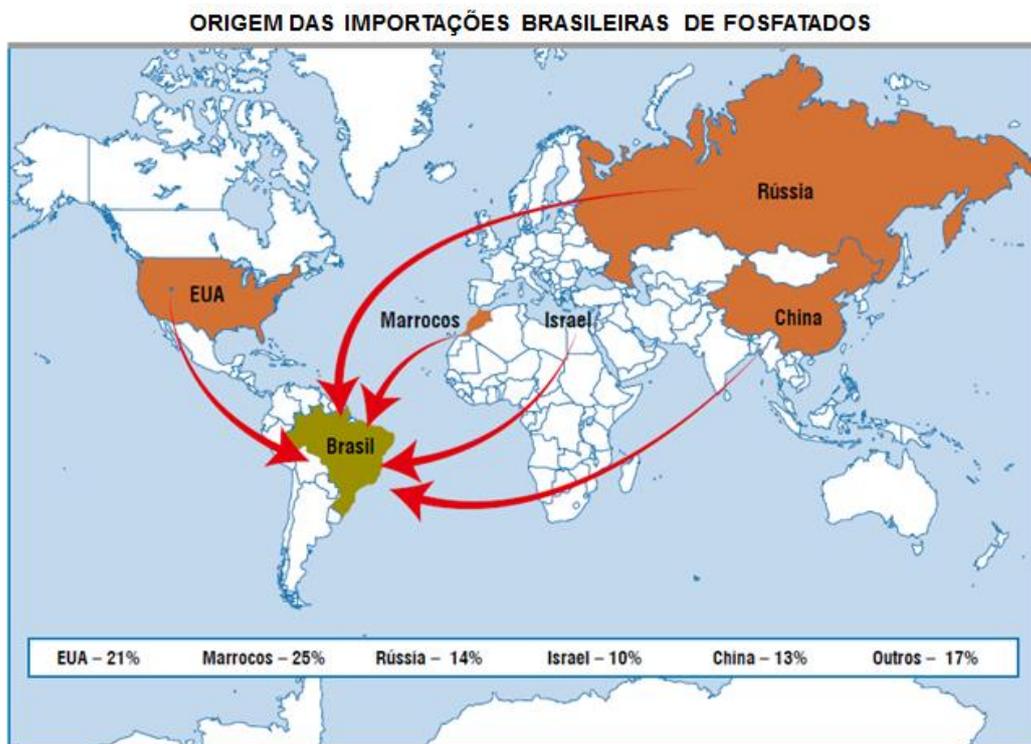


Figura 6: Países que exportam produtos fosfatados para o Brasil. Fonte: JASINSKI, 2012.

1.3.2 O fosfato como poluente e o processo de eutrofização

A eutrofização é um processo que ocorre quando grande quantidade de matéria orgânica e de nutrientes inorgânicos, principalmente nitrogênio e fósforo, são descarregados em altas concentrações em águas superficiais e em condições de boa luminosidade. Essa combinação de fatores leva à proliferação excessiva de micro-organismos, com efeitos negativos que desequilibra o ecossistema, tais como: anóxia (ausência de oxigênio dissolvido na água); florescimento de algas e crescimento incontrolável de outras plantas aquáticas; e produção de substâncias tóxicas por algumas espécies de algas (RIVERA, 2003).

O fosfato presente em ecossistemas aquáticos continentais tem origem em fontes naturais e artificiais. Dentre as fontes naturais, as rochas fosfatadas da bacia de drenagem constituem a fonte básica de fosfato. As fontes artificiais de fosfato mais importantes são os esgotos domésticos e industriais e o material particulado de origem industrial contido na atmosfera (BARROS, 2008).

Além do esgoto sanitário outros tipos de efluentes industriais como os de indústrias de fertilizantes, pesticidas, químicas em geral, conservas alimentícias, abatedouros, frigoríficos e laticínios, apresentam fósforo em quantidades excessivas (CETESB, 2009).

Nos últimos 20 anos, o processo de eutrofização tem se acelerado em reservatórios brasileiros devido aos seguintes fatores: aumento do uso de fertilizantes nas bacias hidrográficas, aumento da população humana, elevado grau de urbanização sem tratamento de esgotos domésticos e intensificação de algumas atividades industriais que levam excessiva carga de fósforo, nitrogênio

e matéria orgânica para essas represas (INSTITUTO INTERNACIONAL DE ECOLOGIA, 2000).

Atualmente, a eutrofização é reconhecida como um dos problemas mais importantes concernentes à qualidade de água. Dentre os fatores que influenciam a eutrofização, além das concentrações de fósforo e nitrogênio, podem ser citados a velocidade da água, a vazão, a turbidez, a profundidade do curso de água, a temperatura entre outros (LAMPARELLI, 2004).

1.4 Recuperação e ciclo do fósforo

O fósforo possui dois ciclos, que acontecem em escalas de tempo distintas. Uma parte do elemento é reciclado localmente entre o solo, as plantas, consumidores e decompositores, em uma escala de tempo relativamente curta, chamada de “ciclo de tempo ecológico”. Outra parte do fósforo sedimenta-se e é incorporada às rochas; seu ciclo envolve uma escala de tempo muito mais longa, chamada “ciclo de tempo geológico” (QUEVEDO, 2011).

Não há nenhum substituto para o fósforo na natureza. Porém, diferentemente do petróleo, o fósforo pode ser reciclado (Fig. 07). A “reciclagem contínua” constitui a base do ecossistema global, mas o homem tende a interromper este balanço ecológico natural introduzindo um sistema linear para fora do ciclo, extraindo matérias-primas, drenando recursos naturais finitos e produzindo bioprodutos prejudiciais durante o processo. Há necessidade de uma intercessão neste processo, para que o sistema linear se torne um circuito conectado ao ciclo original, evitando desta forma o acúmulo

de lixos tóxicos, o esgotamento de recursos naturais e o perecimento do ecossistema (QUEVEDO, 2011).

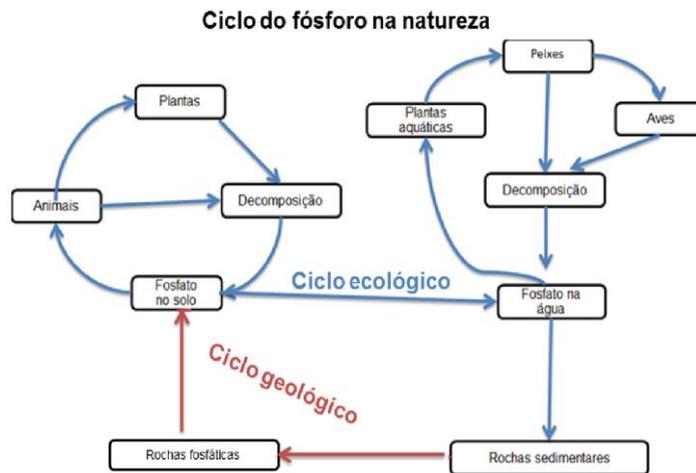


Figura 7: Síntese do ciclo do fósforo na natureza. O fósforo distribuído na natureza é incorporado por todos os grupos de seres vivos, para a constituição das principais biomoléculas, por isso indispensável para a vida. Por intermédio do processo de decomposição, esse elemento é devolvido, porém em uma velocidade bem menor que a taxa de exploração. Fonte: QUEVEDO (2011).

Genericamente as formas de se recuperar fósforo do meio ambiente podem ser agrupadas em químicas e biológicas (GUALBERTO, 2009). Um exemplo de recuperação química, é a empregada pela companhia belga NuReSys (Nutrient Recovery System) que usa uma tecnologia que consegue retirar mais de 85% de fósforo de águas residuárias, em forma de cristais de estruvita ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Resolve o problema da eutrofização, mas o composto gerado inviabiliza o uso desse fósforo para outras aplicações, como por exemplo, fertilizantes. Outras alternativas usando sais de cálcio ou alumínio, resultam no mesmo problema, isto é, a formação de outro resíduo.

Um projeto inovador, PhosFarm, coordenado pelo Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology IGB, almeja desenvolver processos para isolar fosfatos ligados a compostos orgânicos/bioquímicos com o uso de enzimas apropriadas. Estrumes suínos, bovinos e de aves apresentam níveis acima de 50% de fósforo na forma de compostos orgânicos. Embora ainda no estágio de escala piloto, a Fraunhofer consegue recuperar cerca de 90% de fosfatos usando enzimas imobilizadas. O efluente líquido contendo fosfato é precipitado na forma de $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ que são diretamente usados como fertilizante (FRAUNHOFER, 2013).

Mas existe ainda uma possibilidade mais simples de recuperação e reutilização do fósforo, que é a reciclagem microbiológica que se baseia na necessidade de micro-organismos incorporarem esse elemento do meio ambiente, em geral, na forma de íon fosfato (KURODA; KUNIMOTO; HOROHOSHI, 2000; KATO, 1993)

1.5 Sistemas de captação de fósforo inorgânico.

Assim como os demais seres vivos, os micro-organismos são altamente dependentes de macronutrientes para um bom desempenho metabólico. Ao longo do tempo, estes desenvolveram a habilidade de estocar razoáveis quantidade de metabolitos indispensáveis a sua sobrevivência, sob a forma de polímeros osmoticamente inertes (MULAN et al 2005).

O fósforo é um macronutriente essencial para os micro-organismos, contudo não possui passagem livre pelas camadas da célula, sendo necessários, portanto, sistemas de transporte.

Assim como os demais nutrientes, o fósforo possui mecanismos celulares de assimilação regulados pelo regulon fosfato ou regulon PHO (do inglês phosphate) (KATO, 1992; STOCK et al, 1989; WANNER, 1996). Em *Escherichia coli*, por exemplo, o regulon PHO é composto por pelo menos 31 genes e (n) operons (BAEK e LEE, 2006; WANNER, 1996). A disponibilidade de Pi presente no meio é o fator decisivo para qual sistema de captação e acúmulo será ativado e utilizado (VANBOGELEN et al., 1996).

Em *E.coli* foram descritos precisamente os dois principais sistemas de acúmulo de polifosfato: o sistema PIT (Phosphate Inorganic Transport) que não faz parte do regulon PHO, e o sistema PST (Phosphate Specific Transport) que faz parte do regulon PHO.

1.5.1 Sistema PIT

O sistema PIT, ou sistema de baixa afinidade por Pi ($K_m = 38,2 \mu\text{M}$), é constituído por um canal transmembrana de alta velocidade de transporte (55 nm Pi/min) e cuja expressão é constitutiva (WILSK e MALAMY, 1980). O método de transporte desse sistema envolve o complexo de Pi com íons divalentes, tais como Zn^{+2} , Mg^{+2} e Ca^{+2} , via troca de H^+ (BEARD et al, 2000), portanto dependente da força próton-motriz. O complexo fosfato-metal precisa ter carga líquida neutra. Esse sistema de transporte de fosfato é reversível e, portanto, permite influxo e efluxo de íons bivalentes e fosfato. Para o funcionamento ótimo do canal, o pH interno deve ser alcalino, o que facilita a dissociação do próton a partir da proteína transportadora transmembrana (VAN VEEN et al 1997 apud ALAN 2005) (Fig. 08).

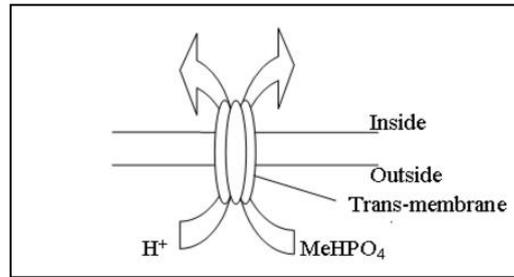


Figura 08: Sistema de transporte de fosfato inorgânico (PIT). Fonte: DAIRY SCIENCE.

Contudo, apesar de ser reconhecido como um sistema de captação de fosfato, o sistema PIT não responde às variações de zinco e principalmente de fósforo no meio. Assim, tudo indica que tal sistema é na verdade um transportador de íons metálicos, e que o transporte de fosfato seja um efeito colateral desse processo (HSIEH e WANNER, 2010)

1.5.2 Sistema PST

Estudos em ambientes onde o Pi é escasso revelaram a existência de um sistema alternativo altamente eficiente na captação de fosfato, PST, que ao contrário do sistema PIT, é um sistema de alta afinidade pela molécula de fosfato, ($K_m = 0,43\mu M$) (RAO e TORRIANI, 1990).

A maioria dos genes associados à captação e assimilação de Pi e de moléculas fosfatadas é expressa somente quando a disponibilidade de Pi no meio encontra-se abaixo de 4 mM (WANNER, 1996).

O operon PST, é composto por cinco genes, onde os quatro primeiros, *psts*, *pstc*, *psta* e *pstb*, codificam proteínas para um sistema de transporte de Pi de alta afinidade, e o último gene codifica para a proteína *phou*, cujo caráter é regulatório. O fosfato presente no periplasma é sequestrado pela proteína PstS e então transferido para as proteínas PstA e PstC, que formam um canal na

membrana citoplasmática. PstB é uma ATPase que fornece energia ao transporte (WARNEER, 2015). (LEE et. al, 2014) (Fig. 09).

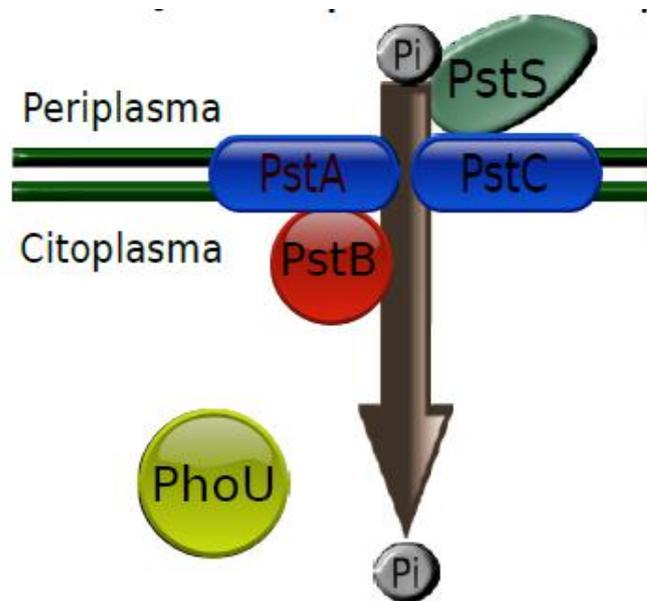


Figura 9: O sistema de transporte PST. Fonte: adaptado de WARNEER, 2015.

Além de transportar Pi, existem evidências que suportam a hipótese do papel regulatório de PST em relação ao regulon PHO. O mecanismo dessa regulação ainda é desconhecido, mas mutantes *PHOU* apresentam expressão constitutiva de todo o regulon mesmo na presença de altas concentrações de Pi (WANNER, 1996).

Os genes do operon PST são regulados pelo sistema de dois componentes PhoB/PhoR. O papel de PhoR e PhoB na cascata de transdução de sinal está razoavelmente claro. Porém, ainda não se sabe como PhoR recebe a informação do meio sobre a disponibilidade de Pi, e nem como a troca entre as atividades de quinase e fosfatase é modulada. Uma das hipóteses, é a de que o conjunto de proteínas PSTSCAB sinaliza para PhoU sobre a disponibilidade de Pi no periplasma. PhoU, por sua vez, interage com PhoR e

este, dependendo do caso, assume a atividade de quinase ou de fosfatase (TASCHNER, et al., 2004)

Além de ser descrito em *E.coli*, o sistema PST também já foi molecularmente caracterizado em *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, dentre alguns outros micro-organismos (Fig 10).

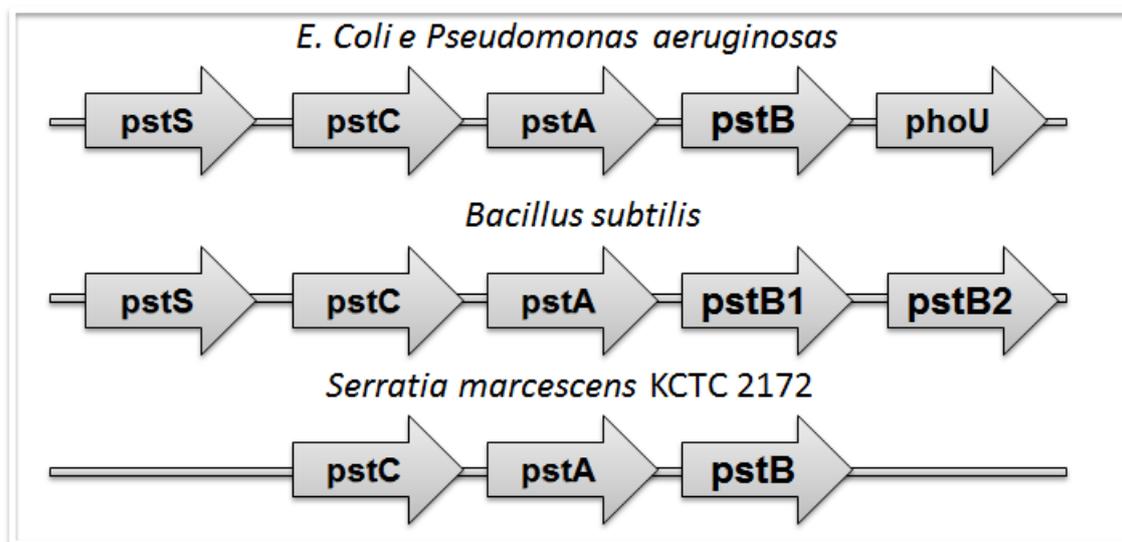


Figura 10: Organização gênica do sistema PST em *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Serratia marcescens*. Fonte: LEE, 2009; KOBAYASHI e HULETT. 1997; NIKATA, 1995

1.6 Sistema PST em *Serratia marcescens*

Serratia marcescens é uma Eubactéria pertencente ao gênero *Serratia*, da família Enterobacteriaceae, da ordem Enterobacteriales, classe das Gammaproteobacteria e do filo das Proteobacterias. Bacilo único e gram-negativo, medindo entre 0,3 a 1,8 μm , móvel, anaeróbio facultativo, saprófita e cosmopolita, sendo a principal bactéria do gênero *Serratia*

Conhecida por sua pigmentação vermelha, os primeiros relatos desse organismo datam do século XXVII, sob a forma de mancha vermelha em

diversos alimentos. O nome *Serratia marcescens* possui duas origens: *Serratia* em homenagem ao físico italiano Seafino Serrati; e o termo *marcescens* é de origem latina que significa decomposição, em referência aos primeiros relatos

Esse micro-organismo pode ser isolado em todos os ambientes, mas segundo GRIMONT e GRIMONT (2006) é mais abundante em ambientes aquáticos, podendo também realizar relações simbióticas com animais e o homem.

O característico pigmento vermelho da bactéria trata-se da prodigiosina (KALIVODA et al., 2010), pigmento natural, pertencente à família das prodigininas, cuja síntese é influenciada por fatores como concentrações de sais e fonte carbono, principalmente o glicerol (KIM e LEE, 2009).

LEE et. al. (2009) caracterizaram parcialmente o sistema PST da cepa KCTC 2172 de *Serratia marcescens* (genes *pstc*, *psta*, e *pstb*), não tendo sido capazes de encontrar os genes *psts* e *phou*; ainda observaram uma capacidade menor de captação em relação ao controle. Capacidade que era reestabelecida quando esse operon parcial era clonado em *E. coli* contendo os genes *psts* e *phou*.

Considerando que os testes bioquímicos revelaram que *S. marcescens* (9rpt1) era tão eficiente na captação de fosfato quanto o controle e que a caracterização do operon PST permanece parcial na literatura, os objetivos desse trabalho foram: analisar o perfil de captação de fosfato da cepa 9rpt1 isolada do rio Araçá, afluente do Rio Negro, e realizar a caracterização molecular do sistema PST dessa cepa. A hipótese principal é que um ambiente com escassez do nutriente, tenha sido imperativo na seleção micro-organismos eficientes na captação desse elemento vital.

2 JUSTIFICATIVA

O fósforo é um macronutriente essencial para a vida de qualquer organismo vivo. É um elemento finito e insubstituível, porém, reciclável. O principal uso desse elemento é na forma de fertilizantes, e muitos países dependem de importação para atender a demanda da agricultura. As colheitas sucessivas retiram o fosfato do solo, e o leva para lagos e rios e, por fim, para o fundo oceânico, impedindo sua reintrodução no ciclo. Por outro lado, estão presentes em águas residuárias e também contribuem para eutrofização artificial, prejudicial aos ecossistemas de rios, lagos e baías. Sua exploração ao longo dos tempos tem ocasionando um risco iminente, levando a um futuro esgotamento das reservas naturais.

Devido ao papel extremamente importante dos micro-organismos no processo de reciclagem do fósforo, estes podem ser usados em sistemas mais eficientes de captação desse nutriente, sem efeitos colaterais para o ambiente. Explorar e conhecer melhor a diversidade microbiana amazônica contribui para acessar o patrimônio genético com sistemas e/ou micro-organismos mais eficientes, e ainda propor processos de reciclagem que auxiliem na biorremediação de áreas eutrofizadas conectada com a geração de um produto que pode ser usado na agricultura.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o sistema PST, do ponto de vista bioquímico, genético e evolutivo de micro-organismos eficientes na captação de fosfato.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Prospectar bactérias eficientes na captação de fosfato;
- II. Realizar a caracterização genética do operon PST do(s) micro-organismo(s) que captar(em) 80% ou mais do fosfato disponível.
- III. Testar a hipótese de vantagem adaptativa para micro-organismos eficientes na captação de fosfato.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Prospecção de bactérias eficientes na captação de fosfato: coleta e isolamento.

As amostras foram coletadas em quatro pontos: (1) rio Araçá (afluente do rio Negro); (2) rio Negro, próximo à foz do rio Araçá; (3) rio Negro, nas dependências do Centro de Projetos e Estudos Ambientais do Amazonas – CEPEAM (Fig. 11); e um ponto no Rio Solimões.



Figura 11: Centro de Projetos e Estudos Ambientais do Amazonas. Fonte: <http://www.cepeam.org.br/>

As coletas foram realizadas nos meses de fevereiro e março de 2015. Utilizou-se garrafas do tipo SCHOTT, devidamente esterilizadas por autoclavagem a 121° C por 15 minutos. Foram coletadas amostras de água na profundidade de 15 cm, seguindo as normas da CETESB (2011) para esse tipo de coleta.

As amostras coletadas foram diluídas sucessivamente em 0.9% de Solução Salina, até a concentração de 10^{-5} . Cada diluição, incluindo a amostra não diluída, foi semeada pela técnica de espalhamento em placa no meio de

cultura Ágar Triptona de Soja (TSA), Cetrimide Ágar e Ágar Luria-Bertuni (LB) e incubadas a 28° C pelo período de 24 horas (HITCHINS et al, 1992).

4.2 Prospecção de bactérias eficientes na captação de fosfato: ensaios de captação de fosfato e acúmulo de polifosfato.

4.2.1 Micro-organismos e meio de cultura

dos isolados, conseguimos triar em torno de 400 bactérias, testando o potencial em captação de fosfato.

Os cultivos foram realizados em meio de cultura mínimo TGP: 0.4% de glicose; NaCl (4.68g/l); KCl (1.5g/l); NH₄Cl (1.08g/l); Tris-base (14.52g/l); MgCl₂.6H₂O (0.2 g/l); Na₂SO₄ (0.35 g/l); CaCl₂ (0,22/l); FeCl₃ (0,32g/l); ZnCl₂ (0,2mg/l) ; e KH₂PO₄ (0,544g/l) por 18 horas/150 rpm/ 30° C.

Duas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram usadas como controle. Uma cepa selvagem, usada como controle negativo de captação de Pi, e uma com o gene *phoU* deletado (gentilmente cedida pelo Prof. Beny Spira, ICB/USP), que serviu de parâmetro positivo para identificar micro-organismos eficientes na captação de Pi.

4.2.2 Microdeterminação de fosfato

Este método consiste em medir a concentração de fosfato inorgânico remanescente no sobrenadante do meio de cultura em que as bactérias foram cultivadas (CHEN et al., 1956). A reação entre ortofosfatos remanescentes com molibdato de amônio e posterior redução com ácido ascórbico resulta na formação de um complexo de cor azul, cuja intensidade da cor está diretamente relacionada à concentração remanescente de fosfato.

A solução reveladora consiste na mistura de 1 volume de 167 mM ácido sulfúrico, 1 volume de 2,5% molibdato de amônia, 1 volume de 10% ácido ascórbico e 2 volumes de água deionizada. Como parâmetro de quantificação foi construída uma curva de calibração utilizando as seguintes concentrações de KH_2PO_4 : 0,16 mM; 0,08 mM; 0,04 mM; 0,02 mM; 0,01 mM.

Essa metodologia foi adaptada em microplacas de 96 poços, a fim de economizar tempo e reagentes, visto a quantidade de amostras a serem processadas. Por isso, as bactérias foram cultivadas em microplacas de 96 poços contendo 100 μl TGP por 16h e centrifugadas a 4.000 rpm/ 20 minutos/ 20 °C. Em seguida, 2 μl do sobrenadante foram transferidos para outra placa previamente preparada com 98 μl de água ultrapura + 100 μl da solução reveladora. A placa foi incubada a 37 °C/1h e a reação foi lida em λ de 820 nm.

4.3 Identificação dos isolados

4.3.1 Identificação molecular

4.3.1.1 Extração de DNA

A extração de DNA total bacteriano foi realizada com o protocolo de MOTA et. al. 2009, adaptado por Silva et. al. 2014, para extração em microplaca de 96 poços. São centrifugados 100 μl de cada cultivo a 4000 g por 5 min, em temperatura ambiente; descarta-se o sobrenadante e adiciona-se 100 μL da solução de lise (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 2 mg/ml lisozima), seguida de incubação a 37° C por 30 min; Para lise da membrana foi adicionado SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) para concentração final de 1%, seguido de incubação a 55° C por 30 min. Para a remoção do SDS e debris celulares foram adicionados 110 μl de 5 M acetato de potássio. A mistura

permaneceu a -20°C durante 30 min, e em seguida a placa foi centrifugada a 4000 g por 10 min; 100 μl do sobrenadante foram transferidos para outra placa contendo 100 μl de isopropanol; e após permanecer a -20°C por 15 min, a placa foi centrifugada a 4000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado uma vez com 100 μL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 400 g por 5 min; o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado permaneceu à temperatura ambiente para a evaporação do etanol residual. O DNA foi hidratado com 30 μL tampão de TE/RNase (10 mM Tris HCl, pH 7,5, 0,1 mM EDTA e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ RNase). Cinco microlitros dos extratos foram aplicados em gel de agarose 0,8 % corado com 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de brometo de etídio.

4.3.1.2 Reação em cadeia da polimerase e sequenciamento direto

A PCR foi realizada com o conjunto de reagentes GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA). Para o volume final de 25 μL : 1X tampão para PCR, 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTPs, 0,2 μM de cada iniciador (Tabela 1), 10 ng dos produtos de extração, 0,2 μL Taq DNA polimerase (5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e água ultrapura q.s.p.

A ciclagem foi realizada no aparelho Veriti (Applied Biosystems by Life Technologies), segundo o programa que consta de uma desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguida de 35 ciclos de: 95°C 30 s, $58-60^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72°C 1 min para 1000 bp. Tanto a temperatura de pareamento quanto o tempo de extensão variaram de acordo com o iniciador utilizado (Tabela 1) e tamanho do amplicon.

Tabela 1: Sequência dos iniciadores usados nesse trabalho

Nome	Sequência e orientação 5' para 3'	Tm °C	Referência
D88	GAG AGT TTG ATY MTG GCT CAG	55	Paster et al, 2001
E94	GAA GGA GGT GWT CCA RCC GCA	55	
785F	GGATTAGATACCCBRGTAGTC	58	Zaura et al, 2009
1061R	TCACGRCACGAGCTGACGAC	58	

Os amplicons do rDNA 16S foram sequenciados pelo método de Sanger e Coulson (1977), utilizando o conjunto de reagentes BigDye v 3.1 (Applied Biosystems - Thermo) e os mesmos iniciadores usados para a PCR, nas condições recomendadas pelo fabricante. As sequências foram determinadas no Analisador Genético ABI 3500 (Applied Biosystems - Thermo).

4.3.2 Identificação fenotípica

A identificação molecular foi complementada pelos métodos fenotípicos tradicionais, através das características morfo-tintoriais como coloração de Gram; provas bioquímicas e fisiológicas, tais como fermentação de lactose, teste da citocromo oxidase; Indol; urease; motilidade; e H₂S, conforme preconizados por Holt et al. (1994).

O micro-organismo foi pré-inoculado em meio de cultura LB, e após 18h inoculado nos respectivos meios de cultura: Ágar Mc-Conkey, Ágar Citrato de Simons, Meio de Cultura SIM, Ágar Ureia, Ágar Motilidade, Ágar VM/VP e Ágar TSI.

4.4 Determinação da atividade da fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina é uma glicoproteína, situada no periplasma bacteriano, que cliva a ligação fosfato de ésteres monofosfatos, liberando assim a molécula de fosfato.

4.4.1 Determinação qualitativa da fosfatase Alcalina.

A bactéria foi semeada em meio sólido mínimo HGP (10 μ M de KH_2PO_4 e 0,4% de glicose). Incubadas durante 3-5 dias a 30 °C. Um volume de *alpha-naphthyl phosphate* foi adicionado ao mesmo volume de *Fast Blue*. A mistura foi gotejada sobre a colônia a ser analisada. A coloração escurecida adquirida pela colônia define a presença de fosfatase alcalina.

4.4.1.1 Ensaio de Fosfatase Alcalina e Construção da Curva de Crescimento microbiano

Pré-Inóculo

A partir de uma única colônia, uma quantidade foi inoculada em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio mínimo A com carência de fosfato (A-Pi) e suplementado com 1 mM de fosfato (A+Pi). As culturas foram incubadas sob agitação a 150 rpm, 37° C, durante 18 horas.

Ensaio

A concentração de bactérias do pré-inóculo foi medida em $\lambda = 600$ nm, e diluída para uma $\text{DO}=0,1$ em 30 mL de meio de cultura correspondente, A-Pi e A+P (triplicada). Incubada nas mesmas condições do pré-inóculo. A cada 1

hora foi retirada uma alíquota de 1 mL para monitorar a turbidez do meio foi monitorada em λ 600 nm e também para o ensaio da fosfatase alcalina.

Determinação da Fosfatase Alcalina

Atividade da fosfatase alcalina foi ensaiada segundo adaptação da metodologia de Michaelis e colaboradores (1983, com uso do p-nitrofenilfosfato (pNPP) como substrato). Este método baseia-se na reação de hidrólise em meio aquoso, catalisada pela enzima. O produto formado é a liberação do p-nitrofenol, que é confirmado pela coloração amarela da solução (Fig. 2). A reação consistiu de uma mistura de 900 μ L do substrato pNPP dissolvido no tampão Tris-HCl 1M, pH 8,0 (1 mg/ml), que foi pré-incubado a 37 °C durante 5 min. Após foi acrescido 100 μ L da cultura bacteriana. A mistura foi incubada a 37 °C durante 30 min, a reação foi interrompida com a adição de 250 μ L do tampão 1 M de Na_2HPO_4 (inibidor da enzima). As absorvâncias foram medidas no comprimento de onda a 410 nm, contra um branco contendo 100 μ L de água em substituição a cultura bacteriana. A leitura da absorvância de cada reação foi utilizada para encontrar a atividade específica, através da fórmula: $E.U = A_{410 \text{ nm}} \times FDT \times \lambda \text{ 600 nm}$

Onde:

$A_{410 \text{ nm}}$ = Absorvância da reação da cultura com o substrato a 410 nm.

FD = Fator de diluição da cultura na reação

T = tempo em minutos

$\lambda \text{ 600nm}$ = Turbidez da cultura lida a 600 nm.

4.4.2 Extração da fosfatase alcalina

Partindo de culturas frescas em LB, as bactérias foram inoculadas em 30 mL de meio A- (carência de fosfato) e incubada a 30 °C sob agitação constante a 150 rpm por 16 horas. Três mililitros da cultura foram transferidos para um tubo falcon de 15 mL e centrifugadas a 5000 g por 10 min a 4 °C;. O precipitado obtido foi utilizado para realização da extração das proteínas.

Foram testadas algumas metodologias, com adaptações, de extração da enzima do periplasma da bactéria, descritas a seguir.

Protocolo 01: O precipitado foi ressuspendido em 900 µL de tampão de lise (50 mM de Tris-HCl pH 8,0; 2 mM de EDTA; 0,15 mM de NaCl, 100 µg/mL de lisozima e 1% Triton X-100), após agitação mecânica (vortex), a reação permaneceu no gelo por 1 hora. Após esse tempo houve incubação por mais uma hora a 30 °C. Foram adicionados ao tubo MgCl₂ para a concentração final de 8 mM e CaCl₂ para a concentração final de 10 mM e DNase para a concentração final de 20 µg/g de célula. As amostras foram incubadas por 1 hora a 30 °C, centrifugadas a 10000 g durante 10 min a 4 °C.

Protocolo 02: A mesma metodologia descrita para o protocolo 1, acrescentou-se no início da reação 1 mM do inibidor de protease PMSF (Fluoreto de Fenilmetilsulfonilo).

Protocolo 03: A mesma metodologia descrita no protocolo 1, apenas diminuindo o volume do tampão de lise para 300 µL.

Protocolo 04: O precipitado foi ressuspendido em 1 mL de tampão de lise (50 mM de Tris-HCl pH 8,0; 1 mM de EDTA; 25% de sacarose; 5% de glicerol; 0,03% Tween-20; 0,03% Triton X-100; 100 µg/mL de lisozima), seguida

de incubação em gelo durante 30 min e mais 30 min em temperatura ambiente. Em seguida os tubos foram centrifugados a 10000 g por 10 min a 4 °C.

Protocolo 05: A mesma metodologia descrita no protocolo 4, porém acrescido de 1 mM de PMSF.

Protocolo 06: apenas diminuindo o volume do tampão de lise para 500 µL.

4.4.2.1 Eletroforese em Gel de poliacrilamida não desnaturante – Gel Nativo para a fosfatase alcalina

A eletroforese em gel de Poliacrilamida, em condições não desnaturantes, foi utilizada como uma etapa para o processo de identificação da fosfatase alcalina, usando um substrato específico para a enzima.

Preparo do gel – Gel Nativo

A eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970), com algumas modificações. O gel separador foi preparado a partir da mistura de uma solução estoque de acrilamida/N,N-Metileno bis-acrilamida 30:1 (p/v) (5 mL), tampão Tris-HCl 3 M , pH 8,8 (1,9 mL), persulfato de amônio (20% p/v) (0,075 mL), N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamino (TEMED) (0,006 mL) e água destilada (7,8 mL).

O gel de empilhamento foi preparado a partir de uma mistura de uma solução estoque de acrilamida/N,N-Metileno bisacrilamida 30:1 (p/v) (0,67 mL), tampão Tris-HCl 3 M , pH 8,8 (0,5 mL), persulfato de amônio (20% p/v) (0,020 mL), N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamino (TEMED) (0,004 mL) e água destilada (2,7 mL).

A montagem do sistema foi feita utilizando placas de vidro com dimensões de 20x12 cm (placa maior) e 20x10 cm (placa menor). O gel foi formado por uma camada de 6 cm para o gel separador e 1,5 cm para o gel empilhamento, sendo o restante do espaço do sistema designado para a amostra.

Preparo da amostra

Uma alíquota de 15 μ L de amostra extraída do periplasma foi reunida a 5 μ L de tampão de amostra 4X Loading buffer (200 mM de Tris-HCl pH 8,8, 0,4% bromophenol blue e 40% de glicerol), homogeneizada e aplicada no poço do gel.

Condições de corrida

A corrida foi iniciada com 25 mA, 120 V, até as amostras saírem do gel de empilhamento. Depois foi alterada para 30 mA e 200 V, até o término da corrida.

4.5 Extração de polifosfato

Para a extração de polifosfato, as culturas cresceram em caldo LB (2 mL) pela noite, a 30 °C, sob agitação constante a 150 rpm. Um mililitro da cultura foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e as células foram recuperadas após centrifugação por 5 min a 10000 g. Foram realizadas 3 lavagens com solução salina (0,9% NaCl) e centrifugadas nas mesmas condições. O precipitado foi solubilizado em 100 μ L de tampão LETS (100 mM LiCl, 10 Mm EDTA, 10 Mm Tris-HCl pH 7,4, 0,2% SDS) acrescido de 100 μ L de fenol ácido (pH 4,3). A mistura foi agitada em agitador mecânico durante 5 min

a 4 °C. Em seguida os tubo foram centrifugados a 16.500 g por 5 min a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e adicionados 200 µL de clorofórmio. A suspensão foi agitada novamente durante 5 min a 4 °C e centrifugadas durante 5 min, a 5000 g em temperatura ambiente. Novamente a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo com 250 µL de etanol absoluto gelado, incubado durante 2 horas a -80 °C, seguido de centrifugação a 16.500 g por 10 min a 4 °C com descarte de sobrenadante. O precipitado foi lavado com etanol 70% e incubado a -20 °C durante 20 min, seguido de centrifugação a 14000 rpm, durante 10 min a 4 °C. em seguida o sobrenadante foi descartado e o precipitado permaneceu a 37 °C para evaporação do etanol residual. O polifosfato foi reidratado em 50 µL de tampão RB (0,1% de SDS, 0,5 Mm EDTA e 10 mM Tris-HCl pH 7,0). A quantidade de polifisfato foi estimada usando a programação para leituras de RNA no aparelho Nanodrop 2.0, 30% de RNA foi retirado , para correr em um gel de poliacrilamida-TEB.

4.5.1 Preparo do gel de Polifosfato 20%.

Para preparação do gel, foram utilizados 12,8 mL de água, 16 mL; de Acrilamida/Bis acrilamida e 3,2 mL de Tampão 10x TEB. Do total de 32 mL, foram retirados 2 mL e acrescentado a este volume 4 µL de Temed e 50 µL de 20% persulfato de amônio, para o gel de selamento das placas. Ao restante foram acrescentados 12 µL de Temed e 150 µL de persulfato de amônio para o gel de corrida.

4.6 Melhoramento das condições de cultivo

A fim de otimizar as condições de cultivo e captação de fosfato, *S. marcescens* 9rp1 foi inoculada nas mesmas condições anteriormente descritas,

em meio de cultura TGP, porém substituindo glicose por outras fontes de carbono como glicerol, frutose, maltose e lactose, na mesma concentração e em concentrações diferentes. Da mesma forma, que avaliamos o critério fonte de carbono, também verificamos o critério temperatura, variando entre 30 e 37 °C, avaliando crescimento e captação de fosfato.

4.7 Vantagem adaptativa no acúmulo de polifosfato

Diversos artigos reportam que os grânulos de polifosfato são fonte de energia e fosfato utilizados por micro-organismos em situação de escassez desse nutriente. Por outro lado, observa-se que a captação é diferenciada, nem todos os micro-organismos apresentam a mesma capacidade. Assim sendo a pergunta natural que surgiu durante o desenvolvimento desse trabalho é se um sistema eficiente de captação de fosfato poderia conferir vantagem adaptativa, visto que a própria literatura relata o polifosfato como uma das primeiras moléculas a serem formadas nos primórdios do surgimento da vida.

Para o teste da vantagem adaptativa com *S. marcescens* propusemos alguns testes simples baseado nas diferenças em acúmulo de fosfato com as fontes de carbono: glicose e glicerol. A pergunta foi: condições de cultivo que estimulem o acúmulo de fosfato pela bactéria conferem refletem um melhor crescimento ou uma viabilidade maior em função do tempo, quando em situação de escassez nutricional?

Para responder esta pergunta, as células foram pré-inoculadas em TGP suplementado com 0,5% glicerol e 4 mM fosfato e TGP suplementado com 0,5% glicose e 4 mM fosfato, e cultivadas por 16 h a 30 °C sob agitação a 150

rpm. Os inóculos foram feitos em TGP glicerol 0 mM de fosfato, pois dessa forma a única forma de sobrevivência que diferencia as culturas é o estoque de fosfato interno.

Um segundo experimento foi desenhado a fim de confrontar os resultados, dessa vez realizando os pré-inóculos nas concentrações de 0,0, 1,0, e 2,0 mM de fosfato e o reinóculo em 0,0 e 1,0 mM de fosfato, porém, neste experimento, além de realizar a leitura em $\lambda = 600$ nm, foi realizado o teste de viabilidade celular em placa. A cada ponto de coleta foram retirados 10 μ L da cultura, e estes foram diluídos 10 mil vezes (diluição definida para a visualização de colônias) e colocada em TGP + ágar sem fosfato.

4.8 Caracterização genética do operon PST em *Serratia marcescens*.

Para determinar a estrutura genética do operon PST, inicialmente fizemos um estudo filogenético para verificar o grau de identidade dos genes de *S. marcescens* com os de outras espécies e para desenho dos primers nas regiões com maior grau de identidade. Foram desenhados nove primers de primers, e testados (Tabela 04 ANEXO IV), entretanto apenas dois desses pares funcionaram de forma eficiente. Considerando o tempo e custo do sequenciamento dos demais genes do sistema PST, optou-se pelo sequenciamento do genoma usando tecnologia de sequenciamento massivo.

O DNA extraído, conforme descrito no item 4.3.1.1, foi enviado para a empresa Genone (<http://www.genone.com.br>) para preparo da biblioteca genômica e sequenciamento na plataforma Illumina HiSeq. O controle da qualidade e pré-processamento foi realizado pela própria empresa, apenas os

reads com qualidade acima de 30 (Phred 30) foram enviados para análises subsequentes.

O genoma foi montado com base no genoma de referência (CP011642.1| *Serratia marcescens* CAV1492) utilizando o programa Bowtie (Referência 60), as ORFs foram determinadas pelo programa GenMark (74) e a notação foi realizada pelo BLASTP.

Para a análise filogenética dos genes do operon PST, foi realizado um alinhamento múltiplo com o programa ClustalX, a história evolutiva foi inferida pelo método probabilístico da máxima verossimilhança, utilizando o programa Mega 7.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta e triagem quanto a capacidade de captação de fosfato

O esforço amostral permitiu coletar, isolar e preservar 756 bactérias dos quatro locais de coleta. Dessas, 412 isolados são do Rio Araçá e sua foz; 138 isolados do CEPEAM; e 205 isolados do Rio Solimões. Foram testado um total de 400 bactérias quanto à capacidade de captação de fosfato e dessas, 71 captam mais de 50% dos fosfato disponível no meio (Fig. 12).

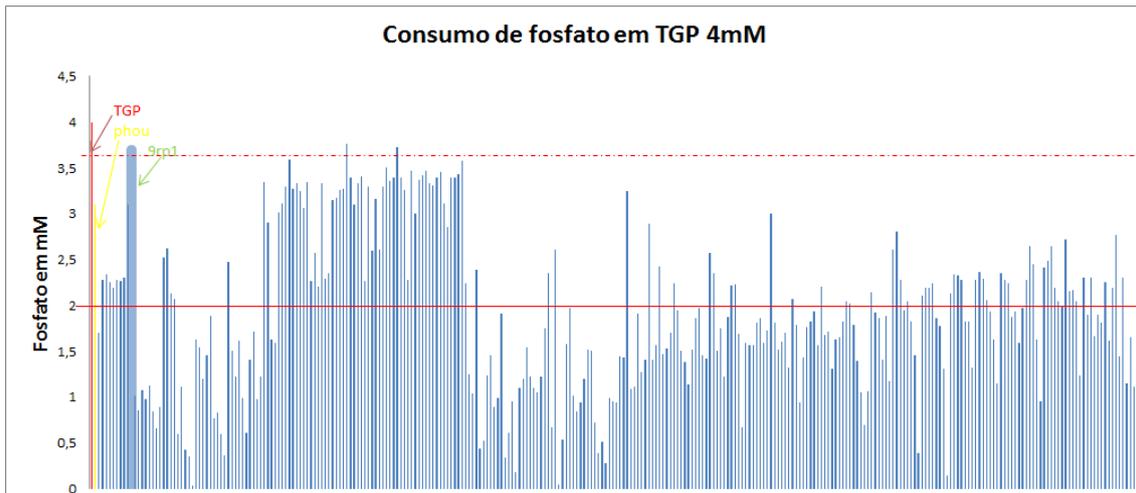


Figura 12: Captação de fosfato em TGP 4mM. No eixo Y constam os valores em escala de milimolar referente à capacidade de captação de fosfato, e em X, os isolados. A barra vertical vermelha indica o meio de cultura TGP 4mM, em amarelo o controle positivo e em verde a bactéria 9rp1. A barra horizontal vermelha contínua indica as bactérias que conseguiram acumular mais de 50% do valor original contido no meio e a barra horizontal pontilhada indica as bactérias que conseguiram acumular mais de 90% do valor original contido no meio .

Dentre as 71 que captaram mais de 50%, três captaram mais de 90% e o isolado 9rp1 foi escolhido para as etapas subsequentes do projeto, por questões de tempo e custo. Esse isolado consegue captar aproximadamente 3,8 mM de fosfato do meio de cultura, muito semelhante ao controle positivo PHOU. Os outros dois isolados com a capacidade equivalente ao 9rp1 foram estocados em glicerol e serão estudados em projetos futuros.

5.2 Consumo de fosfato

Quanto ao consumo de fosfato em meio de cultura TGP, nota-se que a bactéria consome quase que totalmente o fosfato disponível, durante o início da fase exponencial de seu crescimento, ou seja, nas primeiras três horas de

cultivo (Fig 13). Quando comparamos com o crescimento nas mesmas condições, observamos que o início da captação corresponde ao início da fase de crescimento exponencial, por volta da 2ª hora de cultivo (Fig. 14).

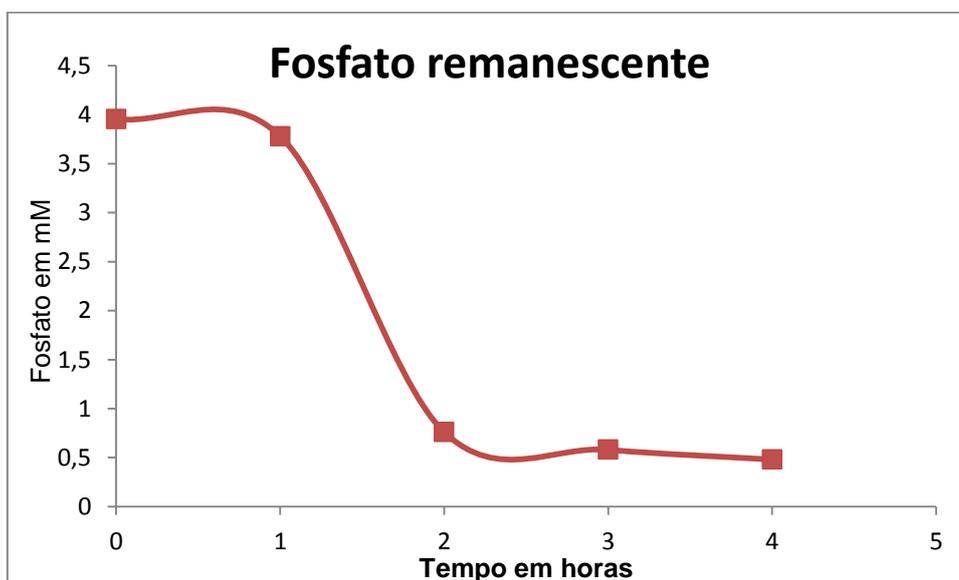


Figura 13: Fosfato remanescente em meio de cultura TGP, após 4h de cultivo.

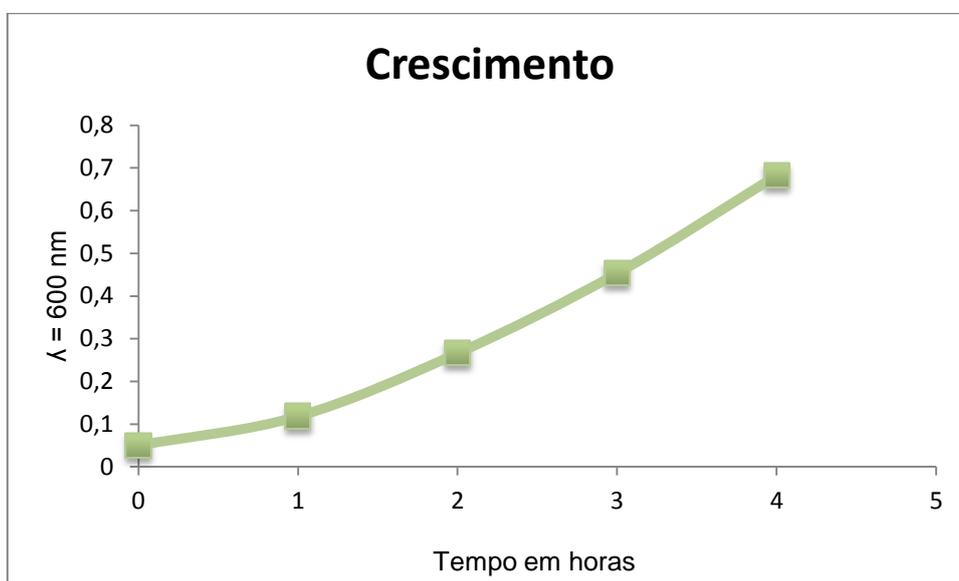


Figura 14: Crescimento bacteriano em meio de cultura TGP, após em 4h de cultivo.

5.3 Identificação da cepa isolada

O isolado 9rp1 apresentava desde o início uma coloração sugestiva para *S. marcescens*, entretanto, como ainda não havia relatos na literatura dessa

espécie como captadora eficiente de fosfato, existia o risco de ser algum caso de mimetismo bacteriano. O sequenciamento de aproximadamente 1300 bp do gene 16S, com todas as regiões variáveis, não foi suficiente para identificar o isolado em nível de espécie, o gênero foi confirmado, mas não houve resolução entre *S. marcescens* e *S. liquefaciens*.

A identificação em nível de espécie foi obtida com associação de testes complementares: morfológicos e bioquímicos (Tab. 2). De acordo com o manual de BERGEY (1994), o isolado 9rp1 apresentou resultado característico da espécie *S. marcescens*. As provas sugeridas no manual de BERGEY foram contrastadas com as listas de identificação encontrada em KONEMAN, 2001 (5ª edição), a qual sugeriu também os testes de Citocromo oxidase, urease, Vermelho de Metila (VM) e Vorges Proskauer (VP), e os resultados destes também confirmaram a espécie *S. marcescens* (Tabela 02).

Tabela 2: Provas bioquímicas e fisiológicas realizadas para a identificação da bactéria

Provas	Resultados
Pigmentação	Vermelha
Gram	-
Oxidase	-
Fermentação de lactose	-
Triptofanase (indol)	+
Motilidade	+
Produção de H ₂ s	-
Citocromo oxidase	+
Uréase	-
Vp	-
Vm	+

5.4 Atividade da fosfatase alcalina

5.4.1 Ensaio de Fosfatase Alcalina e Construção da Curva de crescimento microbiano

A fosfatase alcalina é uma das principais enzimas induzidas durante a fase de carência de P_i , que contribui para o fornecimento de fosfato, além de fazer parte do regulon PHO (WANNER, 1996). O ensaio em condições de suficiência e carência de fosfato corroboram os dados da literatura. Em carência de fosfato é possível observar o início de uma fase exponencial de atividade da fosfatase alcalina a partir de 2 horas de cultivo (Fig 15). Esse padrão coincide com a fase de crescimento exponencial em uma curva clássica de crescimento microbiano Fig. 16).

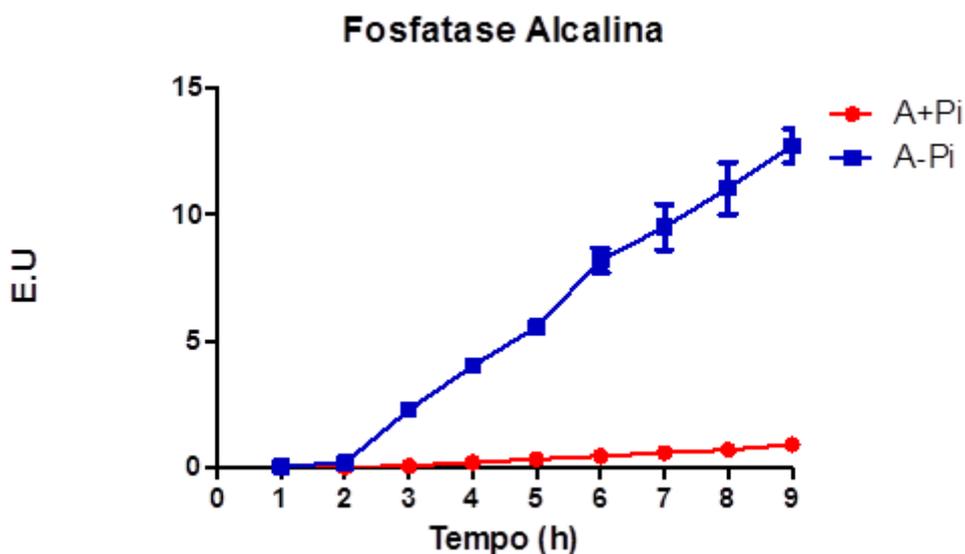


Figura 15: Atividade da fosfatase alcalina de *Serratia marcescens* em Meio A enriquecido com fosfato (A + P_i) e na carência de fosfato (Meio A – P_i).

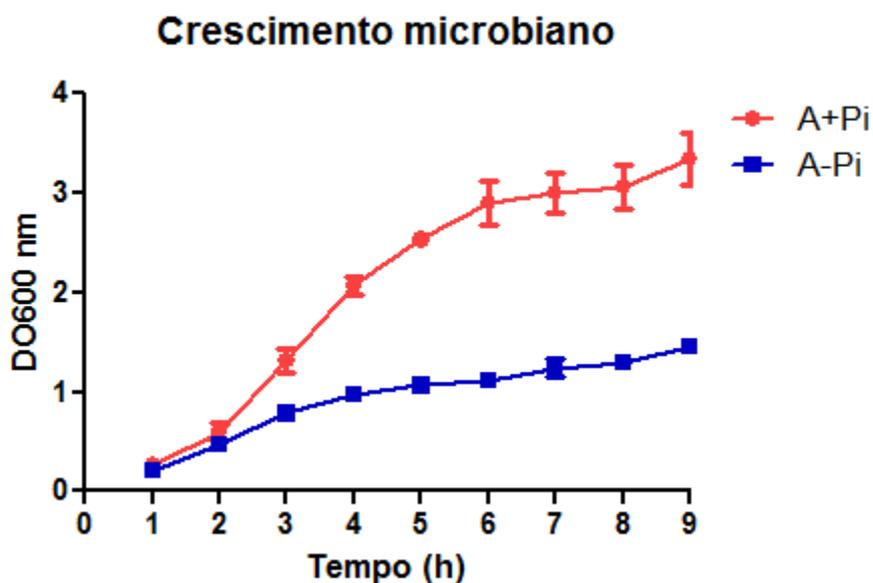


Figura 16: Crescimento microbiano em Meio A enriquecido com fosfato (A + Pi) e na carência de fosfato (Meio A - Pi)

Em meio de cultivo definido suplementado com fosfato, há um crescimento mais acentuado da bactéria, evidentemente devido a alta disponibilidade do elemento, atingindo aproximadamente o triplo da massa celular obtida no mesmo meio definido sem a suplementação. Porém, para o ensaio da atividade da fosfatase alcalina (Fig. 15), nota-se que a partir de 2 horas de cultivo há uma elevada atividade da enzima em meio definido com carência de fosfato, pois em carência de fosfato ocorre a ativação do regulon PHO, e com isso alta expressão da enzima, enquanto que em meio definido suplementado com fosfato, mesmo com 09 horas de cultivo, a atividade da enzima continua a nível basal, praticamente nula. Observa-se também que com o decorrer do tempo o nível de expressão da enzima é exponencialmente aumentado, conforme vai diminuindo a quantidade de Pi.

Em conjunto, esses dados sugerem que durante as primeiras duas de crescimento, o metabolismo bacteriano está voltado para captação e acúmulo

de fosfato (Fig. 13), esgotadas as reservas externas, a bactéria troca o metabolismo para usar as fontes internas de fosfato, o que demanda atividade ótima da fosfatase alcalina e também é o que permite a entrada da cultura na fase exponencial de crescimento.

5.4.2 Extração de Polifosfato

Apesar de uma alta taxa de consumo de fosfato e alta atividade da enzima fosfatase alcalina, o polifosfato não foi detectado (Fig. 17). A ausência do arrasto característico pode ter como possíveis causas: (1) perda do material ao decorrer do processo; (2) o fosfato captado pode ter sido utilizado para outra finalidade que não a reserva, (3) considerando a alta atividade da fosfatase dessa cepa, o tempo de inóculo deve ser revisto ou ainda uma extração em intervalos regulares de tempo, a partir de 2h de cultivo. Portanto o protocolo será revisto e adaptado para as características cinéticas da cepa 9rp1.

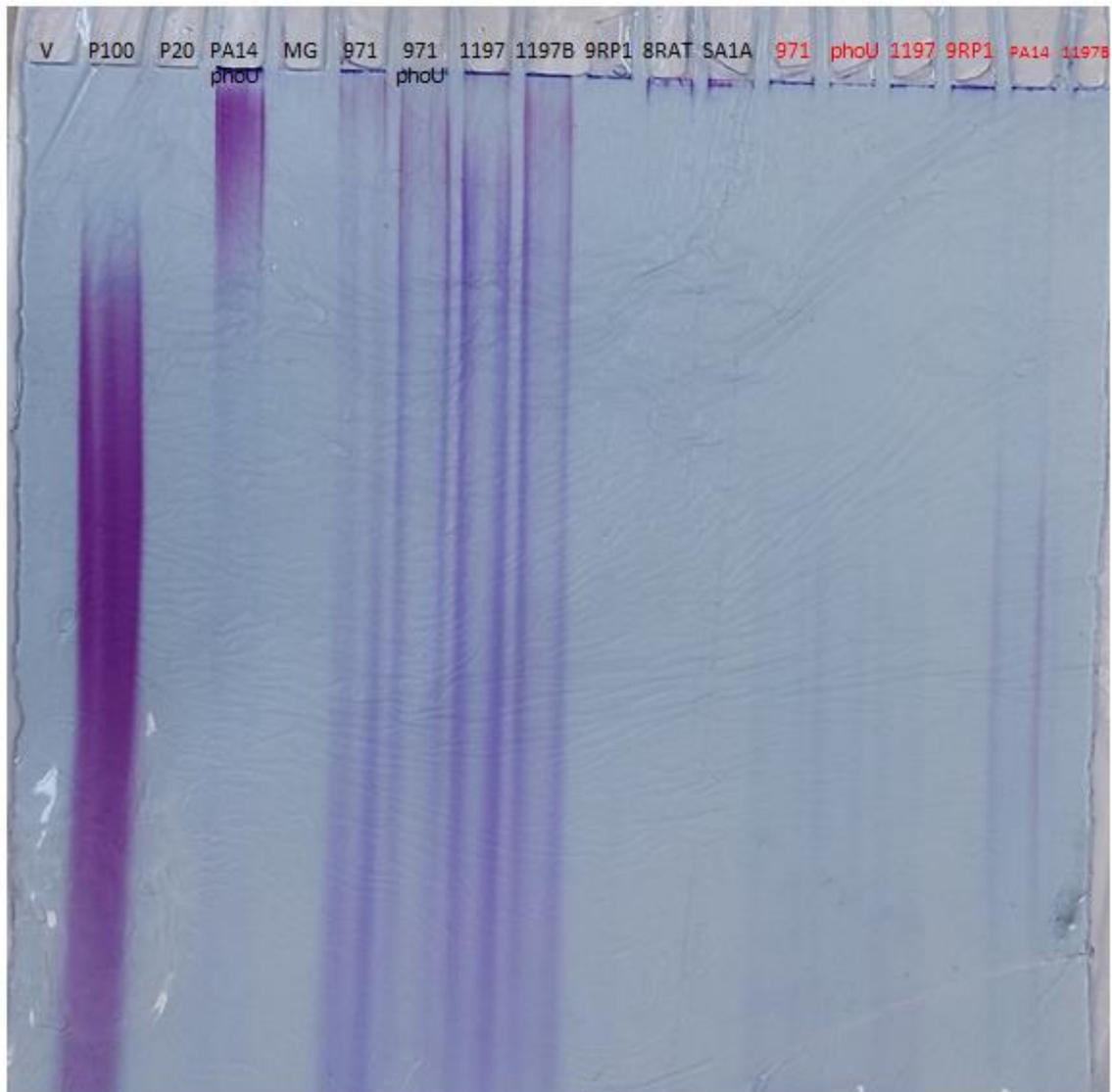


Figura 17: Perfil eletroforético de extração de polifosfato de bactérias. Gel corado com Toluidine blue. V-vazio; P100-padrão de 100 polifosfato; P-20-padrão de 20 polifosfato;

5.5 Otimização das condições de cultivo

Considerando o uso potencial de *S. marcescens* 9rp1 no processo reciclagem de fosfato foi verificada a influência que algumas variações nas condição de cultivo no crescimento e na capacidade de captação de fosfato.

Para a fonte de carbono o desempenho da cultura com glicerol é significativamente melhor (Fig. 18). Verifica-se que a fase LAG em glicerol é

mais pronunciada do que em glicose, compatível com a troca do metabolismo entre o meio de cultivo do pré-inóculo e o TGP. A partir da 5ª hora de cultivo, começa a surgir diferenças no desenvolvimento das culturas: em glicose, a cultura entra a fase estacionária, com leve crescimento, seguido de fase de declínio, já o cultivo em glicerol mantém crescimento contínuo até por aproximadamente 16 horas, quando também entra em fase estacionária, sem fase de e declínio registrada antes de 24 horas de cultivo, rendendo uma massa celular aproximadamente 64,5% a mais que a cultura em glicerol.

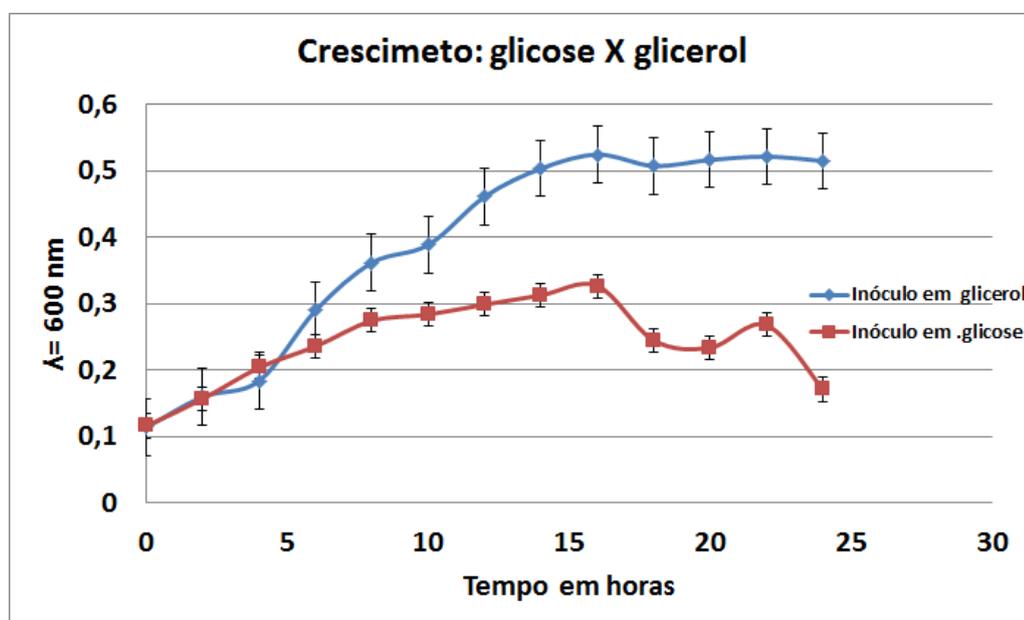


Figura 18: Rendimento da cultura. Cultivo em meio de cultura TGP com glicose e TGP com glicerol

Da mesma forma que no crescimento, foi verificado se e o quanto a fonte de carbono pode influenciar na captação de fosfato (Fig. 19). De fato, existem diferenças no perfil de captação de fosfato em função da fonte de carbono, em glicose a captação foi em média 2,31 mM, em galactose a

captação foi em média 2,22 mM, em frutose a captação foi em média 2,43 mM e em glicerol foi em média 3,2 mM de um total de 4 mM.

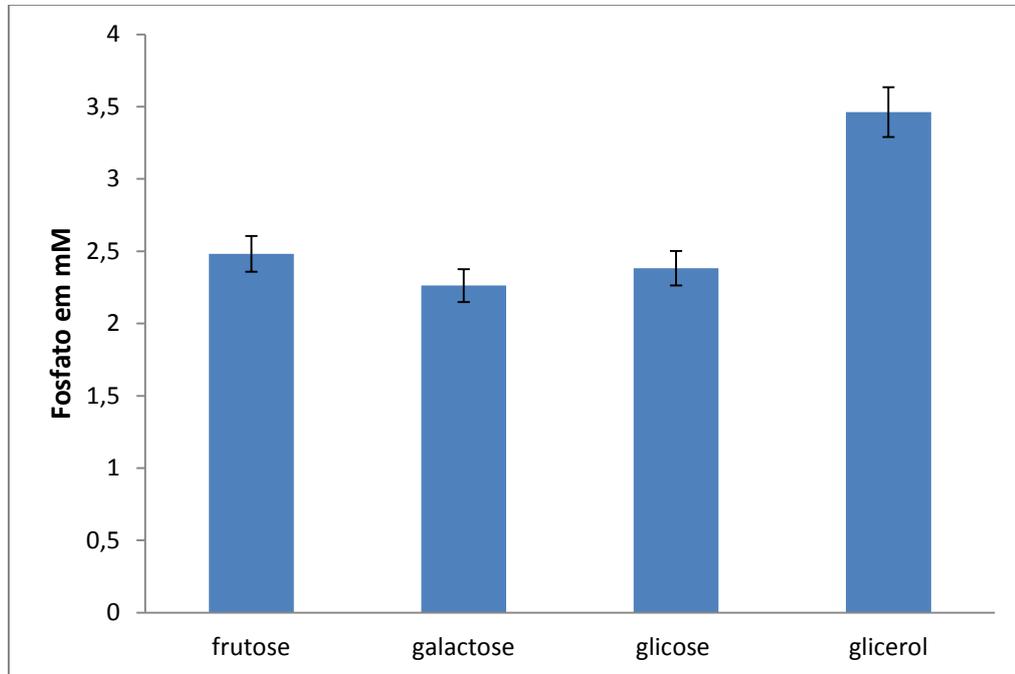


Figura 19: Captação de fosfato. Cultivos em meio de cultura TGP glicose, TGP glicerol, TGP frutose e TGP galactose.

Considerando que o glicerol é a fonte de carbono mais adequada ao cultivo de *S. marcescens*, buscou-se verificar a melhor concentração desse elemento no meio de cultura TGP (Fig. 20).

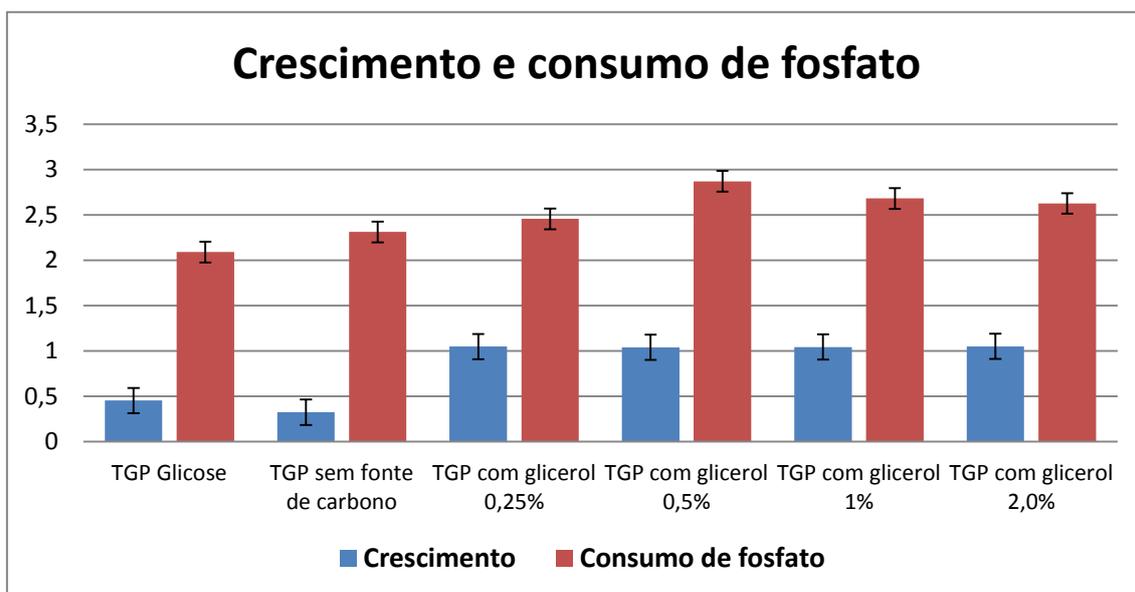


Figura 20: Crescimento bacteriano e consumo de fosfato em TGP 0,5% Glicose, sem glicose e variadas concentrações de glicerol.

Observa-se que não existe diferença para o crescimento entre as concentrações de 0,25 a 2%, com uma discreta diferença para o consumo de fosfato. Esse resultado é coerente com o perfil mostrado na **Figura 14**, onde a fonte de fosfato é praticamente toda consumida nas primeiras horas de cultivo, a partir desse ponto, há uma troca no metabolismo bacteriano para consumo do estoque de polifosfato e, obviamente, há uma flutuação do tempo entre as culturas para que esse ajuste ocorra. A normalização em termos de crescimento muito provavelmente está relacionada ao fosfato como fator limitante e não à disponibilidade de carbono.

Em relação à temperatura, foi levando em consideração que *S. marcescens* é um micro-organismo cosmopolita, e por isso sobrevivendo em uma ampla faixa de temperatura, no entanto também é reportado como patógeno humano oportunista o que pode ser fator impeditivo para utiliza-lo

como em possíveis processos biotecnológicos. Portanto, seu desempenho à temperatura de 37 °C é um dado importante e que precisa ser considerado (Fig. 21).

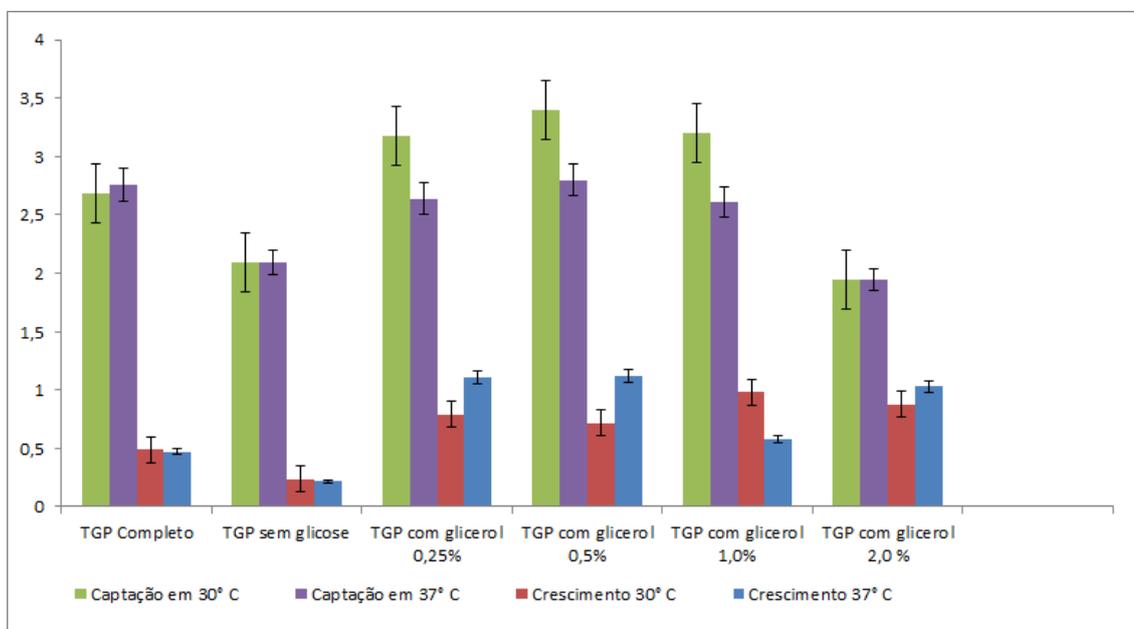


Figura 21: Crescimento bacteriano e consumo de fosfato em fosfato. TGP 0,5% Glicose, sem glicose e variadas concentrações de glicerol, temperaturas de 30 e 37 °C.

Apesar de ser um isolado do meio ambiente, a cepa 9rp1 tolera bem a temperatura de 37.°C, não existindo diferenças significativas, considerando o intervalo de confiança, entre as temperaturas testadas. Uma possível explicação para essa capacidade é que *S. marcescens* é um micro-organismo mesófilo, capaz de crescer em temperaturas que variam de 15 °C a 40 °C e em temperaturas mais altas, o metabolismo é mais alto, refletindo um resultado melhor em termos de massa celular.

O melhor desempenho com glicerol como fonte de carbono pode ser explicado pela via de síntese de prodigiosina, produzida por *S. marcescens*. Esta via está diretamente relacionada ao glicerol como fonte de carbono, pois

esse induz a síntese do pigmento (coloque aqui o nome do pigmento) (KIM e LEE, 2009; Jeanne, 2010). A literatura também mostra que a faixa de temperatura entre 27 e 30° C é ótima para a síntese do pigmento (WEL, 2006). Em conjunto, esses testes apontam a possibilidade do uso de *S. marcescens* nas condições ambientais para recuperação de fosfato, entretanto também aponta um risco potencial tendo em vista a tolerância térmica em torno dos 37 °C.

Em relação ao volume, nas condições de laboratório, foi possível testar a capacidade de captação fosfato de *S. marscecens* até 1L de cultura, nesse volume, não houve perda de eficiência o que motiva seguir para escalas maiores, pré-piloto e piloto.

5.6 Vantagem adaptativa para o acúmulo de polisfosfato.

Micro-organismos que vivem em ambientes com disponibilidade de fosfato, usam preferencialmente o sistema PIT para captação desse nutriente, nessas condições o regulon PHO está desativado e não há acúmulo de fosfato na forma de grânulos de polifosfato. Em contrapartida micro-organismos que vivem em condições de carência ou limitação desse nutriente em torno de 4 mM ou menos, ativam o regulon PHO o que permite captar o fosfato para seu metabolismo basal e ainda estocar o nutriente, provavelmente para suportarem flutuações negativas do nutriente por um determinado período de tempo.

Com base nesse contexto e considerando a competição existente nos microbiomas, uma pergunta que naturalmente deve ser feita é uma alta eficiência na captação e acúmulo confere vantagem adaptativa aos micro-

organismos. Intuitivamente a resposta parece ser sim, mas ainda não foi reportado na literatura qualquer teste dessa natureza. Lacuna essa que o presente trabalho começa a tentar preencher.

O primeiro desenho experimental tentado comparava o perfil da curva de crescimento entre *Pseudomonas aeruginosa* PA14, sabidamente ineficiente no acúmulo de fosfato, e *S. marcescens* 9rp1. Os resultados demonstraram um desempenho melhor de *S. marcescens* 9rp1 na simulação de escassez (dados não mostrados), entretanto esse teste tinha um viés: quando essas duas cepas são cultivadas em concentrações de fosfato acima de 4 mM, *S. marcescens* já apresenta um desempenho melhor, independentemente do metabolismo do fosfato e isso está relacionado à taxa de replicação, metabolismo eficiente de fontes de carbono e outro nutrientes.

A estratégia adotada para superar esse viés foi tentar induzir em uma mesma cepa duas condições, uma em que ela acumula fosfato e outra em que o acúmulo vai estar inibido. Para tanto, foi realizado um pré-inóculo nos meios 4 mM TGP com glicose, 4 mM TGP com glicerol e LB. Com base nos resultados obtidos anteriormente e já discutidos, o resultado esperado para curva de crescimento pós-inóculo seria: melhor desempenho para o pré-inóculo em TGP glicerol, seguido de TGP glicose e por fim, LB. Entretanto o resultado obtido revelou um melhor desempenho para LB e o pior para o TGP glicose (Fig. 22).

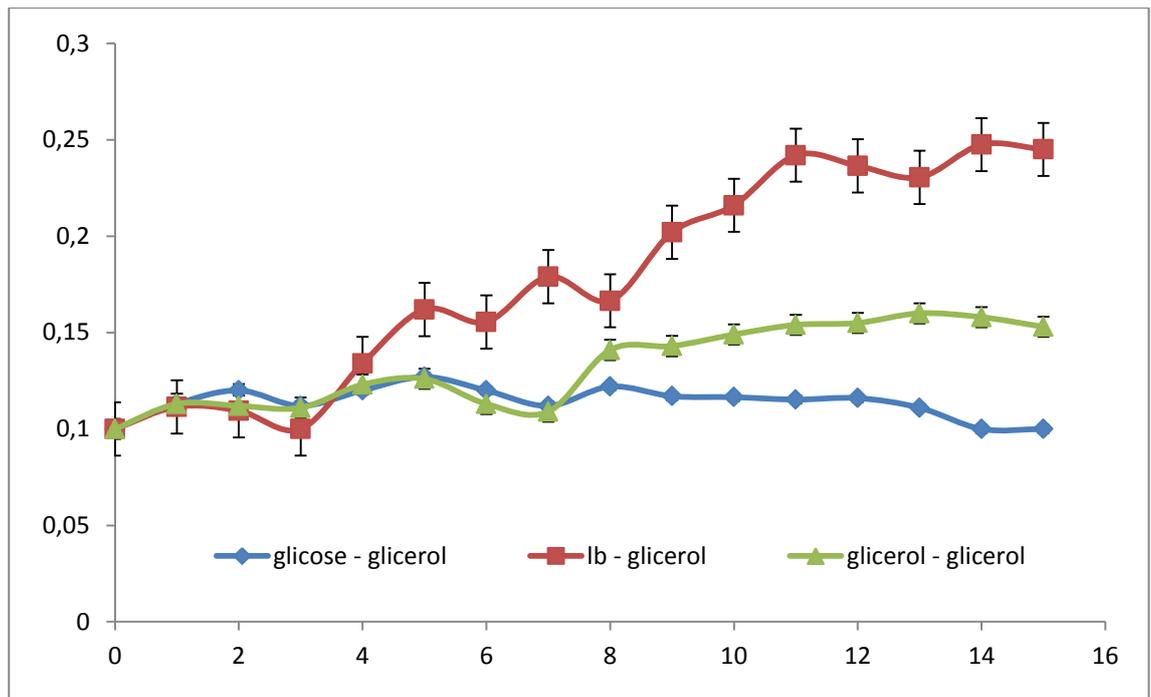


Figura 22: Curva de crescimento 01: em TGP glicerol 4,0 mM de fosfato, com culturas pré-inoculadas em TGP glicose (glucose-glicerol), LB (LB-glicerol) e TGP + glicerol (glicerol-glicerol).

Obviamente o melhor desempenho obtido com pré-inóculo em LB é, a primeira vista, incoerente, sob a ótica de acúmulo de fosfato, tendo em vista ser um meio complexo e em geral mais completo do que os meios definidos usados, não sendo por isso um meio indutor do acúmulo. Nesse caso a suposição foi que a concentração de fosfato no LB era superior à quantidade mínima necessária para ativar a expressão de PST, portanto a bactéria não ativa o sistema de alta eficiência, o que compromete o estoque do nutriente. Entretanto, não existe referência da concentração fosfato no LB e nessas condições foi necessário medir tal concentração.

Os resultados indicam que o LB é um meio pobre em fosfato, média aproximada de 1 mM. Assim sendo, os ensaios foram repetidos, reduzindo-se a

concentração de fosfato nos pre-inóculos: 0,5, 1,0, e 2,0 mM de fosfato e o reinóculo em 0,0 e 1,0 mM de fosfato (Fig. 23 e 24).

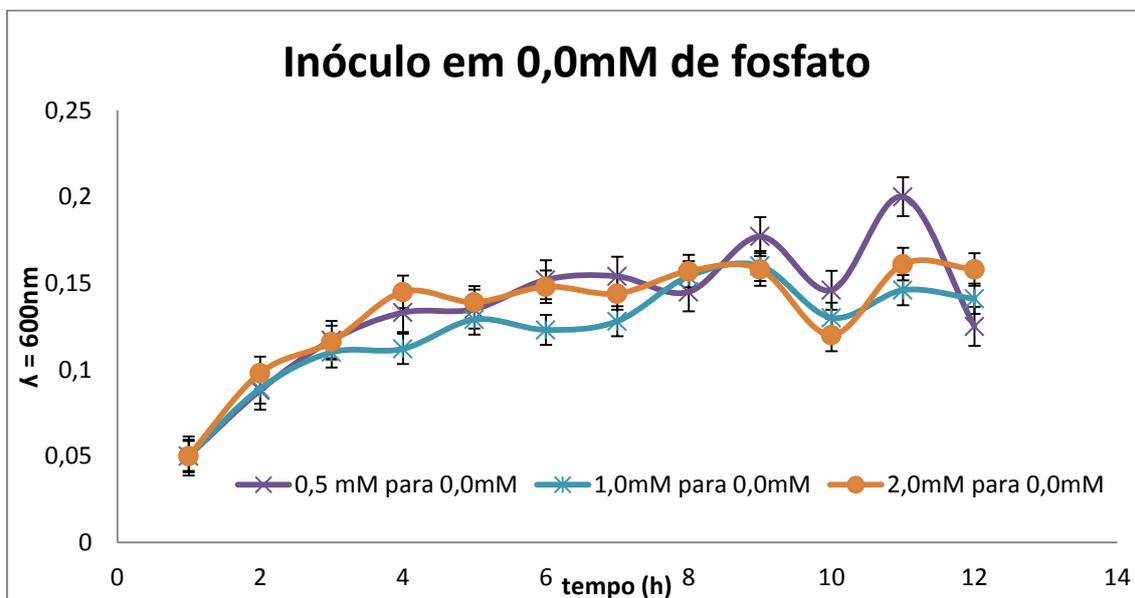


Figura 23: Curva de crescimento 2: crescimento bacteriano em TGP sem fonte de fosfato. Os pré-inóculos foram feito em TGP 0,5% Glicerol e nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM de fosfato, respectivamente, com inóculo em 0,0 mM de fosfato para todas as concentrações.

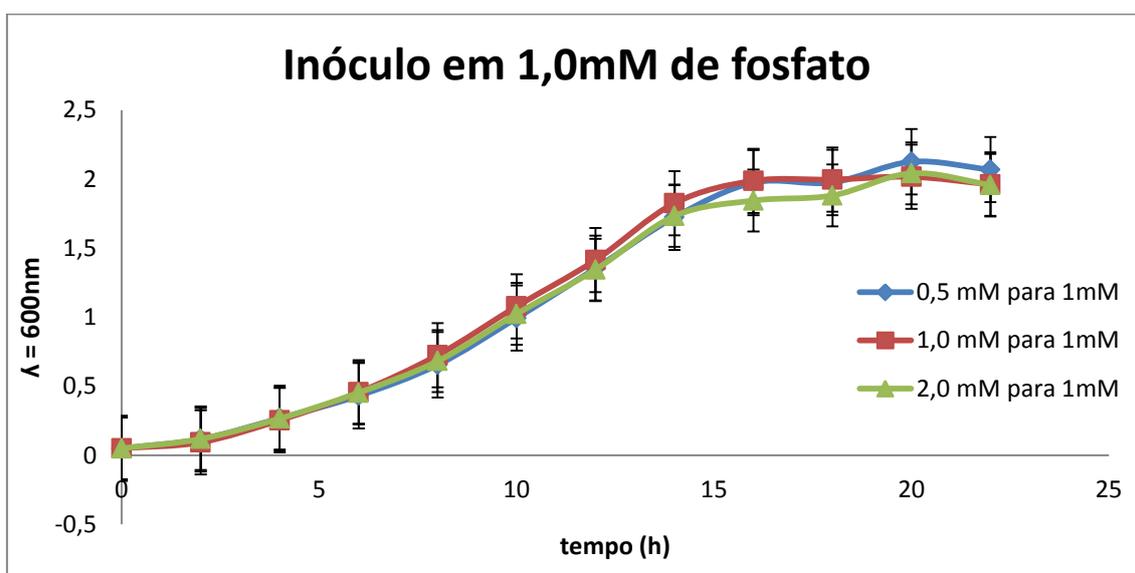


Figura 24: Curva de crescimento 3: crescimento bacteriano em TGP 1 mM de fosfato. Os pré-inóculos foram feito em TGP 0,5% Glicerol e nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM de fosfato, respectivamente, com inóculo em 1,0 mM de fosfato para todas as concentrações.

Como pode ser observado, quando o inóculo é feito em meio sem fosfato, a cultura tem uma fase exponencial curta, provavelmente usando as reservas internas, seguida de uma fase estacionária prolongada, tendendo ao declínio após 12h de cultivo. Já quando o inóculo se dá em meio contendo 1,0 mM de fosfato o resultado se aproxima bastante daquele visto para LB (Fig. 22), com fase estacionária em torno de 0,20 ~ 0,25 (turbidez verificada em λ 600 nm).

Em conjunto esses resultados geraram mais perguntas, por exemplo, por que não houve diferença entre os pré-inóculos em concentrações diferentes de fosfato? Os cultivos feitos com pré-inóculos em concentrações maiores de fosfato não deveriam fornecer curvas de crescimento mais robustas?

Os dados obtidos não permitem respostas conclusivas, mas sustentam hipóteses que devem ser testadas em etapas futuras do estudo. Em primeiro lugar, considerando que quase toda fonte externa de fosfato é consumida nas duas primeiras horas de cultivo (Fig. 13), o desenho experimental apresenta um viés de tempo para o pré-inóculo. Provavelmente um pré-inóculo com 16 horas de crescimento obriga as bactérias a usar todo o fosfato captado, *i. e.*, estoca por 2 horas e consome o estoque nas 14 horas restantes. Sendo assim, os próximos testes levarão em consideração a cinética de consumo de fosfato no pré-inóculo. Ao reduzir o tempo do pré-inóculo para até duas horas, espera-se na curva de crescimento pós-inóculo uma fase exponencial mais robusta para aquelas condições onde o acúmulo foi mais eficiente.

Entretanto, existem outros pontos a serem determinados, como: qual a massa celular a ser pré-inoculada? A partir de que fase de crescimento, LAG, exponencial ou estacionária deve ser feito o reinóculo? Ou ainda, qual o sistema ideal de cultivo, em batelada ou contínuo? A concentração de fosfato que ativa o regulon PHO foi definida para *E. coli* e *P. aeruginosa*, em torno de 4 mM de fosfato, tais concentrações funcionam também para *S. marcescens*?

Os resultados apresentados no presente trabalho apontam para uma afinidade ainda maior ao fosfato, que pode ser explicada pelo local de onde essa cepa foi isolada, o rio Araçá, um tributário do Rio Negro, sabidamente pobre desse nutriente o que pode ter favorecido a seleção de um sistema mais eficiente de captação de fosfato.

A busca na literatura revelou o mapeamento do regulon PHO em uma cepa de *S. marcescens* (LEE, 2009), entretanto os autores não fazem referência à eficiência da captação de fosfato. Surgiu então, a necessidade de acesso à informação genética da cepa 9rpt1, para identificar a estrutura do operon PST e se existiam diferenças entre os genes que o compõe, resultado de um eventual processo de seleção natural.

A cobertura do sequenciamento não foi suficiente para obter o genoma completo da cepa 9rpt1, entretanto, suficiente para identificar todos os genes do operon PST (Fig. 26).

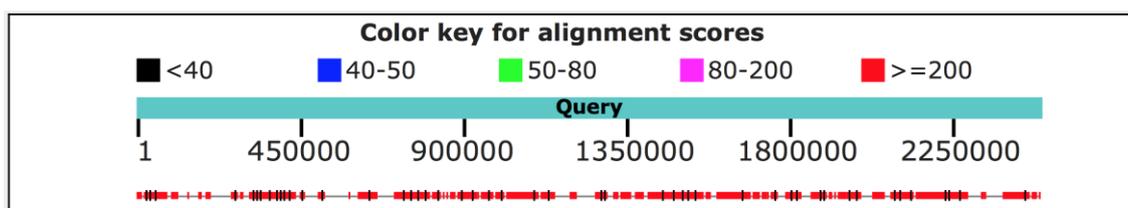


Figura 25: Rascunho do genoma de *S. marcescens* 9rpt1. No diagrama a barra azul representa um genoma de referência com a marcação das posições relativas das bases.

Abaixo, caixas vermelhas indicam regiões com mais de 200 identidades e em preto, regiões com menos de 40 identidades. Traços horizontais indicam os gaps que não foram cobertos pelo esforço do sequenciamento. Gráfico gerado pelo BLASTN.

Além dos genes relacionados ao operon PST, também foram encontrados diversos genes relacionados à virulência; um outro operon (PHN), cuja função está relacionada à captação de fósforo através do transporte de fosfonatos; ao menos três profagos; bem como proteínas do sistema de edição gênica CRISPR/CASn. Também foram encontradas duas fosfatases relacionadas à clivagem dos polifosfatos e uma polifosfato quinase, responsável pela síntese (Tabela 04).

Tabela 3: Anotação gênica para *S. marcescens* 9rpt1

CRISPR/CASn
CRISPR-associated protein, Cas2
CRISPR-associated protein Cas1
CRISPR-associated protein, Cse3 family
CRISPR-associated protein, Cas5e Family
CRISPR-associated protein, Cse4 family
CRISPR-associated protein, Cse2 family
CRISPR-associated protein, Cse1 family
CRISPR-associated helicase Cas3
Fatores de virulência
ABC-type multidrug transport system, ATPase componente
ABC-type multidrug transport system, permease componente
ABC-type multidrug transport system, permease componente
ABC-type multidrug transport system, permease componente
Beta-lactamase (EC 3.5.2.6)
Beta-lactamase class C and other penicillin binding proteins
Beta-lactamase class C and other penicillin binding proteins
Ethidium bromide-methyl viologen resistance protein EmrE
hydrolase, alpha/beta fold Family
Membrane fusion component of tripartite multidrug resistance system
Metallo-beta-lactamase superfamily protein PA0057
Multidrug resistance protein B
Multidrug resistance protein B
Multidrug resistance-like ATP-binding protein mdlB
Multidrug translocase MdfA
Multidrug transporter MdtB
Multidrug transporter MdtC
Multidrug transporter MdtD

Multidrug-efflux transporter, major facilitator superfamily (MFS) (TC 2.A.1)
 Multiple antibiotic resistance protein marC
 Penicillin-binding protein 2 (PBP-2)
 Penicillin-binding protein 2 (PBP-2)
 Penicillin-binding protein AmpH
 Permease of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily
 Putative drug efflux protein
 Putative multidrug resistance protein
 VapB protein (antitoxin to VapC)
 VapC toxin protein
 VapC toxin protein
 VapC toxin protein
 VapC toxin protein
 Virulence factor MviM
 Virulence factor VirK

Fosfato

Phosphate transport system regulatory protein PhoU (A)
 Phosphate transport ATP-binding protein PSTB (TC 3.A.1.7.1) (A)
 Phosphate transport system permease protein PSTA (TC 3.A.1.7.1) (A)
 Phosphate transport system permease protein PSTC (TC 3.A.1.7.1) (A)
 Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein PSTS (TC 3.A.1.7.1) (A)
 Phosphate transport ATP-binding protein PSTB (TC 3.A.1.7.1) (B)
 Phosphate transport system permease protein PSTA (TC 3.A.1.7.1) (B)
 Phosphate transport system permease protein PSTC (TC 3.A.1.7.1) (B)
 Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein PSTS (TC 3.A.1.7.1) (C)
 Phosphate regulon sensor protein PhoR (SphS) (EC 2.7.13.3)
 Phosphate regulon transcriptional regulatory protein PhoB (SphR)
 Putative phosphatase
 Polyphosphate kinase (EC 2.7.4.1)
 Exopolyphosphatase (EC 3.6.1.11)
 Phosphocarrier protein, nitrogen regulation associated
 Phosphate starvation-inducible protein PhoH, predicted ATPase
 Phosphate starvation-inducible protein PhoH, predicted ATPase
 Phosphonates transport ATP-binding protein PhnK
 Phosphonates transport ATP-binding protein PhnL

Fosfonato

2-aminoethylphosphonate ABC transporter permease protein II (TC 3.A.1.9.1)
 2-aminoethylphosphonate ABC transporter permease protein I (TC 3.A.1.9.1)
 2-aminoethylphosphonate ABC transporter ATP-binding protein (TC 3.A.1.9.1)
 2-aminoethylphosphonate ABC transporter periplasmic binding component (TC 3.A.1.9.1)
 2-aminoethylphosphonate uptake and metabolism regulator
 2-aminoethylphosphonate:pyruvate aminotransferase (EC 2.6.1.37)
 Phosphonoacetaldehyde hydrolase (EC 3.11.1.1)
 Phosphonate ABC transporter phosphate-binding periplasmic component (TC 3.A.1.9.1)
 Phosphonate ABC transporter phosphate-binding periplasmic component (TC 3.A.1.9.1)
 Phosphonate ABC transporter permease protein phnE2 (TC 3.A.1.9.1)
 Phosphonate ABC transporter permease protein phnE1 (TC 3.A.1.9.1)

Os fatores de virulência encontrados foram deixados em evidência na tabela porque é uma informação importante, uma vez que o que se pretende

desenvolver é um bioprocesso e portanto, o micro-organismo utilizado deve oferecer pouco ou nenhum risco ao homem ou ao meio ambiente.

Em relação ao operon PST, foi possível mapear um completamente (identificado na tabela pela letra A entre parênteses) pois um único contig contém os 5 genes na ordem vista para outras bactérias: *psts*, *pstc*, *psta*, *pstb* e *phou* (Fig. 10). Outros dois contigs também possuem genes do operon PST (identificados pelas letras B e C entre parênteses). Um contig possui os genes *pstb*, *psta* e *pstc* e um terceiro apenas o gene *psts*. Considerando que existem muitos gaps a serem resolvido, é prematuro afirmar se existem 3 operons, mas seguramente pelo menos 2. É oportuno observar que operons PST sem *psts* e *phou* já foram reportados para outras bactérias e até mesmo para *S. marcescens* (LEE, 2009; KOBAYASHI e HULETT. 1997; NIKATA, 1995) e portanto a existência de três operons em *9rpt1* é uma possibilidade considerável.

A disposição dos genes nos operons PST de *9rpt1* respeita a mesma ordem vista para outras bactérias (Fig. 10), e todas as repetições desse operon se encontram na cadeia reversa do genoma. Considerando a existência de sistemas de edição gênica e genômica (CRISP/CAS(n), fagos e recombinases) a existência de repetições dos operon PST poderia ser resultante tanto de processos de recombinação interna, *i. e.*, do próprio genoma de *S. marcescens 9rpt1* ou de múltiplas inserções a partir do genoma de outras bactérias. Para testar a hipótese de repetições parálogas, verificou-se o grau de identidade entre elas e este é baixo (ANEXO 7). Logo, é possível que estes operons tenham sido inserido por eventos independentes, ou seja, repetições ortólogas,

e a existência de três profagos em seu genoma tem peso nessa hipótese (Tab. 3).

Outro resultado que corrobora a hipótese de inserções múltiplas é a análise filogenética dos genes dessas repetições do PST (Fig. 27 e Anexo 06). Observa-se que não existe um padrão para *Serratia* spp., espécies desse gênero se distribuem ao longo de toda a árvore. Por exemplo, o gene psta1 ocupa o topo da árvore e psta2, a base, observa-se que ocupam ramos opostos reforçando a distância evolutiva já observada na comparação de ambos pelo BLAST2Sequence (ANEXO 06).

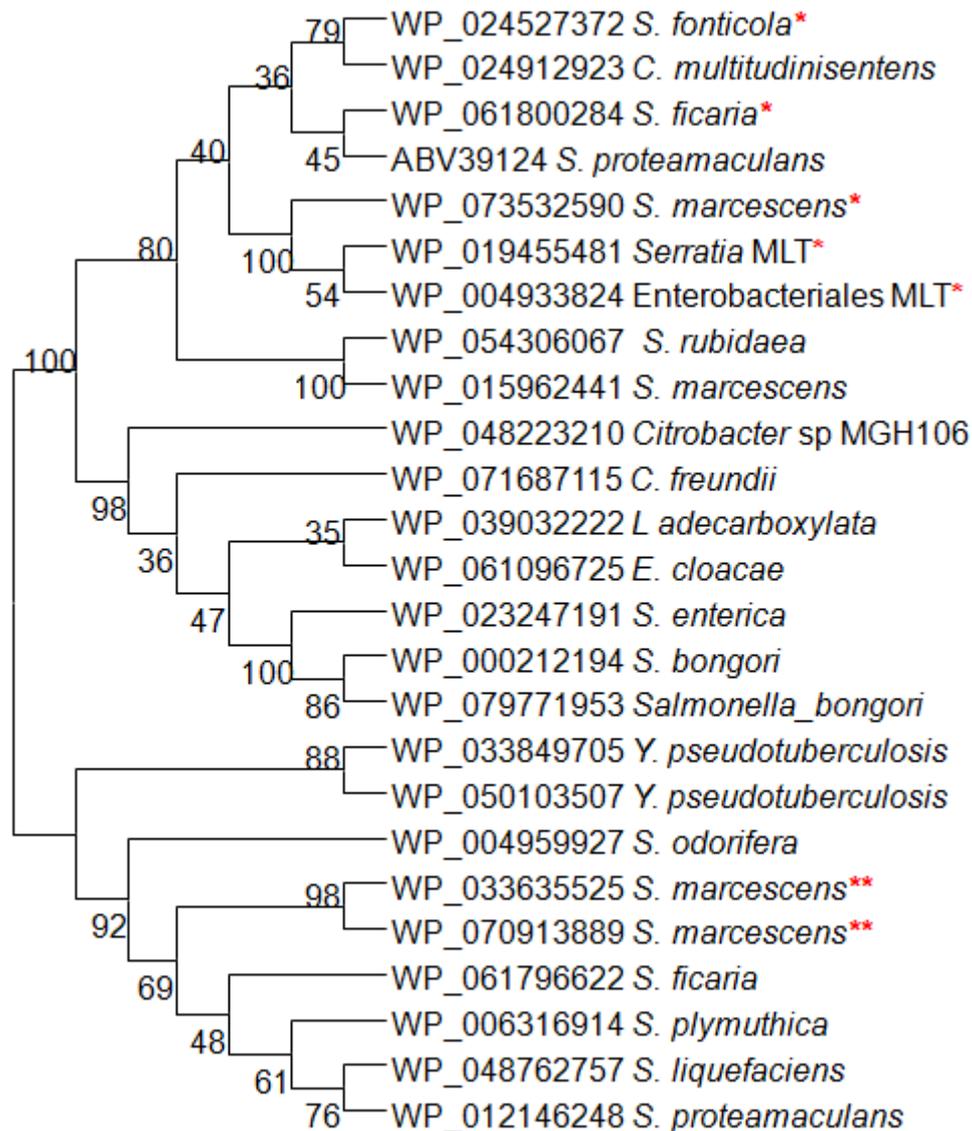


Figura 26: Filogenia molecular do gene PSTA pelo método da máxima-verossimilhança. Os números próximos aos nós representam a taxa de replicação do resultado no teste para um total de 100 repetições. Os asteriscos em vermelho indicam a posição que o gene PSTA1 (*) e PSTA2 (**) de *S. marcescens* 9rpt1 ocupam na árvore. Os braços não estão em escala por taxa de mutação.

Além do polimorfismo de sequência foi encontrada outra diferença significativa para a proteína PstC. A proteína PstC do operon completo possui 318 resíduos de aminoácidos, já a do operon incompleto, possui 723 resíduos de aminoácidos (ANEXO 8). Esse padrão já foi reportado em outras espécies como *Nitricola nitratireducens*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas*

saudiphocaensis, gênero *Pectobacterium*, *Vibrio cholerae* e *Nitricola nitratireducens* (EX_J09692.1, AONB_01000021.1, AL_IV01000005.1, KMK_81270.1, WP_013334175.1, WP_044127545.1) e a hipótese mais provável é que tenha surgido de fusão gênica entre *psta* e *pstc*. Já foi reportado que *psta* e *pstc* são parálogos, assim, uma recombinação homóloga cabeça/cauda pode ser uma explicação para a fusão entre os dois genes. A fusão entre os genes do operon PST não se restringem aos transportadores de membrana, em *Synechocystis* sp. por exemplo, foi reportada uma fusão entre *psta* e *pstb*, permease e ligadora de ATP (TOMII e KANEHISA, 1998).

Serratia marcescens 9rpt1 apresenta em seu genoma duas variações normalmente reportadas separadamente: a fusão de proteínas e a ausência de uma região reguladora. A fusão de proteínas deve conferir alguma vantagem em termos de estruturação do sistema de transporte, mas a ausência da região reguladora é algo que precisa ser investigado.

Os dados apresentados no presente projeto não suportam qualquer conclusão, mas estimulam perguntas: (1) a inexistência de regiões regulatórias em *S. marcescens* 9rpt1 poderia explicar a capacidade de assimilação de fosfato semelhante à cepa modificada geneticamente e usada como controle ou a regulação é em trans e apenas um operon completo é suficiente repressão/ativação do sistema? Estaria *S. marcescens* 9rpt1 expressando de forma constitutiva o operon PST? A redundância do operon PST é expressa simultaneamente ou as cópias vão sendo ativadas à medida que a concentração de fosfato diminui?

Tais perguntas motivam trabalhos futuros, entretanto os resultados obtidos no presente trabalho suportam a estratégia do uso de micro-organismos

eficientes para captação de fosfato, e esta pode ser a chave para a biorremediação de áreas contaminadas com fósforo, podendo ser utilizada de forma singular ou associada a tratamentos já existentes de águas residuárias. Além de tratar áreas contaminadas, o fosfato captado pode ser utilizado como matéria prima para fabricação de fertilizantes, reintroduzindo o fósforo na base do seu ciclo ecológico, algo que beneficiará as presentes e futuras gerações e também o meio ambiente.

6 CONCLUSÃO

O esforço amostral permitiu identificar 71 bactérias que captam mais de 50% do fosfato disponível no meio de cultura e portanto constituem uma coleção com potencial para o processo de recuperação de fosfato.

Três entre as 71 bactérias captam mais de 90% de fosfato disponível no meio.

Uma entre as 3 que captam mais de 90% do fosfato, isolado 9rpt1, foi identificado como *Serratia marcescens*, usando as metodologias bioquímicas, morfológicas e moleculares.

A fonte de carbono ideal para a cepa *S. marcescens* 9rpt1 é glicerol e tolera bem cultivo entre 30 °C e 37 °C.

Os teste em escala laboratorial suportam a estratégia de uso de micro-organismos para a captação de fosfato de águas residuárias.

A rascunho do genoma de *S. marcescens* permitiu identificar um operon PST completo (psta, pstb, pstc, psts e phou), e outro incompleto contendo, separadamente, os genes psts em um contig e os genes psta, B e C em outro contig.

Os dados apresentados suportam a hipótese de origem polifilética para as repetições do operon PST.

7 REFERÊNCIAS

ABELSON P.H. A Potential Phosphate Crisis. **Science direct**. Vol. 283, Issue 5410, p. 2015 ,1999

ASHEY, K.; CORDEL, D.; MAVINIC, D. A brief history of phosphorus: From the philosopher's stone to nutrient recovery and reuse. **Chemosphere. Elsevier**. V 84. P: 737–746

BAEK, J.; LEE, S. Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 264, n. 1, p. 104–109, 2006.

BARROS, F. M. Dinâmica do nitrogênio e do fósforo e estado trófico nas águas do rio Turvo Sujo.. 151 f. **Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola)** Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2008.

BEARD, S.J; HASHIM, R.; BINET, G. W.; HUGHES, M. R.; POOLE R. K. Evidence for the transport of zinc ions via the pit inorganic phosphate transport systems in *Echerichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v, 184, n2, p 231-235, 2000.

BERGWITZ, C., JÜPPNER, H.. Phosphate sensing. Adv. Chronic Kidney Endocrine Unit, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston. p 132–144.2011.

CETESB (Companhia de Tecnologia Ambiental do Estado de São Paulo). **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos** . Companhia Ambiental do

Estado de São Paulo; Organizadores: Carlos Jesus Brandão. São Paulo: CETESB; Brasília; ANA, 2011

CHEN Jr, P.; TORIBARA, T.; WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. **Analytical chemistry, ACS Publications**, v. 28, p. 1756–1758, 1956.

CRAMER, C..L.; DAVIS. R..H. Polyphosphate-cation interaction in the amino-containing vacuoles of *Neurospora crassa*. **Jornal of Biology and Chemistry** p. 259, 5452-5157, 1994.

DAIRY SCIENCE: Food Technology. Polyphosphate in microorganisms.. Disponível em :<https://www.dairyscience.info/index.php/industrial-microbiology/122-polyphosphate-microorganisms.html?showall=1>. 2005.

DUGAS, H.; **Bioorganic Chemistry: A Chemical Approach to Enzyme Action**, 3 ed., New York, 1996.

DURR, M.; URECH, K.; BOLLER, T.; SCHWENCKE, J.; NEGY, M. Sequestration of arginine by polyphosphate in vacuoles of *Saacharomyces cerevisiae*. **Archives microbiology** 121, 169-175. 1979.

FARLOW, J., NIKOLICH, M., TESHIMA, H., MUNK, C., HELD, B., CHERTKOV, O.; DAVENPORT, K., LU, M., GU, W., ZEYUN, A., BRUCE, D.C., Genome Assemblies for 11 *Yersinia pestis* Strains Isolated in the Caucasus Region. **Genome Announc.** 2015

FRAUNHOFER INSTITUTE FOR INTERFACIAL ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY IGB. **PRESS RELEASE**. September, 2013.

GRIMONT, F.; GRIMONT, P,A.D. Genus *Serratia*. **Procarotes**. V. 6, p.:219–244, 2006

GUALBERTO, F. Otimização de processo de precipitação química na remoção de fósforo de esgotos sanitários mediante a utilização de sais de ferro como coagulante. 108 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária)**. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2009.

HAROLD, F.M.. Inorganic Polyphosphates in Biology: Structure, Metabolism, and Function. **BACTERIOLOGICAL REVIEWS: American Society for Microbiology**. V 30, No. 4. 1966

HITCHINS, A. D.; HARTMAN, P. A.; TODD, E. C. D. Coliforms – *Escherichia coli* and its toxins. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods**. 3. ed , 1992.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 ed, 1994.

HSIEH, YU-JU, WANNER, B.L. Global regulation by the seven-component Pi_i signaling system. **Current Opinion in Microbiology**. p.198–203, 2010

HUBBERT, M.K. Nuclear Energy and the Fossil Fuels Drilling and Production Practice. Spring Meeting of the Southern District Division of Production. **American Petroleum Institute Shell Development**. p. 22-27, 1956.

HUNT, D. E. Motility in the marine environment: an adaptive response to patchy nutrient distributions? **Microbial Diversity Summer Course**, 2004

INSTITUTO INTERNACIONAL DE ECOLOGIA. **Lagos e reservatórios. Qualidade da Água: O Impacto da Eutrofização.** São Paulo, Brasil, V.3. 28p, 2000.

JASINSKI, S.M. Minerals commodities summary: phosphate rock. **Retrieved. USGS: science for a changing world.** p124-125, 2012.

JEENER, R., AND J. BRACHET. Ribonucleic acid of yeast, microdetermination and relation of growth conditions to synthesis. **Enzymology.** v. 11, p :222-234, 1944

JEONG, H.; YIM, J.H.; LEE, C.; PARK, S.H.; HUR, C.G. Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing na algicidal agente. **Nucleic. Acids. Res.** Vol 33, 2005.

JING-FU, L; GUI-BIN, J. Selective determination of orthophosphates and total inorganic polyphosphates in detergents by flow injection photometric method. **Talanta,** v 52, p211-216, 2000.

JOHNSON, S.L.; KHIANI, A.; BISHOP-LILLY, K.A.; CHAPMAN, C.; PATEL, M.; VERRATTI, K.; TESHIMA, H.; MUNK, A.C.; BRUCE, D.C.; HAN, C.S.; XIE, G.W.; Davenport, K.W.; Chain, P.; Sozhamannan, S.. Complete Genome Assemblies for Two Single-Chromosome *Vibrio cholerae* Isolates, Strains 1154-74. **Genome Announc.** 2015

KALIVODA, E.J.; STELLA, N.A.; ASTON, M.A.; FENDER, J.E.; THOMPSON, P.P.; KOWALSKI, R.P.; SHANKS, R.M. Cyclic AMP negatively regulates prodigiosin production by *Serratia marcescens*. **Res.**

Microbiology. Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson, p. 158–167, 2010.

KATO, J.; YAMADA, K.; MURAMATSU, A.; OHTAKE, H.. Genetic improvement of *Escherichia coli* for enhanced biological removal of phosphate from wastewater. **Applied and environmental microbiology, American Society Microbiology**, v. 59, p. 3744, 1993. 1993.

KIM, S.J.; LEE, H.K.; YIM, J.H. Statistical optimization of medium components for the production of prodigiosin by *Hahella chejuensis* KCTC 2396. **Journal Microbiology and Biotechnology**. p:1903-1907, 2009

KOMBER, A. inorganic Polyphosphate: a molecule of many junctions. **Annual Review of Biocheistr.** V 68, p 89-125,, 1999.

KONEMAN, E.W; WINN, W.C.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.;; PROCOP. G.W.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WOODS, G.L. **Koneman, Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido.** 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Kobayashi, and F. M. Hulett. The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-related promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the *pho* regulon. **J. Bacteriol.** 179, 2534-2539, 1997.

KURODA, A.; KUNIMOTO, H.; MOROHOSHI, T. Evaluation of phosphate removal from water by immobilized phosphate-binding protein PstS. **Journal of bioscience and bioengineering, Elsevier**, v. 90, p. 688–690, 2000.

LAMARCHE, M G.; WANNER, B.L.; CREPIN, S.; HAREL, J. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate

homeostasis and pathogenesis. **Article reviews. Federation of European Microbiological Societies Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved. FEMS Microbiol.** ed 32, p: 461–473, 2008.

LAMPARELLI, M. C. Grau de trofia em corpos d'água do Estado de São Paulo: avaliação dos métodos de monitoramento. Tese (**Doutorado em Ciências. Universidade de São Paulo**), São Paulo, p.235, 2004.

LEE, S.J.; PARK, Y.S.; KIM, S.J.; SULH, S.W. Cristal Structure of PhoU from *Pseudomonas aeruginosas*, a negative regulator of the Pho regulon. **Journal of Structural Biology.** v 188, p 22–29, 2014.

LICHKO L, KULAKOVSKAYA T, KULAEV I. Inactivation of endopolyphosphatase gene PPN1 results in inhibition of expression of exopolyphosphatase PPX1 and high-molecular-mass exopolyphosphatase not encoded by PPX1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim Biophys Acta**, p 98–102. 2004.

MONTANER B, PÉREZ-TOMÁS R. The prodigiosins: a new family of anticancer drugs. **Currier Cancer Drug Targets.** V.3, p:57–65, 2000.

MOTA, A. J., G. N. BACK-BRITO, F. G. NOBREGA. A practical and rapid microplate method for yeast genomic DNA extraction. **MYCOSES.** Vol. 52. Commerce Place, 350 Main ST, Malden 02148, MA USA: Wiley-Blackwell Publishing, INC, 2009

OHTOMO, R.; SEKIGUCHI, Y.; MINURA, T.; SALTO, M.; EZAVA, T.; Quantification of polyphosphate diferente sensitivities to short-chain polyphosphate using enzymatic and colorimetric methods as revealed by ion chromatography. **Analitical Biochemistry**, p 139-146, 2004.

PATIL, C.D; URYAWANSHI, R.K.; BORASE, H.P. Studies on production and biological potential of prodigiosin by *Serratia marcescens*. **Appl Biochem Biotechnol**. V. 173, p:1209–1221, 2014,

PANDA, P., FIERS, M.W., LU, A., ARMSTRONG, K.F.; PITMAN, A.R. Draft Genome Sequences of Three *Pectobacterium* Strains Causing Blackleg of Potato: *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ICMP 19477, *P. atrosepticum* ICMP 1526, and *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* UGC32. **Genome Announc**. 2015

PEREIRA, J.C.B. Estudo físicoquímico do polifosfato de sódio visando sua aplicação em formulações para nutrição parenteral. **Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Ciências Farmacêuticas**. p.22–31, 2007

PÉREZ-TOMÁS R; FRANCISCO R; GIMÈNEZ-BONAFÉ, P. **Mechanisms of prodigiosin cytotoxicity in human neuroblastoma cell lines**. *Eur Journal Pharmacology*. V. 572, p:111–9, 2003.

QUEVEDO,, C. M. G.; PAGANI, W. S. Impactos das atividades humanas sobre a dinâmica do fósforo no meio ambiente e seus reflexos na saúde pública. **Ciência e Saúde Coletiva, Rio de Janeiro**, v. 16, n. 8, p. 3529-3539, 2011

RAO, N.N., e KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate regulates responses of *Escherichia coli* to nutritional stringencies, environmental stresses and survival in the stationary phase. **Progress in Molecular Biology and subcelular Biology**, ed. 23, p 183–195, 1999.

REUSH, R.N. Biological complexes of poly- β -hydroxybutyrate. **FEMS Microbiology Review**, v. 103, p: 6661-665. 1992

REUSH, R.N. Polyphosphate 3-hydroxybutyrate in channels ion cell membrane. **Progress in Molecular Biology and subcellular Biology** 23, 317p. 1999

RIVERA, A.M. Modelo sistêmico para compreender o processo de eutrofização em um reservatório de água. **Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos**. Campinas-SP, 2003

SAENGER, W.; Principles of Nucleic Acid Structure. Springer: New York, 1984.

SCHMIDT, G. The biochemistry of inorganic pyrophosphates and metaphosphates, **Phosphorus metabolism. Johns Hopkins Press, Baltimore**. vol. 1, p. 443-475

SINGH,A.; PINNAKA,A.K.;VAIDYA,B. Draft genome sequence of *Nitrocola* sp. AK23. **Institute of Microbial Technology**. 2014

SINGH P, SHEKHAWAT N. Chemometric descriptors in the rationale of antimalarial activity of natural and synthetic prodiginines. **Journal of current chemical e pharmaceutical sciences**.V. 2, p:244–260, 2012.

SMITH, I. W.; WILKINSON, J. F.; DUGUID, J. P. Volutin production in *Aerobacter aerogenes* due to nutrient. **Bacteriology Department, University of Edinburgh**, Edinburgh, 1954.

STOCK, J.; NINFA, A.; STOCK, A. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews, Am Soc Microbiol.** v. 53, n. 4, p. 450, 1989.

TASCHNER, N.P., YAGIL, E., SPIRA, B. A differential effect of sigma S on the expression of the PHO regulation gene of *E. coli*. **Microbiology.** p. 150, 2004.

TINSLEY, C.R.; GOTSCHICH, E.C. Cloning and characterization of the meningococcal polyphosphate kinase gene: production polyphosphate synthesis mutante. **Infectionn and imunology.** V. 62, p.1624-1630. 1995.

VANBOGELEN, R.A., OLSON, E.R., WANNER, B.L. e NEIDHARDT, F.C. **Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*.** J Bacteriol 178: 4344–4366, 1996.

WANNER, B.; METCALF, W. Molecular genetic studies of a 10.9-kb operon in *Escherichia coli* for phosphonate uptake and biodegradation. **FEMS microbiology letters, Elsevier.** v. 100, n. 1-3, p. 133–139, 1992.

WANNER, B.L. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. **Cellular Biochemistry,** ed. 51, p: 47–54, 1993.

WANNER, B.L. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. **American Society for Microbiology.** Vol. 1, p. 1357–1381., Washington, DC, 1996.

WIAME, J. M. The metachromatic reaction of hexametaphosphate. **Journal Ameriacan Chemistry Society,** ed. 69, p:3146-3147. 1951.

WILLIAMSON, N.R.; HARRIS A.K.P.; SLATER H. The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation. **Microbiology**. v. 150, p:3547–3560, 2007.

WILLSK, G. R.; MALAMY, M. H. Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escheerichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v 144, n.1, p. 356-365, 1980.

YANG, W.; DAVIS, P.J. Microbial models of mammalian metabolism biotransformation of N-methyl-carbazole using the fungus *Cunninghamella elegans*. **Drug metabolism**. ed 20, p:38-46, 1992.

ZAGO, A.; CHUGANI, S.; CHAKRABARTY, A. Cloning and characterization of polyphosphate kinase and exopolyphosphatase genes from *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and environmental microbiology, American Society Microbiology**, v. 65, p. 2065, 1999.

8 ANEXOS

ANEXO 01: Atividade da fosfatase alcalina

A atividade enzimática da bactéria 9rp1 (*Serratia marcescens*) comparada com a cepa PHOU, utilizada como controle ao decorrer do trabalho, em dois diferentes meios de cultura (Fig. 28). Observamos uma atividade muito maior da cepa 9rp1, uma possível explicação para esse comportamento é que além de possuir um bom sistema de captação de fosfato, a carência do elemento ativo a expressão do sistema PST regulado pelo regulon PHO, estimulando a expressão da enzima de forma mais acentuada que em PHOU.

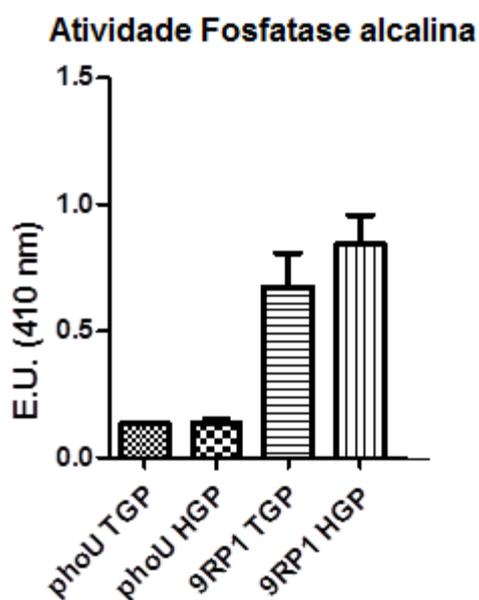


Figura 27: Atividade da fosfatase alcalina. A diferença entre os meios é a substituição do reagente Tris em TGP, por HEPES, em HGP

ANEXO 02: Extração da fosfatase alcalina

Comparando os diferentes protocolos, obtivemos os seguintes resultados (Fig. 29), onde nota-se que os protocolos 04, 05 e 06 foram mais eficiente para extração da enzima nas três bactérias testadas

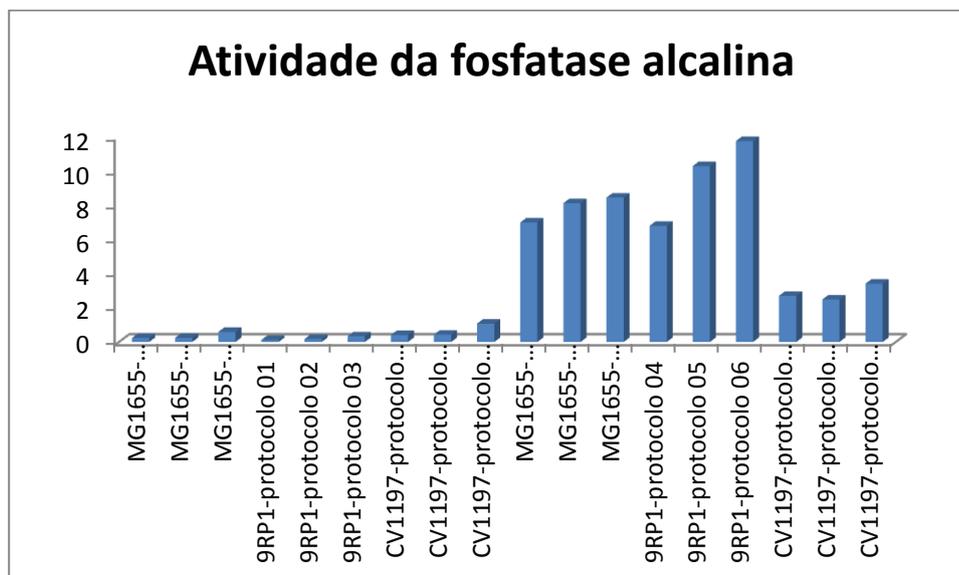


Figura 28: Atividade da fosfatase alcalina. Valores da atividade da fosfatase alcalina, para as extrações do periplasma, com diferentes tampões.

ANEXO 03: Extração de fosfatase alcalina

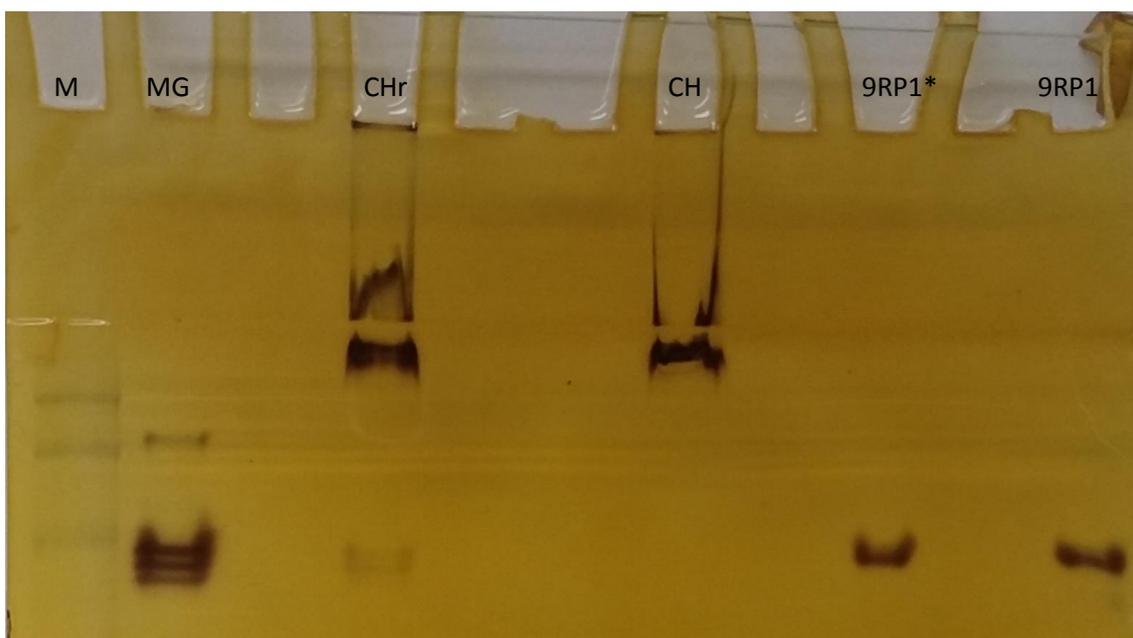


Figura 29: Perfil eletroforético da extração periplasmática. Gel nativo corado com o substrato (um volume de alpha-naphthyl phosphate foi adicionado ao mesmo volume de Fast blue). A mistura foi aplicada sobre o gel, e incubado durante 2-5 min a temperatura ambiente. . M=marcador BIO-RAD 250 Kd; CHr= cepa *Chromobacterium violaceum* CHr= cepa *Chromobacterium violaceum*, 9RP1= *Serratia marcescens*.

A extração da enzima fosfatase alcalina foi visualizada em gel para as três bactérias testadas. As diferenças no perfil de corrida decorrem do ponto isoelétrico de cada enzima que podem perfeitamente interagir com a carga do tampão de corrida.

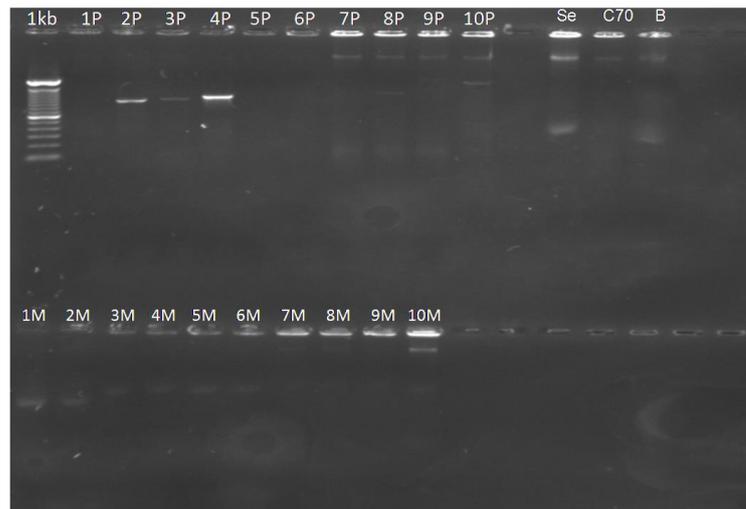
ANEXO 04

Tabela 4: Termociclagem dos primers utilizados no trabalho.

Primers	TM (°C)	Tamanho do ampicon (pb)	Ciclo 01	Ciclo 02	Ciclo 03	Ciclo 04	Ciclo 05
phor_fw_2	58,6	804	95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	59 °C / 30 s	72 °C / 1 m	72 °C / 7 min
phor_rv_2	60,2		95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	59 °C / 30 s	72 °C / 1 m	72 °C / 7 min
phob_fw2	59,2	932	95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	59 °C / 30 s	72 °C / 1 m	72 °C / 7 min
phob_rv2	60,2		95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	59 °C / 30 s	72 °C / 1 m	72 °C / 7 min
phou_fw	59,1	986	95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	59 °C / 30 s	72 °C / 1 m	72 °C / 7 min
phou_rv	59,2		95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	59 °C / 30 s	72 °C / 1 m	72 °C / 7 min
psta_fw	59,3	1057	95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	60 °C / 30 s	72 °C / 1,5 m	72 °C / 7 min
psta_rv	60,1		95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	60 °C / 30 s	72 °C / 1,5 m	72 °C / 7 min
pstb_fw	60,4	1098	95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	60 °C / 30 s	72 °C / 1,5 m	72 °C / 7 min
pstb_rv	60		95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	60 °C / 30 s	72 °C / 1,5 m	72 °C / 7 min
pstc_fw	61	1102	95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	60 °C / 30 s	72 °C / 1,5 m	72 °C / 7 min
pstc_rv	59,1		95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	60 °C / 30 s	72 °C / 1,5 m	72 °C / 7 min
psts_fw2	58,0	1280	95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	59 °C / 30 s	72 °C / 1,5 m	72 °C / 7 min
psts_rv2	59,2		95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	59 °C / 30 s	72 °C / 1,5 m	72 °C / 7 min
phob_fw1_	60,1	1191	95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	60 °C / 30 s	72 °C / 1,5 m	72 °C / 7 min
phob_rv1	59,9		95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	60 °C / 30 s	72 °C / 1,5 m	72 °C / 7 min
psts_fw	59,5	1519	95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	59 °C / 30 s	72 °C / 2 m	72 °C / 7 min
psts_rv	59,8		95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	59 °C / 30 s	72 °C / 2 m	72 °C / 7 min

phor_fw	60,3	1834	95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	60 °C / 30 s	72 °C / 2 m	72 °C / 7 min
phor_rv	61,6		95 °C / 3 min	95 °C / 30 s	60 °C / 30 s	72 °C / 2 m	72 °C / 7 min

ANEXO 05: Perfil eletroforético dos genes do sistema PST amplificados por PCR em *Serratia marcescens*



5 µL de amostra
1kb = marcador 1 kb
(n°)P = amostra de DNA da Paloma (C70)
(n°)M = amostra de DNA do Marcelo(Serratia)
Se = Serratia com primers 94/95
C70 = C70 com primers 94/95
B = branco, sem primers

1 = PhoR_Fw_2; PhoR_Rv_2
2 = PhoB_fw2; PhoB_rv2
3 = PhoU_Fw; PhoU_Rv
4 = PstA_Fw; PstA_RV
5 = PstB_Fw; PstB_Rv
6 = PstC_Fw; PstC_Rw
7 = PstS_Fw2; PstS_Rv2
8 = PhoB_fw1; PhoB_rv1
9 = PstS_Fw; PstS_Rv
10 = PhoR_Fw; PhoR_Rv

Figura 30: Amplificação das regiões phor, phou e psta. As três regiões identificadas como 2p, 3p e 4p correspondem respectivamente as regiões PHOR, PHOU e PSTA, pois o tamanho de tais fragmentos correspondem ao perfil definido pelo marcador de 1Kb, diferentemente dos fragmentos visualizados na parte inferior do gel.

Após amplificados, tais fragmentos foram sequenciados e os contigs gerados foram contratados com a plataforma BLAST, configuração nucleotide, do banco de dados NCBI, onde foi confirmada a veracidade de tais regiões.

ANEXO 06: Filogenia molecular dos genes do sistema PST.

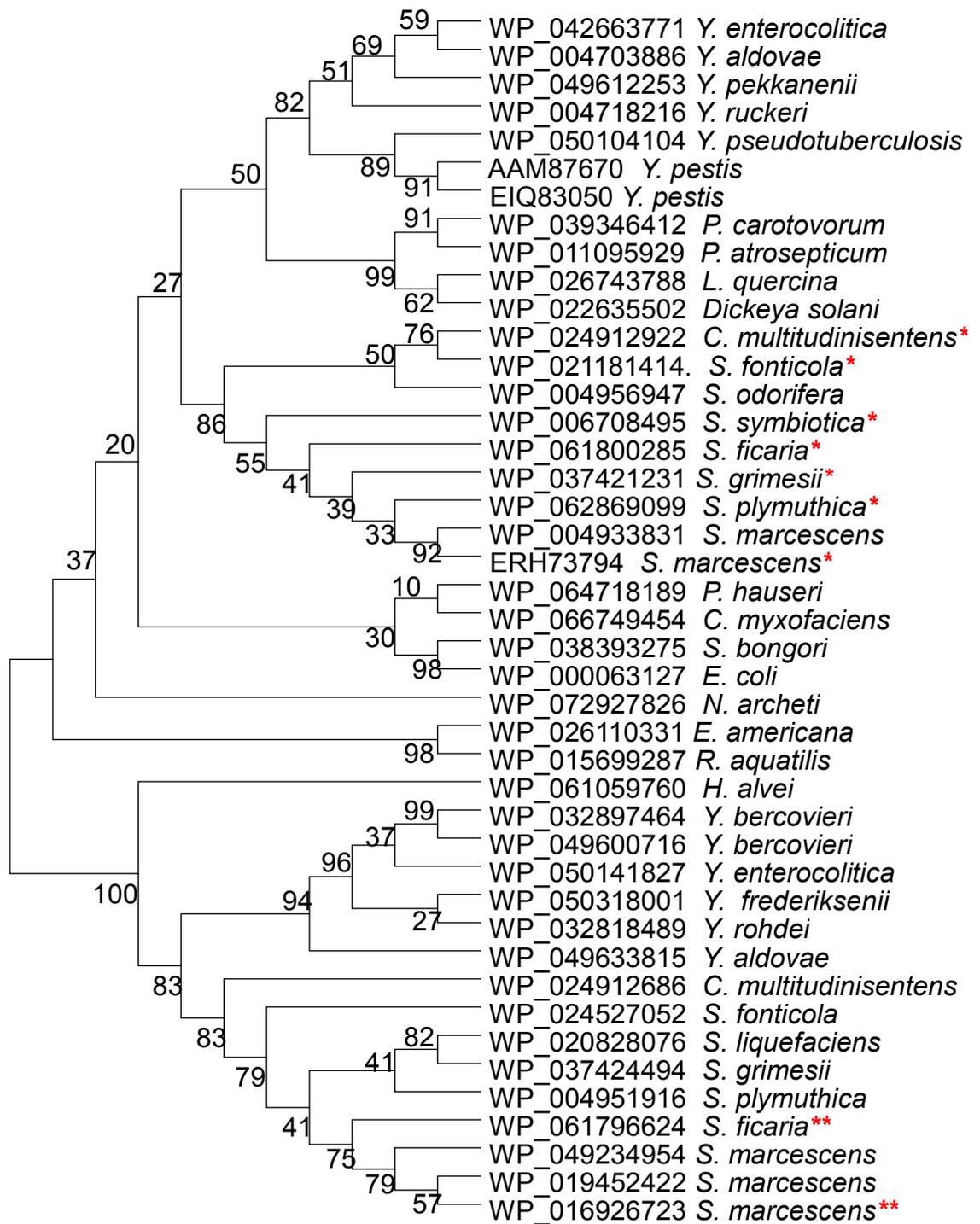


Figura 31: Filogenia molecular do gene *pstb* pelo método da máxima-verossimilhança.

Os números próximos aos nós representam a taxa de replicação do resultado no teste para um total de 100 repetições. Os asteriscos em vermelho indicam a posição que o gene *pstB1* (*) e

PSTB2 (**) de *S. marcescens* 9rp1 ocupam na árvore. Os braços não estão em escala por taxa de mutação.

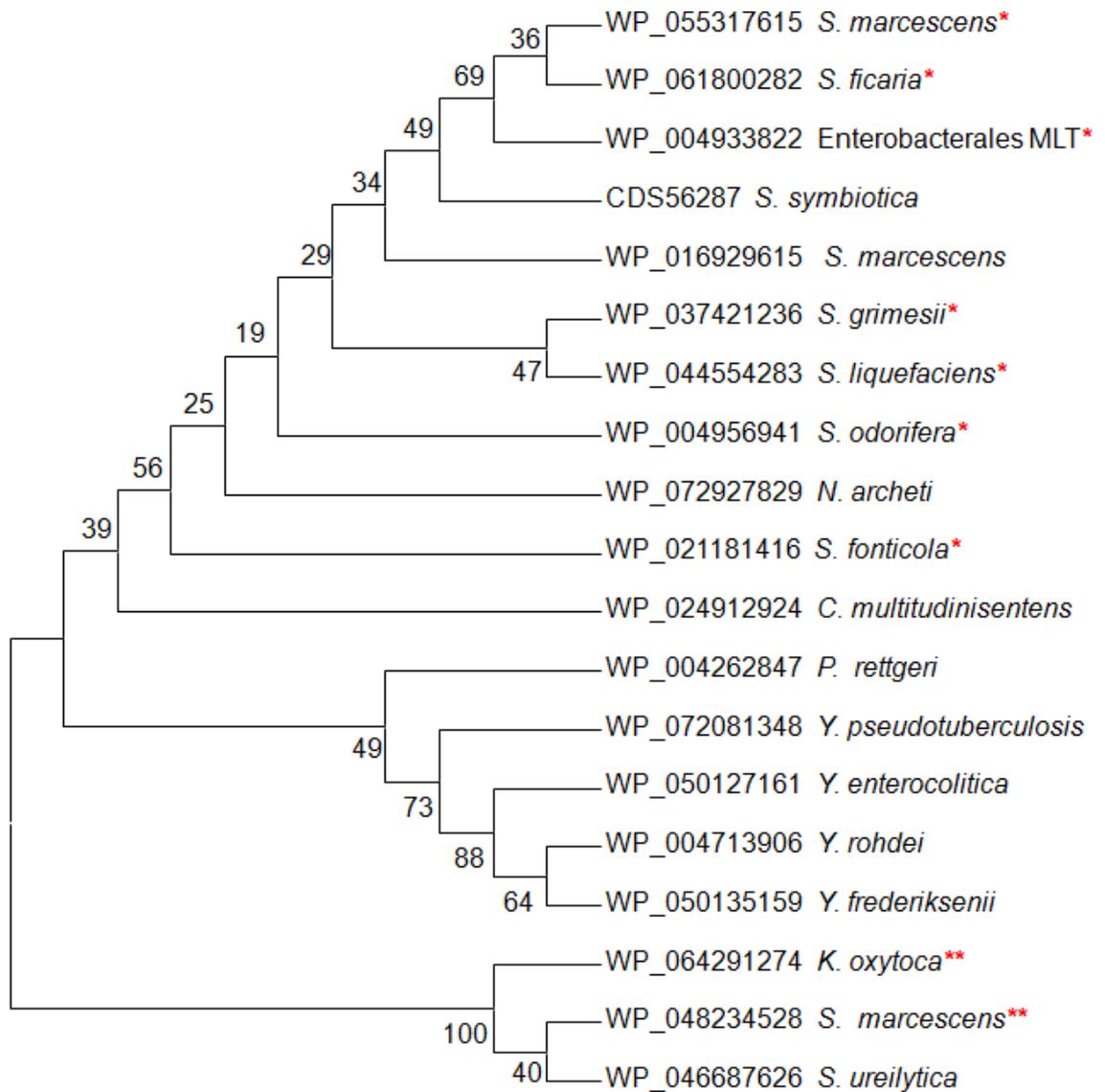


Figura 32: Filogenia molecular do gene *pstc* pelo método da máxima-verossimilhança. Os números próximos aos nós representam a taxa de replicação do resultado no teste para um total de 100 repetições. Os asteriscos em vermelho indicam a posição que o gene *pstC1* (*) e *pstC2* (**) de *S. marcescens* 9rp1 ocupam na árvore. Os braços não estão em escala por taxa de mutação.

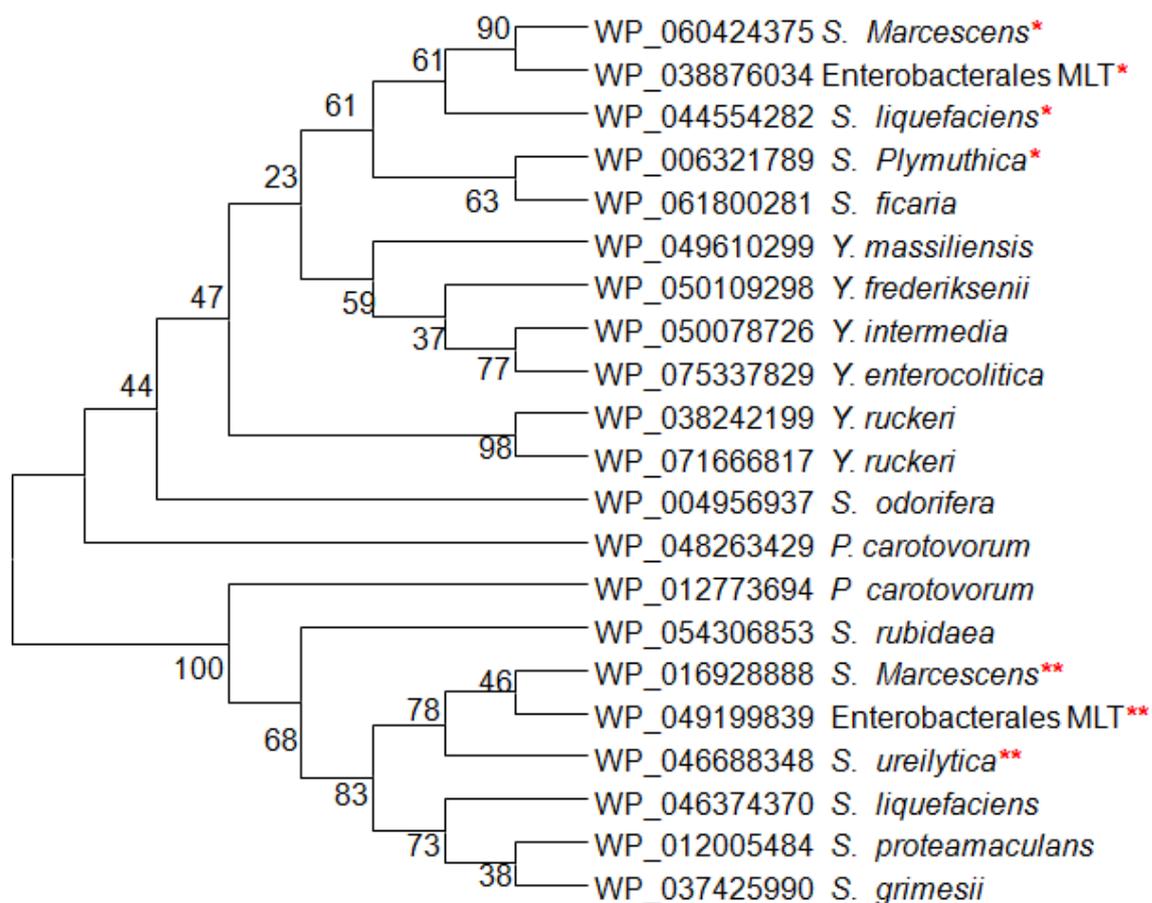


Figura 33: Filogenia molecular do gene *psts* pelo método da máxima-verossimilhança. Os números próximos aos nós representam a taxa de replicação do resultado no teste para um total de 100 repetições. Os asteriscos em vermelho indicam a posição que o gene PSTS1 (*) e PSTS2 (**) de *S. marcescens* 9rp1 ocupam na árvore. Os braços não estão em escala por taxa de mutação.

Anexo 07: Comparação entre os genes do opero PST

Score = 80.1 bits (196), Expect = 4e-21, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 78/257 (30%), Positives = 117/257 (46%), Gaps = 29/257 (11%)

```

Query 59  GMSLALFTEMTPPPNTAGGGLANAIAGSGLLILWATIFGTPLGIMAGIYLAEYGRKSWLA 118
          G + F +P          GG+ AI G+ L+++ +I P G++A +YL EY + L
Sbjct 277  GEQVKKFLTDSPREANTEGGVFPALFGTVLMVILMSIVVMPFGVIAAAVYLHEYAGNNLLT 336

Query 119 EVIRFINDILLSAPSIV-----VGLFVYTIVVAKMEHFS-----GWAGIVALALLQ 164
          VIR L PSIV +G FVY I + F G G++ AL
Sbjct 337  RVIRIAVNVLAGVPSIVYGVFGLGFFVYMIGGTLDQLFYPELNPPTFGTGPVLWAALTL 396

Query 165 V----PIVIRTTENMLKLVPTDLREAAYALGTPKWRMISAITLKASVSGIITGVLLAIAR 220
          P+VI TE L +P +LR+ + ALG + + I L + ++TG++LA+AR
Sbjct 397  ALLTLPVVIVATEEGLSRIPTSLRQGSMAALGASRAETLWRIVLPMAPAMMTGLILAVAR 456

Query 221 IAGETAPLLFTSLSNQ-----FWSTDLMQPIANLPVTIFKFA-MSPFAE-WQQLAW 269
          AGETAPL+ + F L + +L I+ A SP E + L +
Sbjct 457  AAGETAPLMLVGVVKSVPVLPVDEIFPYLHLERKFMHLSFQIYDMAFQSPSVEAARPLVF 516

Query 270 AGVLLITLCVLLLNILA 286
          A L+ V+ LN+ A
Sbjct 517  ATAFLLVTIVVSLNLAA 533

```

Figura 35: Comparação entre os genes psta1 e psta2 pelo programa Blast2sequence. Query = psta1 e Sbjct = psta2

Score = 302 bits (774), Expect = 1e-108, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 146/253 (58%), Positives = 185/253 (73%), Gaps = 0/253 (0%)

```

Query 6  DASSSKIQVRDLNFYFGKFKHALKNITLDIAKNKVTAFIGPSGCGKSTLLRFTFNKMYQLYP 65
          D + + V LN +YG L +I+L I K++VTA IGPSGCGKSTLLR FN+M L
Sbjct 18  DDEQ TALAVNGLNLFYGDQVLDHSLRIPKHRVTALIGPSGCGKSTLLRCFNRMNDLVD 77

Query 66 EQRAEGGILLDQONILTDNSDIALLRKAVGMVFQKPTPFPMISIYDNIAFGVRLFEEKLSRA 125
          R EG + L+G I D+A LR +VGMVFQ+P PFP SIY+N+ +G+RL R
Sbjct 78  NCRIEGDLQLNGAAISGAQIDVAALRRRVGMVFQRPNPFPKSIYENVVYGLRLQGVDRR 137

Query 126 DMDERVQWALTKAALWNETKDKLHQSGYSLSGGQQQLRCIARGIAIRPEVLLLDPECSAL 185
          +DE V+ +L AALW+E KD+L ++ + LS GQQQL IAR IAI PEVLLLDPE SAL
Sbjct 138  LLDEAVERSRLAAALWHEVKDRLRENAFRLSSGQQQLVIARAIAIEPEVLLLDPEPTAL 197

Query 186 DPISTGKIEELISELKADYTVVIVTHNMQQAARCSDESTAFMYLGELIEFSDTDNLFTAPQ 245
          DPIST IEELIS LK Y+V++VTHNMQQAAR SD TAF++ G L+E++DTD +FT+P+
Sbjct 198  DPISLTIEELISALKQRYSVLLVTHNMQQAARVSDYTAFIHQGRVVEYNDTDAIFTSR 257

Query 246 KKQTEDYITGRYG 258
          +++TEDYITGRYG
Sbjct 258  QRRTEDYITGRYG 270

```

Figura 37: Comparação entre os genes pstb1 e pstb2 pelo programa Blast2sequence. Query = pstb1 e Sbjct = pstb2

Score = 80.5 bits (197), Expect = 6e-21, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 48/146 (33%), Positives = 77/146 (53%), Gaps = 2/146 (1%)

```

Query 171 LAAGVILAIMIIPYIAAVMRDVFQTPVMMKESAYGIGCTTWEVIWRIVLPFTKNGVIGG 230
          L GV + ++P I ++ D P + + + +G T W+ + ++VLP G+
Sbjct 571  LVVGVAMGFALVPIIFSLAEDALFSVPATLSQGSALGATQWQTVIKVVLPSASAGIFSA 630

```

```

Query 231 VMLGLGRALGETMAVTFIIGNTYQLDSASLYMPGNSITSALANEFAEAESG-VHTAALME 289
      +M+G GRA+GETM V      GNT +D SL+      ++ + +A E EA SG H L
Sbjct 631 LMIGFGRAVGETMIVLMATGNTPIID-GSLFQGLRALAANIAIEMPEAVSGSSHYRVLFL 689

Query 290 LGLILFVITFIVLALSCLMIMRLAKN 315
      L+LFV TF+      L++ + +RL K
Sbjct 690 TALVLFVFTFVFNTLAEAVRLRLRKR 715

```

Figura 38: Comparação entre os genes pstc1 e pstc2 pelo programa Blast2sequence. Query = pstc1 e Sbjct = pstc2.

Score = 21.6 bits (44), Expect = 0.028, Method: Compositional matrix adjust.
 Identities = 34/165 (21%), Positives = 54/165 (33%), Gaps = 42/165 (25%)

```

Query 199 GKGNDGIAAFVQR-----LPGSIGYVEYAYAKQNNL 229
      G D A +QR                      LPGS V+      N +
Sbjct 152 GLSGDWAARSLQRFGRNSASGTYGYFKLRALCGGDFMPRVNELPGSASVVQAVAGSLNGI 211

Query 230 AYTCL-VSADGKAVSPTEESFSNAAKGADWSKTFAQDLTDQKGDNVWPITSTTFILVHKE 288
      Y + A G + P ES      G D+      A ++ + +      +P++ +I ++K
Sbjct 212 GYASIGFRASGVRLPLAES-----GEDYVAPTAANVRNDR----YPLSRYLIIYINKA 261

Query 289 QKNPAQGAEVLKFFDWAYKT-GAKQANELDYATLPKEVVEQVRAA 332
      P +      F D      T G      N Y LP +++ R A
Sbjct 262 PNQPLEPLTA-AFLDRVLTSGQSLVNHDGYLPLPPAALQKTRQA 305

```

Figura 39: Comparação entre os genes psts1 e psts2 pelo programa Blast2sequence. Query = psts1 e Sbjct = psts2

ANEXO 8

Genes pstC com duas estruturas diferentes

>pstC1

MAEYKPTIKAPGKNGDIIFSALVRLAALITLLLLGGIIVSLIFASWPSMQKFGFAFL
WTKPWDAPAEQFGALVPIYGTVVTSIALIIAVPVSFICIALFTELAPNWLKRPL
GIAIELLAIPSIVYGMWGLFVFAPLFAEYFQTPVGEVLSGPIVGELEFSGPAFGI
GILAAGVILAIMIIPYIAAVMRDVFEQTPVMMKESAYGIGCTTWEVIWRIVLPFTK
NGVIGGVMLGLGRALGETMAVTFFIIGNTYQLDSASLYMPGNSITSALANEFAEA
ESGVHTAALMELGLILFVITFIVLALSCLMIMRLAKNEGR

>pstC2

MTQTTANQHPRDRLRGRIDRGVQAAVTASGLMVLMTLMLIFVYLLFAVLPLFK
PASLGQAQPLPIAASAPALALGMDVQQRVGYRIDAQGSQGFYRLTPPPNGQP
QAPLAQQTLLAKPALLAQAAGERDLFALAQAADGRVVVARADFATAENGRPQW
LFPLGQTPLALDPQRKPLKLLALADTHRGQYLLAGVTDDRRLVFGRFSPDGPP
QLSERPLEHEGQQLVLTDPGRQLYLLTGNRLARYEIEGAQLQLRETRTLGEQA
PYQMTALPGGSALLIKGADGNLREWFVETDRRWRLTPVQHFDHGADGQEL
TVAEPYRRVFATLRPDGGFSLFSTIQPQPLNTRLGAEVRQMAFAPRGDGLLL
ESAQGWQRYALDNPYPDVTWRSLWGKWWYENYPQPAYVWQSTSGEDSYQ
PKFSLMPVIFGTFKAAAYAMLFAIPLALAGAIYTAYFMTPGLRRVIKPAIEVMGA
LPTVVIGLVAGIWLAPIIEQYLLAVLALPLLLAAAVLLCGALTHRFPMPRCRPGVD
LLLLLPLLALTVCFAFSLGPRLEVALFGEPLHFWLGDNYDQRNALVVGVMAMGF
ALVPIIFSLAEDALFSVPATLSQGSALGATQWQTVIKVVLPASAGIFSALMIGF
GRAVGETMIVLMATGNTPIIDGSLFQGLRALAANIAIEMPEAVSGSSHRYRVLFLT
ALVLFVFTFVFNLAEAVRLRLRKRYTPNQEAP