



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



**Montagem e anotação do Genoma de *Serratia nevei* 9rpt1:
estudo *in silico* do potencial de recuperação microbiológica do
fosfato**

Doutoranda: Samára Ferreira Santos.
Orientador: Professor Doutor Adolfo José da Mota.

Área 2: Biotecnologia

Linha de Pesquisa 1: Bioprospecção, Desenvolvimento de Bioprocessos e Bioprodutos

Manaus/AM
2022

SAMÁRA FERREIRA SANTOS

**Montagem e anotação do Genoma de *Serratia nevei* 9rpt1:
estudo *in silico* do potencial de recuperação microbiológica do
fosfato**

Tese apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Professor Doutor Adolfo José da Mota.

Manaus/AM
2022

Ficha Catalográfica

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

S237m	<p>Santos, Samára Ferreira Montagem e anotação do genoma de <i>Serratia marscesens</i> 9rpt1 : : estudo in silico do potencial de recuperação microbiológica do fosfato. / Samára Ferreira Santos . 2022 57 f.: il. color; 31 cm.</p> <p>Orientador: Adolfo José da Mota Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.</p> <p>1. Fosfato . 2. Micro-organismos . 3. <i>Serratia nevei</i>. 4. Genoma. 5. Pst. I. Mota, Adolfo José da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título</p>
-------	---

SAMÁRA FERREIRA SANTOS

**Montagem e anotação do Genoma de *Serratia nevei* 9rpt1:
estudo *in silico* do potencial de recuperação microbiológica do
fosfato**

Tese apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em 15 de setembro de 2022

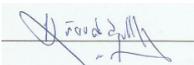
Banca examinadora

Adolfo Mota

Prof^o Dr. Adolfo José da Mota, Presidente
Universidade Federal do Amazonas



Prof^o Dr. José Odair Pereira, membro
Universidade Federal do Amazonas



Prof^o Dr. João Lúcio de Azevedo, membro
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo
(ESALQ/USP)



Prof^o Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva, membro
Universidade Federal do Amazonas



Prof^ª Dra. Enedina Nogueira de Assunção, membro
Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

A Deus Todo Poderoso, pelo dom da vida, meu amparo e guia nessa jornada terrestre sempre.

A Nossa Senhora de Fátima, minha mãezinha, que sempre me protegeu com seu santo manto.

A minha amada família, que é meu porto seguro sempre. A minha amada mãezinha Maria do Carmo, meu pai Raimundo Nonato, pois sem seus esforços e sacrifícios diários eu jamais teria entrado nessa Universidade um dia. Obrigada por tudo sempre. As minhas irmãs Silmara e Sabrina, e meu irmão Marcos, por toda preocupação, cuidado, amor e carinho. Amo vocês.

Ao meu estimado orientador, mentor, incentivador, amigo e parceiro Dr. Adolfo José da Mota, por sempre acreditar em mim, em meu trabalho e por me incentivar a chegar até aqui. Por todo apoio e me oferecer todo suporte e amparo que necessitei ao longo desses anos. Sem sua ajuda eu não conseguiria. Obrigada.

Ao falecido Dr. Tetsuo Yamane, mentor e idealizador do Projeto Fosfato, do qual tive a honra de conhecer e fazer parte de sua equipe, infelizmente ele não pode acompanhar essa última etapa de nosso projeto. Descanse em paz e que a luz perpetua o ilumine.

A meus queridos amigos Whendel Mesquita e Thiago Fernandes por todo apoio, carinho, paciência, dicas e companheirismo sem igual, horas de explicações, sem vocês não seria possível. Agradeço sempre a Deus por ter colocado vocês em minha vida.

As minhas queridas amigas: Dra. Auricélia Matos, Ma. Luana Nonato e Nubi as melhores pessoas que Nosso Senhor Jesus Cristo colocou em minha vida, muito obrigada por toda paciência, carinho e companheirismo sempre.

Aos meus queridos amigos Netinho, Danni, Aline, Kaori, Jocélia, Pablo, Rafael, Lucas, Nani por tornarem a rotina de laboratório mais agradável.

A meu amigo Msc. Marcelo Silva por me ceder gentilmente sua linhagem isolada em seu trabalho de mestrado, para a construção desse trabalho maravilhoso em minha vida.

A Dra. Antônia Queiroz, por ser sempre esse mãezona, carinhosa e presente em minha vida desde a graduação.

Ao Dr. José Odair, por ser meu primeiro orientador, mentor e guia nessa jornada acadêmica, nesse maravilhoso universo dos micro-organismos e sua importância

Ao Dr. João Lúcio por todas conversas e conselhos desde a graduação, e ser essa mente brilhante que ao longo dos anos passou ensinamentos valiosos a todos ao seu redor.

Ao Dr. Carlos Gustavo por toda amizade e ensinamentos valiosos no decorrer desses bons anos em nossa Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

A Universidade Federal do Amazonas e ao PPG/BIOTEC pela grande oportunidade de realizar essa pesquisa, aos professores que tive nesses anos, por cada um, que de alguma maneira contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal.

Ao laboratório de biodegradação, onde pude realizar todo nosso projeto com ajuda de meu estimado orientador.

Ao Centro Acadêmico Multidisciplinar – CAM da UFAM.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo financiamento da bolsa no decorrer do projeto.

Por fim, a todos que estiveram em meu caminho e que de alguma maneira, contribuíram para minha formação e para a realização deste trabalho.

RESUMO

O fósforo (P) é um elemento essencial na composição das principais biomoléculas: proteínas, carboidratos, lipídeos, DNA e RNA. Comercialmente, seu principal uso está na forma de fertilizantes para a agricultura, já que solos geralmente são pobres em relação a esse nutriente. É um elemento finito e insubstituível e sua exploração constante tem levado à depleção e escassez de suas reservas naturais, resultando em uma eventual crise mundial. 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. Os micro-organismos desempenham um papel fundamental no processo de reciclagem do fósforo, visto que, solubilizam íons de fosfato do solo, reciclam o fosfato orgânico, disponibilizando-o para as plantas, e fechando assim o ciclo do fósforo. 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. No intuito de desenvolver futuramente um processo eficiente de reciclagem do fósforo, visamos como objetivo no presente trabalho montar, anotar o genoma e estudar, *in silico*, os sistemas de captação de fosfato da linhagem *Serratia nevei* 9rpt1, isolada a partir do rio pretinho, na Serra do Aracá, capaz de captar mais de 90% do fosfato disponível no meio de cultura.

Palavras-chave: Fosfato, Micro-organismos, *Serratia nevei*, Genoma, PST.

ABSTRACT

Phosphorus (P) is an essential element in the composition of key biomolecules: proteins, carbohydrates, lipids, DNA and RNA. Commercially, its main use is in the form of fertilizers for agriculture, as soils are generally poor in this nutrient. It is a finite and irreplaceable element and its constant exploitation has led to the depletion and scarcity of its natural reserves, resulting in an eventual global crisis. In this context, there is a need for its recycling, and one of the viable alternatives is the use of microorganisms, which store phosphorus in polyphosphate granules. Microorganisms play a key role in the phosphorus recycling process, as they solubilize phosphate ions from the soil, recycle organic phosphate, making it available to plants, and thus closing the phosphorus cycle. Considering the priceless Amazonian biodiversity, it is likely that there are microorganisms that have highly efficient systems for capturing and storing phosphate and, therefore, suitable for the microbiological recycling of the nutrient. In order to develop an efficient phosphorus recycling process in the future, we aim in the present work to assemble, annotate the genome and study, *in silico*, the phosphate uptake systems of the *Serratia nevei* 9rpt1 strain, isolated from the pretinho river, in Serra do Araca, capable of capturing more than 90% of the phosphate available in the culture medium.

Keywords: Phosphite, Microorganisms, *Serratia nevei*, Genome, PST.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Países consumidores de fertilizantes. Fonte: IFA, 2020.....	17
Figura 2: Principais países exportadores de fertilizantes no mundo. Fonte: BRC, 2021.....	18
Figura 3: Organização dos genes do operon <i>pst</i> em <i>E. coli</i> . As duas <i>Pho box</i> e a sequência -10 a montante de <i>pstS</i> são apresentadas. A seta indica a direção de transcrição do operon. Fonte: Adaptado de Torriani-Gorini et. al., 1994.....	20
Figura 4: Processo de ativação/inativação de <i>phoB</i> por <i>phoR</i> , seguido de ativação dos genes do regulon <i>pho</i> . N e C representam regiões amino e carboxi-terminal de <i>phoB</i> e <i>phoR</i> . Em carência de P_i , <i>phoR</i> autofosforila-se, e fosforila <i>phoB</i> . A fosforilação de <i>phoB</i> aumenta sua afinidade as sequencias de <i>Pho box</i> , ativando a transcrição do gene pela interação com a RNA polimerase associada ao fator σ^{70} . Fonte: Adaptado de Torriani-Gorini et. al., 1994.....	21
Figura 5: Representação esquemática de transportadores de fosfato em <i>E. coli</i> . 1) Sistema de transporte específico de fosfato inorgânico (PST); 2) Transportador de fosfato inorgânico (PIT); 3) Sistema antiporte de ligação ao fosfato <i>sn</i> -glicerol-3-fosfato; 4) Sistema antiporte de ligação ao fosfato Glicose-6-Fosfato. Fonte: Adaptado de Van Veen, 1997.....	23
Figura 6: Processo de captação e assimilação de P_i ambiental nas bactérias. Fonte: Adaptado de Neidhardt, 1996.....	24
Figura 7: Estrutura e funcionamento de várias proteínas codificadas genes pertencentes ao regulon <i>Pho</i> de <i>E. coli</i> . <i>PhoE</i> , purina específica para ânions, FA, fosfatase alcalina; <i>UgpB</i> , proteína periplasmática de ligação a G3P; <i>UgpA</i> e <i>UgpE</i> , canais intermembranais para o transporte de G3P; <i>UgpQ</i> , ATPase que catalisa o transporte de G3P; <i>PstS</i> , proteína periplasmática de ligação a P_i ; <i>PstA</i> e <i>PstC</i> , canais intermembranais para o transporte de P_i ; <i>PstB</i> , ATPase que catalisa o transporte de P_i ; <i>PhoU</i> , produto do gene <i>phoU</i> ; <i>PhoR</i> , histidina quinase, e <i>PhoB</i> , regulador de resposta. Fonte: Adaptado de Torriani-Gorini et. al., 1994.....	25

Figura 8: Modelo esquemático do sistema PST em <i>Escherichia coli</i> . Fonte: Adaptado de Dassa, 2000.....	26
Figura 9: Transporte e sinalização de fosfato de acordo com as sete proteínas e os modelos intermediários do ácido teicóico. (A) O modelo de sete proteínas de Hsieh e Wanner, 2010. (lado esquerdo) Em condições repletas de fosfato, a proteína <i>PstS</i> liga-se ao fosfato e esta interação bloqueia a autofosforilação de <i>PhoR</i> e a subsequente fosforilação de <i>PhoP</i> evitando a ativação dos genes do regulon <i>Pho</i> (lado direito). Quando o fosfato é limitante, a conformação de <i>PstS</i> muda e desencadeia a cascata de fosforilação, resultando na fosforilação de <i>PhoP</i> e ativação do regulon <i>Pho</i> . (B) Proposta de modelo de regulação da cascata de fosforilação por um intermediário da biossíntese do ácido teicóico (círculo vermelho). Sob condições repletas de fosfato (lado esquerdo) o intermediário ácido teicóico acumula e inibe a atividade autoquinase de <i>PhoR</i> , bloqueando a cascata de fosforilação. Sob condições de limitação de fosfato (lado direito), o intermediário ácido teicóico não é acumulado (Martín-Martín et. al., 2018) e, portanto, a cascata de fosforilação prossegue ativando a expressão dos genes do regulon <i>Pho</i> . Fonte: Adaptado de Martín e Liras, 2021)	28
Figura 10: Exame macroscópico e microscópico de <i>Serratia marcescens</i> . (A) A morfologia da colônia em ágar de glicose nutriente. (B) Células em forma de bastonete observadas ao microscópio. Fonte: Keawmanee et. al., 2021.....	30
Figura 11: Reativação da linhagem <i>Serratia nevei</i> 9rpt1.....	34
Figura 12: Análises filogenéticas aplicadas à história evolutiva de <i>Serratia</i> sp. operon <i>pst</i>	39
Figura 13: Artigo publicado de nosso projeto.....	42
Figura 14: Artigo submetido de um membro da equipe.....	43
Figura 15: Artigo publicado de uma parceria.....	44
Figura 16: Artigo publicado de uma parceria.....	45
Figura 17: Capítulo de livro de nossa equipe.....	46
Figura 18: Capítulo de livro de nossa equipe.....	47
Figura 19: Artigo submetido de um membro da equipe.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Montagem do genoma e recursos de anotação para <i>Serratia nevei</i>	
9rpt1.....	39

Sumário

1-Introdução.....	12
2-Justificativa.....	15
3-Objetivos.....	15
3.1-Objetivo geral.....	15
3.2-Objetivo específico.....	15
4-Revisão de literatura.....	16
4.1-A crise do fósforo.....	16
4.2- Regulon <i>Pho</i>	19
4.3-Sistema PIT (Phosphate Inorganic Transport)	22
4.4-Sistema PST (Phosphate Specific Transport)	23
4.5-Sistema PST em <i>Serratia marcescens</i>	30
4.6-Montagem do genoma de <i>Serratia</i>	32
5- Metodologia.....	34
6-Resultados e Discussão.....	37
7-Conclusões.....	40
8-Produções do período.....	41
9-Bibliografia de Referência.....	49

1- INTRODUÇÃO

O fósforo (P) possui número atômico 15 e massa atômica 30,97, está localizado no grupo 15 ou grupo do nitrogênio (N), é um elemento não-metal, ametal mole, semitransparente, possui brilho no escuro, daí o termo fosforescente. Possui alta reatividade principalmente com o ar, apresentando elevada tendência de oxidação. Pode ser encontrado como um composto oxidado nas rochas, sendo o elemento livre altamente reativo. O fósforo assume muitas formas – branco, amarelo, vermelho, violeta ou preto – sendo o fósforo branco o mais volátil, propenso à explosão espontânea.

O fósforo foi isolado pela primeira vez da urina humana pelo alquimista alemão Hennig Brand em 1669, destilando 50 baldes de urina humana, durante uma busca pela “pedra filosofal”, um material que poderia transformar qualquer metal em ouro (Weeks, M. E, 1932). Embora o isolamento do fósforo não fosse o objetivo, Brand descobriu um novo elemento que ele chamou de fósforo por causa do brilho suave fosforescente. Não conseguindo encontrar uma maneira de capitalizar essa descoberta, ele acabou vendendo sua conquista para isolar o fósforo da urina, e outros cientistas ganharam fama por seu trabalho no campo (Hernando et. al., 2021). Brand mal imaginava que ele havia isolado o primeiro elemento químico da tabela periódica, sendo um elemento essencial para a vida, talvez crucial para o início das formas de vida atuais da Terra, e que possivelmente apareceu em nosso planeta a partir do impacto de meteoritos ou supernovas (Pasek, et. al., 2013). Tampouco percebeu o potencial econômico deste elemento, inicialmente vendido como medicinal e mais recentemente como fertilizante na agricultura moderna, incendiário (fósforos), amaciante de água e pesticida (Hernando et. al., 2021).

O fósforo é um elemento essencial na composição dos seres vivos, não se conhece um 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 e Davis, 1994), constituí 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 e Gotschich, 1995; Reush, 1999), além de compostos orgânicos e polímeros que servem de estoque energético como ATP e polifosfato (Dairy Science, 1999).

O polifosfato (poliP) é um homopolímero linear contendo dezenas a centenas de resíduos de ortofosfato (Pi), unidos por ligações fosfoanidrícas de alta energia (Kamatani et al., 2018). Esse homopolímero tem sido encontrado em uma variedade de organismos,

incluindo bactérias, fungos, protozoários, plantas e mamíferos. Em bactérias, por exemplo, o polifosfato é armazenado em forma de grânulos metacromáticos, podendo ser encontrados em diferentes compartimentos celulares: na superfície celular, no periplasma e na membrana plasmática (Zhu et al., 2005; Docampo, 2006).

O PoliP é amplamente muito estudado até hoje, sendo considerada uma molécula pré-biótica conservada ao longo da evolução. Atuando em uma grande diversidade de funções biológicas, possuindo um papel na regulação da homeostasia celular, incluindo respostas a diversos processos de stress (Kulaev et. al., 2005). Em diversos organismos, incluindo bactérias, fungos e protozoários, o acúmulo de PoliP e a homeostasia de Pi vem sendo implicada na determinação da virulência de diferentes patógenos (Kulaev et. al., 2005), e, mais recentemente, foi descrito que diversos processos da imunidade de vertebrados são regulados pela modulação do conteúdo de PoliP nas células de defesa do hospedeiro (Souza et. al., 2021).

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 de 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.

O regulon Pho é um mecanismo regulador envolvido no desempenho de Pi (fosfato inorgânico) bacteriano que foi caracterizado pela primeira vez em *Escherichia coli* e, posteriormente, em muitas outras espécies bacterianas (Wanner e Chang, 1987). Os membros mais comuns ativados pelo regulon Pho são: enzimas extracelulares capazes de obter Pi a partir de fosfatos orgânicos, transportadores específicos de Pi e enzimas

envolvidas no armazenamento e economia de nutriente. O Pst (Phosphate Specific Transport) é o transportador específico de Pi, sendo o membro mais conservado do regulon Pho em todas as bactérias, é um sistema de alta afinidade por fosfato, constituído por 5 proteínas e 2 reguladores que são expressos em baixas concentrações do elemento.

Outros transportadores de Pi comumente encontrados em bactérias, como o transportador de Pi de baixa afinidade Pit (Phosphate Inorganic Transport), são regulados de maneira variável nas diferentes espécies (Santos-Beneit et al., 2015). *E. coli* ativa transportadores adicionais para compostos contendo fósforo, como Ugp (ou seja, captação de glicerofosfodiésteres) e Phn (ou seja, captação de fosfonatos). Entre os sequestrantes de Pi, as fosfatases alcalinas (PhoA), fosfolipases (PhoD), fosfodiesterases glicerofosfodiéster (GlpQ e UgpQ), fitases (PhyC) e 5'-nucleotidasas (UshA) são as enzimas mais comuns induzidas em resposta à carência de Pi em bactérias (Wanner e Chang, 1987). Para o armazenamento de Pi, a maioria das bactérias induz a expressão de *PpK*, que é capaz de acumular polifosfato como reservatório de Pi e, quando necessário, reutilizá-lo (Ghorbel et al., 2006). Para economizar nutrientes, algumas bactérias são capazes de substituir os ácidos teicóicos (polímeros ricos em Pi encontrados na parede celular de bactérias Gram-positivas) por ácidos teicurônicos (polímeros livres de Pi). Os genes biossintéticos são reprimidos e ativados, respectivamente, pelo regulon Pho (Liu et al., 1998).

O isolado 9rpt1, identificado como *Serratia nevei* foi capaz de captar quase todo fosfato contido no meio de cultura, mostrando possuir um sistema PST de alta eficiência. Buscar respostas para a tamanha diferença se comparada aos resultados dos outros isolados, foi que direcionou o estudo para aprofundar a caracterização genômica da espécie. A análise genômica foi realizada, com o intuito de aplicar os conhecimentos obtidos através do sistema Pst para auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias que visem o uso da bactéria de forma eficiente e segura no ciclo da recuperação do fosfato. Genômica é uma ciência relativamente recente que tem como objetivo entender como os genes e as sequências não codificadoras envolvidas na regulação dos genes estão organizados e interagem para o funcionamento global do ser vivo, sendo uma ferramenta promissora para o presente trabalho. Esses estudos, permitem avançar na compreensão da estrutura e funcionamento de plantas, animais e micro-organismos e utilizar o conhecimento adquirido para a seleção e a geração de novas variedades e linhagens pelo melhoramento genético (Diniz, F., 2017).

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 contribuem para eutrofização artificial, prejudicial aos ecossistemas de rios, lagos e baías. Sua exploração ao longo dos tempos vem 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

- ✓ Montagem, anotação e caracterização, *in silico*, dos sistemas de captação de fosfato no genoma de *Serratia nevei* 9rpt1.

3.2 Objetivo específico

- ✓ Identificar quantos e quais são os sistemas de captação do fosfato presentes no genoma de *Serratia nevei* 9rpt1.
- ✓ Estudar a relação evolutiva entre os sistemas de captação de fosfato entre a cepa 9rpt1 e outras cepas e/ou espécies do gênero.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 A crise do fósforo

O fósforo é um elemento essencial para todas as formas de vidas conhecidas, não se conhece um organismo que não possua esse elemento em sua composição, constituindo cerca de 3% do peso seco de cada organismo (White e Metcalf, 2007). Na natureza, o fósforo é encontrado principalmente em sua forma química mais oxidada (PO^{3-}_4), denominado ortofosfato ou fosfato inorgânico (Pi). A maioria do Pi presente na natureza apresenta-se na forma de sais minerais insolúveis. Apesar de sua relativa abundância, sua disponibilidade no ambiente é baixa, sendo um dos elementos que mais restringe a produtividade biológica em sistemas naturais, tanto terrestres como aquáticos (Anba et. al., 1990; Turner et. al., 2005).

Na agricultura moderna o Pi deve ser suplementado por meio do uso de fertilizantes, impulsionando cada vez mais seu consumo. Parte do Pi procedente acaba precipitando, formando complexos insolúveis com componentes do solo e sofrendo lixiviação. Há décadas vem sendo anunciada uma possível crise do fósforo, uma vez que se trata de um mineral “finito e insubstituível”. Em diversas regiões o fósforo é um fator limitante a produção agrícola, representando 90% do consumo de todo o fósforo extraído. O fósforo inorgânico que é adicionado ao solo como fertilizante tem baixa solubilidade em água e grande interação com partículas do solo, dessa forma, a adubação fosfatada é maior que a necessidade da cultura (Pantano et. al., 2016).

A interferência no ciclo do fósforo ocasionou drásticas consequências, contribuindo a elevadas concentrações de fósforo em águas superficiais ocasionando a eutrofização artificial de tais corpos hídricos, usualmente chamada apenas de eutrofização. Adicionalmente, se tornou contínua a necessidade de aplicação de fertilizantes para reposição do fósforo que é perdido pelos solos por meio da colheita e erosão (Cordell et. al., 2011).

A intervenção dos homens neste ciclo global do fósforo acarretou nos últimos anos a movimentação de cerca de meio bilhão de toneladas do elemento originalmente imobilizada em rochas e que tiveram como destino a hidrosfera. De ante desta problemática, os interesses com a contaminação dos recursos hídricos, associada à provável escassez deste nutriente, tem sido a força motriz para o desenvolvimento de novas tecnologias que visam a recuperação do fósforo presente em corpos aquáticos e a

sua reutilização como fertilizante de solos destinados à produção de alimentos (Cordell et. al., 2011).

Os principais produtores agrícolas do mundo compõem a lista dos principais consumidores de fertilizantes, contribuindo fortemente à demanda global por esses produtos, que oscila em torno de 185 milhões de toneladas de consumo anual. Os 5 primeiros consumidores atendem mais de 60% da demanda mundial, são eles: China com 24%, Índia com 14,6%, EUA com 10,3%, Brasil com 8,3% e Indonésia com 3,8%. O mercado mundial é composto por 60% de nitrogênio (N), 20% de fósforo (P) e 20% de potássio (K), fig. 1 (IFA, 2020). Neste contexto, o Brasil é o quarto maior consumidor de insumos destinados à fabricação de fertilizantes fosfatados, sendo que o país importa cerca de 80% dos fertilizantes consumidos no mercado local, caracterizando um quadro de grande dependência do mercado externo (IFA, 2021).

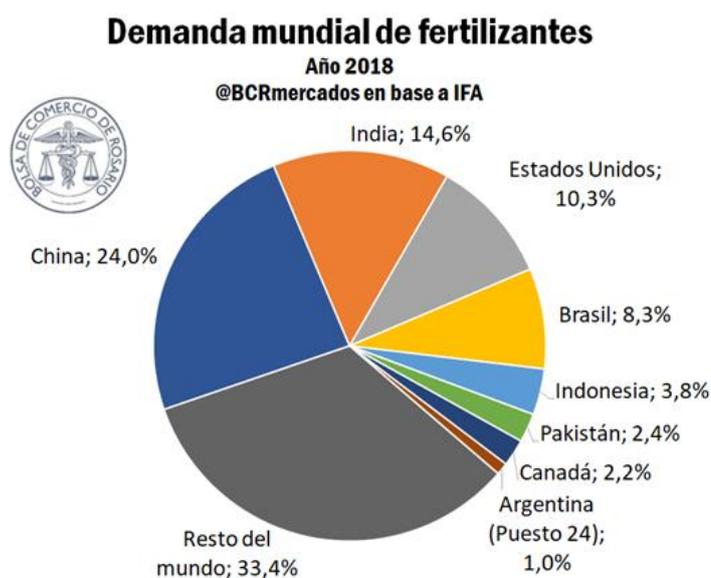


Figura 1: Países consumidores de fertilizantes. Fonte: IFA, 2020

Por outro lado, a oferta exportável é mais dispersa do que a demanda global. Rússia, Canadá e China estão perto da metade das exportações globais de fertilizantes utilizados na agricultura moderna, totalizando mais de 100 milhões de toneladas. Nesse sentido, a Rússia é responsável por 15,6% da exportação de fertilizantes nitrogenados e o Canadá destaca-se com 14,5% na produção de potássio, por fim, a China concentra suas exportações em potássio e nitrogênio, sendo este exportado menor escala, fig. 2 (BCR, 2021).

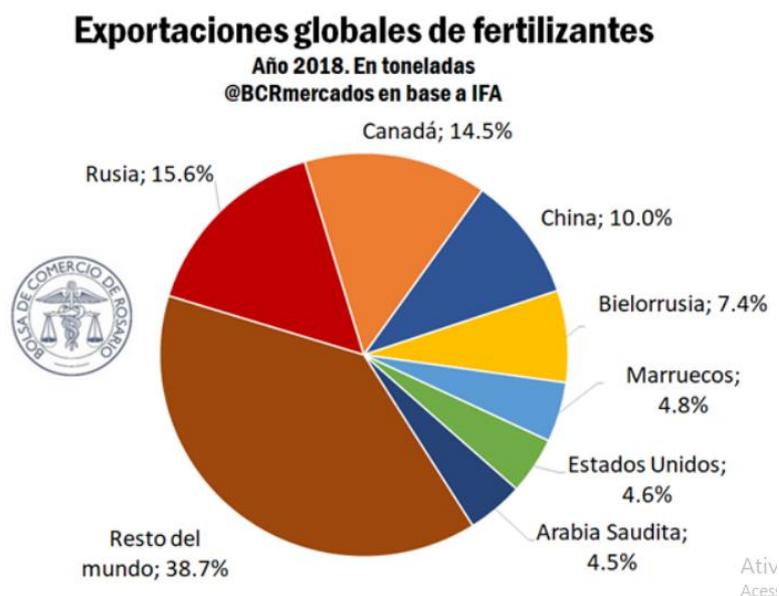


Figura 2: Principais países exportadores de fertilizantes no mundo. Fonte: BCR, 2021

Não há nenhum substituto para o fósforo na natureza. Porém, diferentemente do petróleo, o fósforo pode ser reciclado. 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 e Pagani, 2011).

O uso de resíduo animal (esterco) como fertilizante em solos cultiváveis pode ser uma alternativa promissora para a reciclagem do fósforo, sendo que o esterco bovino contém cinco vezes mais fósforo do que os excrementos humanos. Alguns pesquisadores afirmam que o esterco é um importante depósito de fósforo passível de reutilização, podendo suprir 50% do uso de fósforo destinado à agricultura na Europa Ocidental e 25% nos Estados Unidos (WEF, 2021).

A reciclagem do fósforo jamais será completa, o que torna o esgotamento das rochas fosfáticas uma realidade, porém passível de ser postergada. Evidentemente, a reutilização do fósforo, a partir de resíduos orgânicos, esterco e micro-organismos, que é a reciclagem microbiológica que se baseia na necessidade de micro-organismos

incorporarem esse elemento do meio ambiente, dentro de moldes seguros, desempenha papel primordial na gestão de um sistema sustentável para o fósforo (Seyhan et al., 2012).

O tratamento biológico de águas residuais fundamenta-se na capacidade que os micro-organismos têm em captar grandes quantidades de Pi, armazenando-o principalmente na forma de polifosfato (poli P) (Christensson et. al., 1998). Parte da remoção biológica do fósforo deve-se à atividade de bactérias de diversos gêneros, dentre elas: *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Bacillus* sp. e *Serratia* sp. (Lin-Lin et. al., 2007; Streinchan et. al., 1990).

Levando em consideração a reciclagem microbiológica de fósforo como uma alternativa viável aos processos clássicos de remoção desse elemento de águas residuais, é importante aprimorar a capacidade de armazenamento de Pi na forma de poli P em bactérias. De fato, já foram descritas linhagens modificadas de *E. coli* com capacidade de captar 10 vezes mais Pi e armazená-lo na forma de poli P (Hardoyo et. al., 1994; Kato et. al., 1993; Ohtake et. al., 1994).

4.2 Regulon PHO

O regulon Pho é um sistema de genes e operons envolvidos da captação e assimilação de compostos fosforados do meio, ou seja, é um regulador usado para a conservação e gestão de fosfato inorgânico dentro da célula. Foi descoberto pela primeira vez em *Escherichia coli* como um sistema operacional para a linhagem bacteriana e mais tarde foi identificado em outras espécies. (Wanner e Chang, 1987) O sistema Pho é composto por vários componentes, incluindo enzimas extracelulares e transportadores que são capazes de assimilar fosfato, além de extrair fosfato inorgânico de fontes orgânicas (Santos-Beneit, 2015). Este é um processo essencial, pois o fosfato desempenha um papel importante nas membranas celulares, expressão gênica e metabolismo celular.

Diante de baixa disponibilidade de nutrientes, o regulon Pho ajuda a célula a sobreviver e prospectar apesar do esgotamento de fosfato no ambiente, ou seja, esses genes são induzidos em condições de limitação de Pi (concentração de Pi externo < 4 μ M), e são regulados pelo sistema de dois componentes *PhoB/PhoR* (Hsieh e Wanner, 2010). Quando isso ocorre, os genes induzíveis por inanição de fosfato (PSI) ativam outras proteínas que auxiliam no transporte de fosfato inorgânico.

Em *E. coli*, o regulon Pho é formado por mais de 40 genes distribuídos em 9 unidades transcricionais, espalhadas aleatoriamente no cromossomo da bactéria (Neidhardt, 1996). Entretanto, a descoberta de novos genes que respondem ao estímulo de Pi indicam que a lista de genes pertencentes ao regulon Pho tende a aumentar (BaeK e Lee, 2006). Os membros do regulon Pho melhor estudados são: *PhoE*, uma purina específica para ânions (Korteland et. al., 1984); *FA*, uma fosfatase alcalina periplasmática (Torriani, 1960); o sistema *Ugp*, que forma um transportador específico de glicerol-3-fosfato (G3P) e de glicerolfosfodiésteres (Yang et. al., 2009); as proteínas envolvidas no transporte e utilização pelo operon *phn CDFGHIJKLMNOP* (Makino et. al., 1991); *PhoU* e as proteínas que formam transportador de Pi de alta afinidade, todas codificadas pelo operon *pst* e as proteínas *PhoB* e *PhoR*.

O *pst* além de participar da regulação de Pho, forma um sistema de transporte do tipo ABC (*ATP-binding cassette*). Sua atividade é exercida por meio das proteínas: *pstS*, uma proteína periplasmática de alta afinidade por Pi, *pstC* e *pstA*, duas proteínas integrais de membrana através das quais é conduzido Pi, e *pstB* uma ATPase associada a membrana citoplasmática, que hidrolisa ATP para gerar a energia para o transporte (Chan e Torriani, 1996).

Os genes que codificam as proteínas do transportador *pst* encontram-se agrupados formando um operon de cinco genes denominado operon *pst* (fig.3), destes, os quatro primeiros (*pstS*, *pstC*, *pstA* e *pstB*) codificam para um sistema de transporte de Pi de alta afinidade e o último gene codifica para a proteína *phoU*, cujo caráter é regulatório (Wanner, 1996). Esta é uma proteína associada a membrana citoplasmática e que não participa da captação de Pi.

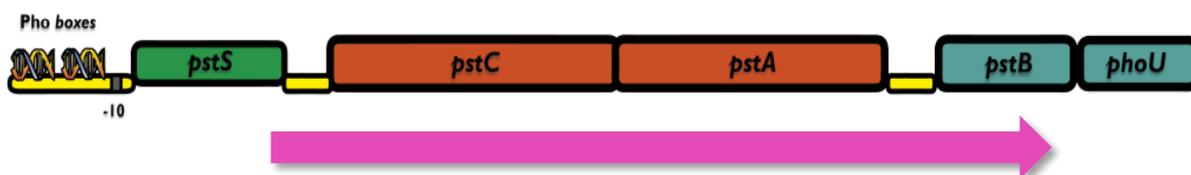


Figura 3: Organização dos genes do operon *pst* em *E. coli*. As duas *Pho box* e a sequência -10 a montante de *pstS* são apresentadas. A seta indica a direção de transcrição do operon. Fonte: Adaptado de Torriani-Gorini et. al., 1994.

A expressão dos genes do regulon *pho* é controlada pelo sistema de dois componentes *phoB/phoR*. *PhoR* é a histidina quinase sensora (Makino et. al., 1986) e *phoB*, que é regulador de resposta. Em *E. coli*, quando P_i está em excesso, *phoR*, que é uma proteína bifuncional, desfosforila *phoB*, inativando-a (Carmany et. al., 2003; Torriani-Gorini et. al., 1994).

Quando a concentração de P_i externo $< 4 \mu M$, *phoR* autofosforila-se e, em seguida, transfere o grupo fosforil a *phoB* (Makino et. al., 1989; Torriani-Gorini et. al., 1994). Uma vez fosforilada, *phoB* liga-se as regiões promotoras de genes que apresentam sequencias consenso características, conhecidas como *pho box*. A interação de *phoB* com o fator σ^{70} associado a RNA polimerase proporciona o início da transcrição desses genes (Makino et. al., 1988) O sistema simplificado de funcionamento do regulon PHO está disposto na figura 4.

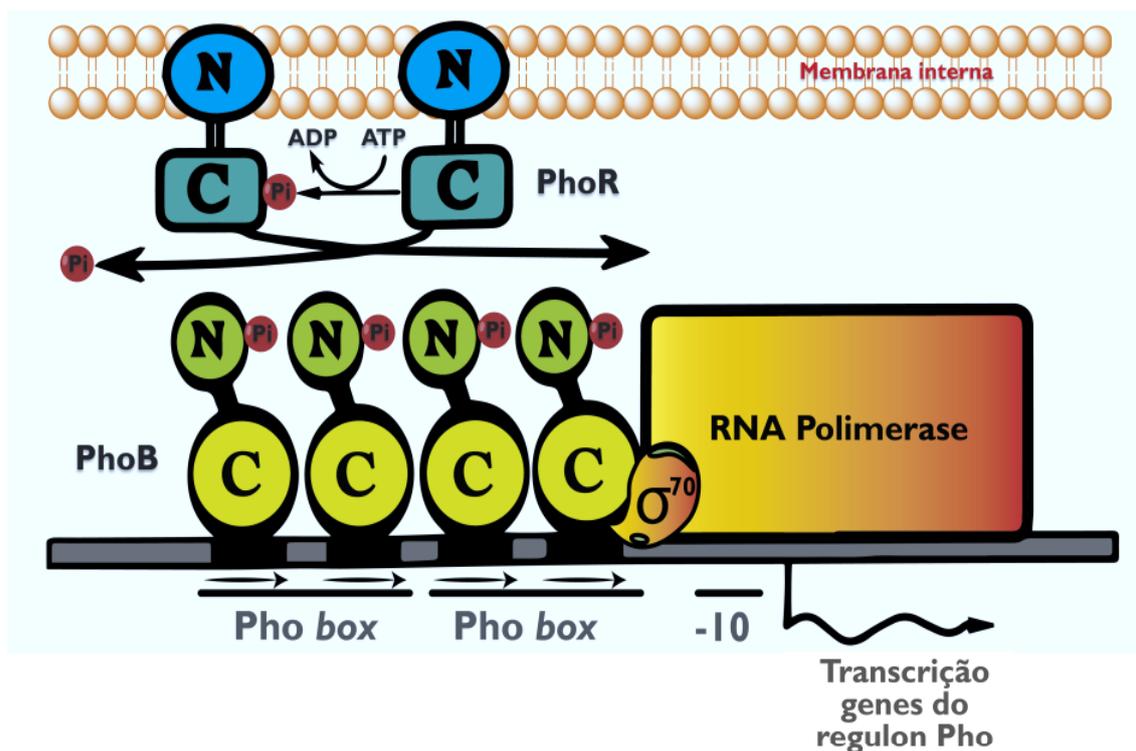


Figura 4: Processo de ativação/inativação de *phoB* por *phoR*, seguido de ativação dos genes do regulon *pho*. N e C representam regiões amino e carboxi-terminal de *phoB* e *phoR*. Em carência de P_i , *phoR* autofosforila-se, e fosforila *phoB*. A fosforilação de *phoB* aumenta sua afinidade as sequencias de *Pho box*, ativando a transcrição do gene pela interação com a RNA polimerase associada ao fator σ^{70} . Fonte: Adaptado de Torriani-Gorini et. al., 1994.

4.3 Sistema PIT (Phosphate Inorganic Transport)

Em *Escherichia coli* são conhecidos quatro sistemas de transporte de fosfato que podem ser classificados com base na especificidade ao substrato, bioenergética e critérios estruturais (Van Veen, 1997) (fig.5). O sistema PST e o sistema PIT são específicos para o fosfato inorgânico e são controlados pelo seu movimento.

O sistema PIT (phosphate inorganic transport) em *Escherichia coli*, é um sistema de baixa afinidade por Pi, é constituído por um canal transmembrana de alta velocidade de transporte e cuja expressão é constitutiva, ou seja, catalisa uma troca rápida entre o fosfato inorgânico externo e os pools de fosfato internos, incluindo alguns fosfatos de éster que estão em rápido equilíbrio com o pool interno de Pi. Ao contrário da captação energizada líquida, a troca de Pi ocorre em células com depleção de energia na presença de desacopladores e não é acompanhada pelo movimento de íons potássio. Na ausência de fosfato adicionado externamente, a saída de Pi das células é insignificante. O Km aparente para o Pi externo na reação de troca é de cerca de 7 mM (2 ordens de magnitude maior que a da captação energizada), mas a velocidade máxima é aproximadamente a mesma (Rosenberg et. al., 1981).

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 (Ahn et. al., 2005).

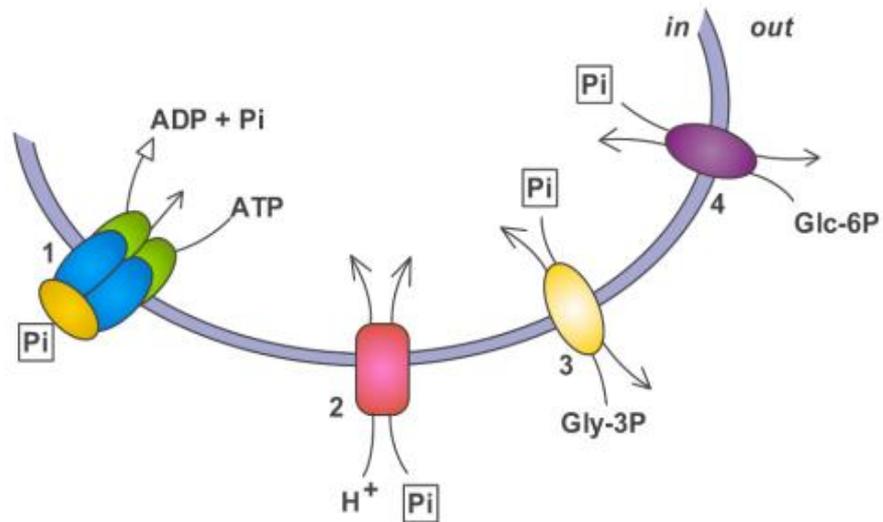


Figura 5: Representação esquemática de transportadores de fosfato em *E. coli*. 1) Sistema de transporte específico de fosfato inorgânico (PST); 2) Transportador de fosfato inorgânico (PIT); 3) Sistema antiporte de ligação ao fosfato *sn*-glicerol-3-fosfato; 4) Sistema antiporte de ligação ao fosfato Glicose-6-Fosfato. Fonte: Adaptado de Van Veen, 1997.

Existem mais dois sistemas de transporte de fosfato inorgânico mediados por troca iônica, onde o fosfato inorgânico é aceito como um análogo de um organofosfato, como os sistemas que transporta *sn*-glicerol-3-fosfato (GlpT) e o transportador de glicose-6-fosfato (UhpT) (Maloney et. al., 1990). Pit, GlpT e UhpT são considerados sistemas de transporte secundários. Pit funciona como um sistema simporte H^+ /soluto. GlpT e UhpT são sistemas antiporte que acopla a acumulação de açúcares fosfatados a liberação de fosfato sob condições fisiológicas (Sonna et. al., 1988). Pit, GlpT e UhpT não utilizam uma proteína ligadora periplasmática e aparentemente consistem em uma única proteína transmembrana (Eiglmeier et. al., 1987). O sistema pst, por outro lado, opera como um mecanismo de transporte primário, sua estrutura é mais complexa, envolvendo várias proteínas de membrana e também uma proteína ligadora de fosfato (Surin et. al., 1987).

4.4 Sistema PST (Phosphate Specific Transport)

Nos micro-organismos, podemos encontrar o elemento fósforo na estrutura de diversas moléculas, sendo um constituinte primordial de ácidos nucleicos, carboidratos complexos, proteínas modificadas e fosfolipídios. Também está associado a metabolismo energético, devido a presença de ligações fosfoanídricas de alta energia, como em moléculas de ATP, fosfoenolpiruvato e acetilfosfato (Neidhardt, 1996).

Como principal fonte de fósforo são conhecidos três tipos de compostos, fosfato inorgânico (Pi), organofosfatos e fosfonatos (Neidhardt, 1996). Independente da natureza química do elemento, seu processo de assimilação compreende duas etapas: a captação na qual atua algum tipo de transporte ativo, e o metabolismo no qual o Pi irá geralmente formar moléculas de ATP, que será utilizada como substrato em diversas rotas anabólicas e catabólicas, fig. 6.

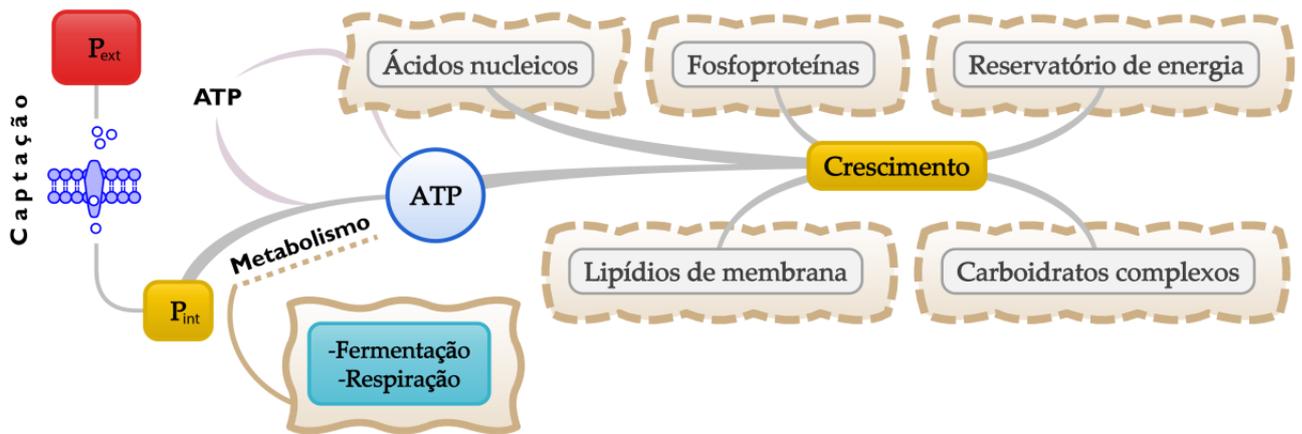


Figura 6: Processo de captação e assimilação de Pi ambiental nas bactérias. Fonte: Adaptado de Neidhardt, 1996.

Estudos em ambientes onde o Pi (fosfato inorgânico) é escasso revelaram a existência de um sistema alternativo altamente eficiente na captação de fosfato, PST (Phosphate Specific Transport), que ao contrário do sistema PIT (Phosphate Inorganic Transport), 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 (Santos-Beneit, 2015). A adaptação bacteriana ao crescimento em baixos níveis de Pi ambiental é realizado de forma coordenada pelos genes pertencentes ao regulon *Pho*, fig.7. O controle deste conjunto de genes por Pi extracelular representa o modelo de um sistema regulatório de dois componentes (Torriani-Gorini et. al., 1994).

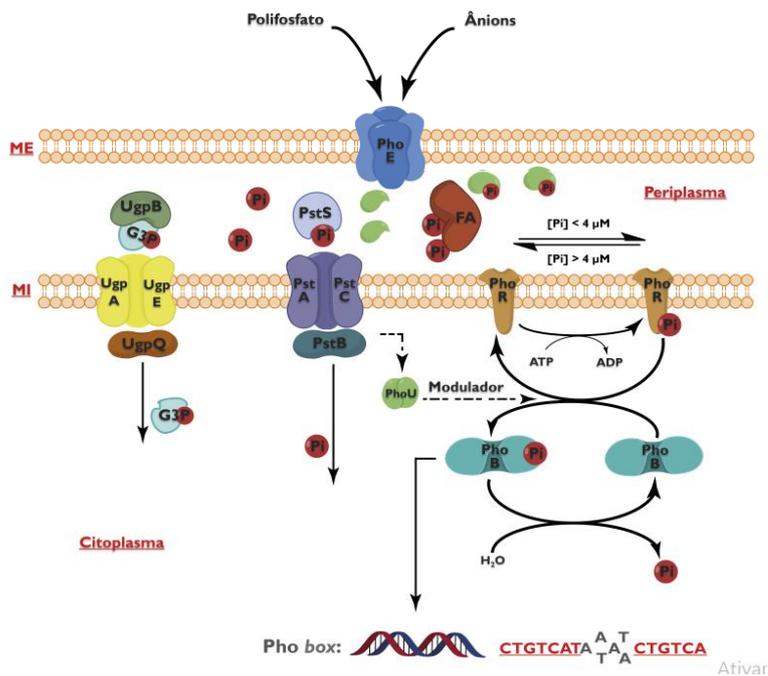


Figura 7: Estrutura e funcionamento de várias proteínas codificadas genes pertencentes ao regulon *Pho* de *E. coli*. *PhoE*, proteína específica para ânions, FA, fosfatase alcalina; *UgpB*, proteína periplasmática de ligação a G3P; *UgpA* e *UgpE*, canais intermembranais para o transporte de G3P; *UgpQ*, ATPase que catalisa o transporte de G3P; *PstS*, proteína periplasmática de ligação a Pi; *PstA* e *PstC*, canais intermembranais para o transporte de Pi; *PstB*, ATPase que catalisa o transporte de Pi; *PhoU*, produto do gene *phoU*; *PhoR*, histidina quinase, e *PhoB*, regulador de resposta. Fonte: Adaptado de Torriani-Gorini et. al., 1994.

O sistema PST de transporte pertence a grande família dos ABC transportadores, caracteriza-se por possuir uma alta afinidade com o fosfato inorgânico (Higgins et. al., 1990). A caracterização desse transportador em *E. coli* mostrou que é codificado por um operon policistrônico contendo cinco genes, sendo que quatro codificam os componentes estruturais do sistema de transporte, ou seja, 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 (Werner et al., 2017).

O primeiro cóstron consiste no gene *pstS* e codifica a proteína ligadora de fosfato, caracterizada pela alta afinidade e especificidade a esse íon. A jusante são encontrados os genes *pstA* e *pstC*, que são codificadoras de proteínas hidrofóbicas com seis hélices transmembranas e são responsáveis pela formação do poro pelo qual o fosfato atravessa após a ligação por *PstS*.

É necessário o movimento participativo das hélices de *PstA* e *PstC* para abrir e/ou fechar o canal de fosfato, “chave-fechadura”, isto é ativado pela isomeração cis-trans de dois pares de resíduos de cisteína energizadas pelo ATP hidrolisado por *PstB* (Webb et. al., 1992). *PstB* consiste na proteína ligadora de nucleotídeo, pois se liga ao ATP codificada pelo cóstron seguinte a *pstC* (fig.8). *Pst* interage com *PstA* e/ou *PstC* em sua face citoplasmática, e por analogia a outros sistemas ABC transportadores, provavelmente funciona como um dímero (Wanner, 1993).

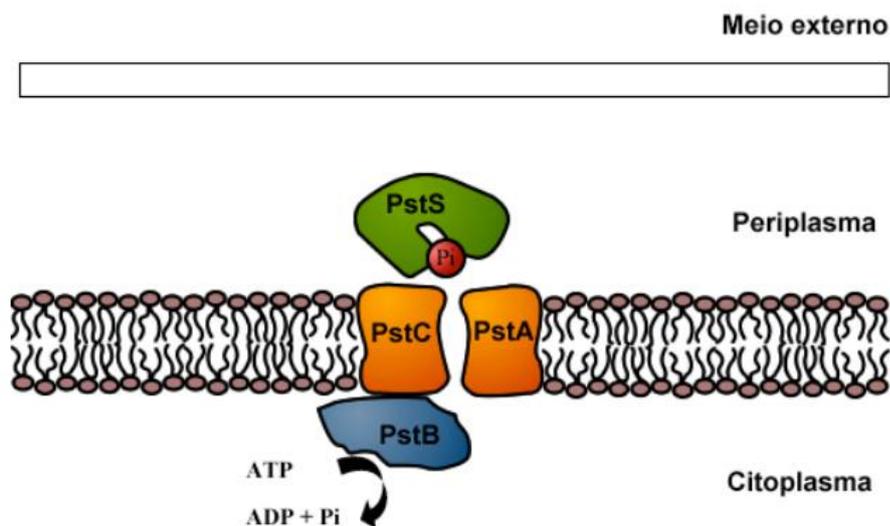


Figura 8: Modelo esquemático do sistema PST em *Escherichia coli*. Fonte: Adaptado de Dassa, 2000.

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 P_i , 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 P_i 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.

O conjunto de proteínas *pstSCAB* de alta afinidade foi historicamente estudado em *Escherichia coli*, *Streptomyces lividans* e *Bacillus subtilis* (Wanner, 1996; Sola-Landa et. al., 2003; Allnby et. al., 2004). Nessas bactérias, o sistema consiste em quatro proteínas *PstS*, *PstC*, *PstA* e *PstB*, mas em *Bacillus subtilis* existem duas cópias de *PstB* (*PstB1* e *PstB2*). Em *Streptomyces* e na maioria das outras bactérias, o sistema é organizado como um cassete de ligação de ATP (ABC) compreendendo quatro proteínas. O *PstS* que é uma proteína de ligação específica de fosfato ancorada no sítio externo da membrana em bactérias Gram-positivas, por exemplo, em *Mycobacterium bovis* ou *S. lividans* (Lefevre et. al., 1997; Wehmeier et. al., 2009; Esteban et. al., 2008), enquanto nas bactérias Gram-negativas está localizada no espaço periplasmático. *PstC* e *PstA* são proteínas integrais de membrana que formam um canal de membrana e *PstB* é uma proteína hidrolisadora de ATP que energiza o transporte de fosfato (Fig. 9).

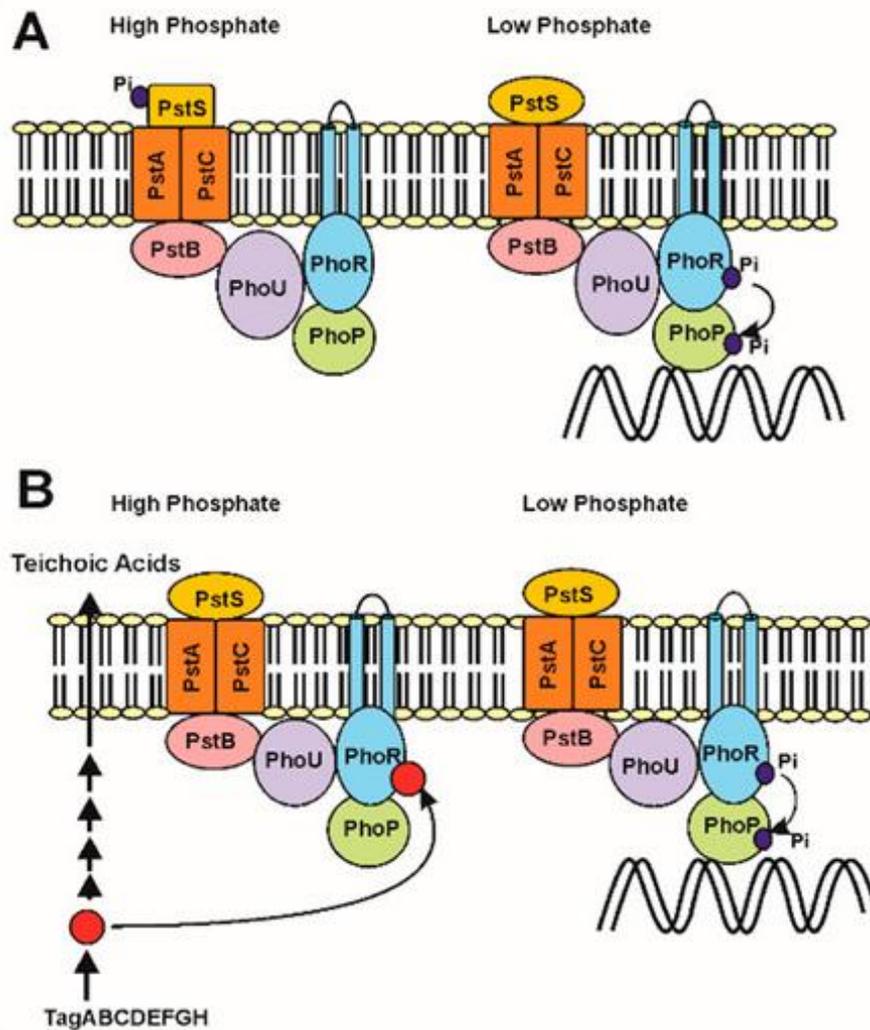


Figura 9: Transporte e sinalização de fosfato de acordo com as sete proteínas e os modelos intermediários do ácido teicóico. (A) O modelo de sete proteínas de Hsieh e Wanner, 2010. (lado esquerdo) Em condições repletas de fosfato, a proteína *PstS* liga-se ao fosfato e esta interação bloqueia a autofosforilação de *PhoR* e a subsequente fosforilação de *PhoP* evitando a ativação dos genes do regulon *Pho* (lado direito). Quando o fosfato é limitante, a conformação de *PstS* muda e desencadeia a cascata de fosforilação, resultando na fosforilação de *PhoP* e ativação do regulon *Pho*. (B) Proposta de modelo de regulação da cascata de fosforilação por um intermediário da biossíntese do ácido teicóico (círculo vermelho). Sob condições repletas de fosfato (lado esquerdo) o intermediário ácido teicóico acumula e inibe a atividade autoquinase de *PhoR*, bloqueando a cascata de fosforilação. Sob condições de limitação de fosfato (lado direito), o intermediário ácido teicóico não é acumulado (Martín-Martín et. al., 2018) e, portanto, a cascata de fosforilação prossegue ativando a expressão dos genes do regulon *Pho*. Fonte: Adaptado de Martín & Liras, 2021).

Diante da descoberta do sistema de dois componentes *PhoR-PhoB* e do sistema de transporte de fosfato *pstSCAB em E. coli*, foram propostos modelos para tentar entender qual é o mecanismo de detecção e, particularmente, a cascata de transdução que responde a diferentes concentrações de fosfato no espaço periplásmico (Martín e Liras, 2021). Hsieh e Wanner, 2010 elaboraram um modelo refinado no qual propuseram que sete proteínas interagem em nível de membrana, servindo para detectar a concentração de fosfato no caldo e então transmitir o sinal para controlar a expressão dos genes do regulon Pho.

Este modelo propõe que as quatro proteínas, *PstSCAB*, do sistema transportador ABC interagem com *PhoR-PhoB* e com o modulador de fosfato *PhoU*. Segundo os autores, dependendo da concentração de fosfato no caldo de cultivo, o transportador *Pst* encontra-se: (1) em estado ativo de sinalização e transportador (estado fechado) ou, (2) em estado em que atua como transportador, mas não transmite sinais (estado aberto). A mudança dependente da concentração de fosfato entre os dois estados, produzindo um rearranjo do complexo de sete proteínas na membrana celular, que sob condições de limitação de fosfato resulta na autofosforilação de *PhoR*, que por sua vez transfere o grupo fosfato para *PhoB*. Por fim, o *PhoB* fosforilado liga-se às sequências específicas nos promotores dos genes do regulon Pho, conforme observado na fig.9.

A montagem e anotação do genoma de *Streptomyces coelicolor* (Bentley et. al., 2008) permitiu identificar o operon *pstSCAB* que é conservado na maioria das espécies de *Streptomyces*. A expressão do cluster *pstSCAB* responde drasticamente à concentração de fosfato no meio e é estritamente dependente da ativação pelo regulador de fosfato *PhoP* (Sola-Landa et. al., 2005; Díaz et. al., 2005).

A deleção do gene *pstS* de *S. lividans* ou *S. coelicolor* prejudicou o transporte de fosfato e retardou a esporulação em meio sólido (Díaz et. al., 2005). Além da regulação pelo regulador *PhoP*, a formação da proteína *PstS* foi altamente aumentada em um mutante deficiente em polifosfato quinase (Díaz et. al., 2005; Esnault et. al., 2017) que catalisa, *in vitro*, a polimerização reversível do fosfato de ATP em polifosfato. Isto é provavelmente devido à regulação positiva de *phoR/phoP* observada na cepa mutante *ppk* (Ghorbel et. al., 2006). A formação de *PstS* aumenta significativamente em meios contendo frutose, galactose ou manose, sugerindo que o controle do operon *pstSCAB* é regulado tanto por fosfato inorgânico quanto por algumas fontes de carbono (Martín e Liras, 2021).

4.5 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 XIX, (fig. 10) 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.

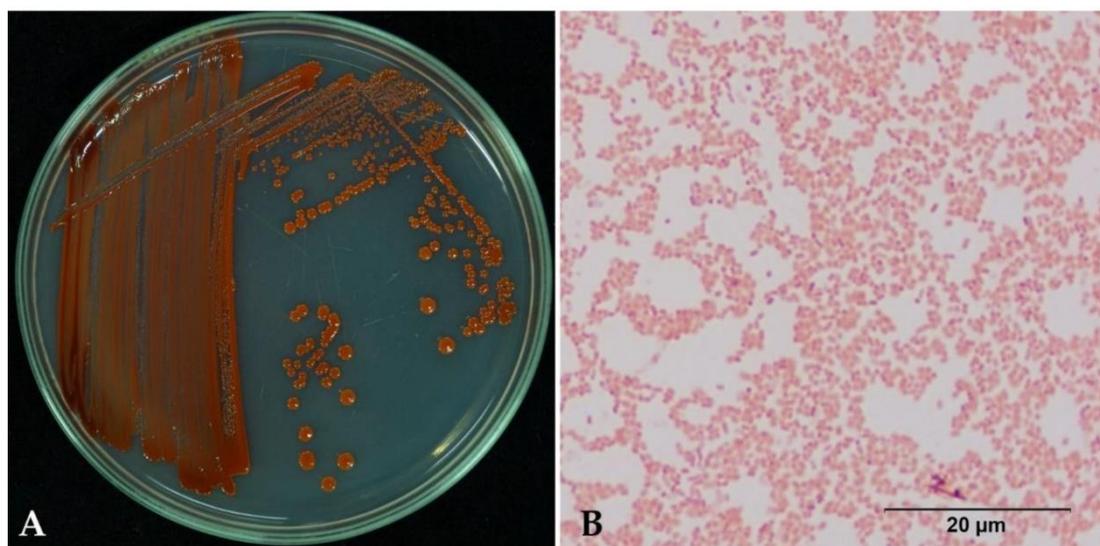


Figura 10: Exame macroscópico e microscópico de *Serratia marcescens*. (A) A morfologia da colônia em ágar de glicose nutriente. (B) Células em forma de bastonete observadas ao microscópio. Fonte: Keawmanee et. al., 2021.

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 et al., 2009).

Lee et. al., (2014) caracterizaram parcialmente o sistema PST da linhagem 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*. O *PhoU* é um regulador negativo da via de sinalização Pi e modula o transporte Pi através de proteínas de transporte Pi (*PstS*, *PstC*, *PstA* e *PstB*) através do sistema de dois componentes *PhoR* e *PhoB*. A inativação do *PhoY2*, um dos dois homólogos da *PhoU* em *Mycobacterium tuberculosis*, causa defeitos nos fenótipos de persistência e aumento da suscetibilidade a antibióticos e estresses. Apesar do importante papel biológico, o mecanismo da função *PhoU* ainda é desconhecido.

Lee et. al., (2009) analisaram a sequência de nucleotídeos mostrando a homologia nas sequências de aminoácidos entre a proteína *PstC* e *Yersinia* sp., *Vibrio* sp., e *Pseudomonas* sp. foram 49, 37 e 33%, respectivamente. A proteína *PstA* e *Yersinia* sp., *Vibrio* sp., e *Pseudomonas* sp. apresentaram homologia de 64, 51 e 47%, respectivamente. A proteína *PstB* e *Methanocaldococcus* sp., *E. coli* e *Mycoplasma* sp. apresentaram homólogos de 60, 50 e 48%, respectivamente. Os genes *pst* poderiam ser expressos *in vivo* e regulados positivamente pelo cAMP-CRP. A cepa *E. coli* que abriga o pPH7 plasmídeo, com genes *pst*, aumentou com o transporte de fosfato.

Hou et. al., (2021) utilizaram o banco de dados NCBI RefSeq para coletar 478 sequências de genomas inteiros para *Serratia marcescens*, variando de 1961 até 2019, para documentar tendências globais de resistência antimicrobiana (AMR) de longo prazo em populações de *S. marcescens*. No total, 100 subtipos genéticos AMR (16 tipos de genes AMR) foram detectados nos genomas das populações de *S. marcescens*. Identificaram 3 genes de resistência do núcleo nos genomas de *S. marcescens*, e uma alta diversidade de genes AMR foi observada nos genomas de *S. marcescens* representando um perigo crescente para a saúde pública. Corroborando dessa forma a grande importância do uso dessa ferramenta atualmente.

4.6 Montagem do genoma de *Serratia*

A montagem e contagem do genoma é uma ferramenta de vital importância em nosso ambiente de trabalho na atualidade. Recentemente foi proposto que a espécie *Serratia marcescens* compreende duas subespécies: *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* e *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis*. Na última espécie foi observada a presença de formação de endósporos. Diante da análise genômica, obtiveram como resultado que *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* não forma um clado distinguível pela indexação geral relacionada à genômica e árvore filogenômica (Doijad, S. e Chakraborty, T., 2019).

Esponaneamente, são encontrados em diversos nichos ambientais, sendo capaz de infectar animais e plantas. O surgimento e disseminação de estirpes multirresistentes, representam uma ameaça a saúde pública no mundo inteiro. Iguchi et al., (2014), caracterizaram o genoma completo de duas linhagens de *Serratia marcescens*, uma de um isolado clínico multirresistente e um isolado de inseto. Uma análise mais ampla com outras espécies de *Serratia* identificou um conjunto de aproximadamente 3.000 genes que caracterizam o gênero. Dentro dessa aparente diversidade genética, obtiveram a identificação de muitos genes implicados no alto potencial de virulência e resistência a antibióticos para a linhagem que foi obtida de um isolado clínico.

Mbelle et al., (2019) caracterizaram o genoma completo de uma linhagem clínica multirresistente isolada da urina de um paciente. Esse isolado, apresentou um tamanho de montagem do genoma de 4.832.624 pb com um teor de GC de 40,7%, um gene de replicase de plasmídeo A/C, quatro integrons/cassetes de genes, 17 genes de resistência e vários genes de resistência a metais pesados e virulência, confirmando como um patógeno humano. Essa linhagem foi resistente a todos os antibióticos testados, exceto amicacina, carbapenêmicos, cefotaxima-clavulanato, ceftazidima-clavulanato, cefoxitina e fosfomicina.

Abreo, E. e Altier, N., (2019), realizaram um estudo baseado em genomas publicamente disponíveis, para aplicar esquemas de tipo de sequência multilocus (MLST) de genoma inteiro para avaliar se havia uma associação entre fonte e genótipo, visando diferenciar entre isolados de fontes hospitalares e o ambiente, e entre linhagens relatadas como bactérias promotoras de crescimento em plantas (PGPR) de outras estirpes ambientais.

A maioria dos genomas de origem hospitalar e ambiental foi atribuída aos MLSTs hospitalares ou ambientais propostos, o que é indicativo de uma associação entre a fonte e o genótipo. O fato de que alguns genomas de uma fonte hospitalar mostraram um MLST ambiental sugere que uma minoria de estirpes hospitalares derivou recentemente do ambiente. Com relação as linhagens de PGPR foram atribuídas a diferentes tipos ambientais e clados, mas apenas um clado compreendeu estirpes acumulando um baixo número de determinantes associados a fatores de virulência e resistência a antibióticos e eram exclusivamente de fontes ambientais.

Desta forma, pode-se comprovar que o crescente uso do recurso de informação genômica ajudou a tirar conclusões preliminares sobre a diversidade e composição genética das populações de *Serratia marcescens* e sua adequação para uso como bactérias promotoras de crescimento em plantas (Abreo, E. e Altier, N., 2019).

Khan et. al., 2017, caracterizaram o genoma completo de uma linhagem de *Serratia marcescens* RSC-14 que estimula o crescimento das plantas e alivia o estresse do cádmio (CD) nas plantas hospedeiras. O genoma completo compreendeu um cromossomo circular de 5,12 Mbp de comprimento contendo 4.593 genes de codificação de proteínas previstos, 22 genes de rRNA, 88 genes tRNA e 41 pseudogenes. Além disso, a anotação usando NCBI e Anotação Rápida usando Tecnologia subsistema identificou vários genes que codificam enzimas antioxidantes, bem como genes envolvidos na produção antioxidante, apoiando a resistência observada em relação a metais pesados, como o CD.

A análise de genoma inteiro desta cepa esclareceu a base genética subjacente às suas características fenotípicas e bioquímicas, sustentando as interações benéficas entre a RSC-14 e as plantas.

Chung et al., 2013, conseguiram determinar a sequência completa do genoma de *Serratia marcescens*, que consiste em um cromossomo circular de 5.241.455 bp com um teor de GC de 59.6%. Essa linhagem, foi isolada de agregados de máquina de papel, é uma bactéria formadora de biofilmes e sob condições de limitação do fosfato, apresentou inibição intergênica de *Pseudomonas aeruginosa*.

Muyldearmans et al., 2021, comprovaram que o sequenciamento de genoma completo (WGS), é uma ferramenta promissora em investigações de surtos em unidades de terapia intensiva neonatal (UTINs), causadas por *Serratia marcescens* que é

incontestável por sua crescente resistência antimicrobiana e potencial para causar surtos em UTINs. Observaram, que tanto os neonatos quanto os drenos eram reservatórios de contaminação cruzada por *Serratia marcescens* pelas mãos de profissionais de saúde e pais. E só puderam chegar a essa conclusão, utilizando o WGS permitiu o reconhecimento mais rápido de um surto com mapeamento preciso da disseminação, facilitando a implementação de medidas de controle de infecção.

Considerando a importância da linhagem de *Serratia nevei* 9rpt1 (que é eficiente na captação de fosfato), que foi isolada e cedida gentilmente por Silva, M. S., (2017) tornou-se evidente a necessidade de montar, anotar o seu genoma e realizar um estudo *in silico* dos sistemas de captação de fosfato de *Serratia nevei* 9rpt1, tendo esses como objetivos de nosso trabalho.

5 METODOLOGIA

Reativação da *Serratia nevei* 9rpt1

A linhagem *Serratia nevei* 9rpt1, utilizada no presente trabalho, foi gentilmente cedida por Silva, M. S, que realizou seu isolamento no Rio Pretinho, na serra do Aracá. Esse isolado foi reativado no meio de cultura estéril Luria Bertani Ágar (LB – composição: 5 g Extrato de levedura, 1% Triptona, 0,5% Cloreto de sódio, 2% Ágar bacteriológico, pH 7,0). Após o esgotamento em estrias, as placas foram vedadas com filme PVC e incubadas em estufas bacteriológicas na temperatura de 28°C por um período de 24 horas, (Hitchins et al., 1992), conforme mostrado na fig.11.

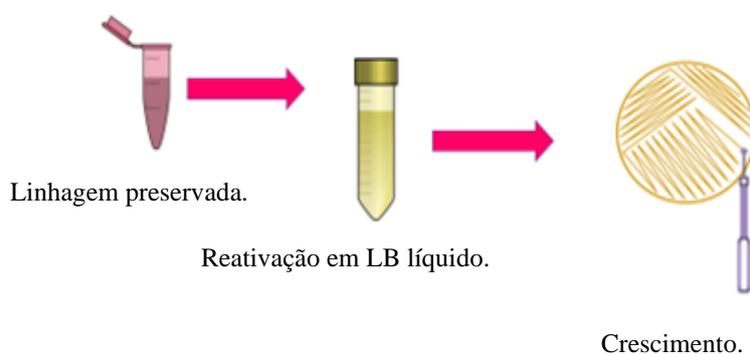


Figura 11: Reativação da linhagem *Serratia nevei* 9rpt1

Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada com o conjunto de reagentes Purelink® Genomic DNA (Invitrogen K1820-01). O produto da extração foi avaliado quanto à qualidade de quantidade por espectrofotometria (NanoDrop 2000c, Thermo). A integridade do material genético foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml).

Sequenciamento do genoma

O DNA genômico da *Serratia nevei* 9rpt1 foi preparado com Mini Kit de DNA Genômico PureLink® (Invitrogen™ by Thermo) e quantificado em Qubit™ 2.0 Fluorometer usando o kit dsDNA BR Assay (Invitrogen™ by Thermo). Um micrograma de cada DNA genômico foi enviado para o sequenciamento do genoma que foi realizado pela empresa Soluções em Biotecnologia (Rio de Janeiro, Brasil). Foi adquirido inserções curtas de DNA genômico de construção biblioteca e 2 Giga Bases de (150 leituras de extremidade emparelhada, Q30>80%) sequenciamento de genoma inteiro em um Sistema Illumina HiSeq 2500.

Montagem e anotação do genoma

A montagem do genoma foi realizada com o *SPAdes genome assembler* (3.15.4) disponíveis no Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC: <https://www.patricbrc.org>), e o genoma foi anotado pelo NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP). O genoma e a anotação foram depositados no GenBank sob o número de adesão JAMYWQ0000000000000000.

A anotação definitiva do genoma foi realizada pelo próprio pipeline de depósito do NCBI, em geral baseada nos algoritmos de alinhamento local associado às ferramentas de busca do próprio banco (BLAST).

As buscas por homologia do *pstSCAB* nos bancos de dados nucleotídeos foram realizadas utilizando-se a Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local (BLASTn) (Altschul et. al., 1990) com parâmetros padrão. A história evolutiva foi inferida usando o método De Probabilidade Máxima e o modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). A árvore de consenso bootstrap inferida a partir de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985) foi tomada para representar a história evolutiva dos táxons analisados (Felsenstein, 1985). Os ramos correspondentes a partições

reproduzidas em menos de 50% de réplicas de bootstrap são recolhidos. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap são mostrados ao lado dos ramos (Felsenstein, 1985). A árvore inicial para a busca heurística foi obtida automaticamente aplicando-se os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando o modelo Tamura-Nei e, em seguida, selecionando a topologia com valor de probabilidade logarítmico superior. Uma distribuição Gamma discreta foi usada para modelar as diferenças de taxa evolutiva entre os sites: 5 categorias + G, parâmetro = 0,3713. Esta análise envolveu 8 sequências completas de nucleotídeos do operon *pst*: *Serratia nevei* 9rpt1 e houve um total de 4688 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas em MEGA X (Felsenstein, 1985; Kumar et. al., 2018).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Serratia nevei 9rpt1 foi isolada a partir da coleta de água superficial do rio pretinho, na serra do Aracá, Barcelos/AM (0.8737 N 63.3397 W). O local é caracterizado por baixo teor de nutrientes, águas levemente ácidas (pH<5) e de baixa condutividade elétrica, o que reflete a pobreza em elementos alcalinos, alcalinos terrosos e nutrientes como fósforo. Tais características podem favorecer a seleção de um sistema mais eficiente de captação e e/ou síntese de polifosfato.

Segundo Silva (2017), a linhagem 9 rpt1 é capaz de assimilar 90% de todo o fosfato disponível no meio de cultivo, semelhante ao mutante *phoU* constitutivo (cedido gentilmente pelo Dr. Beny Spira, ICB/USP), portanto, deve ter um sistema eficiente de captação.

Serratia nevei é uma Gammaproteobacteria Gram-negativa, móvel e em forma de bastonete, recentemente reclassificada da subespécie *Serratia marcescens* (Cho et. al., 2020). É um micro-organismo aeróbio quimioorganotrófico encontrado em uma ampla gama de habitats, incluindo a água. São seis genomas, até o momento, depositados no GenBank, variando de 4,95 Mega Bases a 5,45 MB e conteúdo de GC% variando de 59,2% a 59,7%. O genoma preliminar de *Serratia nevei* abrange 5.302.788 pb e GC de 59,52%, consistente com seus genomas correlacionados. Foram anotados 5.094 Genes e destes, 4.885 são genes codificadores e 172 genes RNAs (Tabela 1). Existem 67 sequências de codificação (CDS) sem proteínas (definidas como pseudogenes) e também 5 matrizes CRISPR. A maior parte desses genes codificadores está relacionada ao metabolismo (n=968, 19,82%), seguido por energia (n=309, 6,33%), processamento de proteínas (n=252, 5,16%) e resposta ao estresse genes relacionados (n=246, 5,04%).

O operon *pst* é um tipo de sistema de resposta ao estresse, importante para a absorção de fósforo sob privação de Pi (Santos-Beneit, 2015). *Serratia nevei* 9rpt1 abriga uma cópia completa deste operon e uma segunda com apenas *pstA* e *pstB* anotados. A cópia completa é encontrada no contig 11 e abrange 4.552 pb da fita do complemento (JAMYWQ010000011.1). Os cinco genes estão na sequência do gene do operon canônico, i. e., *pstS* (1041 pb), *pstC* (957 pb), *pstA* (891 pb), *pstB* (777 pb) e *phoU* (735 pb). *PstS* é uma proteína de ligação ao substrato periplasmático, enquanto *PstA* e *PstC* são proteínas responsáveis por formar o canal de permease. *PstB* é uma proteína citoplasmática de ligação de ATP em sua função é hidrolisar ATP para

suportar o transporte ativo de fosfato através da membrana. *PhoU* é importante no processo de sinalização e regulação, porém o mecanismo detalhado ainda é desconhecido (Vuppada et. al., 2018).

Tabela 1: Montagem do genoma e recursos de anotação para *Serratia nevei* 9rpt1

Recurso de montagem	Parâmetros	Recurso de anotação	Parâmetros
Contigs	221	Total de genes	5,094
Conteúdo GC	59,52%	CDS	4,922
Contig L50	15	Genes de codificação	4,885
Contig N50	108,391	tRNA	82
Tamanho do genoma	5,302,788	rRNA completo	6, 60, 7 (5S, 16S, 23S)

O operon *pst* completo é muito semelhante a outros encontrados em *Serratia* spp., compartilhando pelo menos 98% de identidade com *Serratia marcescens*, 97% com *S. ureilytica*, *S. surfactantfaciens*, *S. nematodiphila*, entre outros, e cerca de 90% com *S. S. liquefaciens*, *S. quinovarans*, *S. rubidaea* e *S. odorifera*. A identidade entre o operon *Serratia nevei* 9rpt1 *pst* e *Escherichia coli* é de cerca de 80% (~96% da Cobertura da Consulta) e pouca similaridade ao pesquisar contra *Pseudomonas* spp (identidade < 80%; Cobertura da Consulta < 15%). A árvore filogenética ilustra esses achados, mostrando no ramo superior o grupo formado por *Serratia nevei* e *Serratia marcescens* e em direção à base, as espécies com menor similaridade (Fig. 12).

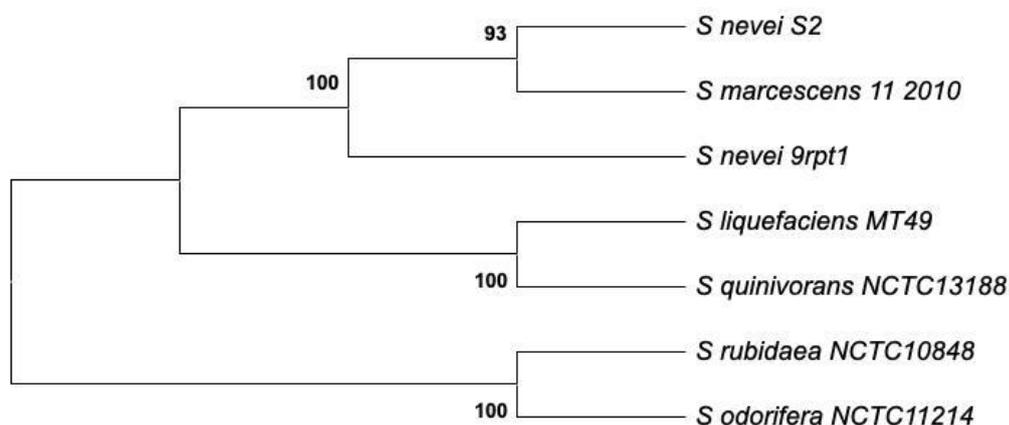


Figura 12: Análises filogenéticas aplicadas à história evolutiva de *Serratia* sp. operon *pst*

Os números dispostos próximos aos nós de ancestralidade comum representam a porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste de bootstrap.

No operon incompleto, faltam os genes *pstS*, *pstC* e *phoU* (JAMYWQ010000026.1). Como afirmado anteriormente, um padrão semelhante foi relatado em *Serratia marcescens* (Lee et. al., 2009), porém em seu trabalho *pstB* e os dois genes de permeases (*pstA* e *pstC*) foram encontrados. Mesmo faltando *PstS* e *PhoU*, as proteínas restantes são capazes de formar um sistema *pst* parcial viável. Em *Serratia nevei* 9rpt1 o operon *pst* incompleto é composto por *pstB*, *pstA* e uma subunidade permease do transportador ABC, semelhante a WP_013814090.1. Esses achados sugerem que, se ativa, a permease putativa pode substituir a função de *PstC* ausente, criando um canal funcional capaz de transportar Pi para dentro da célula. A hipótese de um segundo complexo de transporte funcional é corroborada pelo gene da polifosfato quinase 1 (*ppk1*), anotado a montante da suposta subunidade permease do transportador ABC.

A polifosfato quinase (EC número 2.7.4.1) é essencial na via anabólica do polifosfato, sob condições favoráveis, esta enzima catalisa a polimerização do polifosfato a partir do ATP (Brow & Kornberg, 2008), um armazenamento de energia e fosfato. Duas exopolifosfatases (EC número 3.6.1.11) também foram encontradas no genoma de *Serratia nevei* 9rpt1. Esta enzima é importante no catabolismo do polifosfato quando em condições adversas, a bactéria é capaz de mobilizar energia e ortofosfato deste biopolímero (Akiyama et. al., 1993).

Naturalmente, outros sistemas de captação de fosfato foram anotados no genoma de *S. nevei*: *pitA* (locus M6G53_19530, contig 33); *PhnCDE* (locus M6G53_04165, contig 3); e *glpT* (locus M6G53_12625, contig 15). Assim, *S. nevei* 9rpt1 é capaz de modular o metabolismo de Pi em função das condições ambientais, expressando os sistemas de baixa afinidade quando em suficiência de nutriente ou expressando o sistema de alta afinidade quando este se torna escasso.

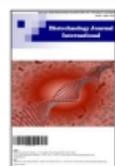
7 CONCLUSÕES

Serratia nevei 9rpt1 possui três sistemas de captação de fosfato de baixa afinidade, o gene *pitA*, *glpT* e operon *phn*.

Adicionalmente, possui o sistema de alta afinidade, o operon *pst*, sob controle do regulon PHO. Foram anotados um operon completo, contendo os genes canônicos: *pstABCSU*; e um incompleto, contendo apenas os genes *pstAB*.

S. nevei 9rpt1 também tem informação genética necessária para armazenar o ortofosfato em grânulos de polifosfato e, quando necessário, é capaz de catabolizar o polímero como fonte de energia e fosfato, por meio das enzimas polifosfato quinase 1 e fosfatase alcalina.

8 PRODUÇÕES NO PERÍODO



Biotechnology Journal International

26(3): 5-10, 2022; Article no.BJI.90552

ISSN: 2456-7051

(Past name: British Biotechnology Journal, Past ISSN: 2231–2927, NLM ID: 101616695)

Serratia nevei 9rpt1, a Potential Microorganism for Phosphorus Recovery

**Samara Ferreira Santos^a, Marcelo Santos Silva^a,
Tetsuo Yamane^b and Adolfo José Da Mota^a**

^a Laboratório de Biodegradação, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.

^b Escola Superior Da Ciências Da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. Author MSS performed the isolation test and micro determination of all the isolates. Author SFS performed the genome sequencing and molecular analyses of the study. Author TY proposed the null hypothesis, methodology for micro determination of residual phosphate and funded part. Author AJDM supervised all stages of the research. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/BJI/2022/v26i330175

Open Peer Review History:

This journal follows the Advanced Open Peer Review policy. Identity of the Reviewers, Editor(s) and additional Reviewers.

Figura 13: Artigo publicado de nosso projeto.

A publicação de nosso trabalho (fig. 13) foi para nós uma grande conquista, especialmente para mim, pois, tive a oportunidade única de ter o amparo e orientação do meu orientador, que em sua delicadeza, esforço e paciência me guiou nesse universo acadêmico e conduziu-me com estudo e uso dessas ferramentas da nova geração. Ensinando-me o que é montagem do genoma que consiste na sobreposição de pequenos pedaços de DNA, se obter pedaços cada vez maiores e, por fim, o genoma completo.

E aí começa o processo mais incerto e trabalhoso que é a anotação do genoma: identificando que sequencias são genes, promotores, transposomos, micro e macrostélites, e que sequencias não contém informações.

1 **Plant growth-promoting bacteria from an Amazonian native palm tree and its**
2 **potential to reduce aluminum saturation in soil and improve root growth in maize**¶

3 Lucas Smith PIMENTA^{1*}, Samára Ferreira SANTOS¹, Maria Carolina QUECINE³,
4 Adolfo José da MOTA¹, José Odair PEREIRA², João Lúcio de AZEVEDO³¶

5 ¹ Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Programa de Pós-graduação em
6 Biotecnologia, Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos 1200 – Bairro Coroado I,
7 Manaus, Amazonas, Brasil.¶

8 ² Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Faculdade de Ciências Agrárias, Av.
9 General Rodrigo Octávio Jordão Ramos 1200 – Bairro Coroado I, Manaus, Amazonas,
10 Brasil.¶

11 ³ Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo (ESALQ)

Figura 14: Artigo submetido de um membro da equipe.

Neste trabalho de nosso colega (fig.14), pude ajudar na coleta e isolamento de suas amostras, o que contribuiu muito para nosso conhecimento. O objetivo deste estudo foi prospectar, a partir da rizosfera da bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.), BPCPs capazes de reduzir o estresse por Al^{3+} em soja e milho. Um total de 207 isolados bacterianos foi obtido a partir das raízes e solo rizosférico (SR) da bacaba, dentre os quais 31 foram capazes de crescer após serem cultivados em meio Luria-Bertani (LB) com 14,8 mM $AlCl_3$ e pH 4.



Oral prevalence and antifungal susceptibility of *Candida* species in cystic fibrosis patients

Laura Soares Souto Lepesqueur ^a✉, Marcia Hiromi Tanaka ^a✉, Gabriela de Morais Gouvêa Lima ^a✉, Sonia Mayumi Chiba ^b✉, Adolfo José Mota ^c✉, Samára Ferreira Santos ^c✉, Cristiane Yumi Koga-Ito ^a✉

Show more

+ Add to Mendeley Share Cite

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104772>

[Get rights and content](#)

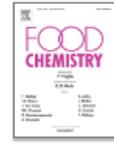
Abstract

Objective

This study aimed at assessing the oral prevalence of *Candida* species in cystic fibrosis patients and the antifungal susceptibility of the isolates.

Figura 15: Artigo publicado de uma parceria.

Neste trabalho, tive a grande oportunidade de aprender muito, pois fizemos identificação clássica e molecular de diversas *Candidas* sp. aprendi a utilizar a técnica de RFLP (Restriction fragment length polymorphism), que consiste em usar uma enzima de restrição *DdeI* tratando o DNA, seguido de eletroforese para separação dos fragmentos de acordo com o seu tamanho, corroborando com sua identificação molecular.



Non-thermal combined treatments in the processing of açai (*Euterpe oleracea*) juice

Ana Flávia A. Oliveira ^a, Josiana M. Mar ^b, Samara F. Santos ^c, Joel L. da Silva Júnior ^a, Ariane M. Kluczkovski ^d, Amr M. Bakry ^e, Jaqueline de Araújo Bezerra ^f, Rita de Cássia Saraiva Nunomura ^g, Edgar A. Sanches ^b, Pedro H. Campelo ^{a, b} ✉

Show more

+ Add to Mendeley Share Cite

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.081>

[Get rights and content](#)

Figura 16: Artigo publicado de uma parceria.

Neste trabalho (fig. 16) de um parceiro, pudemos ajudar nas avaliações dos parâmetros de qualidade do suco de açai processado com ultra-som, ozônio e contagens microbianas (bactérias mesofílicas, bolores e leveduras). Mostrando que os tratamentos com ozônio foram melhores para inativação microbiana e o ultrassom para inativação enzimática.

Uso de resíduos de abacaxi (*Ananas comosus*) e maracujá (*Passiflora edulis*) para a produção de bioplásticos por bactérias.

Oliveira R. C.¹, Santos J. P.¹, Santos S. F.², Mota A. J.³

¹ Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, ² Graduação em Ciências Biológicas, Centro Universitário do Norte – UNINORTE, ³ Professor, Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Emails: cintra.rc@gmail.com, jocelia.p.santos@gmail.com, samara_venture@yahoo.com.br, adolfo.mot@gmail.com

Resumo

Os polihidroxicarboxilatos (PHAs), biopolímeros armazenados por bactérias como fontes de carbono, são alternativas viáveis aos polímeros petroquímicos, usados como matéria-prima para os plásticos convencionais, porque possuem propriedades termoplásticas semelhantes, porém são biodegradáveis. Contudo, o alto custo dos substratos para a sua produção é um fator limitante. Por outro lado, o descarte inadequado de resíduos de alimentos, provenientes de empresas alimentícias, gera impactos socioambientais, além do desperdício energético, uma vez que esses resíduos são fontes ricas de carbono. No intuito de solucionar os problemas com o descarte inapropriado de resíduos, e diminuir os custos da produção de PHA, é proposto nesse trabalho um processo de reaproveitamento dos resíduos agroindustriais, provenientes das empresas de alimentos de Manaus-AM, como fonte de carbono para produção de PHA. Foram testadas diversas formulações de meio de cultivo acrescido de resíduos de abacaxi e maracujá e o acúmulo de PHA foi monitorado pelo corante vermelho do nilo. Os meios adaptados com resíduos de abacaxi e maracujá apresentaram grande potencial para a produção de PHA, sobretudo o meio de abacaxi na concentração de 2% (m/v).

Figura 17: Capítulo de livro de nossa equipe.

No presente trabalho (fig. 17), conseguimos publicar um capítulo no livro: Diversidade Microbiana da Amazônia. 2ed. Manaus: INPA, 2017, v. 2. Foi uma oportunidade muito gratificante, pois após tantos anos trabalhando na área de micro-organismos, só pude ter essa oportunidade com meu orientador e guia nesse doutorado. Neste trabalho, conseguimos obter bons resultados utilizando resíduos de abacaxi, com o intuito de solucionar problemas com o descarte inapropriado e diminuir custos na produção de PHA (polihidroxicarboxilatos).

Análise comparativa de captação de fosfato usando bactérias isoladas do rio Negro e rio Solimões

Nonato L. da S.¹, Nascimento N. J. C. do², Silva M. da S.³, Santos S. F.⁴, Mota A. J.⁵

¹ Graduanda de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, ² Graduanda de Zootecnia da Universidade Federal do Amazonas, ³ Mestrando de Biotecnologia na Universidade Federal do Amazonas, ⁴ Pesquisadora da Universidade Federal do Amazonas, ⁵ Docente da Universidade Federal do Amazonas.

E-mails: luana_nonato@hotmail.com, natasha.jamily@hotmail.com, smarcelo1@hotmail.com, samara_venture@yahoo.com.br, adolfo.mot@gmail.com

Resumo

O fósforo é um dos elementos mais importantes para os seres vivos por ser constituinte de várias moléculas essenciais sem as quais não existiria vida. Porém, há uma possível crise desse elemento, devido à grande exploração de suas jazidas. Apesar de finito, o fósforo pode ser reciclado através de processos químicos e biológicos, sendo este último empregando microrganismos. Estudos limnológicos mostram que há uma diferença de riqueza e limitação desse nutriente entre os rios Solimões e Negro, respectivamente. Logo, a hipótese que naturalmente surge é que a pressão seletiva do rio Negro selecione captadores eficientes de fosfato. O objetivo foi comparar a capacidade de captação de fosfato entre as cepas isoladas dos dois rios. Foram isoladas 756 bactérias desses ambientes e até o momento foi possível testar 55 isolados usando um meio de cultura salino e com baixa concentração de fosfato. A mensuração da captação de fosfato foi feita por diferença de concentração do elemento existente no meio de cultura no início do experimento menos a concentração residual depois do cultivo. De forma qualitativa foi possível observar que houve uma maior prevalência de bactérias eficientes na captação de fosfato isoladas a partir do rio Negro.

Figura 18: Capítulo de livro de nossa equipe.

No presente trabalho (fig. 18), conseguimos publicar novamente um capítulo no livro: *Diversidade Microbiana da Amazônia*. 2ed. Manaus: INPA, 2017, v. 2. Foi uma oportunidade muito gratificante, pois após tantos anos trabalhando na área de microrganismos, só pude ter essa oportunidade com meu orientador e guia nesse doutorado. O objetivo do projeto foi comparar a capacidade de captação do fosfato entre isolados dos Rios Negro e Solimões, usando meios de cultura salino e com baixa concentração de fosfato.



Yeasts from the nests of two Amazonian stingless bees: screening and PCR-RFLP molecular analysis

Sabrina da Fonseca Meireles¹ · Samára Ferreira dos Santos² · Míriam Silva Rafael³ · Adolfo José da Mota⁴ · Carlos Gustavo Nunes da Silva⁵

Received: 12 December 2021 / Accepted: 28 July 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

Abstract

The Amazonian Forest hosts a great diversity of stingless bees. The Tropical Amazonian climate – moist and hot – favors the development of a diverse mycobiota associated with them, which is largely unknown. We isolated and identified yeasts associated with the nests of *Melipona interrupta* and *Cephalotrigona femorata*, which are native to the Central Amazonia. The yeasts were cultured on YPD and screened with a BD™ CHROM-agar™ *Candida* medium (CHROM-agar). Isolates with the same color pattern were identified based on the sequencing of the hypervariable domains from rRNA *loci* (ITS1/2 and 28 S rRNA D1/D2) and the *Dde* I restriction pattern targeting 3Kb amplicons from the same *loci* via the PCR-RFLP method. We isolated 532 yeasts from the nests of pollen, honey, larval food, and cerumen, which were grouped into 15 color and restriction pattern. The 15 strains belonged to the genera: *Aureobasidium*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hyphopichia*, *Hanseniaspora*, *Kodamaea*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Wickerhamiella*, and *Zygosaccharomyces*. The combined use of the YPD cultivation method and CHROM-agar medium screening allowed the identification of the diverse community of yeasts associated with these stingless bees, while *Dde* I restriction pattern analysis enabled the discrimination of the strains in 15 different yeast groups and can serve as a model for further studies.

Keywords Beehive · CHROM-agar · *Dde* I · Restriction fragment · Social insects

Ati
Ace

Figura 19: Artigo publicado de um membro da equipe.

Neste presente projeto (fi.19), foi proposto identificar leveduras associadas ao ninho de duas abelhas nativas da Amazônia e estabelecer um banco de linhagens amazônicas de referência. Os procedimentos metodológicos adotados foram: isolamento em YPD, triagem em CHROMágar para separação dos isolados em grupos de cores, extração de DNA, triagem de padrões moleculares por PCR/RFLP baseado na amplificação das regiões 18S, ITS1-5,8S-ITS2 e D1/D2 do gene 26S rRNA e digestão do amplicon com a enzima *Dde* I e sequenciamento dos amplicons dos diferentes padrões obtidos na RFLP e a identificação mediante comparação das sequências obtidas contra os bancos de dados de sequências nucleotídicas do consórcio INSDC, com auxílio da ferramenta BLASTN.

9 BIBLIOGRAFIA DE REFERÊNCIA

Abreo, E. & Altier, N. **Pangenome of *Serratia marcescens* strains from nosocomial and environmental origins reveals different populations and the links between them.**, 2019.

Ahn, S. J.; Lemos, J. A. & Burne, R. A. **Role of HtrA in growth and competence of *Streptococcus mutans* UA159.** Journal of Bacteriology. v. 187, n.9, p. 3028-3038, 2005.

Akiyama, M.; Crooke, E. & Kornberg, A. **An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon.** Journal of Biological Chemistry, v. 268, n. 1, p. 633-639, 1993.

Allenby, N. E.; O'Connor, N.; Pragai, Z.; Carter, N. M.; Miethke, M. & Engelmann, S. **Post-transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* pst operon encoding a phosphate specific ABC transporter.** Microbiology, v. 150, p. 2619–2628, 2004.

Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. & Lipman, D. J. **Basic local alignment search tool.** Journal of Molecular Biology. 215(3):403-10, 1990.

Anba, J.; Bidaud, M.; Vasil, M. L. & Lazdunski, A. **Nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* phoR gene, the regulatory gene for the phosphate regulon.** Journal of Bacteriology, v. 172, n. 8, p. 4685-4689, ago. 1990.

Beard, S. J; Hashim, R.; Binet, G. W.; Hughes, M. R. & Poole R. K. **Evidence for the transport of zinz inos via the pit inorganic phosphate transport systems in *Echerichia coli*.** FEMS Miicrobiology Letters, v, 184, n2, p 231-235, 2000.

Baek, J. H. & Lee, S. Y. **Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*.** FEMS Microbiology Letters, v. 264, n. 1, p. 104-109, 2006.

Bentley, S. D.; Chater, K. F.; Cerdeño-Tárraga, A. M.; Challis, G. L.; Thomson, N. R.; James, K. D. & Hopwood, D. A. **Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)** Nature, v. 417, p. 141–147,2002.

BCR: Bolsa de Comercio de Rosario, Informativo semanal. Mercados. **Demandantes y exportadores de fertilizantes en el mundo.** 18/06/2021.

Brown, M. R. & Kornberg, A. **The long and short of it - polyphosphate, PPK and bacterial survival.** Trends Biochem.;33(6): 284–90, Sci. 2008

Chan, F. Y. & Torriani, A. ***PstB* protein of the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli* is an ATPase.** Journal Bacteriol, v.178, p. 3974-3977, 1996.

Christensson, M.; Blackall, L. L. & Welander, T. Metabolic transformations and characterisation of the sludge community in an enhanced biological phosphorus removal system. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 49, n. 2, p. 226-234, fev. 1998.

Cho, G.S.; Stein, M.; Brinks, E.; Rathje, J.; Lee, W.; Suh, S, H. & Franz, C. M. A. P. ***Serratia nevei* sp. nov. and *Serratia bockelmannii* sp. nov., isolated from fresh produce in Germany and reclassification of *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* *ajithkumar* et al. 2003 as a later heterotypic synonym of *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*.** Systematic and Applied Microbiology.; 43(2):126055. Available:<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126055>. 2020.

Chouayekh, H. & Virolle, M. J. The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibiotic production in *Streptomyces lividans*. Mol. Microbiol, v. 43, p. 919–930. 2002.

Chung, W. C.; Chen, L. L.; Lo, W. S.; Kuo, P. A.; Tu, J. & Kuoa, C. H. Complete genome sequence of *Serratia marcescens* WWW. 2013.

Cordell, D. & White, S.; **Sustainability** 2011.

Cordell, D.; Drangert, J.-O. & White, S.; **Global Environ.** Change 2011.

Cordell, D.; Rosemarin, A.; Schroder, J. J. & Smit, A. L. **Chemosphere** 2011.

Cramer, C. L. & Davis, R. H. **Polyphosphate-cation interaction in the amino containing vacuoles of *Neurospora crassa*.** Journal of Biology and Chemistry p. 259, 5452-5157, 1994.

Dairy Science: **Food technology. polyphosphate in microorganisms.** 2005.

Dassa, E. **ABC transport.** In: Leddenberg, J. Encyclopedia of microbiology. v.1, p. 1-12, 2000.

Díaz, M.; Esteban, A.; Fernández-Ábalos, J. M. & Santamaría, R. I. **The high-affinity phosphate-binding protein *PstS* is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans*.** Microbiology, v. 151, p. 2583–2592, 2005.

- Diniz, F. **Novas ferramentas genômicas mudam a cara do melhoramento genético.** Embrapa, 2017.
- Docampo, R. **Acidocalcisomes and polyphosphate granules.** Microbiol Monogr. P. 19, 2006.
- Doijad, S. & Chakraborty, T. **Genome-based analyses indicate that *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* and *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* do not merit separation to subspecies status.**, Microbiology Society, 2019.
- Durr, M.; Urech, K.; Boller, T.; Schwwenche, J. & Negy, M. **Sequestration of arginine by polyphosphate in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*.** Archivess microbiology 121, 169-175. 1979.
- Eiglmeier, K.; Boos, W. & Cole, S. T. **Nucleotide sequence and transcriptional startpoint of the *glpT* gene of *Escherichia coli*: extensive sequence homology of the G-3-P transport protein with components of the H-6-P transport system.** Molecular Microbiology., v. 1, p. 251-258, 1987.
- Esnault, C.; Dulermo, T.; Smirnov, A.; Askora, A.; David, M.; Deniset-Besseau, A. & Virolle, M. J. **Strong antibiotic production is correlated with highly active oxidative metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145.** v.7, p. 200. Sci Rep. 2017.
- Esteban, A.; Díaz, M.; Yepes, A. & Santamaría, R. I. **Expression of the *pstS* gene of *Streptomyces lividans* is regulated by the carbon source and is partially independent of the PhoP regulator.** BMC Microbiol. v. 8, p. 201. 2008.
- Felsenstein, J. **Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.** Evolution. 39:783-791. 1985.
- Ghorbel, S.; Smirnov, A.; Chouayekh, H.; Sperandio, B.; Esnault, C.; Kormanec, J. & Virolle, M. J. **Regulation of *ppk* expression and in vivo function of Ppk in *Streptomyces lividans* TK24.** J. Bacteriol. v. 188, p. 6269–6276. 2006.
- Grimont, F. & Grimont, P. A. D. **Genus *Serratia*. Procariotes.** V. 6, p.219–244, 2006.
- Hardoyo; Yamada, K.; Shinjo, H.; Kato, J. & Ohtake, H. **Production and release of polyphosphate by a genetically engineered strain of *Escherichia coli*.** Applied and Environmental Microbiology, v.60, n. 10, p. 3485-3490, out. 1994.

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.

Hou, J.; Mao, D.; Zhang, Y.; Huang, R.; Li, L.; Wang, X. & Luo, Y. **Long-term spatiotemporal variation of antimicrobial resistance genes within the *Serratia marcescens* population and transmission of *S. marcescens* revealed by public whole-genome datasets**. DOI:10.1016/j.jhazmat. 127220. 2021.

Hsieh, Y. J. & Wanner, B. L. **Global regulation by the seven-component Pi signaling system**. Current Opinion in Microbiology, p. 1-6, fev. 2010.

IFA. International Fertilizer Association. **COVID-19 and Beyond: Responsible Plant Nutrition for Food Security and Human Health**. París: International Fertilizer Association, 2021.

IFA International Fertilizer Association. **Fertilizer Outlook 2020 – 2024**. París: International Fertilizer Association, 2020.

Iguchi, A.; Nagaya, Y.; Pradel, E.; Ooka, T.; Ogura, Y.; Katsura, K.; Kurokawa, K.; Oshima, K.; Hattori, M.; Parkhill, J.; Sebahia, M.; Coulthurst, S. J.; Gotoh, N.; Thomson, N. R.; Ewbank, J. J. & Hayashi, T. **Genome evolution and plasticity of *serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen**. 2014.

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

Kamatani, Y.; Okada, Y.; Kubo, M.; Matsuda, K.; Hirata, M.; Ikegawa, S.; Iwata, N.; Ikeda, M.; Momozawa, Y.; Matoba, N.; Takahashi, A.; Akiyama, M. & Kanai, M. **Catalytic activity profile of polyphosphate kinase 1 from *Myxococcus xanthus***. Curr Microbiol. 379-385p., 2018.

Kato, J.; Yamada, K.; Muramatsu, A.; Hardoyo, & Ohtake, H. **Genetic improvement of *Escherichia coli* for enhanced biological removal of phosphate from wastewater**. DOI: 10.1128/aem.59.11.3744-3749. 1993.

Keawmanee, P.; Rattanakreetakul, C. & Pongpisutta, R. **Microbial Reduction of Fumonisin B1 by the New Isolate**. Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand. 2021.

Khan, A. R.; Park, G. S.; Sajjad Asaf, S.; Sung-Jun Hong, S. J.; Jung, B. K. & Shin, J. H. **Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants**. School of Applied Biosciences, College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu, Republic of Korea, & Department of Plant and Microbial Biology, University of California, Berkeley, CA, United States of America, 2017.

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.

Korteland, J.; Degraaff, P. & Lugtenberg, B. ***PhoE* protein pores in the outer membrane of *Escherichia coli* k-12 not only have a preference for Pi and Pi-containing solutes but are general anion-preferring channels**. Biochimica Et Biophysica Acta, v. 778, n. 2, p. 311-316, 1984.

Kulaev, I. S.; Vagabov, V. M. & Kulakovskaya, T. V. **A bioquímica de polifosfatos inorgânicos**. 2^a ed. West Sussex, Inglaterra. 2005.

Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C. & Tamura, K. **MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms**. Molecular Biology and Evolution. 35:1547-1549. 2018.

Kumar, S; Stecher, G; Li, M; Knyaz, C. & Tamura, K. **MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms**. Molecular Biology and Evolution. 35:1547-1549. 2018.

Lee, K; Jung, J.; Kim, K.; Bae, D. & Lim, D. **Overexpression of outer membrane protein OprT and increase of permeability in *phoU* mutant of toluene-tolerant bacterium *Pseudomonas putida* GM730**. The Journal of Microbiology, v. 47, n. 5, p. 557-562, out. 2009.

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.

Lee, S. J.; Lee, Y. S.; Lee, S. C.; Park, I. H.; Ahn, S. C. & Choi, Y. L. **Molecular Cloning and Analysis of Phosphate Specific Transport (pst) Operon from *Serratia marcescens* KCTC 2172.** Department of Biotechnology, College of Natural Resources and Life Science, Dong-a University, Busan 604-714, South Korea & School of Medicine, College of Medicine, Pusan National University, Busan 602-735, South Korea Received March 4, 2009 /Accepted March 23, 2009.

Lefevre, P.; Braibant, M.; de Wit, L.; Kalai, M.; Roeper, D.; Grotzinger, J. & Content, J. **Three different putative phosphate transport receptors are encoded by the *Mycobacterium tuberculosis* genome and are present at the surface of *Mycobacterium bovis* BCG.** Journal Bacteriol. v. 179, p. 2900–2906. 1997.

Lin-Lin, Bao; Dong Li; Xiang-kun Li; Rong-xin Huang; Jie Zhang; Yang L. V. & Guang-qing Xia. **Phosphorus accumulation by bacteria isolated from a continuous-flow two-sludge system.** Journal of Environmental Sciences, v. 19, n. 4, p. 391-395, 2007.

Makino, K.; Kim, S. M.; Shinnagawa, H.; Amemura, M. & Nakata, A. **Molecular analysis of the cryptic and funcional phn operons for phosphate use in *Escherichia coli* k-12.** Journal of Bacteriology, v. 173, n. 8, p. 2665-2672, abr. 1991. DOI:10.1128/jb.173.8.2665-2672.1991.

Maloney, P. C.; Ambudkar, S. V.; Anantharam, V.; Sonna, L. A. & Varad-Hachary, A. **Anion-exchange mechanisms in bacteria.** Microbiology Review, v. 54, p.1-17, 1990.

Martín-Martín, S.; Rodríguez-García, A.; Santos-Beneit, F.; Franco-Domínguez, E.; Sola-Landa, A. & Martín, J. F. **Self-control of the PHO regulon: The PhoP-dependent protein PhoU controls negatively expression of genes of PHO regulon in *Streptomyces coelicolor*.** Journal Antibiotics. v.71, p. 113–122. 2018.

Martín, J. F. & Liras, P. **Molecular Mechanisms of Phosphate Sensing, Transport and Signalling in *Streptomyces* and Related Actinobacteria.** Department of Molecular Biology, Microbiology Section, University of León, 24071 León, Spain. Int. J. Mol. v. 22, p.1129, doi.org/10.3390/ijms22031129. Sci. 2021.

Mbelle, N. M.; Sekyere, J. O.; Amoako, D. G.; Maningi, N. E.; Modipane, L.; Essack, S. Y. & Feldman, C. **Genomic analysis of a multidrug-resistant clinical *Providencia rettgeri* (PR002) strain with the novel integron In1483 and an A/C plasmid replicon.** 2019.

Muyldermans, A.; Crombé, F.; Bosmans, P.; Cools, F.; Piérard, D. & Wybo, I. **Serratia marcescens outbreak in a neonatal intensive care unit and the potential of whole-genome sequencing.** 2021.

Neidhardt, F. C. ***Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium***: Cellular and Molecular Biology 2. Washington, D. C., USA: American Society for Microbiology, 1996.

Ohtake, H.; Yamada, K.; Hardoyo; Muramatsu, A.; Anbe, Y.; Kato, J. & Shinjo, H. **Genetic approach to enhanced biological phosphorus removal.** Water Science and Technology, v. 30, n. 6, p. 185-192, 1994.

Pantano, G.; Grosseli, G. M.; Mozeto, A. A. & Fadini, P. S. **Sustainability in phosphorus use: a question of water and food security.** 2016.

Pasek, M. A.; Harnmeijer, J. P.; Buick, R.; Gull, M.; & Atlas, Z. **Evidence for reactive reduced phosphorus species in the early Archean ocean.** Proc Natl Acad Sci U S A 110: 10089-10094, 2013.

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.

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

Rosenberg, H.; Russell, L. M.; Jacomb, P. A. & Chegwidan, K. **Phosphate Exchange in the Pit Transport System in *Escherichia coli*.** Department of Biochemistry, John Curtin School of Medical Research, Australian National University, Canberra City, A.C.T., 2601 Australia. 1981.

Santos-Beneit, F. **The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria.** Frontiers in Microbiology. DOI=10.3389/fmicb.2015.00402. 2015.

Seyhan, D.; Weikard, H. & Ierland, E.; **Resour.** Conserv. Recycl. 2012

Silva, M. S.: **Caracterização do sistema PST em *Serratia marcescens***. Dissertação. PPG-BIOTEC, 2017.

Sola-Landa, A.; Moura, R.S. & Martín, J.F. **The two component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans***. Proc. Natl. Acad. Sci. v. 100, p. 6133–613. USA 2003.

Sola-Landa, A.; Rodríguez-García, A.; Franco-Domínguez, E. & Martín, J. F. **Binding of PhoP to promoters of phosphate regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: Identification of PHO boxes**. Mol. Microbiol. v. 56, p. 1373–1385. 2005.

Sonna, L. A.; Ambudkar, S. V. & Maloney, P. C. **The mechanism of glucose 6-phosphate transport by *Escherichia coli***. Journal of Biological Chemistry, v. 263, n. 14, p. 6625-6630, 1988.

Souza, M. F. J.; Attias, M. & Gomes, F. M. **Comparação de metodologias de extração e quantificação de polisfosfato inorgânico em sistemas biológicos**. 2021.

Surin, B. P.; Cox, G. B. & Rosenberg, H. **Molecular studies on the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli***. In: Torriani-Gorini, A.; Rothman, F. G.; Silver, S.; Wright, A. & Yag-il, E. **Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in Microorganisms**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p. 145-149, 1987.

Streichan, M.; Golecki, J. R. & Schön, G. **Polyphosphate-accumulating bacteria from sewage plants with different processes for biological phosphorus removal**. FEMS Microbiology Letters, v. 73, n.2, p. 113-124, 1990.

Tamura, K. & Nei, M. **Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees**. Molecular Biology and Evolution. 10:512-526. 1993.

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**. Infection and Immunology. V. 62, p.1624-1630. 1995.

Torriani, A. **Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphates by *Escherichia coli***. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 38, p. 460-469, mar. 1960.

Torriani-Gorini, A.; Yagil, E. & Silver, S. **Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology**. Washington, D. C., USA: ASM Press, 1994.

Turner, B. L.; Frossard, E. & Baldwin, D. S. **Organic Phosphorus in the Environment**. Cambridge, M. A., USA: CABI Pub., 2005.

Wanner, B. L. **Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon**. In: Neidhardt, F. C.; Curtiss, R. III.; Ingraham, J. L.; Lin, E. C. C.; Low, K. B.; Magasanik, B.; Reznikoff, W. F.; Riley, M.; Shaechter, M.; Umberger, H. E. (eds). *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology. ASM Press, Washington D.C., p. 1357-1387, 1996.

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

Wanner, B. L. & Chang, B. D. **The *phoBR* operon in *Escherichia coli* k-12**. *J Bacteriol*, 1987 Dec;169(12):5569-74. doi: 10.1128/jb.169.12.5569-5574.1987.

Webb, D. C.; Rosenberg, H. & Cox, G. B. **Mutation analysis of the *Escherichia coli* phosphate-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane transporters. A role for proline residues in transmembrane helices**. *J. Biol Chem* v.267, p.24661-24668, 1992.

Weeks, M. E. **The discovery of the elements. II. Elements known to the alchemists**. *J Chem Educ* 9: 1932.

WEF. **The Global Risks Report** – 16th Edition. Davos: World Economic Forum, 2021.

Wehmeier, S.; Varghese, A.S.; Gurucha, S.S.; Tissot, B.; Panico, M.; Hitchen, P.; Smith, M. C. M. **Glycosylation of the phosphate binding protein, *PstS*, in *Streptomyces coelicolor* by a pathway that resembles protein O-mannosylation in eukaryotes**. *Mol. Microbiol.* v. 71, p. 421–433. 2009.

Werner, F.; Mueller, C. W.; Thieme, J.; Gianoncelli, A.; Rivard, C.; Höschen, C. & Prietzel, J. **Polyphosphate as a donor of high-energy phosphate for the synthesis of ADP and ATP**. *Journal of Cell Science*. 130, 2747-2756p., 2017.

White, A. K. & Metcalf, W. W. **Microbial metabolism of reduced phosphorus compounds.** Annual Review of Microbiology, v. 61, n. 1, p. 379-400, out. 2007.

Van Veen, H. W. **Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms.** Antonie Van Leeuwenhoek, v. 72, n. 4, p. 299-315, 1997.

Vuppada, R. K.; Hansen, C. R.; Strickland, K. A. P.; Kelly, K. M. & McCleary, W. R. **Phosphate signaling through alternate conformations of the PstSCAB phosphate transporter.** BMC Microbiol. 18: 8. Available: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1126-z>. 2018.

Yang, K.; Wang, M. & Metcalf, W. W. **Uptake of Glycerol-2-Phosphate via the *ugp*-Encoded Transporter in *Escherichia coli* k-12.** Journal of Bacteriology, v. 191, n. 14, p. 4667-4670, jun. 2009.

Zhu, Y.; Fu, X.; Bettati, B. & Zhao, W. **Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis.** Embo. 6, 681-687, 2005.