

**GENÔMICA E PROTEÔMICA DE *Enterobacter cloacae* UENF P7: UMA
BACTÉRIA RESISTENTE A ESTRESSES ISOLADA DE PLANTA AQUÁTICA**

NATHÁLIA DUARTE DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

Campos dos Goytacazes - RJ

Novembro de 2017

**GENÔMICA E PROTEÔMICA DE *Enterobacter cloacae* UENF P7: UMA
BACTÉRIA RESISTENTE A ESTRESSES ISOLADA DE PLANTA AQUÁTICA**

NATHÁLIA DUARTE DA SILVA

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia.”

Orientadora: Prof^a Marília Amorim Berbert de Molina

Co-orientadora: Prof^a Aline Chaves Intorne

Campos dos Goytacazes - RJ

Novembro de 2017

GENÔMICA E PROTEÔMICA DE *Enterobacter cloacae* UENF P7: UMA BACTÉRIA RESISTENTE A ESTRESSES ISOLADA DE PLANTA AQUÁTICA

NATHÁLIA DUARTE DA SILVA

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia.”

Aprovada em 8 de novembro de 2017.

Comissão Examinadora:

Prof. Francisco José Alves Lemos (Dr. em Ciências Biológicas)
CBB/LBT/UENF

Prof. Alessandro Coutinho Ramos (Dr. em Produção Vegetal)
CBB/LFBM/UENF

Prof. Alan Trindade Branco (Dr. em Biociências e Biotecnologia)
LBCMC/CCS/UFES

Prof^a. Aline Chaves Intorne (Dr^a. em Biociências e Biotecnologia)
CBB/LFBM/UENF - (Co-orientadora)

Prof^a. Marília Amorim Berbert de Molina (Dr^a. em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica)
CBB/LBT/UENF - (Orientadora)

Dedico esta tese ao soberano Deus, ao meu esposo e a minha pessoa.

"Contudo, seja qual for o grau a que chegamos, o que importa é prosseguir decididamente." (Filipenses 3, 16)

AGRADECIMENTOS

À UENF e ao Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, pela infraestrutura, recursos humanos e conhecimentos compartilhados, os quais culminaram na concretização dessa tese e no meu aperfeiçoamento acadêmico/profissional.

À UENF e à FAPERJ pela concessão da bolsa de Doutorado.

À FAPERJ, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro para execução do projeto de pesquisa.

À minha orientadora, Prof^a. Marília Amorim Berbert de Molina e co-orientadora Prof^a. Aline Chaves Intorne, pela corragem, dedicação, paciência, compreensão, ensinamentos e compromisso com a minha formação profissional.

Aos Professores Gonçalo Apolinário de Souza Filho, Vanildo Silveira e Fábio Olivares, pelo trabalho colaborativo no decorrer das análises, compartilhando o conhecimento e auxiliando na obtenção dos dados.

Obrigada a todos que contribuíram de alguma forma para que esse doutorado fosse concluído. E não poderia deixar de expressar de forma objetiva o meu eterno agradecimento aqueles (Deus, minha família, meus amigos) que foram espelhos para que hoje eu pudesse refletir a pessoa e a profissional que sou.

SUMÁRIO

Resumo	IV
Abstract	V
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. Interações benéficas planta-bactéria	5
2.2. Estresse oxidativo	6
2.3. Defesas antioxidantes	7
2.4. As ômicas na prospecção dos microrganismos	9
2.5. <i>Enterobacter cloacae</i>	11
3. Objetivos	14
3.1. Objetivo geral	14
3.2. Objetivos específicos	14
4. Materiais e Métodos	15
4.1. Microrganismo e meios de cultivo	15
4.2. Sequenciamento genômico de <i>Enterobacter cloacae</i> UENF P7	15
4.3. Identificação pelo sistema BIOLOG™ - GEN III	16
4.4. Avaliação quanto à tolerância ao estresse oxidativo	18
4.4.1. Estresse oxidativo causado pela exposição ao H ₂ O ₂	18
4.4.2. Estresse oxidativo causado pela exposição a cobre e cádmio	18
4.4.3. Estresse oxidativo causado pelo oxigênio molecular	19
4.5. Detecção da produção de ERO por microscopia de fluorescência	20
4.6. Análise de proteômica	20
4.7. Análise das características promotoras do crescimento vegetal	22
4.7.1. Solubilização de fosfato	22
4.7.2. Produção de fitormônio	23
4.7.3. Fixação biológica de nitrogênio (FBN)	23
5. Referências	24
6. CAPÍTULO 1	29
7. CAPÍTULO 2	60

RESUMO

Relações entre microrganismos e plantas são frequentes na natureza e desempenham um papel importante na promoção do crescimento vegetal, em condições normais e de estresse. Macrófitas aquáticas apresentam capacidade de absorver o excesso de nutrientes e compostos tóxicos em ambientes poluídos, sendo empregada na manutenção da qualidade de água em processo de fitorremediação. *Pistia stratiotes* é uma macrófita aquática com grande potencial fitorremediador e constitui substrato para uma diversificada comunidade microbiana. O presente trabalho teve como objetivo investigar as características genéticas associadas à promoção do crescimento vegetal e à resistência a estresses ambientais, bem como realizar a análise proteômica da bactéria cultivada sob condição de estresse oxidativo. Em ensaios *in vitro*, foi feita a caracterização fisiológica da bactéria (Biolog, GEN III MicroPlates™), e avaliada a produção de catalase e de compostos indólicos, a tolerância ao H₂O₂, cobre e cádmio, bem como a capacidade de solubilização de fosfato. O sequenciamento do genoma foi feito em plataforma Illumina. Os ensaios de fermentação foram feitos em biorreator (B.Braun, Biostat B), mantendo-se concentração de oxigênio (OD) constante em 20% ou 100% da saturação, usando, neste último caso, oxigênio puro em lugar de ar. A análise proteômica foi baseada na quantificação relativa de proteínas celulares obtidas durante a fermentação, feita por espectrometria de massas (Waters, SYNAPT G2-Si HDMS). O sequenciamento genômico permitiu identificar o isolado como *Enterobacter cloacae* UENF P7. O genoma de *E. cloacae* UENF P7 apresenta genes relacionados à adaptação da bactéria ao hospedeiro, sua colonização e proteção, além de genes envolvidos na produção de compostos que atuam no desenvolvimento vegetal. A bactéria carrega ainda genes de resistência a metais e salinidade, assim como para degradação de compostos xenobióticos. Os ensaios *in vitro* mostraram que a bactéria metaboliza inúmeras fontes de carbono, produz compostos indólicos e solubiliza fosfato, demonstrando ainda resistência a cobre e cádmio, peróxido de hidrogênio e vários outros compostos tóxicos. A análise proteômica mostrou que OD 100% teve impacto negativo no crescimento bacteriano. No entanto, a bactéria possui mecanismos eficientes de defesa antioxidante, o que lhe permite contornar parcialmente os danos provocados pela geração excessiva de ERO. Em conjunto, as características de *E. cloacae* UENF P7 indicam grande potencial para emprego em processos biotecnológicos como a produção de bioinoculantes e biorremediação.

Palavras-chave: *Enterobacter cloacae* UENF P7, genoma, proteoma, tolerância a estresses, promoção do crescimento, biorremediação.

ABSTRACT

Relationships between microorganisms and plants are frequent in nature and play an important role in promoting plant growth under normal and stress conditions. Aquatic macrophytes are used to maintain water quality in phytoremediation processes due to their ability to uptake nutrients and toxic compounds in polluted environments. *Pistia stratiotes* is an aquatic macrophyte with great phytoremediation potential and constitutes a substrate for a diverse microbial community in their habitat. The present work aimed to sequence the genome of an *Enterobacter* strain isolated from *P. stratiotes*, in order to investigate the bacterial characteristics involved with the plant growth and to environmental stresses resistance. Another objective was to perform proteomic analysis of the bacterial biomass obtained under oxidative stress caused by molecular oxygen. *In vitro* assays were carried out to characterize some physiological traits of the bacterium (Biolog, GEN III MicroPlates™), the production of catalase and indole compounds, tolerance to H₂O₂ and the metals copper and cadmium, as well as phosphate solubilization ability. Genome sequencing was done on the Illumina platform. The fermentation assays were performed in a bioreactor (B.Braun, Biostat B), at constant oxygen concentration (OD) of 20% or 100% of air saturation. In the latter case, it was used pure oxygen instead air. The proteomic analysis was based on the relative quantification of cellular proteins obtained during the fermentation, and was done by mass spectrometry (Waters, SYNAPT G2-Si HDMS). The genome sequence allowed to identify the isolate as *Enterobacter cloacae* UENF P7. It has been shown that *E. cloacae* genome carries genes related to host adaptation, colonization and protection, as well as genes involved in the production of compounds associated with plant development. The bacterium also carries genes for metals and salinity resistance, as well as for degradation of xenobiotic compounds. The *in vitro* assays have shown that the bacteria metabolize several carbon sources, and is able to produce indolic compounds, solubilize phosphate, and is resistant to copper, cadmium, hydrogen peroxide and numerous other toxic compounds. Proteomic analysis showed that OD 100% had negative impact on bacterial growth. However, the bacterium has efficient mechanisms of antioxidant defense, which allows it to partially counteract the damage caused by the excessive generation of ROS. Together, the characteristics of *E. cloacae* UENF P7 indicate great potential for employment in biotechnological processes such as the production of bioinoculants and bioremediation.

Key words: *Enterobacter cloacae* UENF P7, genome, proteomics, stress tolerance, growth promotion, bioremediation

1. Introdução

As comunidades microbianas desempenham um papel importante no crescimento e no desenvolvimento de plantas hospedeiras. Algumas espécies podem melhorar o desenvolvimento vegetal (Ryan *et al.*, 2008), produzindo uma gama de substâncias e facilitando a absorção de nutrientes primários e secundários (Gothwal *et al.*, 2008), que resulta na promoção do crescimento vegetal (Spaepen *et al.*, 2007), na superação de algum tipo de estresse (Zamioudis e Pieterse, 2012), bem como na melhoria da sobrevivência e o desempenho da planta em áreas poluídas (Yergeau *et al.*, 2015).

Macrófitas aquáticas são organismos fotossintéticos que habitam ecossistemas aquáticos dulcícolas e salobros; esse grupo é representado por macroalgas, briófitas, pteridófitas e angiospermas. Essas plantas, devido a sua capacidade de absorver o excesso de nutrientes e compostos tóxicos, desempenham papel importante na manutenção e qualidade da água (Ferdoushi *et al.*, 2008).

A qualidade da água dos ecossistemas de água doce é submetida à degradação natural, aos processos de eutrofização e aos impactos das atividades humanas. Uma vasta literatura está disponível abordando as questões da poluição aquática (Nagai *et al.*, 2007, Camargo e Alonso 2006, Khan e Srivastava 2008, Shukla *et al.*, 2009) e sua remediação biológica (Sooknah e Wilkie 2004; Nahlik e Mitsch 2006; Hadad *et al.*, 2006; Srivastava *et al.*, 2014). Nesses estudos, a maioria dos resultados de melhoria da qualidade da água foi obtida através da remoção dos poluentes ambientais por plantas aquáticas (*in situ* e *ex situ*), ou por micróbios isoladamente. Apenas alguns relatos indicam o impacto direto da interação das macrófitas e dos micróbios aquáticos (Stout e Nusslein 2010; Sharma *et al.*, 2012; Lamers *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2014) e sua possível influência na despoluição das águas (Stottmeister *et al.*, 2003; Radhika e Rodrigues, 2007; Srivastava *et al.*, 2008, Toyama *et al.*, 2011, Chakraborty *et al.*, 2013).

Pistia stratiotes é uma macrófita aquática amplamente encontrada em ambientes tropicais, sendo utilizada como fitorremediadora, pois é capaz de acumular metais, como zinco, cromo, cobre, cádmio, chumbo, prata e mercúrio (Odjeigba e Fasidi 2004). Ao longo da evolução, essa espécie desenvolveu mecanismos para resistir aos estresses causados por contaminantes presentes

no ambiente aquático, que causam danos oxidativos às células pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), reagindo com as biomoléculas e comprometendo a estrutura celular (Gill e Tuteja, 2010). Deste modo, as plantas aquáticas possuem mecanismos de proteção que envolve antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (Yamane *et al.*, 2004.). Do mesmo modo, a microbiota associada a essas plantas deve ser capaz de resistir a tais estresses.

As macrófitas constituem substrato para uma diversificada comunidade microbiana presente nos ecossistemas aquáticos (Ali *et al.*, 2012), com destaque para a família Enterobacteriaceae, que é onipresente nos corpos hídricos (Srivastava *et al.*, 2017). No entanto, a relação entre macrófitas aquáticas e a sua microbiota é pouco esclarecida (Achà *et al.* 2005). Apesar das interações benéficas terem sido bastante estudadas pelos pesquisadores no século passado, isso ocorreu em função do interesse na agricultura e indústria farmacêutica. Somente nas últimas décadas as pesquisas têm focado na relação íntima entre microrganismos e hospedeiros, sendo conhecido que esses seres são vitais para a evolução do hospedeiro (Sachs *et al.*, 2011). Por isso, tem crescido o interesse em compreender as relações entre as comunidades microbianas e plantas aquáticas (Jun *et al.*, 2015).

Enterobacter cloacae é uma bactéria que já foi isolada da rizosfera de várias plantas, e os estudos têm demonstrado sua capacidade de colonização e associação benéfica com o hospedeiro (Liu *et al.*, 2013; Coulson *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2017). Algumas cepas são capazes de produzir fitohormônios (Riu e Patten, 2008; Bose *et al.*, 2016), sideróforos e compostos antimicrobianos (Taghavi *et al.*, 2010). Além disso, a versatilidade metabólica da bactéria tem despertado interesse com aplicações industriais (Khanna *et al.*, 2011; Kumar e Das, 2001, Sarafzadeh *et al.*, 2013) e na descontaminação ambiental (Haq *et al.*, 1999; Hua *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2017).

Compreender as origens e trajetórias evolutivas de parcerias simbióticas é um grande desafio, uma vez que algumas simbioses são perdidas ao longo do tempo, enquanto outras se tornam essenciais para a sobrevivência do hospedeiro (Salem *et al.*, 2015). A bactéria *E. cloacae* é uma espécie ubíqua na natureza e tem sido isolada de diferentes nichos ambientais, incluindo humanos, plantas, insetos, solo, ambientes aquáticos e efluentes industriais (Haq *et al.*, 1999; 2001; Ren *et al.*, 2010; Schroeder *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013). Esta gama de habitats reflete a

diversidade genética da espécie *E. cloacae* (Liu *et al.*, 2013), que compreende um grupo extremamente diverso de bactérias (Clementino *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2005; Paauw *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013) e que apresentam características positivas e de interesse biotecnológico. Algumas são importantes na engenharia genética e outras atuam como bactérias promotoras do crescimento de plantas (French *et al.*, 1998; Nie *et al.*, 2002) e no biocontrole de fitopatógenos (Chernin *et al.*, 1996). A versatilidade metabólica da bactéria também tem despertado grande interesse industrial, tais como a produção de hidrogênio (Khanna *et al.*, 2011; Kumar e Das, 2001), biosurfactante (Sarafzadeh *et al.*, 2013) e biorremediação (Haq *et al.*, 1999; Hua *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2017).

Em pesquisa conjunta realizada no Laboratório de Biotecnologia (LBT) e no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM), foi sequenciado o genoma completo de uma bactéria isolada de raízes da planta aquática *Pistia stratiotes*, obtida no Rio Paraíba do Sul, no município de Resende, RJ. A cepa foi identificada e denominada *Enterobacter cloacae* UENF P7. No trabalho, foi possível identificar características importantes e, possivelmente, necessárias para a interação da bactéria com o hospedeiro, que devem implicar na promoção do crescimento vegetal e na resistência da planta a estresses ambientais. Foram realizados experimentos *in silico* e *in vitro*, utilizando abordagens genômicas e proteômicas, que serão apresentadas nos Capítulos 1 e 2 dessa tese, respectivamente.

No Capítulo 1, visando ampliar o conhecimento genético da espécie isolada e identificar uma linhagem com potencial biotecnológico para tratamento de águas residuais, foi sequenciado o primeiro genoma completo de uma *E. cloacae* isolada de planta aquática e a sua habilidade metabólica caracterizada. As análises genômicas revelaram que *E. cloacae* UENF P7 contém uma série de genes associados a propriedades de promoção de crescimento vegetal e de resistência a estresses ambientais, sendo notável a presença de um forte aparato antioxidante. Além disso, constatou-se, em ensaios *in vitro*, a capacidade da bactéria para produzir fitormônios e resistir a elevadas concentrações de cobre, cádmio, peróxido de hidrogênio e vários outros compostos tóxicos.

No Capítulo 2, foi explorada a resposta de *E. cloacae* UENF P7 ao estresse oxidativo gerado por elevadas concentrações de oxigênio molecular no meio de cultivo. Foi estudada a cinética de fermentação e a produção de biomassa em

duas condições distintas de transferência de oxigênio para o meio, realizando-se análise proteômica em momento previamente determinado do processo. Os resultados mostraram que *E. cloacae* UENF P7 sofreu impacto negativo na presença de elevadas concentrações de oxigênio dissolvido, mas demonstrou possuir mecanismos eficientes de defesa antioxidante, que lhe permite contornar parcialmente os danos provocados pela geração excessiva de ERO.

Os dados obtidos no trabalho sugerem que *E. cloacae* UENF P7 é uma candidata com elevado potencial para inoculação de plantas aquáticas usadas na fitorremediação de áreas contaminadas. Somado a isso, no futuro, essa bactéria poderá ser explorada em processos biotecnológicos voltados para a produção de substâncias antioxidantes, que tem grande importância para o homem, e outros metabólitos de interesse industrial.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Interações benéficas planta-bactéria

As bactérias são a porção principal de biomassa na Terra, sendo as interações simbióticas ubíquas na natureza (Andreote *et al.*, 2009). As interações de longo prazo entre dois organismos pertencentes a espécies diferentes é definida como simbiose e são consideradas uma grande força evolutiva. Estas interações são muitas vezes mediadas por vias de sinalização compartilhadas, altamente complexas e dinâmicas, envolvendo múltiplos mecanismos que influenciam a biologia de ambos os parceiros em vários ambientes (Jones e Dangl, 2006; McFall-Ngai *et al.*, 2013).

Por pelo menos 1,5 bilhões de anos, procariotos e eucariotos co-evoluíram e co-adaptaram em resposta a pressões ambientais; essas interações criaram numerosas associações simbióticas (Kostygov *et al.*, 2016). Nesse contexto, o início e a manutenção de uma relação simbiótica é dependente da capacidade de ambas as partes em perceberem um ao outro e coordenarem as suas atividades (Pontes *et al.*, 2008). Diversos animais e plantas são exemplos de adaptações metabólicas e defensivas como consequência direta das associações simbióticas com microrganismos benéficos. Quase todos os organismos dependem de associações simbióticas para alguma forma de metabolismo ou de energia (McFall-Ngai *et al.*, 2013). Estima-se que toda espécie de planta estabelece simbiose com micróbios benéficos, num resultado de milhões de anos de co-evolução (Van Geem, 2013). Dessa forma, as interações simbióticas são de grande interesse agrônomo (Zamioudis e Pieterse, 2012), pois podem resultar em diversos efeitos na planta, como incremento da altura e biomassa da parte aérea, do caule e das raízes, e formação de pelos radiculares e foliares, resultando em aumento de produtividade no campo (Sturtz, 1995). Esses efeitos são devido aos mecanismos de promoção do crescimento vegetal desenvolvidos pelas bactérias associadas às plantas. Podemos citar: a fixação biológica de nitrogênio atmosférico, a biodisponibilização de fosfato, a aquisição de ferro, a exposição de atividade enzimática específica e a proteção contra patógenos (Spaepen *et al.*, 2007). A planta, por sua vez, contribui com a bactéria disponibilizando abrigo e nutrientes gerados pelo processo fotossintético (Glenn e Dilworth, 1985).

Além dos mecanismos que contribuem para a fisiologia da planta, as bactérias desempenham um papel importante no processo de desintoxicação e melhora na tolerância do hospedeiro ao estresse oxidativo (Oliveira *et al.*, 2015). No caso das plantas aquáticas, efluentes poluídos podem induzir diversas mudanças no metabolismo do vegetal (Yruela, 2005), culminando com a formação de espécies reativas que em excesso podem causar danos aos componentes estruturais das células, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (Dröge, 2002).

2.2. Estresse oxidativo

ERO são substâncias químicas contendo um ou mais elétrons desemparelhado (Halliwell e Gutteridge, 2006), que reagem independentemente com as macromoléculas celulares, capturando elétrons, modificando as estruturas e alterando as funções biológicas dessas moléculas (Dalton *et al.*, 1999). Eles podem ser gerados durante as funções metabólicas normais dos seres vivos (Sharma *et al.*, 2012), de maneira endógena, na mitocôndria, no citocromo P450, no peroxissomo e na ativação de células inflamatórias. E também podem ser produzidos em resposta a substâncias exógenas, tais como: agentes cancerígenos não-genotóxicos, xenobióticos, metais, ultra-som e radiação de micro-ondas (Valko *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo é definido como um distúrbio no equilíbrio entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes (Foyer e Noctor, 2003). O estresse oxidativo pode ser classificado em quatro categorias: 1) aumento da carga oxidativa (produção de ERO); 2) potencial de oxidação descontrolada, devido à taxa de produção superior à taxa de metabolismo; 3) dano oxidativo aos componentes celulares, o que supõem que a taxa de oxidação é superior a taxa de reparação ou substituição; causando 4) acúmulo de componentes celulares danificados de forma que conduzem a perda da função e eventual morte. A consequência disso são danos aos componentes estruturais da célula, tais como: ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (Dröge, 2002; Foyer e Noctor, 2003).

O O₂ é uma molécula pequena e não polar, que se difunde rapidamente pelas membranas biológicas (Ligeza *et al.*, 1998), sendo altamente destrutivo ao reagir com macromoléculas celulares (Foyer *et al.*, 1994). A formação de ERO ocorre quando o O₂ colide com uma enzima redox, roubando seus elétrons (Messner e Imlay, 1999; Messner e Imlay, 2002).

O tamanho da molécula de O_2 é pequena suficiente para entrar no sítio ativo e reduzir a flavina, provocando a transferência involuntária de um ou dois elétrons consecutivos. A transferência de um elétron gera O_2^- (radical superóxido), que na célula pode ser convertido por dismutação, ou seja, o composto é oxidado e reduzido ao mesmo tempo, levando a formação do H_2O_2 (peróxido de hidrogênio). Caso ocorra a transferência de dois elétrons, a formação será diretamente em H_2O_2 (Messner e Imlay, 2002). O H_2O_2 é capaz de atravessar as membranas biológicas, o que não acontece com o O_2^- (Halliwell e Gutteridge, 1989). No entanto, ambos podem encontrar alguma molécula alvo e provocar danos diretos, mas no geral, a reatividade é limitada (Bielski, 1985; Winterbourn e Metodiewa, 1994). Os maiores danos estão relacionados à conversão do O_2^- e H_2O_2 em espécies mais reativas, sendo o mais importante o OH^- (radical hidroxila) (Resende, 2003), que causa danos indiscriminados a toda célula (Imlay, 2008).

Primeiramente, as ERO foram descritas como espécies prejudiciais, já que podem provocar diversos danos celulares (Halliwell e Gutteridge, 1986), em consequência de seu efeito altamente reativo (Ercal *et al.*, 2001). No entanto, mais tarde, foi observado que as ERO podem desempenhar um papel importante na sinalização de vários mecanismos celulares (Neill *et al.*, 2002), bem como no sistema de defesa da planta contra patógenos (Apel e Hirt, 2004) e em processos fundamentais, como o crescimento celular (Foreman *et al.*, 2003), fechamento dos estômatos (Pei *et al.*, 2000) e regulação da expressão gênica (Vranova *et al.*, 2002). Desse modo, seus efeitos são considerados bimodais (Valko *et al.*, 2007).

Os microrganismos anaeróbicos escapam do estresse oxidativo (Imlay, 2013), pois evoluíram desprovidos de O_2 (Anbar, 2008). Porém, os outros microrganismos tiveram que elaborar estratégias para se defender contra essa molécula química (Imlay, 2013). Nesse caso, uma ampla variedade de enzimas antioxidantes, como catalase, superóxido dismutase e peroxidases são essenciais para reduzir o efeito de ERO (Grant, 2001).

2.3. Defesas antioxidantes

Os procariotos lidam com o estresse oxidativo (Pahl e Baeurle, 1994) por meio de adaptações a variações ambientais (Peters *et al.*, 2014), aumentando a síntese e acumulando compostos antioxidantes em resposta a produção excessiva de ERO (Lü *et al.*, 2009). Isso garante que a alta concentração de ERO

produzido pela célula seja eliminada para a sua própria sobrevivência (Zhang *et al.*, 2012).

Antioxidantes são definidos como qualquer substância presente em baixa concentração comparado com o substrato oxidável, que retarda significativamente ou evita a oxidação desse substrato (Halliwell, 1999). Portanto, é qualquer molécula capaz de estabilizar ou desativar ERO antes que elas ataquem as estruturas celulares (Percival, 1996). Os compostos que atuam na defesa antioxidantes são divididos em enzimáticos e não-enzimáticos (Halliwell, 1996).

Na defesa antioxidante enzimática são destacados dois grupos de enzimas: superóxido dismutases (SOD) e peroxidases. A SOD catalisa a dismutação de O_2^- para gerar H_2O_2 e O_2 (Fridovich, 2011), sendo considerada importante agente antioxidante (Baker e Orlandi, 1995). As peroxidases desempenham papel primário quando a dose de H_2O_2 está na faixa de milimolar (Seaver e Imlay, 2001; Chelikani *et al.*, 2004). Isso é possível devido à elevada afinidade que a enzima possui em remover H_2O_2 mesmo em baixas concentrações (Kohen e Nyska, 2002). Finalmente, H_2O_2 é convertido à água e O_2 livre pela ação da enzima catalase (Breusegem *et al.*, 2001; Sarah e Herb, 2012).

Na defesa antioxidante não-enzimática podemos destacar o manganês, um metal de transição requerido por todos os organismos como um micronutriente essencial (Sigel e Sigel, 2000), necessário para as bactérias mediante a neutralização da explosão oxidativa na interação com o hospedeiro (Coady *et al.*, 2015). A função mais conhecida do manganês é como cofator enzimático (Wieghardt, 1989), sendo opcional para muitas enzimas, mas essencial como cofator para a SOD dependente de manganês (Imlay, 2013). Todavia, a maior parte deste elemento está presente nas células formando complexos de baixo peso molecular (Galiazzo, 1989), que fazem diretamente a desintoxicação celular de ERO (Coady *et al.*, 2015). A glutathiona (GSH) é outra defesa antioxidante não-enzimática, que existe principalmente na sua forma reduzida e sua forma dissulfureto (GSSG) (Meister e Anderson 1983). É considerado o antioxidante mais potente (Taté *et al.*, 2012), doando elétrons para os radicais reativos por meio de reações de autooxidação de modo a formar GSSG (Chesney *et al.* 1996). Assim, sob condições de estresse oxidativo, a relação de GSH/GSSG pode cair na faixa de 1-10 (Reed, 1990). Da mesma forma, NADPH e NADH são

antioxidantes não enzimáticos, que ajudam a remover o excesso destes radicais (Cabiscol *et al.*, 2000).

O estudo do estresse oxidativo e das formas de combatê-lo são alvos da pesquisa científica nos últimos anos. Isso se deve a importância desse estresse para a célula que é a principal causa do envelhecimento humano (Barreiros *et al.*, 2015) e tem mostrado relação com algumas doenças com Alzheimer e Parkinson (Moreiria *et al.*, 2005; Chen e Chan, 2009; Martin, 2012). Neste sentido, as indústrias de fármacos, cosméticos e alimentos vêm trabalhando a fundo maneiras de retardar o processo de oxidação celular (Barreiros *et al.*, 2015), sendo interessante a estratégia de explorar diferentes ferramentas na busca de substâncias antioxidantes a partir de microrganismos resistentes as ERO.

2.4. As ômicas na prospecção de microrganismos

A bioprospecção de compostos bioativos é uma forma viável e eficiente de exploração comercial dos recursos biológicos, na qual a genômica é uma importante ferramenta para o processo, permitindo o estudo do genoma completo de um organismo a partir da identificação de todos os seus genes (Torrance, 2000; Hocquette, 2005). Mas mesmo com o advento da genômica, somente o seu emprego não permite a compreensão dos sistemas biológicos. Apesar da importância de se sequenciar e caracterizar genomas, a finalização desta etapa conduz a uma etapa posterior, que corresponde à análise funcional e holística dos seres vivos, a pós-genômica (Dent *et al.*, 2005). A pós-genômica é capaz de informar os transcritos - transcriptômica, as proteínas - proteômica e os metabólitos – metabolômica de um organismo, integrando o que é denominado de Ômicas (Keersmaecker *et al.*, 2006).

As Ômicas correspondem à análise global dos sistemas biológicos, na qual os esforços são para identificar, quantificar e caracterizar os componentes em sistemas celulares, a fim de dissecar as redes e, conseqüentemente, as vias metabólicas intracelulares (Espindola *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2010). No entanto, há vários desafios para a aplicação das Ômicas, um dos problemas-chave está em desenvolver maneiras de lidar com esses enormes e heterogêneos conjuntos de dados (Mochida *et al.*, 2011). Para auxiliar neste processo de integração, a bioinformática tornou-se fundamental para fazer a análise *in silico* e compreender os dados obtidos nas diferentes áreas das Ômicas (Souza *et al.*, 2014). Mas os

organismos são dotados de especializações e interações celulares complexas na própria célula, em tecidos ou na relação com o ambiente, que tornam este trabalho uma tarefa árdua. Neste sentido, a utilização dos microrganismos como modelos para aplicação das Ômicas geram dados que auxiliam na determinação das vias celulares, auxiliando também na prospecção dos compostos bioativos com potencial para aplicações industriais (Souza *et al.*, 2014). Alguns estudos realizados utilizando as Ômicas em microrganismos demonstraram que esta abordagem é uma ferramenta valiosa, para a compreensão dos princípios funcionais dos sistemas celulares (Zhang *et al.*, 2010).

A sequência de DNA do genoma é o ponto de partida para todo um novo conjunto de análises destinado a compreender a estrutura, função e evolução do genoma e seus componentes (Griffiths *et al.*, 2008). Desde o final da década de 1970 a tecnologia do sequenciamento tem sido aprimorada, diminuindo o tempo de leitura e, atualmente a obtenção da informação completa do DNA em curto período é realizada em vários laboratórios (McPherson 2014), principalmente com os microrganismos, pela estrutura mais simplificada do material genético. Com isso, uma grande quantidade de dados está disponível em banco de dados públicos, evidenciando a enorme diversidade e abundância dos microrganismos (Jarrell *et al.*, 2011).

As proteínas são moléculas essenciais para a vida, pois garante o funcionamento da célula (Özdemir *et al.*, 2017). Assim, os avanços na genômica estimularam o desenvolvimento da proteômica (Armengaud *et al.*, 2014). Isso porque a proteômica geralmente depende da anotação do genoma para identificação das proteínas (Evans *et al.*, 2012) de um organismo, a fim de conhecer sua estrutura e função (Aslam *et al.*, 2017).

Proteômica refere-se á análise sistemática de proteínas em uma dada condição. Ela complementa outras tecnologias Ômicas, como genômica e transcriptômica, em elucidar a identidade das proteínas de um organismo e compreender suas funções (Noordin e Othman, 2013). Um exemplo para auxiliar na prospecção de compostos bioativos é união das análises genômica e proteômica, de forma a identificar a presença do gene e o produto da sua expressão dada na proteína, facilitando estrategicamente o direcionamento para engenharia de cepas para uma pequena região, ao invés do genoma inteiro (Guarnieri *et al.*, 2011)

A integração entre o estudo genômico e proteômico pode ser utilizada para entender as relações entre genótipo e fenótipo (Joyce e Palsson 2006), fornecendo uma visão geral das respostas celulares genéticas e fisiológicas quanto às mudanças ambientais (Santos *et al.*, 2011; Bordbar *et al.*, 2014). As bactérias simbióticas possuem genomas altamente especializados e que codificam para uma gama de substâncias de interesse associadas ao hospedeiro (McCutcheon e Moran, 2011). Essas substâncias podem promover desde o crescimento do vegetal à resistência do hospedeiro aos estresses ambientais (Spaepen *et al.*, 2007). Com isso, estudar genomas e proteomas dessas bactérias é de grande interesse para a compreensão desses mecanismos e para a aplicação biotecnológica das bactérias simbióticas e seus produtos bioativos.

2.5. *Enterobacter cloacae*

E. cloacae é um bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo, não esporulante, pertencente à família Enterobacteriaceae. Apresenta diâmetro entre 0,3 a 0,6 μm e comprimento entre 0,8 a 2,0 μm , com flagelos peritríqueos para motilidade (Nishijima, 1999). As principais vias metabólicas são conservadas entre as diferentes cepas da bactéria, que caracterizam-se pela capacidade de usar uma ampla gama de fontes de carbono (Liu *et al.*, 2013). Carboidratos como glicose, lactose, frutose, xilose, galactose, sacarose, maltose, rafinose, trealose, manose, glicerol, sorbitol, arabitol, manitol, adonitol, ramnose, celobiose, D-arabinose, esculina e inulina (Singh *et al.*, 2017). A temperatura ótima de crescimento da bactéria é 37 °C (Nishijima, 1999), mas recentemente foi isolada uma cepa capaz de tolerar até 50 °C (Singh *et al.*, 2017). A faixa ótima de pH para crescimento está entre 5 e 7 (Kanna *et al.*, 2011).

E. cloacae é ubíqua na natureza e tem sido isolada de diferentes nichos ambientais, incluindo humanos, plantas, insetos, solo, ambientes aquáticos e efluentes industriais (Haq *et al.*, 1999; Halda-Alija *et al.*, 2001; Marchini *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2010; Schroeder *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013). As espécies de *E. cloacae* compreendem um grupo extremamente diverso de bactérias, com genomas bastante heterogêneos (Clementino *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2005; Paauw *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013). Análises filogenéticas resultaram na formação do chamado complexo *E. cloacae*, formado pelas

espécies *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* e *E. nimipressuralis* (Hoffmann e Roggenkamp, 2003; Pauauw *et al.*, 2008).

E. cloacae tem sido relatada como patógeno humano oportunista e de relevância clínica, responsável por várias infecções hospitalares (Davin-Regli *et al.*, 1997; Hoffmann e Roggenkamp, 2003; Ren *et al.*, 2010). A prevalência de cepas patogênicas nosocomiais tem sido atribuída à presença de múltiplos genes de resistência a antibióticos e outros agentes antimicrobianos (Leverstein-van Hall *et al.*, 2006; Paauw *et al.*, 2008). Estirpes patogênicas de plantas de *E. cloacae* foram relatadas como causa da degradação de bulbo em plantas de cebola e murchidão bacteriana em amoreira (Liu *et al.*, 2013). No entanto, várias cepas apresentam características positivas e de interesse biotecnológico. Algumas são importantes na engenharia genética e outras atuam como bactérias promotoras do crescimento de plantas (French *et al.*, 1998; Nie *et al.*, 2002) e no biocontrole de fitopatógenos (Chernin *et al.*, 1996). A versatilidade metabólica da bactéria também tem despertado grande interesse industrial, tais como a produção de hidrogênio (Khanna *et al.*, 2011; Kumar e Das, 2001), biosurfactante (Sarafzadeh *et al.*, 2013) e biorremediação (Haq *et al.*, 1999; Hua *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2017).

Dessa forma, devido a grande importância da bactéria, já existem alguns trabalhos de diferentes cepas de *E. cloacae* com seus genomas sequenciados (Taghavi *et al.*, 2010; Jodi *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012, 2013; Coulson *et al.*, 2015). Taghavi *et al.* (2010) avaliaram o genoma completo de uma bactéria endofítica promotora do crescimento vegetal, que foi isolada de álamo. Neste estudo, os autores encontraram genes envolvidos na interação com o hospedeiro e na sobrevivência na rizosfera, bem como relacionados à saúde e ao desenvolvimento da planta. Jodi *et al.* (2011) estudaram uma cepa causadora de doença em cebola (*E. cloacae* EcWSU1) e Ren *et al.* (2011) estudaram uma cepa patogênica oportunista em humanos. Liu *et al.* (2012) sequenciaram o genoma de uma cepa causadora de doença em pimenta, *E. cloacae* subsp. *cloacae* ENHKU01. Em 2013, Liu *et al.* (2013) fizeram uma análise comparativa de quatro genomas de *E. cloacae* mostrando a grande diversidade genética da espécie. E em 2015, Coulson *et al.* estudaram uma linhagem isolada da rizosfera de junco capaz de produzir níveis elevados do fitormônio ácido indol acético. No trabalho de Xu *et al.* (2011) foi sequenciada uma linhagem utilizada para produzir 2,3-butanediol, que apresenta interesse industrial.

Como pode ser observado, o sequenciamento genômico é necessário para conhecer as peculiaridades de cada cepa de *E. cloacae*, assim como o seu potencial biotecnológico. Dessa forma, associar genômica e proteômica para o estudo da bactéria deve trazer uma maior compreensão deste sistema biológico e da sua interação com o ambiente, possibilitando seu emprego para o homem no futuro.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Sequenciar o genoma de uma nova linhagem de *Enterobacter* isolada da macrófita aquática *Pistia stratiotes*, buscando investigar as características associadas à promoção do crescimento vegetal e à resistência a estresses ambientais, bem como realizar a análise proteômica da bactéria cultivada sob condição de estresse oxidativo causado por oxigênio molecular.

3.2. Objetivos específicos

- Sequenciar, montar e anotar o genoma completo do isolado bacteriano;
- Realizar e buscar *in silico* genes da bactéria relacionados à promoção do crescimento vegetal e à resistência a estresses ambientais;
- Avaliar *in vitro* o perfil metabólico da bactéria quanto ao consumo de diferentes fontes de carbono e sensibilidade química a compostos tóxicos;
- Avaliar *in vitro* a resistência da bactéria aos agentes estressantes cádmio, cobre e peróxido de hidrogênio;
- Avaliar *in vitro* as características de fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônio e solubilização de fosfato;
- Estudar a cinética de crescimento da bactéria em processo fermentativo realizado sob elevada concentração de oxigênio dissolvido;
- Realizar análise de microscopia de fluorescência para investigar a produção endógena de ERO em amostras da biomassa;
- Realizar análise de proteômica da biomassa bacteriana obtida no processo fermentativo.

4. Materiais e Métodos

4.1. Microrganismo e meios de cultivo

A bactéria foi isolada da macrófita aquática *Pistia stratiotes*, oriunda do Rio Paraíba do Sul, Resende, Rio de Janeiro. *E. cloacae* UENF P7 foi mantida em solução de glicerol 40%, a -80 °C. Para obtenção de suspensões celulares necessárias para as todas as análises, exceto para cultivo em biorreator, a bactéria foi cultivada em tubos tipo Falcon de 50 mL contendo 5 mL de meio DYGS (Rodrigues Neto, 1986), cuja composição é (g.L⁻¹): glicose, 2; extrato de levedura, 2; peptona, 1,5; K₂HPO₄, 0,5; MgSO₄.7H₂O, 0,5; e ácido glutâmico, 1,5. O pH foi corrigido para pH 6,0 e os tubos incubados por 16 horas a 30 °C e 120 min⁻¹ em agitadora-incubadora de movimento recíproco (NOVA ÉTICA 430 RDB). Para preparo de inóculos e ensaios de fermentação foi utilizado meio GYS (Berbert-Molina *et al.*, 2008), com 10 e 20 g.L⁻¹ de glicose, respectivamente, e os seguintes componentes (g.L⁻¹): extrato de levedura, 12; (KH₄)₂SO₄, 3,0; MgSO₄.7H₂O, 1,5; CaCl₂.2H₂O, 0,12; MnSO₄.1H₂O, 0,09; K₂HPO₄, 1,5; e KH₂PO₄, 1,5.

4.2. Sequenciamento genômico de *Enterobacter cloacae* UENF P7

A extração do DNA genômico foi feita com o kit QIAamp® DNA Mini kit (QUIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante, empregando-se 1 mL do cultivo bacteriano obtido conforme descrito no item 4.1. Para verificar a integridade do DNA extraído, uma alíquota de 1 µL da solução foi adicionada a 2 µL de tampão de amostra contendo gel red, que posteriormente foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2% contendo tampão de corrida TAE 1 X [980 mL água destilada e 20 mL TAE 50X (242 g de Tris base, 57,1 mL de ácido acético e 100 mL de EDTA 0,5 M pH 8.0)]. O gel de agarose foi analisado em um fotodocumentador (UVP Benchtop UV Transilluminator) para verificar a presença da banda. O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8%, usando como referência lambda DNA de concentração conhecida. Após a quantificação, 50 ng de DNA serão utilizados para a etapa de clivagem ou tagmentação por meio do Nextera DNA Library Prep Kit, seguindo as instruções do fabricante. Após essa etapa, as amostras serão purificadas, utilizando o QIAquick PCR Purification Kit, conforme manual do fabricante. Após purificadas, será realizada a ligação dos

index e adaptadores na amostra, utilizando o Nextera Index kit, segundo instruções do fabricante. Em seguida, a biblioteca será novamente purificada, utilizando o reagente AMPure XP beads, conforme sugere o fabricante. Após a construção da biblioteca, o material será quantificado, utilizando o Qubit dsDNA HS Assay kit, conforme instruções do fabricante, no intuito de obter a concentração aproximada de cada biblioteca. Após essa etapa, as bibliotecas serão diluídas e quantificadas por qPCR, utilizando o kit KAPA Library Quantification, seguindo as instruções do fabricante. Feito isso, a biblioteca será diluída para 500 pM e desnaturadas a 98 °C por 10 min e em seguida colocada no gelo por 5 min. Como controle, será utilizado Illumina PhiX control, disponibilizado no MiSeq Reagent kit. O uso desse controle na corrida é importante para certificar qualquer eventual erro. A biblioteca obtida e amostra controle serão diluídas para uma concentração final de 15 pM com o tampão HT1, disponibilizado no MiSeq Reagent kit. Em seguida, a biblioteca e amostra controle serão misturadas em um pool com volume final de 600 µL. O volume adicionado será de 150x para a biblioteca genômica de bactéria sequenciada na plataforma com MiSeq Reagent kit v2 2 x 250 pb.

4.3. Identificação pelo sistema BIOLOG™ - GEN III

Os isolados foram analisados pelo sistema BIOLOG™ - GEN III que fornece uma impressão digital do fenótipo bacteriano que pode ser utilizado para a identificação ao nível de espécie, com o uso de *software* específico que confronta os resultados obtidos com um extenso banco de dados contendo o perfil fenotípico de espécies previamente identificadas. O método consiste no cultivo das bactérias na presença de 71 fontes de carbono distintas e 23 ensaios de sensibilidade química, feitos em microplacas de polietileno de 96 poços. Um esquema representativo é mostrado na Figura 1. Para a realização do teste, uma alíquota do cultivo bacteriano, realizado conforme descrito no item 3.2, foi inoculada em estrias na superfície de meio DYGS sólido em placa de Petri com auxílio de uma alça de platina. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por 24 h. Com auxílio de uma alça de inoculação, uma colônia foi transferida para tubo de ensaio contendo o meio denominado “fluido A inoculante” e a densidade celular da suspensão ajustada para 90 a 98% de absorvância com auxílio de um turbidímetro. Uma alíquota de 100 µL desta suspensão foi transferida para cada

um dos poços da placa de polietileno contendo o reagente a ser testado, com o auxílio de uma pipeta multicanal. As placas foram vedadas e incubadas em estufa a 33 °C por 24 h. Após o período de incubação, as placas foram analisadas em um leitor semiautomático, e os resultados interpretados pela identificação do sistema de software, contendo o banco de dados GEN III. Os valores de absorvância computados como ‘positivo’, a alteração da cor do meio de cultura para roxa, ou ‘negativo’, quando não havia qualquer alteração. O resultado ‘positivo’ significa a capacidade de utilização da fonte de carbono ou a resistência ao agente estressante, o que resulta na alteração da cor original do meio. Os perfis gerados em cada placa, que representa a análise de um único isolado bacteriano, foram analisados no programa *Bio*, integrante do *kit* BIOLOG™ - GEN III, originando resultados que expressam a probabilidade e a similaridade do organismo em estudo com as espécies do banco de dados, o que, em conjunto, e após análise estatística, fornece a identificação da espécie avaliada. Caso o resultado seja um falso positivo, não é possível a identificação do isolado, e, assim, o teste foi repetido utilizando o mesmo procedimento, substituindo, porém, o “fluido A” por “fluido B” para o preparo da suspensão bacteriana.

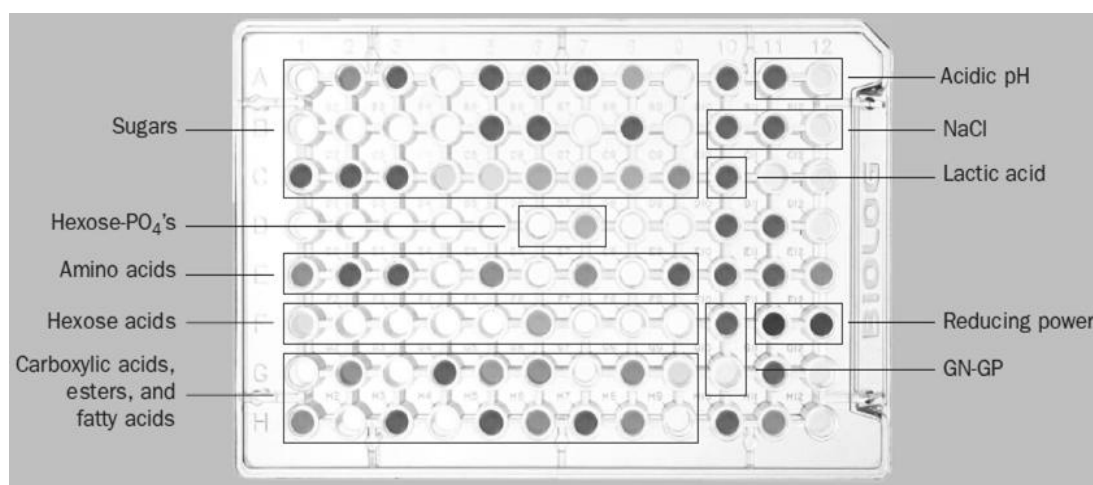


Figura 1: Layout da microplaca de 96 poços da Biolog™-GEN III, composto de 71 fontes de carbono e 23 ensaios de sensibilidade química.

4.4. Avaliação quanto à tolerância ao estresse oxidativo

4.4.1. Estresse oxidativo causado pela exposição ao H₂O₂

Foram utilizadas duas metodologias para avaliar o estresse oxidativo causado pela exposição ao H₂O₂: o teste de tolerância em meio de cultivo sólido e a atividade enzimática da catalase.

O teste de tolerância a H₂O₂ em meio de cultivo sólido é baseado na formação de um halo de inibição do microrganismo ao redor do disco contendo o agente estressante (Bauer *et al.*, 1966). Para condução dos ensaios, as bactérias foram cultivadas em meio DYGS líquido, conforme descrito no item 2.1, com a densidade óptica ajustada para 0,800 (DO₆₀₀=0,8). Em seguida, uma alíquota de 100 µl do inóculo foi inoculada no meio sólido e espalhada com auxílio de uma alça de Drigalski. Após a secagem do inóculo na placa de Petri, um disco de papel estéril de mm de diâmetro foi colocado no centro, adicionando-se sobre esta uma solução de 10 µl de H₂O₂ a 10 M. Em seguida, a placa foi incubada em estufa a 30 °C durante 3 dias. A avaliação do halo de inibição foi feita por sua medição com o auxílio de um paquímetro. O ensaio foi realizado em triplicata.

O teste enzimático permite detectar a presença da catalase, cuja função é promover a decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio livre. Para realização do teste, uma alíquota de 30 µL de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) é depositada no fundo de uma placa de Petri ou na superfície de uma lâmina de vidro e sobre ela será colocada uma alíquota de 30 µL do cultivo bacteriano (item 2). Reagente e amostra são misturados delicadamente com a alça. O teste é identificado como positivo quando o oxigênio é liberado levando à formação de bolhas. Na ausência de bolhas o teste é identificado como negativo.

4.4.2. Estresse oxidativo causado pela exposição a cobre e cádmio

A concentração inibitória mínima (CIM) de cobre foi determinada de acordo com o método descrito por Cooksey *et al.* (1990). Para o teste de CIM com cobre e cádmio, que define a menor concentração destes metais que inibe o crescimento da bactéria, o isolado foi cultivado em meio DYGS líquido contendo concentrações crescentes de CuSO₄ (0; 0,1; 1,0 e 2,5 mM) e CdCl₂ (0; 0,1; 0,5 e 0,75 mM). Os tubos foram incubados em agitador orbital a 30 °C por 1 dia a 175

rpm, e após esse período a viabilidade das células foi analisada por turbidimetria em espectrofotômetro (600 nm).

4.4.3. Estresse oxidativo causado pelo oxigênio molecular

A avaliação do nível de tolerância ao estresse gerado pelo metabolismo aeróbico foi feita pelo estudo da cinética de crescimento da bactéria em biorreator de bancada em duas diferentes condições de transferência de oxigênio. O processo fermentativo foi realizado em sistema descontínuo, empregando-se biorreator B. Braun Biotech, modelo Biostat B, com cuba de vidro com volume útil de 2 L, e volume inicial de meio de 1,5 L. A temperatura foi mantida em 30 °C e o pH do meio corrigido em 6,0 com adição automática de NaOH 4 M ou H₂SO₄ 2 M. No início do processo, as condições de aeração e agitação foram ajustadas em 1 vvm e 600 min⁻¹. Porém, quando a concentração de oxigênio dissolvido (OD) atingiu o valor de 20% da saturação do meio, o mesmo foi mantido em dois valores: 20% (controle) e 100% (tratamento) da saturação, até o final do cultivo. A manutenção destes valores de OD foi feita automaticamente pela variação da frequência de agitação e/ou da vazão de ar, conforme permitido pela configuração do biorreator. O crescimento foi avaliado pela medida da densidade ótica de amostras do meio fermentado. Os ensaios foram realizados em triplicata, para cada uma das duas condições testadas.

As concentrações de glicose foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizando equipamento Shimadzu modelo LC10A VP. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro de 0,20 µm. Foi usado um detector de espalhamento de luz (ELSD-LT II), com a coluna Prevail Carbohydrate ES 5 µm (250 x 4,6 mm), na temperatura de 25 °C, utilizando-se 10 µL de amostra. Os solventes utilizados foram água ultra pura (solvente A) e acetonitrila 100% (solvente B). A corrida foi realizada em gradiente isocrático ajustado para 80% de solvente B durante 20 min, com fluxo de 1 mL.min⁻¹. O detector foi ajustado para a temperatura de 40 °C e pressão de 350 KPa, com nitrogênio. As áreas e tempos de retenção dos compostos foram avaliados por comparação com padrão de glicose em diferentes concentrações.

4.5. Detecção da produção de ERO por microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência foi empregada para detectar qualitativamente a produção endógena de ERO em resposta ao metabolismo oxidativo, durante a cinética de crescimento e a produção final de biomassa bacteriana sob diferentes condições de oxigênio, utilizando a sonda fluorogênica permeável às células bacterianas, 2',7' diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (MERCK). No interior da célula enzimas citosólicas (esterases) desacetilam o DCFH-DA para formar o 2',7' diclorofluoresceína (DCFH), que na presença de ERO geradas durante o metabolismo oxidam o DCFH formando o 2',7' diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência verde. As amostras foram retiradas durante fermentação em biorreator, nos tempo de 2, 4, 6 e 8 h. Uma alíquota de 47,5 µL do cultivo foi tratada com 2,5 µL da sonda e incubada no escuro por 30 min a 30 °C e agitação de 120 min⁻¹ (agitadora-incubadora NOVA ÉTICA 430 RDB). Após este período, uma alíquota de 10 µL foi depositada na superfície de uma lâmina de vidro, coberta com lamínula, e analisada em um microscópio invertido de fluorescência (Zeiss Axio Vert.A1), utilizando filtros para detecção de fluoresceína de excitação e emissão de 450-490 nm e 500 nm, respectivamente.

4.6. Análise de proteômica

A análise proteômica foi baseada na quantificação relativa das proteínas de biomassa de *E. cloacae* UENF P7 obtida em processo fermentativo. As proteínas diferencialmente reguladas foram extraídas de 3 amostras biológicas, nas duas condições (controle e tratamento). As amostras foram retiradas no tempo de 6 h de cultivo, seguindo-se o resultado de análise prévia da cinética de crescimento em cada condição testada. Para a extração de proteínas totais foi utilizado o protocolo descrito por (Natarajan *et al.*, 2005) modificado. Para tanto, adicionou-se 1 mL de tampão de extração TCA/Acetona (ácido tricloroacético 10% em acetona com 20 mM de ditioneitol - DTT) e mantidas sob agitação constante a 4 °C por 60 min. Em seguida, foram incubadas por 60 min a -20 °C e, posteriormente, centrifugadas a 12.000 g a 4 °C por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado três vezes pela adição de acetona gelada contendo 20 mM de DTT, breve agitação e centrifugação a 12.000 g por 5 min, 4 °C. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e o pellet secou à temperatura ambiente por aproximadamente 30 min. Os pellets foram

ressuspensos em 0,7 mL de tampão ureia/tioureia (7M ureia, 2M tioureia, 1% DTT, 2% triton X-100, 5 μ M pepstatina, 1mM fenilmetanosulfonilfluorídrico – PMSF) e mantidos sob agitação até completa homogeneização das amostras. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante proveniente desta centrifugação foi coletado e as proteínas totais foram quantificadas.

A concentração de proteínas totais foi estimada utilizando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare, UK) segundo recomendações do fabricante. A leitura da absorbância de cada amostra e da curva padrão com soro de albumina bovina (BSA, GE Healthcare, UK) foi realizada em leitor de microplacas Synergy 2 Multimode Reader (Biotek Instruments, USA) a 480 nm. As amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C até as análises proteômicas. Antes da etapa de digestão, as amostras foram precipitadas com a utilização de membranas Vivaspin 500MWCO5000 (GE Healthcare), utilizando como tampão bicarbonato de amônia (Sigma-Aldrich) na concentração de 50mM e pH 8.5. As membranas foram preenchidas com bicarbonato de amônia até o máximo de sua capacidade e centrifugadas a 15.000 g for 20 min at 8 °C. Este procedimento foi repetido pelo menos por 3 vezes até restarem cerca de 50 μ L da amostra. A metodologia utilizada para a digestão de proteínas é a descrita por Calderan-Rodrigues *et al.* (2014). Foram adicionados 25 mL de 0,2% (v/v) de RapiGest® (Waters, Milford, CT, EUA) às amostras, que foram brevemente vortexadas e incubadas durante 15 min em um Eppendorf Thermomixer® a 80 °C. Posteriormente, 2,5 mL de ditioneitol (DTT) 100 mM foram adicionados, e os tubos foram incubados a 60 °C durante 30 min, sob agitação. Adicionaram-se 2,5mL de iodoacetamida 300mM, seguidos de agitação e incubação no escuro durante 30 min à temperatura ambiente. A digestão foi feita pela adição de 20 μ L de solução de tripsina (50ngmL⁻¹) (V5111, Promega, Madison, WI, EUA), preparada em bicarbonato de amônio 50mM. As amostras foram incubadas a 37 °C *overnight*. Em seguida, para a precipitação do RapiGest®, 10 μ L de ácido trifluoroacético (TFA) 5% (v/v) foram adicionados e incubados a 37 °C durante 90 min, seguido por um passo de centrifugação de 30 min a 15.000xg. As amostras foram transferidas para tubos "Total Recovery Vials" (Waters).

A análise de *shotgun* foi feita segundo metodologia descrita por Liu *et al.* (2004). As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massas SYNAPT

G2 HDMS Si (nano cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a um espectrômetro de massas quadrupolo-tempo de voo, em tandem). Um UPLC nanoACQUITY ligado a um espectrômetro de massas SYNAPT G2-Si HDMS (Waters, Manchester, Reino Unido) foi utilizado para análise de LC-ESI-MS/MS. O espectrômetro de massa é operado em modo de resolução (modo V) e positivo com mobilidade iônica; transferência de energia de colisão de 19 a 45V, no modo de alta energia; cone de tensão e capilar de 30v e 2800v, respectivamente, e temperatura da fonte de 70 °C. Para os parâmetros do TOF, o tempo de verificação foi definido para 0.5s, em modo contínuo, e uma faixa de massa de 50 a 2000 Da.

O programa Mass Linx foi utilizado na identificação de proteínas. A lista de peptídeos foi contrastada com a base de dados de proteínas do banco particular obtido pela anotação do genoma de *Enterobacter cloacae* UENF P7. Após a identificação, as proteínas foram selecionadas de acordo a análise ANOVA, tendo sido selecionadas as proteínas com $p < 0,05$, e a diferença mínima de *fold change* de 1,5 vezes. As proteínas abundantes que tiveram o número EC (*Enzyme Commission*) atribuídos pelo programa Blast2GO software v3.0 PRO foram classificadas de acordo com a sua atividade enzimática segundo a nomenclatura do NCIUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*).

4.7. Análise das características promotoras do crescimento vegetal

4.7.1. Solubilização de fosfato

Para avaliar a capacidade do isolado em solubilizar fósforo foi utilizada a metodologia baseada na formação de um halo translúcido (zona de clareamento) ao redor da colônia. O meio de cultura foi suplementado com $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de fosfato de cálcio terciário ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), com a seguinte composição (g.L^{-1}): glicose, 10,0; NH_4Cl , 5,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0; agar, 15,0 (Verma *et al.*, 2001). O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,0. Uma alíquota de 20 μL do cultivo bacteriano foi colocada na superfície dos meios em placas de Petri, as quais foram incubadas em estufa a 30 °C durante 7 dias para observação da formação ou não do halo de solubilização. A avaliação do halo de solubilização foi feita por medição, com o auxílio de um paquímetro, sendo o resultado expresso pela fórmula: diâmetro do

halo (cm) = diâmetro total - diâmetro da colônia. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.7.2. Produção de fitormônio

Para avaliar a produção de compostos indólicos realizou-se o teste colorimétrico de Salkowski (Glickmann e Dessaux, 1995). Uma alíquota de 10 μL da suspensão bacteriana contendo 10^8 células mL^{-1} , foi inoculada em 10 mL de meio DYGS com e sem suplementação de triptofano ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Após 72 h de incubação a 130 min^{-1} a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, misturou-se 1 mL de sobrenadante com 1 mL do reagente de Salkowski (SARWAR *et al.*, 1995). A reação foi mantida no escuro por 30 minutos e após foram realizadas leituras de espectroscopia a 420 nm. A análise foi realizada em triplicata.

4.7.3. Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

Para avaliar a atividade enzimática do isolado quanto a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico foi utilizada a metodologia baseada na formação de uma película aerotóxica no meio de cultura semi-sólido (isento de N) (Döbereiner *et al.*, 1995). A bactéria foi cultivada em meio DYGS, conforme descrito no item 2.1. Em seguida, lavada com solução salina (NaCl 0,85%) e o pellet ressuspendido em água destilada. Alíquotas de 20 μL da suspensão celular foram inoculadas em triplicatas em frascos de 10 mL contendo 5 mL de semi-sólido JNFb e NFb (Döbereiner *et al.*, 1995) e incubadas em estufa a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 7 dias, caracterizando-se como positivo aqueles com evidente formação de película na superfície.

5. Referências

Achà, D.; Iniguez, V.; Roulet, M.; Guimarães, J.R.D.; Luna, R.; Alanoca, L.; Sanchez, S., 2005. Sulfate-reducing bacteria in floating macrophyte rhizospheres from an Amazonian Floodplain Lake in Bolivia and their association with Hg methylation. *Appl. Environmental. Microbiology.* 71, 7531-7535.

Ali, A.I.-B., Bour, M. E., Ktari, L., Bolhuis, H., Ahmed, M., Boudabbous, A., Stal, L.J. 2012. *Jania rubens*-associated bacteria: molecular identification and antimicrobial activity. *Journal of Applied Phycology.* 24, 525-534.

Andreote, F. D., Azevedo, J. L., Araújo, W. L. 2009. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. *Brazilian Journal of Microbiology.* 40, 417-32.

Baker, C. J., Orlandi, E. W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology.* 33, 299-321.

Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS.* 61, 192-208.

Chernin, L., Brandis, A., Ismailov, Z. Chet, I. 1996. Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strain with a broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopathogens. *Current Microbiology.* 32, 208-212

Clementino, M.M., Filippis, I., Nascimento, C.R., Branquinho, R., Rocha, C.L., Martins, O.B. 2001. PCR Analyses of tRNA Intergenic Spacer, 16S-23S Internal Transcribed Spacer, and Randomly Amplified Polymorphic DNA Reveal Inter- and Intraspecific Relationships of *Enterobacter cloacae* Strains. *Journal. Clinical Microbiology.* 39, 3865-3870.

Coulson, T.J.D., Patten, C.L. 2015. Complete genome sequence of *Enterobacter cloacae* UW5, a rhizobacterium capable of high levels of indole-3-acetic acid production. *Genome Announcements.* 3, e00843-15.

Coady, A., Xu, M., Phung, Q., Cheung, T. K., Bakalarski, C., Alexander, M. K., Nishiyama, M. 2015. The *Staphylococcus aureus* ABC-Type Manganese Transporter MntABC Is Critical for Reinitiation of Bacterial Replication Following Exposure to Phagocytic Oxidative Burst. *Plos One.* 10, e0138350.

Dalton, T. P., Shertzer, H. G., Puga, A. 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 39, 67-101.

Dröge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 82, 47-95.

Ercal, N., Yang, P., Aykin, N. 2001. Determination of biological thiols by high-performance liquid chromatography following derivatization by Thio Glomaleimide reagents. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 753, 287-292.

Ferdoushi, Z., Haque, F., Khan, S., Haque, M. 2008. The effects of two aquatic floating macrophytes (Lemna and Azolla) as biofilters of nitrogen and phosphate in fish ponds. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 8, 253-258.

Foyer, C. H., Noctor, G. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*. 119, 355-364.

French, C.E., Nicklin, S., Bruce, N.C. 1998. Aerobic Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by Pentaerythritol Tetranitrate Reductase. *Applied and Environmental Microbiology* . 64, 2864-2868.

Fridovich, I. 2011. Superoxide Dismutases : Anti- Versus Pro- Oxidants? Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. 11, 175-177.

Galiazzo, F., Pedersen, J. Z., Civitareale, P., Schiesser, A. 1989. Manganese accumulation in yeast cells. Electron-spin-resonance characterization and superoxide dismutase activity. *Biology of Metals*. 2, 6-10.

Gill, S. S., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48, 909-930.

Haq, R., Zaiki, S.K., Shakoori, A.R. 1999. Cadmium resistant *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella* sp. isolated from industrial effluents and their possible role in cadmium detoxification *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 15, 283-290.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2006. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press, Oxford.

Hua, X., Wu, Z., Zhang, H., Lu, D., Wang, M., Liu, Y., Liu, Z. 2010. Degradation of hexadecane by *Enterobacter cloacae* strain TU that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier. *Chemosphere*. 80, 951-956.

Imlay, J.A. 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microb.* 7, 443-54.

Jones, J. D. G., Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature.* 444, 323-329.

Khanna, N., Kotay, S.M., Gilbert, J.J., and Das, D., 2011. Improvement of biohydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 under regulated pH. *Journal Biotechnology.* 152, 9-15.

Kohen, R., Nyska, A. 2002. Toxicologic Pathology. *Toxicologic Pathology.* 30, 620-650.

Kumar, N., and Das, D., 2001. Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. *Enz. Microbial Technol.* 29, 280-287.

Ligeza, A., Tikhonov, A. N., Hyde, J. S., Subczynski, W. K. 1998. Oxygen permeability of thylakoid membranes: electron paramagnetic resonance spin labeling study. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1365, 453-63.

Liu, W.H., Wong, C.F., Chung, K.M.K., Jiang, J.W., Leung, F.C.C. 2013. Comparative genome analysis of *Enterobacter cloacae*. *Plos One.* 8, 1-15.

Lu, J., Holmgren, A. 2014. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine.* 66, 75-87.

McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C. G., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., Wernegreen, J. J. 2013. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 110, 3229-3236.

Messner, K. R. 2002. Mechanism of Superoxide and Hydrogen Peroxide Formation by Fumarate Reductase, Succinate Dehydrogenase, and Aspartate Oxidase. *Journal of Biological Chemistry.* 277, 42563-42571.

Messner, K. R., Imlay, J. A. 1999. The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry.* 274, 10119-10128.

Nie, L., Shah, S., Burd, G.I., Dixon, D.G., Glick, B.R. 2002. Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting

bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. *Plant Physiology Biochemistry*. 40, 355-361.

Oliveira, V., Gomes, N. C. M., Almeida, A., Silva, A. M. S., Silva, H., Cunha, Â. 2015. Microbe-Assisted Phytoremediation of Hydrocarbons in Estuarine Environments. *Microbial Ecology*. 69, 1-12.

Pahl, H.L., Baeurle, P.A. 1994. Oxygen and the control of gene expression. *Bioessays*. 16, 497-501.

Ren, Y., Ren, Y., Zhou, Z., Guo, X., Li, Y., Feng, L., Wang, L. 2010. Complete Genome Sequence of *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* Type Strain ATCC 13047. *Journal Bacteriology*. 192, 2463-2464.

Resende, M. L. V., Salgado, S. M. L., & Chaves, Z. M. 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 123-130.

Sarafzadeh, P., Hezave, A.Z., Ravanbakhsh, M., Niazi, A., and Ayatollahi, S., 2013. *Enterobacter cloacae* as biosurfactant producing bacterium: differentiating its effects on interfacial tension and wettability alteration mechanisms for oil recovery during MEOR process. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 105, 223-229.

Seaver, L. C., Imlay, J. A. 2001. Hydrogen Peroxide Fluxes and Compartmentalization inside Growing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 183, 7182-7189.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*. 1-26.

Singh, R.P., Jha, P., and Jha, P.N., 2017. Bio-inoculation of plant growth-promoting rhizobacterium *Enterobacter cloacae* ZNP-3 increased resistance against salt and temperature stresses in wheat plant (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Growth Regul.* 36, 783-98.

Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*. 31, 425-448.

Srivastava, J., Gupta, A., Chandra, H. 2008. Managing water quality with aquatic macrophytes. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 7, 255-266.

Sturz, a V. 1995. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant and Soil*. 175, 257-263.

Stout, L., Nüsslein, K. 2010. Biotechnological potential of aquatic plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*. 21, 339-345.

Taté, R., Cermola, M., Riccio, A., Diez-Roux, G., Patriarca, E. J. 2012. Glutathione is required by *Rhizobium etli* for glutamine utilization and symbiotic effectiveness. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*. 25, 331-40.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39, 44-84.

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160, 1-40.

Van Geem, M., Gols, R., van Dam, N. M., van der Putten, W. H., Fortuna, T., Harvey, J. A. 2013. The importance of aboveground-belowground interactions on the evolution and maintenance of variation in plant defense traits. *Frontiers in Plant Science*. 4, 431.

Yergeau, E., Bell, T., Champagne, J., Maynard, C., Tardif, S., Tremblay, J., Greer, C. 2015. Transplanting soil microbiomes leads to lasting effects on willow growth, but not on the rhizosphere microbiome. *Frontiers in Microbiology*. 6, 1-14.

Yrueala, I. 2005. Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 17, 145-156.

Xu, C., He, S., Liu, Y., Zhang, W. Lu, D. 2017. Bioadsorption and biostabilization of cadmium by *Enterobacter cloacae* TU *Chemosphere*. 173, 622-629.

Zamioudis, C., e Pieterse, C. M. J. 2012. Modulation of Host Immunity by Beneficial Microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 139-150.

6. CAPÍTULO 1

**SEQUENCIAMENTO GENÔMICO DE *Enterobacter cloacae* UENF P7
ISOLADA DE PLANTA AQUÁTICA: UMA BACTÉRIA PROMOTORA DE
CRESCIMENTO VEGETAL E RESISTENTE A ESTRESSES AMBIENTAIS**

Nathália Duarte da Silva^a, Nicholas Costa Barroso Lima^c, Alan Trindade Branco^d,
Laura Mathias Barroso^b, Luciano Vespoli^a, Gonçalo Apolinário de Souza Filho^a,
Aline Chaves Intorne^b, Marília Amorim Berbert de Molina^{a,*}

^aLaboratório de Biotecnologia (LBT), Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro (UENF), Avenida Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes
28013-602, Rio de Janeiro, Brasil;

^bLaboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM/UENF),
Avenida Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes 28013-602, Rio de
Janeiro, Brasil;

^cLaboratório de Bioinformática (LabInfo), Laboratório Nacional de Computação
Científica (LNCC), Avenida Getúlio Vargas, 333, Petrópolis 25651-075, Rio de
Janeiro, Brasil;

^dCentro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES),
Maruípe Vitória 29043-900, Espírito Santo, Brasil;

*Autora correspondente: Laboratório de Biociências e Biotecnologia (LBT),
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Avenida
Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes 28013-602, Rio de Janeiro,
Brasil. E-mail: mberbert@uenf.br; Tel: +55-22-2739-7088.

RESUMO

O sequenciamento do genoma de *Enterobacter cloacae* UENF P7, isolada da planta aquática *Pistia stratiotes*, revelou a presença de genes relacionados à adaptação da bactéria ao hospedeiro (defesa antioxidante e vias do metabolismo central que permitem absorção de nutrientes liberados pela planta), colonização (quimiotaxia e flagelos), adesão às raízes (fímbrias e biossíntese de celulose) e proteção da planta (compostos antimicrobianos e resistência a antibióticos). Também foram encontrados genes potencialmente envolvidos na promoção do crescimento vegetal (metabolismo de nitrogênio, produção de compostos indólicos, trealose e sideróforos, e solubilização de fosfato). A análise revelou ainda que a bactéria carrega genes de resistência a metais (cobre, zinco, cobalto, cádmio, níquel e arsênio) e a salinidade e para degradação de compostos xenobióticos. Em ensaios *in vitro*, foi demonstrada a capacidade de fermentar inúmeras fontes de carbono, produzir compostos indólicos e solubilizar fosfato, assim como resistência a cobre e cádmio, peróxido de hidrogênio e vários outros compostos tóxicos. Em conjunto, as características de *E. cloacae* UENF P7 indicam grande potencial para emprego em processos biotecnológicos como a produção de bioinoculantes e biorremediação.

Palavras-chave: *Enterobacter cloacae*, genoma, estresse oxidativo, promoção do crescimento, biorremediação

1. Introdução

A exploração excessiva e desordenada dos recursos hídricos tem gerado um forte impacto nos ecossistemas aquáticos. Além da escassez, a deterioração da qualidade da água, atribuída principalmente aos insumos antropogênicos e processos naturais (Shin *et al.*, 2013), tornou-se uma das principais preocupações em todo o mundo (Xie *et al.*, 2013; Morse e Wollheim, 2014). A contaminação dos ambientes aquáticos por metais tóxicos é um dos aspectos mais severos desta questão, pois, ao contrário dos poluentes orgânicos, são persistentes e bioacumulativos (Pio *et al.*, 2013).

A fitorremediação é uma ferramenta biotecnológica atrativa e promissora para a remoção de poluentes em ambientes contaminados (Odjeigba and Fasidi, 2004; Sood *et al.*, 2012; Galal e Shehata, 2014). Neste contexto, plantas aquáticas com capacidade para remoção de contaminantes orgânicos e acúmulo de metais constituem uma opção ambientalmente amigável para restaurar recursos aquáticos poluídos e no tratamento de efluentes industriais e águas residuais (Sood *et al.*, 2012; Srivastava *et al.*, 2017). Plantas aquáticas são substrato para uma comunidade microbiana diversa presente nos corpos d'água (Ali *et al.*, 2012), principalmente membros da família de bactérias Enterobacteriaceae, que é ubíqua nos ecossistemas aquáticos (Srivastava *et al.*, 2017). Entretanto, a relação entre plantas aquáticas e sua microbiota é pouco compreendida (Achà *et al.*, 2005). Por outro lado, a aplicação biotecnológica de plantas no tratamento de águas contaminadas está fortemente ligada à associação da mesma com uma miríade de microrganismos (Ali *et al.*, 2012). Essa interação contribui para a fisiologia da planta, assim como nos processos de desintoxicação e aumento de tolerância a estresses oxidativos (Oliveira *et al.*, 2015). Adicionalmente, esse consórcio de microrganismos tem um papel vital para aumentar a capacidade de absorção da planta e, dessa forma, aumentar a capacidade de remoção de metais de águas residuais (Collins *et al.*, 2004; Buta *et al.*, 2014).

Enterobacter cloacae tem sido isolada da rizosfera de várias plantas, e estudos tem demonstrado sua capacidade de colonização e associação benéfica com o hospedeiro (Liu *et al.*, 2013; Coulson *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2017). Algumas cepas são capazes de produzir fitohormônios (Riu e Patten, 2008; Bose *et al.*, 2016), sideróforos e compostos antimicrobianos (Taghavi *et al.*, 2010). Além

disso, a versatilidade metabólica da bactéria tem despertado grande interesse industrial, tais como a produção de hidrogênio (Kumar e Das, 2001; Khanna *et al.*, 2011), biosurfactante (Sarafzadeh *et al.*, 2013), e biorremediação (Haq *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2017). Neste sentido, visando ampliar o conhecimento genético dessa espécie e identificar linhagens com potencial biotecnológico para tratamento de águas contaminadas, sequenciamos o genoma de uma linhagem de *E. cloacae*, isolada de raízes de *Pistia stratiotes*, e caracterizamos sua habilidade metabólica. Análises genômicas revelaram que *E. cloacae* UENF P7 contém uma série de genes associados a propriedades de promoção de crescimento vegetal, de tolerância ao estresse oxidativo, degradação de xenobióticos e de resistência a metais. Além disso, esta cepa produz fitohormônios e resiste a altos níveis de cobre, cádmium, peróxido de hidrogênio e vários outros compostos tóxicos. Em conjunto, estas características a tornam uma candidata com elevado potencial como inoculante de plantas aquáticas usadas na fitorremediação de águas residuais contaminadas.

2. Materiais e Métodos

Enterobacter cloacae foi isolada de raiz da planta aquática *Pistia stratiotes*, oriunda do Rio Paraíba, Resende-RJ, Brasil. A cepa foi denominada *Enterobacter cloacae* UENF P7. A bactéria foi cultivada em meio DYGS, pH 6,0 (Rodrigues Neto, 1986) e o crescimento avaliado por turbidimetria a 600 nm. O DNA genômico foi extraído com QIAamp® DNA Mini kit (Quiagen) e purificado com QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen). A biblioteca foi preparada com Nextera kit (Illumina) e 50 ng de DNA, de acordo com o fabricante, e sequenciada *paired-end* utilizando MiSeq Reagent Kit v2 (2 x 250 bp) na plataforma Illumina. As leituras foram montadas *de novo* em 2.356 scaffolds usando o software Newbler 2.9 (N50 = 2.470). Os scaffolds foram comparados com o genoma de referência de 12 linhagens de *E. cloacae* (UW5, GGT036, ECNIH5, CAV1669, 34977, ECR091, EcWSU1, P101, ATC 13047, ATC 13047, SDM e ENHKU01), 3 de *Enterobacter aerogenes* (CAV1320, EA1509E e KCTC 2190) e 3 de *Enterobacter asburiae* (CAV1043, L1 e LF7a), e montado usando o software progressive Mauve disponível no software Mauve (versão do Windows lançada em 26/2/2015). Os genes foram preditos utilizando o programa *ab initio* AUGUSTUS v3.0.3 e

anotados utilizando o programa RAST. Os ORFs foram anotados com o NCBI Prokaryotic Genomes Annotation Pipeline e a sequência foi depositada sob o número de acesso NQLK00000000.1. Análise de ortologia foi realizada com a ferramenta online WebMGA (Program: rpsblast 2.2.15, Database: NCBI COG 28/3/2017) (Wu *et al.*, 2011).

A caracterização fisiológica da bactéria quanto à utilização de fontes de carbono e sensibilidade química foi realizada com o sistema automatizado GEN III MicroStation System (Biolog Inc.). A produção de catalase foi estimada pela capacidade de degradação de peróxido de hidrogênio a 3% (m/v), enquanto a tolerância ao H₂O₂ foi avaliada conforme descrito por Bauer *et al.* (1966). A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por cultivo em meio líquido contendo concentrações variadas de cobre (CuSO₄) e cádmio (CdCl₂), de acordo com o método descrito por Cooksey *et al.* (1990). A capacidade de solubilização de fosfato foi avaliada em meio sólido contendo Ca₅(PO₄)₃OH (Verma *et al.*, 2001). A produção de compostos indólicos foi medida pelo teste colorimétrico de Salkowski (Sarwar e Kremer, 1995).

3. Resultado e Discussão

O sequenciamento do genoma da bactéria *E. cloacae* UENF P7 teve uma cobertura média de 10 vezes, gerando um total de 2,356 contigs. A análise revelou que o genoma da bactéria tem um tamanho médio de 4.9 Mb com um conteúdo de G + C de 55%. A anotação automática revelou 6.403 genes. Dentre eles, 5.834 possuem regiões codificantes para proteínas e 83 codificam para RNAs (Tabela 1).

A análise funcional indicou que 5.470 genes estão associados com as 22 categorias COG (Fig. 1). As proteínas de maior abundância são as que regulam as funções metabólicas (42%), seguidas daquelas envolvidas nos processos celulares (23%). Ensaio realizados para avaliar a versatilidade metabólica de *E. cloacae* UENF P7 revelaram que ela é capaz de metabolizar 54 das 71 fontes de carbono testadas no trabalho (Tabela 2), as quais incluem as principais classes de compostos bioquímicos (carboidratos, ácidos acético e carboxílicos, aminoácidos, polímeros, aminas e amidas).

Tabela 1: Características do genoma de *Enterobacter cloacae* UENF P7.

Características do genoma	
GenBank accession	NQLK00000000.1
Tamanho (Mb)	4,9
Conteúdo G + C (%)	55
Número de genes	6.403
Número of CDSs (Genes que codificam proteínas)	5.834
Pseudogenes	486
Proteínas hipotéticas	952
Genes de rRNA	15
Genes de tRNA	62
ncRNAs	6

A habilidade das bactérias para colonizar ambientes específicos depende da sua capacidade de captar nutrientes necessários ao seu desenvolvimento (Kehl-Fie e Skaar, 2010). O genoma de *E. cloacae* UENF P7 codifica um grande número de transportadores envolvidos na absorção de carboidratos, aminoácidos e vários íons metálicos essenciais ao metabolismo bacteriano (Tabela S1). As análises *in silico* permitiram a identificação de proteínas transportadoras pertencentes às superfamílias ABC - *ATP-Binding Cassete* (328 genes), PTS - *Phosphotransferase system* (70 genes), MFS - *Major Facilitator System* (84 genes) e RND - *Resistance Nodulation and Cell Division* (20 genes). Além disso, estão presentes vias metabólicas importantes, como Embden-Meyerhof-Parnas e via das pentoses-fosfato, e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Estas características podem favorecer a adaptação e colonização de hospedeiros vegetais e são compatíveis com a habilidade da bactéria para este tipo de associação.

Ao avaliar a versatilidade metabólica de *E. cloacae* UENF P7 foi verificado que ela é capaz de utilizar 76% das 71 fontes de carbono disponíveis (Tabela 2), as quais incluem as principais classes de compostos bioquímicos (carboidratos, ácidos carboxílicos e acético, amino ácidos, polímeros e aminas e amidas), comprovando sua diversidade metabólica.

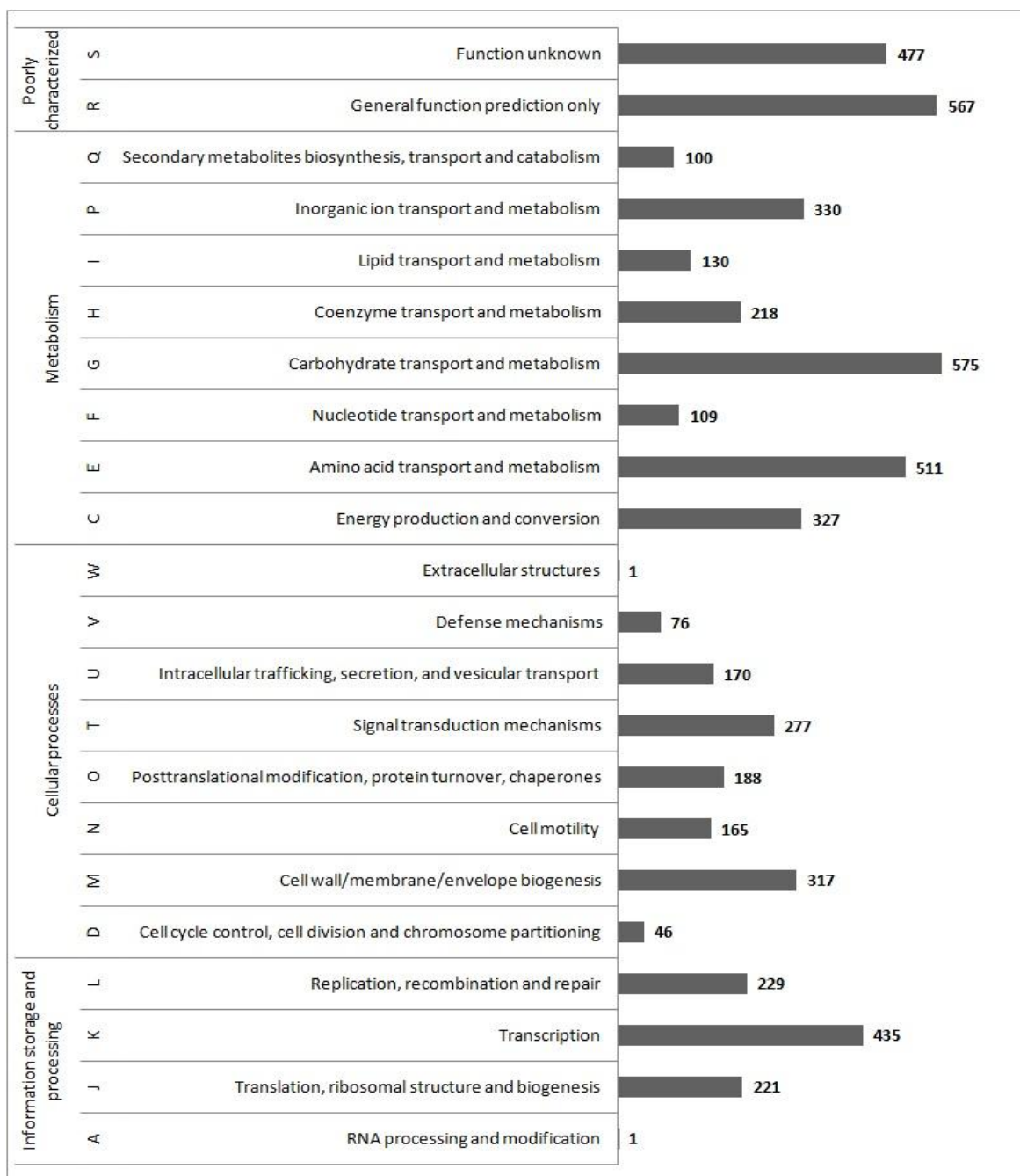


Figura1: Classificação funcional por COG do genoma de *Enterobacter cloacae* UENF P7.

A interação entre planta e microrganismos envolve uma série de genes para o reconhecimento e colonização das raízes. Inicialmente, há uma interação química, na qual moléculas liberadas pelas plantas são reconhecidas por receptores que controlam a quimiotaxia (Hölscher *et al.*, 2015). Subsequentemente, ocorre a ativação de fatores responsáveis pela motilidade. Finalmente, um grupo de genes de adesão é ativado para a interação física com a planta; este contato próximo e ancoragem iniciam a invasão dos tecidos vegetais

(Sprent e Defaria, 1988; Taghavi *et al.*, 2010; Kolter *et al.*, 2016). Análises do genoma da *E. cloacae* UENF P7 revelaram 25 genes relacionados à quimiotaxia, dentre os quais 15 codificam para proteínas MCPs (*Methyl-accepting Chemotaxis Proteins*) - quimiorreceptores fundamentais para os estágios iniciais da colonização e predominantes em bactérias. Essas proteínas respondem a mudanças na concentração de atraentes e repelentes no ambiente e modulam o comportamento de motilidade bacteriana (Ud-Din e Roujeinikova, 2017). Outros 8 genes identificados são diretamente responsáveis pela transdução de sinais quimiotáticos (*chemotaxis protein*) e 2 pela regulação da resposta (*chemotaxis response regulator protein-glutamate methyltransferase*). A quimiotaxia está diretamente relacionada à regulação da atividade flagelar, propiciando o movimento rápido da célula em direção a ambientes ricos em nutrientes (Soutourina *et al.*, 2003). As análises revelaram 49 genes que codificam para proteínas relacionadas à motilidade flagelar; dentre esses, 26 fazem parte dos componentes principais do flagelo. Por fim, a capacidade de aderência da bactéria *E. cloacae* UENF P7 foi avaliada. A análise revelou 1 gene para *adhesin* e 64 outros genes que facilitam a adesão às raízes, sendo 6 deles envolvidos na biossíntese de celulose e 58 na formação de fímbrias, um dos fatores chave na interação com o hospedeiro (Taghavi *et al.*, 2010). O número de genes para fímbrias descrito para essa espécie varia entre 9 e 13 (Liu *et al.*, 2013). Assim, a presença de 58 genes que codificam para fímbrias na linhagem *E. cloacae* UENF P7 sugere uma capacidade diferenciada para colonizar uma gama de hospedeiros e nichos ambientais (Liu *et al.*, 2013). Essa característica pode representar uma vantagem para a aderência à raiz e a sobrevivência no ambiente aquático.

A regulação do estresse oxidativo possui um papel fundamental no estabelecimento e manutenção da interação entre hospedeiros e simbioses (Taghavi *et al.*, 2010; Moné *et al.*, 2014). As bactérias utilizam um sistema complexo de defesa antioxidante para controlar os níveis basais de espécies reativas de oxigênio - ERO (Imlay, 2013). O mecanismo envolve a produção de uma variedade de enzimas antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 1989), como catalases, peroxidases e superóxido dismutase (Mishra e Imlay, 2012). Ensaios realizados *in vitro* e *in silico* indicaram que *E. cloacae* UENF P7 é positiva para atividade da enzima catalase e tolera até 10 M de H₂O₂. O fenótipo está associado a 3 genes que codificam para catalases distintas (*Mn-containing*

catalase, *catalase HPII* e *catalase/peroxidase HPI*) e 9 genes associados à resposta ao estresse por H₂O₂. Entre os primeiros estão *alkyl hydroperoxide reductase* (1 gene) e *peroxide stress protein YaaA* (1 gene), elementos-chave na eliminação de peróxido em *E. coli* (Seaver and Imlay, 2001; Liu *et al.*, 2011) e *peroxiredoxin* (3 genes). Além disso, foram observados diferentes tipos de superóxido dismutase [Mn-SOD (1 gene), Fe-SOD (1 gene) e Cu/Zn-SOD C2 (2 genes)], um antioxidante normalmente presente na forma de isoenzimas com cofatores metálicos distintos (Hippler *et al.*, 2015).

Tabela 2: Utilização de fontes de carbono e sensibilidade química de *Enterobacter cloacae* UENF P7.

Property	Chemical	Result
Source of Carbon	3-methyl glucose, acetic Acid, Acetoacetic Acid, Bromo-Succinic Acid, Citric Acid, D-Arabitol, D-Cellobiose, Dextrin, D-Fructose, D-Fructose- 6-PO ₄ , D-Fucose, D-Galactose, D-Galacturonic Acid, D-Gluconic Acid, D-Glucose- 6-PO ₄ , D-Glucuronic Acid, D-Lactic Acid Methyl Ester, D-Maltose, D-Mannitol, D-Mannose, D-Melibiose, D-Raffinose, D-Saccharic Acid, D-Serine, D-Sorbitol, D-Trehalose, Gentiobiose, Glucuronamide, Glycerol, Glycyl-I-Proline, Glycyl-I-Proline, Inosine, L-Alanine, L-Arginine, L-Aspartic Acid, L-Fucose, L-Glutamic Acid, L-Histidine, L-Lactic Acid, L-Malic Acid, L-Pyroglutamic Acid, L-Rhamnose, L-Serine, Mucic Acid, N-Acetyl Neuraminic Acid, N-Acetyl-d-Galactosamine, N-Acetyl-d-Glucosamine, N-Acetyl-β-d-Mannosamine, Pectin, p-HydroxyPhenylacetic Acid, Quinic Acid, Sucrose, α-D-Glucose, α-D-Lactose, β-Methyl-D-Glucoside	YES
	β-Hydroxy Butyric Acid, D-Aspartic Acid, D-Malic Acid, D-Salicin, D-Turanose, Formic Acid, Gelatin, L-Galactonic Acid Lactone, Methyl Pyruvate, myo-Inositol, Propionic Acid, Stachyose, Tween 40, γ-Amino-Butyric Acid, α-Keto-Butyric Acid, α-Keto-Glutaric Acid, β-Hydroxy-d,l-Butyric Acid	NO
Tolerance to Chemicals	8% NaCl, 1% Sodium Lactate, Fusidic Acid, D-Serine, Lincomycin, Guanidine HCl, Niaproof 4, Vancomycin, Tetrazolium Violet, Tetrazolium Blue, Lithium Chloride, Potassium Tellurite, Troleandomycin, Rifamycin SV, Aztreonam, Sodium Butyrate	YES
	Nalidixic Acid, Minocycline, Sodium Bromate	NO

O metabolismo celular é altamente dependente de Íons metálicos. Estimativas sugerem que quase 50% das enzimas dependem de cátions para sua função molécula (Andreini *et al.*, 2008). Todavia, apesar da relevância dos metais para muitos processos celulares, concentrações intracelulares elevadas perturbam o potencial redox da célula e favorece a geração de radicais hidroxila (Chong *et al.*, 2016). Por exemplo, cádmio, chumbo e mercúrio podem se ligar a macromoléculas, comprometendo suas funções fisiológicas e causando alta toxicidade (Klein e Lewinson, 2011). Em bactérias, diferentes proteínas transportadoras, tais como as ATPases de tipo P e os transportadores ABC, participam da manutenção da homeostase de metais. Em bactérias Gram-negativas, sistemas de transporte pertencentes às superfamílias RND e CDF são também essenciais (Nies, 2003).

No presente trabalho, a tolerância da bactéria ao cobre e a cádmio foi avaliada *in vitro* (Fig. 2). A produção de biomassa de *E. cloacae* UENF P7 foi similar na condição controle e em meio com até 0,1 mM de CuSO_4 (Fig. 2A). O aumento de dez vezes nesta concentração implicou em redução de 35% na DO final do cultivo, sendo o crescimento totalmente inibido na presença de 2,5 mM de cobre. O comportamento da bactéria na presença de cádmio, um elemento não essencial, apresentou perfil distinto ao observado para cobre. A adição de 0,1 mM de CdCl_2 causou forte inibição do crescimento, obtendo-se DO final cerca de 66% menor que a obtida no meio controle (Fig. 2B). A bactéria mostrou um nível similar de tolerância na presença de 0,5 mM do metal, em comparação com 0,1 mM, mas o crescimento foi inibido em meio com 0,75 mM do sal.

Haq *et al.* (1999) verificaram que *E. cloacae* CMBL-Cd1 tolerou uma concentração de CdCl_2 de $220 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (1,0 mM de CdCl_2) em teste de CIM. A cepa *Enterobacter* 638 foi capaz de crescer na presença de 0,5 mM de CdCl_2 (Taghavi *et al.*, 2010). Não foram encontrados relatos de tolerância a cobre em *E. cloacae* em cultivo líquido. Entretanto, linhagens de *E. cloacae* isoladas de sedimento de estuário e biofilmes anódicos resistiram até $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cobre, que é o equivalente a 3,9 mM de CuSO_4 em meio sólido (Altug e Balkis, 2009; Feng *et al.*, 2014). Assim, é possível concluir que a linhagem *E. cloacae* UENF P7 é muito resistente a metais, sugerindo um potencial biotecnológico para biorremediação de ambientes contaminados.

A análise do genoma de *E. cloacae* UENF P7 revelou 5 genes envolvidos na resistência ao cobre (*copper resistance protein*) e 2 genes que codificam *copper-translocating P-type ATPase*. A capacidade de tolerância ao cádmio da bactéria pode estar relacionada à presença do gene que codifica para a proteína CzcA (*CusA/CzcA family heavy metal efflux RND transporter*), já descrito como essencial para a resistência a cobalto-zinco-cádmio (Laviad-Shitrit *et al.*, 2017; Intorne *et al.*, 2012). Adicionalmente, também foram observados genes relacionados ao efluxo de arsênio (*arsenical efflux pump membrane protein ArsB*), e transportadores tipo ATPase tipo P para zinco, chumbo e mercúrio (*zinc/cadmium/mercury/lead-transporting ATPase* e *cadmium-translocating P-type ATPase*).

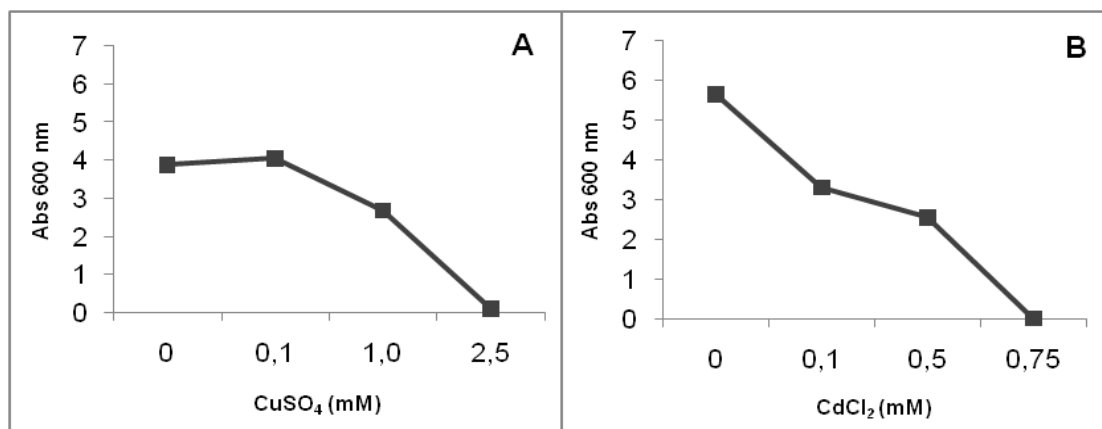


Figura 2: Tolerância de *E. cloacae* UENF P7 a diferentes concentrações de CuSO₄ (A) e CdCl₂ (B). Cultivo em meio DYGS por 24 h a 30 °C e 175 min⁻¹.

E. cloacae UENF P7 também carrega genes que codificam para enzimas com potencial para remoção de poluentes orgânicos do ambiente. Dentre elas, destaca-se a nitrilase (1 gene), que hidrolisa compostos de nitrilo em ácidos carboxílicos e seus derivados (Gong *et al.*, 2012) e amônia (Kohyama *et al.*, 2006); lipase (2 genes), que catalisa a esterificação, interesterificação, acidólise, alcoólise e aminólise (Pandey *et al.*, 1999), podendo ser usada para remediar contaminação por óleos e ter aplicações industriais como a produção de biocombustíveis; e amidase (1 gene), que converte o acetonitrilo em ácido acético (Kohyama *et al.*, 2006). Além desses, foram encontrados genes que codificam para diversas outras enzimas envolvidas na degradação de xenobióticos como tolueno, nitrotolueno, clorociclohexano, clorobenzeno e etil benzeno. Por exemplo,

foram identificados 11 genes *para alcohol dehydrogenase*, 5 genes *para aldehyde dehydrogenase* e 6 genes *para glutathione S-transferase*.

Bactérias que prosperam em um habitat natural requerem repertório genético essencial. Diferentes cepas de *E. cloacae* possuem múltiplos mecanismos de ação antagonista, característica essencial para a competição em uma comunidade microbiana. Entre eles estão a produção de sideróforos, compostos antimicrobianos, quitinases e proteínas de resistência a antibióticos (Liu *et al.*, 2013). A análise do genoma de *E. cloacae* UENF P7 mostrou vários genes de resistência a antibióticos (*multiple antibiotic resistance protein MarB*, *multiple antibiotic resistance transcriptional regulator MarR*, *antibiotic resistance protein MarC*, *class C beta-lactamase resistance*, *class D beta-lactamase resistance*, *glyoxalase/bleomycin resistance/dioxygenase family protein*, *glyoxalase/bleomycin resistance/extradiol dioxygenase family protein*) e de sistemas de transporte (23 genes) e efluxo multidrogas (*Bcr/CfIA family drug resistance efflux transporter*, *Bcr/CfIA family multidrug efflux MFS transporter*, *multidrug export protein EmrA*, *MATE family multidrug exporter*, *MATE family efflux transporter*, *EmrB/QacA family drug resistance*, *MexE family multidrug efflux RND transporter*, *multidrug efflux MFS transporter subunit EmrB*, *multidrug efflux pump-associated protein-AcrZ family*). A alta aptidão desta cepa foi ainda reforçada pelo teste *in vitro*, no qual a bactéria apresentou capacidade de crescer na presença de 16 dos 19 compostos químicos testados neste trabalho (Tabela 2).

Somada às características de resistência, que são importantes para os processos de biorremediação, a interação da bactéria com a planta também pode trazer outros benefícios como a promoção do crescimento vegetal. Alguns dos mecanismos descritos para bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPB) são a solubilização de fósforo (Saravanan *et al.*, 2007), a produção de fitormônios (Sethia *et al.*, 2015; Verma *et al.*, 2016), a fixação biológica de nitrogênio e a produção de sideróforos (Taghavi, *et al.*, 2010).

A síntese e secreção de sideróforos, que têm alta especificidade e afinidade pelo ferro insolúvel (Fe³⁺), é um mecanismo bem sucedido usado por bactérias para lidar com biodisponibilidade extremamente baixa de ferro (Vraspir e Butler, 2009). Alguns tipos de sideróforos foram encontrados no genoma de *E. cloacae* UENF P7: *enterobactin* (2 genes), *ferrichrome* (1 gene), *hydroxamate* (1 gene), *salmochelins* (1 gene), *lucA/lucC family siderophore biosynthesis protein* (1 gene)

and *aerobactin* (1 gene). Ao comparar o genoma de quatro estirpes de *E. cloacae*, Liu *et al.* (2013) confirmaram que todas carregam genes para biossíntese de enterobactina. As bactérias usam diferentes sistemas de transporte de ferro mediado por sideróforos. Em Gram-negativas, o transporte pode ser realizado por receptores de membrana externa TonB-dependentes, que reconhecem os complexos Fe^{+3} (Krewulak e Vogel, 2008). No genoma de *E. cloacae* UENF P7 foram identificados 10 genes que codificam para *TonB- dependent siderophore receptor*, além de *iron-enterobactin transporter* (3 genes) e outros transportadores sideróforos (5 genes). Também foram identificados genes que codificam para proteínas de armazenamento de ferro; as proteínas *ferritin* (3 genes) e *bacterioferritin* (2 genes) estocam ferro intracelular para uso quando os suprimentos externos são restritos e, simultaneamente, ajudam a minimizar a produção de ROS (Andrews *et al.*, 2003). Estão presentes, também, vários transportadores de ferro, incluindo os do sistema ABC.

Os sideróforos também podem desempenhar papel significativo na desintoxicação de ambientes contaminados, pois apresentam capacidade de se ligar a diferentes metais tóxicos (Saha *et al.*, 2016). No genoma de *E. cloacae* UENF P7 foram encontrados genes para *AraC family transcriptional regulator*, que pode estar associado a um ativador transcricional dos genes para receptores de *pyochelin* e *ferripyochelin*. *Pyochelin* é um sideróforo que quela uma variedade de metais catiônicos, como Ag^+ , Al^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} , e impede a entrada desses metais nas bactérias (Braud *et al.*, 2009).

A capacidade de algumas bactérias de solubilizar fosfato é uma das características mais importantes associadas à nutrição vegetal (Chen *et al.*, 2006). *E. cloacae* UENF P7 demonstrou aptidão para obter fósforo a partir de fosfato de cálcio terciário, tendo sido observado um halo de 25 mm de diâmetro ao redor da colônia em meio sólido. A análise do genoma revelou vários genes considerados importantes para a provisão de fosfato para plantas (Misra *et al.*, 2012; Duan *et al.*, 2013), incluindo genes que codificam para as enzimas da via de biossíntese de PQQ (*pyrroloquinoline quinone*) (7 genes), *phosphatase* (1 gene), *acid phosphatase AphA* (2 genes), *NADH pyrophosphatase* (1 gene), *phosphatase PAP2 family protein* (2 genes), *esterase-like activity of phytase* (1 gene) and *carbon-phosphorus lyase* (3 genes). A capacidade notável desta estirpe de solubilizar o fósforo pode estar associada às várias rotas de

metabolismo de carboidratos que ela exhibe (Tabela 2), o que, por sua vez, pode gerar diferentes ácidos orgânicos. Esses subprodutos secretados no meio ambiente podem solubilizar nutrientes para a planta (Saravanan *et al.*, 2007; Intorne *et al.*, 2009).

A produção de fitohormônios por microorganismos também é uma característica relevante para a associação com o hospedeiro (Kang *et al.*, 2009; Rashid *et al.*, 2012). *E. cloacae* UENF P7 possui genes que codificam *indolepyruvate decarboxilase* (2 genes) e *aldehyde dehydrogenase* (NAD⁺) (1 gene), que são enzimas chave na via de produção de IAA a partir de triptofano (Straub *et al.*, 2013). O genoma também codifica *TyrR family transcriptional regulator* (1 gene), cujo produto, o factor de transcrição TyrR, é requerido para a expressão do gene indolpiruvato decarboxilase em *E. cloacae* UW5, uma bactéria promotora de crescimento de plantas (Ryu e Patten, 2008). O estudo *in vitro* mostrou que esses genes são funcionais em *E. cloacae* UENF P7 e a bactéria produziu 20,08 µg.mL⁻¹ de compostos indólicos após 72 h de cultivo em meio DYGS suplementado com triptofano. Esta concentração é 6 vezes maior que a obtida com *E. cloacae* ZNP-3 (3,117 µg.mL⁻¹), considerada uma cepa promotora do crescimento vegetal (Singh *et al.*, 2017). Adicionalmente, o genoma de *E. cloacae* UENF P7 apresenta genes para a síntese de acetina, um potente composto volátil promotor de crescimento de plantas (Taghavi *et al.*, 2010): *acetolactate synthase* (12 genes) and *acetoin reductase* (1 gene).

Não foram encontrados genes diretamente relacionados à fixação de nitrogênio atmosférico (FBN) em *E. cloacae* UENF P7, mas a bactéria mostrou atividade da enzima nitrogenase quando cultivada *in vitro*. Por outro lado, o isolado contém vários genes para o metabolismo de nitrogênio (3 *nitrite reductase*, 11 *nitrate reductase*, 2 *nitrogen assimilation transcriptional regulator*, 2 *nitrogen regulation protein NR(I)*, 6 *glutamate synthase*, 2 *glutaminase*, 2 *histidine ammonia-lyase*, 1 *carbon-nitrogen hydrolase family protein*, 2 *nitrate/nitrite transporter*).

Pela primeira vez, o genoma de uma cepa de *E. cloacae* isolada de planta aquática foi sequenciada. *E. cloacae* UENF P7 é capaz de tolerar o estresse oxidativo e o estresse por metais, além de possuir rotas metabólicas que favorecem a saúde e o desenvolvimento das plantas. Somadas, estas habilidades podem aumentar a resistência do hospedeiro e contribuir para o crescimento das

plantas sob condições de estresse abiótico. Assim, este estudo indica a potencial aplicação desta bactéria como um inoculante para planta aquática, e o uso deste sistema para a fitorremediação de água poluída.

4- Referências

Achà, D.; Iniguez, V.; Roulet, M.; Guimarães, J.R.D.; Luna, R.; Alanoca, L.; Sanchez, S., 2005. Sulfate-reducing bacteria in floating macrophyte rhizospheres from an Amazonian Floodplain Lake in Bolivia and their association with Hg methylation. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7531-7535.

Ali, A.I.-B., El Bour, M., Ktari, L., Bolhuis, H., Ahmed, M., Boudabbous, A., Stal, L.J., 2012. *Jania rubens*-associated bacteria: molecular identification and antimicrobial activity. *J. Appl. Phycol.* 24, 525-534.

Altug, G., Balkis, N., 2009. Levels of some toxic elements and frequency of bacterial heavy metal resistance in sediment and sea water. *Environ. Monit. Assess.* 149, 61-69.

Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G.L., Thornton, J.M., 2008. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles *J. Biol. Inorg. Chem.* 13, 1205-1218.

Andrews, S.C., Robinson, A.K., and Rodríguez-Quñones, F., 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 215-37.

Bose, A., Kher, M.M., Nataraj, M., and Keharia, H., 2016. Phyto stimulatory effect of indole-3-acetic acid by *Enterobacter cloacae* SN19 isolated from *Teramnus labialis* (L.f.) Spreng rhizosphere. *Biocat. Agric. Biot.* 6, 128-137.

Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T., and Schalk, I.J., 2009. New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine–iron uptake pathway. *Environ. Microbiol.* 11, 1079-1091.

Buta, E., Torok, A., Csog, A., Zongo, B., Cantor, M., Buta, M., and Majdik, C., 2014. Comparative studies of the phytoextraction capacity of five aquatic plants in heavy metal contaminated water. *Not. Bot. Horti. Agrobi.* 42, 173-179.

Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.-A., and Young, C.C., 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.* 34, 33–41.

Chong, T.M., Yin, W.F., Chen, J.W., Mondy, S., Grandclément, C., Faure, D., Dessaux, Y., and Chan, K.G., 2016. Comprehensive genomic and phenotypic

metal resistance profile of *Pseudomonas putida* Strain S13.1.2 isolated from a vineyard soil. *AMB Express* 6, 95.

Collins, B., McArthur, J.V., and Sharitz, R.R., 2004. Plant effects on microbial assemblages and remediation of acidic coal pile runoff in mesocosm treatment wetlands. *Ecol. Eng.* 23, 107-115.

Cooksey, D., AZAD, H.R., Cha, J.-S., Lim, C.-K., 1990. Copper resistance gene homologs in pathogenic and saprophytic bacterial species from tomato. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 431-435.

Coulson, T.J.D., and Patten, C.L., 2015. Complete genome sequence of *Enterobacter cloacae* UW5, a rhizobacterium capable of high levels of indole-3-acetic acid production. *Genome Announc.* 3, e00843-15.

Das, S., Dash, H.R., and Chakraborty, J., 2016. Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2967-84.

Das, S., Goswami, S., and Talukdar, A.D., 2014. A study on cadmium phytoremediation potential of water lettuce, *Pistia stratiotes* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92, 169-174.

Dhir, B., Srivastava, S., (2013). Heavy metal tolerance in metal hyperaccumulator plant, *Salvinia natans*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 720-724.

Dhir, B., and Srivastava, S., 2011. Heavy metal removal from a multi-metal solution and wastewater by *Salvinia natans*. *Ecol. Eng.*, 37, 893-896.

Duan, J., Jiang, W., Cheng, Z., Heikkila, J.J., Glick, B.R., 2013. The complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas sp.* UW4. *PLoS ONE* 83, e58640.

Feng, C., Li, J., Qin, D., Chen, L., Zhao, F., Chen, S., Hu, H., Yu, C.P., 2014. Characterization of exoelectrogenic bacteria enterobacter strains isolated from a microbial fuel cell exposed to copper shock load. *PLoS One* 9, e113379.

Galal, T.M., and Shehata, H.S., 2014. Evaluation of the invasive macrophyte *Myriophyllum spicatum* L. as a bioaccumulator for heavy metals in some watercourses of Egypt. *Ecolog. Indicators*, 41, 209-214.

Gong J.S., Lu, Z.M., Li, H., Shi, J.S., Zhou, Z.M., and Xu, Z.H., 2012. Nitrilases in nitrile biocatalysis: recent progress and forthcoming research. *Microb. Cell. Fact.* 201, 1-18.

Gratão, P.L., Monteiro, C.C., Carvalho, R.F., Tezotto, T., Piotto, F.A., Peres, L.E., and Azevedo, R.A., 2012. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 56, 79-96.

Haq, R., Zaidi, S.K., and Shakoori, A.R., 1999. Cadmium resistant *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella sp.* isolated from industrial effluents and their possible role in cadmium detoxification. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15, 283-290.

Hippler, F.W.R., Boaretto, R.M., Quaggio, J.A., Azevedo, R.A., and Mattos, D., 2015. Towards soil management with Zn and Mn: estimates of fertilisation efficacy of citrus trees. *Ann. Appl. Biol.* 166, 484-495.

Hua, X., Wu, Z., Zhang, H., Lu, D., Wang, M., Liu, Y., and Liu, Z., 2010. Degradation of hexadecane by *Enterobacter cloacae* strain TU that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier. *Chemosphere* 80, 951-956.

Imlay, J.A., 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microb.* 7, 443-54.

Intorne, A.C., De Oliveira, M.V., De M. Pereira, L., and De Souza Filho, G.A., 2012. Essential role of the *czc* determinant for cadmium, cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. *Int Microbiol.* 15, 69-78

Intorne, A.C., De Oliveira, M.V., Lima, M.L., Da Silva, J.F., Olivares, F.L., and De Souza Filho, G.A., 2009. Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Arch. Microbiol.* 191, 477-83.

Kehl-Fie, T.E., and Skaar, E.P., 2010. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14, 218-24.

Khanna, N., Kotay, S.M., Gilbert, J.J., and Das, D., 2011. Improvement of biohydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 under regulated pH. *J. Biotechnol.* 152, 9-15.

Klein, J.S., and Lewinson, O., 2011. Bacterial ATP-Driven transporters of transition metals: physiological roles, mechanisms of action, and roles in bacterial virulence. *Metallomics* 3, 1098–1108.

Kohyama, E. et al., 2006. Convenient treatment of acetonitrile-containing wastes using the tandem combination of nitrile hydratase and amidase-producing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 600-606.

Kolter, R., Dietrich, L.E.P., and Kovács, A.T., 2015. Motility, chemotaxis and aerotaxis contribute to competitiveness during bacterial pellicle biofilm development. *J. Mol. Biol.* 427, 3695-3708.

Krewulak, K., and Vogel, H.J., 2008. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1781-1804.

Kumar S., Mathur, A., Singh, V., Nandy, S., Khare, S.K., and Negi, S., 2012. Bioresource technology bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase Produced by *Penicillium Chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. *Bioresour. Technol.* 120, 300-304.

Kumar, N., and Das, D., 2001. Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. *Enz. Microbial Technol.* 29, 280-287.

Laviad-Shitrit, S., Göker, M., Huntemann, M., Clum, A., Pillay, M., Palaniappan K., Varghese, N., Mikhailova, N., Stamatis, D., Reddy, T.B.K., Daum, C., Shapiro, N., Markowitz, V., Ivanova, N., Woyke, T., Klenk, H.P., Kyrpides, N.C., and Halpern, M., 2017. High quality permanent draft genome sequence of *Chryseobacterium bovis* DSM 19482T, isolated from raw cow milk. *Stand Genomic Sci.* 1-7.

Liu, W-H., Wong, C-F., Chung, K.M-K., Jiang, J-W., and Leung, F.C-C., 2013. Comparative genome analysis of *Enterobacter cloacae*. *Plos One* 8, 1-15. e74487.

Mishra, S., and Imlay, J., 2012. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Arch. Biochem. Biophys.* 525, 145-160.

Misra, H.S., Rajpurohit, Y.S., and Khairnar, N.P., 2012. Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. *J. Biosci.* 37, 313-25.

Moné, Y., Monnin, D., and Kremer, N., 2014. The oxidative environment: a mediator of interspecies communication that drives symbiosis evolution. *Proc. Biol. Sci.* 7, 281

Morse, N.B., and Wollheim, W.M., 2014. Climate variability masks the impacts of land use change on nutrient export in a suburbanizing watershed. *Biogeochemistry* 121, 45-59.

Nies, D.H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes, 2003. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 313-339.

Odjeigba, V., and Fasidi, I. 2004. Accumulation of trace elements by *Pistia stratiotes* (water lettuce): implication for phytoremediation". Soc. Environ. Toxicol. Chem. 4, 490.

Oliveira, V., Gomes, N.C., Almeida, A., Silva, A.M., Silva, H., and Cunha, Â., 2015. Microbe-assisted phytoremediation of hydrocarbons in estuarine environments. Microbial. Ecol. 69, 1-12.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., and Soccol, V.T., 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnol. Appl. Biochem. 29, 119-31.

Pio, M.C.S., de Souza, K. dos, S., and Santana, G.P., 2013. Capacidade da *Lemna aequinoctialis* para acumular metais pesados de água contaminada. Acta Amaz, 43, 203-210.

Rodrigues Neto, J., Malavolta Jr, V.A., Victor, O., 1986. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. Summa Phytopathol. 12, 16.

Ryu, R.J., and Patten, C.L., 2008. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. J. Bacteriol. 190, 7200-7208.

Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B.K., Bhattacharjee, S., and Tribedi, P., 2016. Microbial siderophores and their potential applications: a review. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 3984-99.

Sarafzadeh, P., Hezave, A.Z., Ravanbakhsh, M., Niazi, A., and Ayatollahi, S., 2013. *Enterobacter cloacae* as biosurfactant producing bacterium: differentiating its effects on interfacial tension and wettability alteration mechanisms for oil recovery during MEOR process. Colloids Surf. B. Biointerfaces 105, 223-229.

Saravanan, V.S., Madhaiyan, M., and Thangaraju, M., 2007. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Chemosphere 66, 1794-1798.

Sarwar, M., Kremer, R.J., 1995. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. Plant Soil 172, 261-269.

Seaver, L.C., Imlay, J.A. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*., 2001. J Bacteriol. 183, 7182-9.

Sethia, B., Mustafa, M., Manohar, S., Patil, S.V., and Jayamohan, N.S., 2015. Indole acetic acid production by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the rhizosphere of *Plectranthus Amboinicus* (Lour.) Spreng. and their variation in extragenic repetitive DNA sequences. *Indian J. Exp. Biol.* 53, 342-49.

Shin, J.Y., Artigas, F., Hobble, C., and Lee, Y.S., 2013. Assessment of anthropogenic influences on surface water quality in urban estuary, northern New Jersey: multivariate approach. *Environ. Monit. Assess.* 185, 2777-2794.

Singh, R.P., Jha, P., and Jha, P.N., 2017. Bio-inoculation of plant growth-promoting rhizobacterium *Enterobacter cloacae* ZNP-3 increased resistance against salt and temperature stresses in wheat plant (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Growth Regul.* 36, 783-98.

Sood, A., Uniyal, P.L., Prasanna, R., and Ahluwalia, A.S., 2012. Phytoremediation potential of aquatic macrophyte, *Azolla*. *AMBIO.* 41, 122-137.

Soutourina, O.A., Bertin, P.N., 2003 Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 505-23.

Sprent, J.I., Defaria, S.M., 1988. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant Soil* 110, 157-165.

Srivastava, J.K., Chandra, H., Kalra, S.J.S., Mishra, P., Khan, H., and Yadav, P., 2017. Plant-microbe interaction in aquatic system and their role in the management of water quality: a review. *Appl. Water Sci.* 7, 1079-1090.

Straub, D., Yang, H., Liu, Y., Tsap, T., and Ludewig, U., 2013. Root ethylene signalling is involved in *Miscanthus sinensis* growth promotion by the bacterial endophyte *Herbaspirillum frisingense* GSF30(T). *J. Exp. Bot.* 64, 4603-15.

Taghavi, S., Van Der Lelie D., Hoffman, A., Zhang, Y.B., Walla, M.D., Vangronsveld, J., Newman, L., and Monchy, S., 2010. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS Genet.* 6, 1000943.

Tatusov, R.L., 2000. The COG Database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* 28, 33-36.

Ud-Din, S., and Roujeinikova, A., 2017. Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea. *Cell. Mol. Life Sci.* 18, 3293-3303.

Verma, A., Singh, H., Anwar, M.S., Kumar, S., Ansari, M.W., and Agrawal, S., 2016. Production of thermostable organic solvent tolerant keratinolytic protease from *Thermoactinomyces* sp. RM4: IAA production and plant growth promotion. *Front Microbiol.* 7, 1-13.

Verma, R., McDonald, H., Yates, J.R., and Deshaies, R.J., 2001. Selective degradation of ubiquitinated Sic1 by purified 26S proteasome yields active S phase cyclin-Cdk. *Mol. Cell* 8, 439-48.

Wu, S., Zhu, Z., Fu, L., Niu, B., and Li, W., 2011. "WebMGA: a Customizable Web Server for Fast Metagenomic Sequence Analysis". *BMC Genomics.* 12, 444.

Xie, W.Y., Huang, Q., Li, G., Rensing, C., and Zhu, Y.G., 2013. Cadmium accumulation in the rootless macrophyte *Wolffia globosa* and its potential for phytoremediation. *Int. J. Phytoremediation* 15, 385-397.

Xu, C., He, S., Liu, Y., Zhang, W., and Lu, D., 2017. Bioadsorption and biostabilization of cadmium by *Enterobacter cloacae*. *Chemosphere* 173, 622-629.

Tabela S1: Genes que contribuem para a promoção do crescimento vegetal e para a resistência a estresses ambientais no genoma de *Enterobacter cloacae* UENF P7.

Características	Nome	Gene ID	
PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL			
Produção de AIA	<i>TyrR family transcriptional regulator</i>	PAC72150.1	
	<i>indolepyruvate decarboxylase</i>	PAC66931.1 PAC67712.1	
	<i>nitrilase family protein</i>	PAC70416.1	
Metabolismo de nitrogênio	<i>nitrogen assimilation transcriptional regulator</i>	PAC71316.1 PAC67642.1	
	<i>nitrogen regulation protein NR(I)</i>	PAC68428.1 PAC68199.1	
	<i>PTS IIA-like nitrogen regulatory protein PtsN</i>	PAC68615.1	
	<i>carbon-nitrogen hydrolase family protein</i>	PAC68247.1	
	<i>nitrate reductase A subunit alpha</i>	PAC67976.1	
	<i>nitrate reductase molybdenum cofactor assembly chaperone</i>	PAC71858.1 PAC68339.1 PAC68313.1	
	<i>nitrate reductase subunit alpha</i>	PAC71861.1 PAC69627.1	
	<i>nitrate reductase subunit beta</i>	PAC71859.1	
	<i>nitrate reductase</i>	PAC68540.1 PAC67438.1	
	<i>respiratory nitrate reductase subunit gamma</i>	PAC71857.1 PAC68338.1	
	<i>nitrate/nitrite two-component system sensor histidine kinase NarQ</i>	PAC67632.1 PAC68673.1	
	<i>nitrate/nitrite two-component system sensor histidine kinase NarX</i>	PAC68372.1 PAC67320.1	
	<i>nitrite reductase (NAD(P)H) small subunit</i>	PAC68890.1	
	<i>nitrite reductase (NAD(P)H)</i>	PAC71194.1	
	<i>nitrite reductase small subunit NirD</i>	PAC67663.1	
	<i>NarK family nitrate/nitrite MFS transporter</i>	PAC69629.1	
	<i>nitrate/nitrite transporter</i>	PAC67026.1	
	Solubilização de fosfato	<i>phosphatase</i>	PAC70484.1 PAC67826.1
		<i>esterase-like activity of phytase</i>	PAC72468.1
		<i>phosphatase PAP2 family protein</i>	PAC72094.1 PAC69648.1
<i>NADH pyrophosphatase</i>		PAC69768.1	
<i>carbon-phosphorus lyase complex subunit PhnI</i>		PAC69858.1	
<i>carbon-phosphorus lyase complex subunit PhnJ</i>		PAC69857.1	
<i>carbon-phosphorus lyase subunit PhnH</i>		PAC69859.1	
<i>acid phosphatase AphA</i>		PAC67583.1 PAC67798.1	
<i>membrane-bound PQQ-dependent dehydrogenase, glucose/quininate/shikimate family</i>		PAC68848.1 PAC68577.1	
<i>pyrroloquinoline quinone biosynthesis peptide chaperone PqqD</i>		PAC72370.1	
<i>pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein B</i>		PAC72371.1	
<i>pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqE</i>		PAC72369.1	
<i>pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqF</i>		PAC72368.1	
<i>pyrroloquinoline quinone precursor peptide PqqA</i>		PAC72377.1	

Transporte e absorção de ferro	<i>ferrous iron transport protein B</i>	PAC68857.1 PAC67290.1 PAC69580.1 PAC69567.1	
	<i>ferrous iron transporter A</i>	PAC68574.1	
	<i>ferrous iron transporter C</i>	PAC68855.1	
	<i>ferrous iron transporter</i>	PAC69113.1	
	<i>iron ABC transporter ATP-binding protein FetA</i>	PAC71627.1	
	<i>iron ABC transporter permease</i>	PAC71670.1 PAC71671.1 PAC71025.1 PAC69662.1 PAC66818.1	
	<i>iron ABC transporter substrate-binding protein</i>	PAC67448.1 PAC67078.1	
	<i>iron ABC transporter</i>	PAC67595.1	
	<i>iron donor protein CyaY</i>	PAC71743.1	
	<i>iron export ABC transporter permease subunit FetB</i>	PAC71628.1	
	<i>manganese/iron transporter ATP-binding protein</i>	PAC69355.1	
	<i>zinc/iron-chelating domain-containing protein</i>	PAC69120.1 PAC67804.1	
	Estoque de ferro	<i>bacterioferritin</i>	PAC67983.1
		<i>bacterioferritin-associated ferredoxin</i>	PAC67984.1
		<i>ferritin</i>	PAC68840.1
		<i>ferritin-like domain-containing protein</i>	PAC70185.1 PAC70186.1
Sideróforos	<i>enterobactin synthase</i>	PAC69352.1	
	<i>enterobactin synthase subunit F</i>	PAC70801.1	
	<i>hydroxamate siderophore iron reductase FhuF</i>	PAC71822.1	
	<i>lucA/lucC family siderophore biosynthesis protein</i>	PAC71912.1	
	<i>Salmochelin siderophore protein IroE</i>	PAC69719.1	
	<i>aerobactin synthase lucA</i>	PAC71910.1	
	<i>iron-enterobactin transporter ATP-binding protein</i>	PAC70802.1	
	<i>iron-enterobactin transporter permease</i>	PAC70804.1	
	<i>iron-enterobactin transporter</i>	PAC70803.1 PAC69468.1	
	<i>Fe²⁺-enterobactin ABC transporter substrate-binding protein</i>	PAC69466.1	
	<i>Fe³⁺-hydroxamate ABC transporter permease FhuB</i>	PAC69626.1 PAC67794.1	
	<i>iron-hydroxamate transporter ATP-binding subunit</i>	PAC69966.1	
	<i>iron-hydroxamate transporter substrate-binding subunit</i>	PAC69967.1 PAC67793.1	
	<i>iron-siderophore ABC transporter permease</i>	PAC66718.1	
	<i>siderophore-interacting protein</i>	PAC72196.1	
	<i>TonB-dependent siderophore receptor</i>	PAC72438.1 PAC71966.1 PAC71836.1 PAC71668.1 PAC70556.1 PAC69757.1 PAC69718.1 PAC69277.1 PAC69296.1 PAC69123.1	
	<i>ferrichrome porin FhuA</i>	PAC69965.1	
	Colonização		
	Atividade flagelar	<i>flagellar assembly peptidoglycan hydrolase FlgJ</i>	PAC67757.1

		PAC67215.1
	<i>flagellar assembly protein FliH</i>	PAC71923.1
	<i>flagellar basal body L-ring protein FlgH</i>	PAC68980.1
	<i>flagellar basal body P-ring formation protein FlgA</i>	PAC70070.1
	<i>flagellar basal body rod protein FlgB</i>	PAC70068.1
		PAC67403.1
	<i>flagellar basal body rod protein FlgC</i>	PAC70067.1
		PAC67402.1
	<i>flagellar basal body rod protein FlgF</i>	PAC70064.1
	<i>flagellar basal body rod protein FlgG</i>	PAC70063.1
	<i>flagellar basal body-associated protein FliL</i>	PAC71927.1
	<i>flagellar basal-body rod protein FlgG</i>	PAC68981.1
	<i>flagellar biosynthesis protein FlgA</i>	PAC68979.1
	<i>flagellar biosynthesis protein FlgI</i>	PAC67214.1
	<i>flagellar biosynthesis protein FlgN</i>	PAC67426.1
	<i>flagellar biosynthesis protein FlhA</i>	PAC69460.1
		PAC68860.1
		PAC67547.1
		PAC67275.1
	<i>flagellar biosynthesis protein FlhB</i>	PAC69461.1
	<i>flagellar biosynthetic protein FliP</i>	PAC71931.1
	<i>flagellar biosynthetic protein FliQ</i>	PAC71932.1
	<i>flagellar brake protein</i>	PAC69756.1
	<i>flagellar filament capping protein FliD</i>	PAC71915.1
	<i>flagellar hook assembly protein FlgD</i>	PAC70066.1
	<i>flagellar hook protein FlgE</i>	PAC70065.1
	<i>flagellar hook-associated protein FlgK</i>	PAC68751.1
		PAC67011.1
	<i>flagellar hook-basal body complex protein FliE</i>	PAC71920.1
	<i>flagellar hook-filament junction protein FlgL</i>	PAC68750.1
		PAC67625.1
	<i>flagellar hook-length control protein FliK</i>	PAC71926.1
	<i>flagellar motor stator protein MotA</i>	PAC69972.1
	<i>flagellar motor switch protein FliG</i>	PAC71922.1
	<i>flagellar motor switch protein FliM</i>	PAC71928.1
	<i>flagellar motor switch protein FliN</i>	PAC71929.1
	<i>flagellar M-ring protein FliF</i>	PAC71921.1
	<i>flagellar protein FlhE</i>	PAC68859.1
	<i>flagellar protein FliJ</i>	PAC71925.1
	<i>flagellar protein FliS</i>	PAC71916.1
	<i>flagellar transcriptional activator FlhD</i>	PAC69974.1
	<i>flagellar transcriptional regulator FlhC</i>	PAC69973.1
	<i>flagellar type III secretion system protein FliO</i>	PAC71930.1
	<i>flagellar type III secretion system protein FliR</i>	PAC71933.1
	<i>flagellin FliC</i>	PAC71019.1
		PAC69702.1
		PAC71914.1
	<i>flagellum-specific ATP synthase FliL</i>	PAC71924.1
Biosíntese de fímbrias	<i>type IV pili twitching motility protein PilT</i>	PAC71989.1
	<i>type IV pilin biogenesis protein</i>	PAC69897.1
	<i>type 1 fimbrial protein</i>	PAC72381.1
		PAC72401.1
		PAC72404.1
		PAC70156.1
		PAC69964.1
	PAC68976.1	
	PAC68977.1	
	PAC68772.1	

	<i>type 1 fimbrial protein subunit FimA</i>	PAC71595.1
	<i>type 1 fimbrial protein subunit FimI</i>	PAC71594.1
	<i>fimbrial assembly protein</i>	PAC71729.1
		PAC70965.1
		PAC70657.1
		PAC69707.1
		PAC69582.1
		PAC69569.1
		PAC69021.1
		PAC68799.1
		PAC68286.1
		PAC67824.1
		PAC67764.1
		PAC67675.1
	<i>fimbrial protein</i>	PAC72384.1
		PAC72201.1
		PAC72202.1
		PAC72205.1
		PAC72206.1
		PAC71731.1
		PAC71454.1
		PAC71385.1
		PAC70653.1
		PAC70454.1
		PAC70455.1
		PAC70456.1
		PAC68554.1
		PAC68192.1
		PAC71204.1
		PAC70158.1
		PAC68191.1
		PAC67560.1
	<i>fimbrial chaperone</i>	PAC68800.1
	<i>fimbrial chaperone protein FimC</i>	PAC71593.1
	<i>fimbrial protein FimD</i>	PAC72204.1
	<i>fimbrial protein StkG</i>	PAC70453.1
	<i>fimbrial biogenesis outer membrane usher protein</i>	PAC71730.1
	<i>long polar fimbrial chaperone LpfB</i>	PAC69581.1
		PAC69568.1
	<i>pili assembly chaperone</i>	PAC72207.1
	<i>prepilin peptidase</i>	PAC70901.1
		PAC67541.1
	<i>prepilin peptidase-dependent pilin</i>	PAC68930.1
	<i>prepilin-type cleavage/methylation domain-containing protein</i>	PAC69899.1
		PAC69901.1
		PAC69902.1
	<i>export and assembly usher protein of type 1 fimbriae</i>	PAC69708.1
	<i>type 1 fimbrin D-mannose specific adhesin FimH</i>	PAC71205.1
Adesão	<i>adhesin</i>	PAC68319.1
	<i>invasin</i>	PAC66972.1
		PAC68112.1
Quimiotaxia	<i>chemotaxis protein CheA</i>	PAC68433.1
		PAC68306.1
	<i>chemotaxis protein CheV</i>	PAC68651.1
		PAC67684.1
	<i>chemotaxis protein CheW</i>	PAC68434.1
	<i>chemotaxis protein</i>	PAC69836.1
		PAC69016.1

		PAC67118.1
	<i>chemotaxis response regulator protein-glutamate methyltransferase</i>	PAC69775.1
	<i>methyl-accepting chemotaxis protein</i>	PAC69464.1
		PAC72365.1
		PAC72314.1
		PAC72225.1
		PAC72198.1
		PAC71590.1
		PAC69371.1
		PAC72050.1
		PAC71351.1
		PAC71131.1
		PAC70921.1
		PAC70676.1
		PAC67066.1
	<i>methyl-accepting chemotaxis protein II</i>	PAC71323.1
		PAC69777.1
		PAC69023.1
Biossíntese de celulose	<i>cellulose biosynthesis cyclic di-GMP-binding regulatory protein BcsB</i>	PAC71647.1
	<i>cellulose biosynthesis protein BcsC</i>	PAC71649.1
	<i>cellulose biosynthesis protein BcsE</i>	PAC70720.1
	<i>cellulose biosynthesis protein BcsF</i>	PAC70721.1
	<i>cellulose biosynthesis protein BcsG</i>	PAC70722.1
	<i>cellulose biosynthesis protein BcsQ</i>	PAC70725.1
RESISTÊNCIA A ESTRESSE		
ESTRESSE OXIDATIVO	<i>oxidative stress defense protein</i>	PAC71401.1
	<i>DNA-binding transcriptional regulator OxyR</i>	PAC70713.1
	<i>catalase HPII</i>	PAC69631.1
	<i>catalase/oxidase HPI</i>	PAC69306.1
	<i>Mn-containing catalase</i>	PAC70187.1
	<i>superoxide dismutase [Cu-Zn] SodC2</i>	PAC70227.1
		PAC67423.1
	<i>superoxide dismutase [Fe]</i>	PAC70146.1
	<i>superoxide dismutase [Mn]</i>	PAC72130.1
	<i>peroxide stress protein YaaA</i>	PAC72167.1
	<i>peroxiredoxin</i>	PAC71033.1
		PAC70715.1
		PAC66895.1
	<i>OsmC family peroxiredoxin</i>	PAC72257.1
	<i>alkyl hydroperoxide reductase subunit F</i>	PAC71032.1
	<i>lipid hydroperoxide peroxidase</i>	PAC72149.1
	<i>organic hydroperoxide resistance protein</i>	PAC71317.1
	<i>biofilm peroxide resistance protein BsmA</i>	PAC70923.1
SALINIDADE		
Cation/H⁺ proteína antiporter	<i>divalent cation tolerance protein CutA</i>	PAC68992.1
	<i>divalent metal cation transporter</i>	PAC69065.1
		PAC67516.1
Proteína de transporte de íon	<i>cation transporter</i>	PAC68165.1
	<i>cation transport regulator</i>	PAC69839.1
	<i>Na(+)/H(+) antiporter subunit F</i>	PAC67308.1
	<i>Na+/H+ antiporter NhaA</i>	PAC72175.1
	<i>Na+/H+ antiporter subunit E</i>	PAC67309.1
	<i>sodium-potassium/proton antiporter ChaA</i>	PAC69840.1
	<i>cation:proton antiport protein</i>	PAC68317.1
		PAC67662.1
		PAC67436.1
	<i>cation-efflux pump FieF</i>	PAC72125.1

	<i>SulP family inorganic anion transporter</i>	PAC69693.1
Osmoreguladores	<i>proline/betaine transporter</i>	PAC67993.1
		PAC68498.1
	<i>proline/glycine betaine ABC transporter permease ProW</i>	PAC68488.1
	<i>betaine-aldehyde dehydrogenase</i>	PAC68492.1
		PAC68370.1
	<i>glycine betaine ABC transporter substrate-binding protein</i>	PAC68489.1
		PAC67510.1
	<i>glycine betaine/L-proline ABC transporter ATP-binding protein</i>	PAC68487.1
		PAC67437.1
		PAC67330.1
	<i>glycine/betaine ABC transporter ATP-binding protein</i>	PAC69733.1
	PAC67123.1	
<i>glycine/betaine ABC transporter permease</i>	PAC69730.1	
	PAC68987.1	
	PAC67069.1	
<i>glycine/betaine ABC transporter substrate-binding protein</i>	PAC69731.1	
<i>osmoprotectant uptake system permease</i>	PAC71076.1	
	PAC71074.1	
	PAC70284.1	
Trealose	<i>malto-oligosyltrehalose synthase</i>	PAC72033.1
	<i>malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase</i>	PAC72034.1
	<i>PTS trehalose transporter subunit IIBC</i>	PAC72511.1
	<i>trehalose-6-phosphate synthase</i>	PAC69976.1
	<i>trehalose-phosphatase</i>	PAC69977.1
	PAC67750.1	
ESTRESSE BIÓTICO		
Compostos antimicrobianos	<i>4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase</i>	
	<i>chorismate lyase</i>	PAC69615.1
	<i>chorismate synthase</i>	PAC67968.1
Resistência a antibióticos	<i>class C beta-lactamase resistance</i>	PAC68256.1
	<i>1 class D beta-lactamase resistance</i>	PAC66905.1
	<i>glyoxalase/bleomycin resistance/dioxygenase family protein</i>	PAC72255.1
	<i>glyoxalase/bleomycin resistance/extradiol dioxygenase family protein</i>	PAC72444.1
	<i>multiple antibiotic resistance protein MarB</i>	PAC71004.1
	<i>multiple antibiotic resistance transcriptional regulator MarR</i>	PAC71006.1
	<i>antibiotic resistance protein MarC</i>	PAC67361.1
Produção de quitinase	<i>chitinase</i>	PAC70898.1
		PAC68667.1
ESTRESSE ABIÓTICO		
METAIS E XENOBIÓTICOS		
Cobre	<i>copper resistance protein</i>	PAC70638.1
		PAC68870.1
	<i>copper resistance protein B</i>	PAC71558.1
	<i>copper resistance protein CopC</i>	PAC71557.1
	<i>copper resistance protein D</i>	PAC71556.1
	<i>copper-translocating P-type ATPase</i>	PAC70641.1
		PAC68653.1
	<i>copper oxidase</i>	PAC68460.1
	<i>copper-binding protein</i>	PAC71553.1
	<i>copper homeostasis/adhesion lipoprotein NlpE</i>	PAC67678.1
Cádmio	<i>zinc/cadmium/mercury/lead-transporting ATPase</i>	PAC71174.1

	<i>cadmium-translocating P-type ATPase</i>	PAC68895.1
	<i>MerR family transcriptional regulator</i>	PAC67372.1 PAC67156.1
Zinco	<i>zinc ABC transporter ATP-binding protein ZnuC</i>	PAC68126.1
	<i>zinc ABC transporter permease</i>	PAC68625.1
	<i>zinc ABC transporter substrate-binding protein</i>	PAC68590.1
	<i>zinc transporter ZntB</i>	PAC70870.1
	<i>zinc transporter ZupT</i>	PAC71732.1
	<i>zinc/cadmium/mercury/lead-transporting ATPase</i>	PAC71174.1
	<i>zinc/iron-chelating domain-containing protein</i>	PAC69120.1 PAC67804.1
	<i>zinc-dependent alcohol dehydrogenase</i>	PAC72250.1
	<i>ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH</i>	PAC70560.1
	<i>DksA/TraR family C4-type zinc finger protein</i>	PAC70252.1
	<i>zinc metalloprotease HtpX</i>	PAC67647.1 PAC67520.1
	<i>transcriptional regulator Zur</i>	PAC70632.1
Cobalto	<i>nickel/cobalt efflux protein RcnA</i>	
	<i>nickel/cobalt homeostasis protein RcnB</i>	
	<i>HoxN/HupN/NixA family nickel/cobalt transporter</i>	PAC68386.1 PAC67676.1
	<i>magnesium/cobalt efflux protein</i>	PAC68949.1 PAC67938.1 PAC67751.1
Arsênio	<i>arsenical efflux pump membrane protein ArsB</i>	PAC70648.1 PAC67359.1
	<i>arsenate reductase (glutaredoxin)</i>	PAC70647.1 PAC69714.1
Níquel	<i>HoxN/HupN/NixA family nickel/cobalt transporter</i>	PAC68386.1 PAC67676.1
	<i>hydrogenase isoenzyme nickel incorporation hypB domain protein</i>	PAC66956.1
	<i>hydrogenase maturation nickel metallochaperone HypA</i>	PAC67550.1
	<i>hydrogenase nickel incorporation protein HypB</i>	PAC67551.1
	<i>nickel ABC transporter permease subunit NikC</i>	PAC67039.1 PAC66812.1
	<i>nickel transporter</i>	PAC68091.1 PAC67450.1 PAC67310.1 PAC67216.1
	<i>nickel/cobalt efflux protein RcnA</i>	PAC71247.1
	<i>nickel/cobalt homeostasis protein RcnB</i>	PAC70961.1
Chumbo	<i>zinc/cadmium/mercury/lead-transporting ATPase</i>	PAC71174.1
Compostos aromáticos	<i>ring-cleaving dioxygenase</i>	PAC67227.1
	<i>aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha</i>	PAC72003.1
	<i>naphthalene 1,2-dioxygenase</i>	PAC72001.1
	<i>benzoate transporter</i>	PAC70469.1 PAC69020.1
	<i>homoprotocatechuate degradation operon regulator HpaR</i>	PAC71324.1
	<i>pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase</i>	PAC72006.1
	<i>2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate succinyltransferase</i>	N- PAC71343.1
TEMPERATURA		
Proteínas heat-shock	<i>heat shock chaperone IbpB</i>	PAC69451.1
	<i>heat shock protein HspQ</i>	PAC68210.1

	<i>heat shock protein IbpA</i>	PAC69452.1
	<i>heat-inducible protein</i>	PAC72017.1
	<i>heat-shock protein</i>	PAC69843.1
		PAC69416.1
	<i>zinc metalloprotease HtpX</i>	PAC67647.1
Proteínas cold-shock	<i>cold-shock protein</i>	PAC72347.1
		PAC72021.1
		PAC70578.1
		PAC67807.1
		PAC70086.1
		PAC66793.1
	<i>cold-shock protein CspC</i>	PAC67495.1
	<i>cold shock domain protein CspD</i>	PAC67948.1
ESTRESSES GERAIS		
	<i>stress adaptor protein CpxP</i>	PAC72126.1
	<i>stress protection protein MarC</i>	PAC71007.1
	<i>stress response kinase A</i>	PAC68573.1
	<i>stress response membrane protein YncL</i>	PAC70215.1
		PAC68792.1
	<i>RNA polymerase sigma factor RpoS</i>	PAC68047.1
		PAC66860.1
		PAC66696.1
	<i>RNA polymerase sigma factor RpoD</i>	PAC71277.1
	<i>RNA polymerase sigma factor RpoE</i>	PAC68221.1
	<i>RNA polymerase sigma factor RpoH</i>	PAC71167.1
	<i>stress response serine/threonine protein kinase YihE</i>	PAC68679.1
	<i>stress response translation initiation inhibitor YciH</i>	PAC69058.1
	<i>universal stress protein UspA</i>	PAC70703.1
	<i>universal stress protein UspB</i>	PAC70704.1
	<i>universal stress protein UspC</i>	PAC69975.1
	<i>universal stress protein UspE</i>	PAC72357.1
	<i>universal stress protein UspG</i>	PAC71961.1
		PAC71428.1
		PAC69245.1
	<i>envelope stress response membrane protein PspB</i>	PAC71070.1
	<i>envelope stress response membrane protein PspC</i>	PAC71071.1
	<i>envelope stress response protein PspG</i>	PAC70034.1
	<i>general stress protein 17m</i>	PAC67055.1
	<i>general stress protein</i>	PAC67041.1
	<i>Rcs stress response system protein RcsF</i>	PAC70105.1
	<i>GlsB/YeaQ/YmgE family stress response membrane protein</i>	PAC70214.1
Sistemas de bombas de efluxo multidrogas, transportadores	<i>MexE family multidrug efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit</i>	PAC71636.1
	<i>multidrug efflux pump-associated protein, AcrZ family</i>	PAC67112.1
	<i>multidrug efflux MFS transporter subunit EmrB</i>	PAC68774.1
	<i>multidrug efflux RND transporter permease subunit</i>	PAC69620.1
	<i>Bcr/CflA family multidrug efflux MFS transporter</i>	PAC68654.1
	<i>MATE family multidrug exporter</i>	PAC70030.1
	<i>MATE family efflux transporter</i>	PAC70634.1
		PAC68065.1
	<i>multidrug ABC transporter ATP-binding protein</i>	PAC69942.1
		PAC69867.1
	PAC69741.1	

	PAC67584.1
<i>multidrug ABC transporter permease</i>	PAC67379.1
<i>multidrug ABC transporter permease/ATP-binding protein</i>	PAC70829.1 PAC68442.1 PAC68422.1 PAC68216.1
<i>multidrug export protein EmrA</i>	PAC70020.1 PAC69935.1 PAC68773.1 PAC67623.1 PAC67332.1
<i>multidrug transporter EmrA</i>	PAC72332.1
<i>multidrug transporter EmrD</i>	PAC71472.1
<i>multidrug transporter MdfA</i>	PAC69647.1
<i>multidrug transporter MdtL</i>	PAC71660.1
<i>multidrug transporter permease</i>	PAC71219.1
<i>multidrug transporter subunit MdtA</i>	PAC68504.1
<i>multidrug transporter subunit MdtB</i>	PAC69712.1
<i>multidrug transporter subunit MdtC</i>	PAC69711.1 PAC69597.1
<i>multidrug transporter subunit MdtD</i>	PAC69598.1
<i>multidrug transporter subunit MdtG</i>	PAC69958.1
<i>multidrug transporter</i>	PAC69415.1
<i>multidrug/spermidine transporter subunit MdtI</i>	PAC70000.1
<i>multidrug/spermidine transporter subunit MdtJ</i>	PAC69999.1

7. CAPÍTULO 2

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE *Enterobacter cloacae* UENF P7
SOB ESTRESSE OXIDATIVO**

Nathália Duarte da Silva^a, Angelo Schuabb Heringer^a; Vanildo Silveira^a, Fabio Lopes Olivares^c, Milena Mangefeste Magalhães^a, Gabriela Petroceli Mota^a, Aline Chaves Intorne^b, Marília Amorim Berbert de Molina^{a,*}

^aLaboratório de Biotecnologia (LBT), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Avenida Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes 28013-602, Rio de Janeiro, Brasil;

^bLaboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM/UENF), Avenida Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes 28013-602, Rio de Janeiro, Brasil;

^cLaboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT/UENF), Avenida Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes 28013-602, Rio de Janeiro, Brasil

***Autor correspondente:** Laboratório de Biotecnologia (LBT), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Avenida Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes 28013-602, Rio de Janeiro, Brasil. Endereço de e-mail: mberbert@uenf.br, Tel: +55-22-2739-7088; Fax: +55-22-2739-7031

RESUMO

Bactérias que vivem em um ambiente aeróbio deparam-se, inevitavelmente, com espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas durante o metabolismo respiratório, o que é controlado por defesas antioxidantes que garantem a adaptação ao ambiente hostil. No entanto, o excesso de ERO leva ao estresse oxidativo, que pode resultar em danos irreversíveis aos componentes celulares e comprometer a viabilidade celular. Dentre as múltiplas estratégias de defesa para eliminar componentes tóxicos, está a desintoxicação direta de ERO por enzimas como catalase, peroxidases e superóxido dismutase. O sequenciamento genômico de *E. cloacae* UENF P7 evidenciou a presença de uma série de genes para promoção do crescimento vegetal e processos de biorremediação, sendo a resistência ao estresse oxidativo um aspecto fundamental em ambas aplicações. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do estresse causado pelo oxigênio molecular sobre os perfis cinéticos de crescimento da bactéria e os níveis de abundância de proteínas totais na biomassa obtida nesta condição. Os resultados mostraram que a bactéria possui diversas proteínas para contornar o estresse gerado por elevadas concentrações de oxigênio dissolvido no meio, as quais são responsáveis pela sua adaptação e retomada do crescimento nas condições hostis. Considerando que elevadas densidades celulares representam um fator essencial para a economia de eventuais aplicações biotecnológicas de *E. cloacae* UENF P7, justifica-se o estudo do impacto do oxigênio sobre o cultivo da bactéria, que demanda elevada concentração de oxigênio para o crescimento.

Palavras-chave: *Enterobacter cloacae*, cinética de crescimento, estresse oxidativo, análise proteômica.

1. Introdução

O oxigênio é essencial para vários processos fisiológicos (Miller *et al.*, 1993), mas pode se tornar tóxico e mutagênico para seres humanos, plantas ou bactérias quando em altas concentrações (Halliwell, 2006). Espécies reativas de oxigênio (ERO) são substâncias químicas altamente reativas que atacam moléculas orgânicas, capturando elétrons, modificando sua estrutura química e alterando suas funções (Dalton *et al.*, 1999). ERO são geradas a partir de substâncias endógenas e exógenas durante as funções metabólicas normais dos seres vivos (Sharma *et al.*, 2012; Valko *et al.*, 2006). Estresses bióticos e abióticos também contribuem para o aumento do nível de ROS, causando estresse oxidativo (Sharma *et al.*, 2012).

Os microrganismos que vivem em um ambiente aeróbio enfrentam as ERO como subproduto de sua respiração (Halliwell e Gutteridge, 2006; Korshunov e Imlay, 2010), o que é controlado por defesas antioxidantes. No entanto, a geração excessiva de ERO pode ser extremamente prejudicial para a viabilidade da célula (Valko *et al.*, 2007; Imlay, 2013), levando até mesmo a morte (Van Acher e Coeny, 2016). Por conta disso, as células microbianas desenvolveram complexos mecanismos de proteção contra os radicais reativos de oxigênio. Algumas moléculas constitutivas, como NADPH e NADH, que são antioxidantes não enzimáticos, ou enzimas específicas, ajudam a remover o excesso destes radicais (Cabiscol *et al.*, 2000).

Mecanismos moleculares refinados de resposta ao estresse oxidativo, que envolvem conjuntos específicos de genes, são ativados para ajudar a célula no processo de adaptação ao ambiente hostil e sobreviver (De Martino *et al.*, 2016). Dentre as múltiplas estratégias de defesa para eliminar componentes tóxicos, está a desintoxicação direta de ERO por enzimas como catalase, peroxidases e superóxido dismutase (Imlay, 2009, 2014).

E. cloacae UENF P7, isolada da planta aquática *Pistia stratiotes*, teve seu genoma recentemente sequenciado pelo nosso grupo de pesquisas. As características reveladas pela análise dos dados mostraram que a bactéria apresenta grande potencial para promoção do crescimento vegetal e processos de biorremediação, sendo a resistência ao estresse oxidativo um aspecto fundamental para estas aplicações biotecnológicas.

E. cloacae UENF P7 é uma bactéria anaeróbia facultativa e a obtenção de elevadas densidade celulares, necessária para a sua aplicação biotecnológica, exige o emprego de sistemas altamente aerados para satisfazer a elevada demanda de energia para crescimento (Castan *et al.*, 2002). Muitas vezes, a aeração somente com ar comprimido, não é suficiente para atender as elevadas demandas de oxigênio nestes processos, sendo necessário o emprego de estratégias como o uso de ar enriquecido com oxigênio, estratégia preferida para este propósito (O'Donnell *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2010).

O suprimento de O₂ em processos fermentativos exige que a linhagem bacteriana seja resistente ao estresse oxidativo e que disponha de mecanismos antioxidantes potentes, já que o O₂ se difunde rapidamente pelas membranas biológicas (Ligeza *et al.*, 1998) e pode destruir macromoléculas celulares (Foyer *et al.*, 1994). Os dados obtidos com o sequenciamento genômico *E. cloacae* UENF P7 mostraram que essa cepa possui uma gama de estratégias antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas. Dessa forma, no presente trabalho foi explorada a resposta dessa bactéria ao estresse gerado pelo oxigênio molecular, pela manutenção da concentração e oxigênio dissolvido em 100% da saturação, avaliando-se a cinética do processo fermentativo e realizando-se análise proteômica da biomassa em momento de evidente impacto exercido pelo estresse. Brevemente, os resultados mostram que as velocidades de crescimento e a produção de biomassa por *E. cloacae* UENF P7 foram prejudicadas pelas condições de elevada transferência de oxigênio para o meio. No entanto, a bactéria possui mecanismos eficientes de defesa antioxidante, que lhe permite contornar os danos provocados pela geração excessiva de ERO.

2. Materiais e Métodos

E. cloacae UENF P7 foi mantida em solução de glicerol 40%, a -80 °C. Para preparo de inóculos e ensaios de fermentação foi utilizado meio GYS (Berbert-Molina *et al.*, 2008), com 10 e 20 g.L⁻¹ de glicose, respetivamente, e os seguintes componentes (g.L⁻¹): extrato de levedura, 12; (KH₄)₂SO₄, 3,0; MgSO₄.7H₂O, 1,5; CaCl₂.2H₂O, 0,12; MnSO₄.1H₂O, 0,09; K₂HPO₄, 1,5; e KH₂PO₄, 1,5. A ativação da cultura foi feita por estrias em meio GYS sólido (12% ágar), a partir da cultura estocada, e incubação das placas por 48 h a 30 °C. Uma alçada desta cultura foi

transferida para Erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio, e os frascos incubados a 30 °C por 7 h em agitadora-incubadora de movimento recíproco (NOVA ÉTICA 430 RDB). Uma alíquota de 5% (v/v) desta cultura foi utilizada como inóculo para o meio de fermentação. Os ensaios de fermentação foram realizados em sistema descontínuo, em biorreator Biostat B (B.Braun Biotech) com cuba de 2 L e volume inicial de meio de 1,5 L. O pH foi controlado em 6,0 e a temperatura em 30 °C. Inicialmente, foi empregada agitação de 600 min⁻¹ e vazão de gás de 1,0 L/min. Após atingir 20% da saturação, o controlador automático de concentração de oxigênio (OD) no meio foi acionado, a fim de manter OD em 20% (controle) ou em 100% (tratamento), pela variação da agitação e/ou da vazão de gás. Para obter OD 100%, foi empregado oxigênio puro. Os ensaios foram feitos em triplicata.

As concentrações de glicose foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Shimadzu modelo LC10A VP), com detector de espalhamento de luz (ELSD-LT II), coluna Prevail Carbohydrate ES 5 µm (250 x 4,6 mm), 25 °C. Os solventes utilizados foram água ultra pura (solvente A) e acetonitrila 100% (solvente B). A corrida foi realizada em gradiente isocrático ajustado para 80% de solvente B durante 20 min, com fluxo de 1 mL.min⁻¹. O detector foi ajustado para a temperatura de 40 °C e pressão de 350 KPa, com nitrogênio. As áreas e tempos de retenção dos compostos foram avaliados por comparação com padrão de glicose em diferentes concentrações.

Microscopia de fluorescência foi empregada para detectar qualitativamente a produção endógena de ERO em amostras de biomassa retiradas em 2, 4, 6 e 8 h, em ambas as condições de processo. Foi utilizado a sonda fluorogênica 2',7' diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (MERCK). Uma alíquota de 47,5 µL do cultivo foi tratada com 2,5 µL da sonda e incubada no escuro, em agitadora-incubadora (NOVA ÉTICA 430 RDB), por 30 min, 30 °C e 120 min⁻¹. As amostras foram analisada em um microscópio invertido de fluorescência (Zeiss Axio Vert.A1), utilizando filtros para detecção de fluoresceína de excitação e emissão de 450-490 nm e 500 nm, respectivamente.

A análise proteômica foi baseada na quantificação relativa das proteínas de biomassa de *E. cloacae* UENF P7 obtidas no processo fermentativo. As proteínas diferencialmente reguladas foram extraídas de 3 amostras biológicas, nas duas condições (controle e tratamento). As amostras foram retiradas no tempo de 6 h

de cultivo. Para a extração de proteínas totais foi utilizado o protocolo descrito por Natarajan *et al.* (2005). A concentração de proteínas totais foi estimada utilizando o 2-D *Quant Kit* (GE Healthcare, UK). A leitura da absorbância de cada amostra e da curva padrão com soro de albumina bovina (BSA, GE Healthcare, UK) foi realizada em leitor de microplacas Synergy 2 Multi-mode Reader (Biotek Instruments, USA) a 480 nm. A digestão de proteínas foi feita segundo protocolo descrito por Calderan-Rodrigues *et al.* (2014). As amostras foram analisadas em espectrômetro de massas SYNAPT G2 HDMS Si (nano cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a um espectrômetro de massas quadrupolo-tempo de voo, em tandem). Um UPLC nanoACQUITY ligado a um espectrômetro de massas SYNAPT G2-Si HDMS (Waters, Manchester, Reino Unido) foi utilizado para análise de LC-ESI-MS/MS. O programa Mass Linx foi utilizado para identificação de proteínas. A lista de peptídeos foi contrastada com a base de dados de proteínas do banco particular obtido pela anotação do genoma de *E. cloacae* UENF P7. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para mensurar a significância entre os tratamentos a 5% de probabilidade, empregando o programa Assistat (Silva *et al.*, 2002), e a diferença mínima de *fold change* de 1,5 vezes. As proteínas abundantes que tiveram o número EC (*Enzyme Commission*) atribuídos pelo programa Blast2GO software v3.0 PRO foram classificadas de acordo com a sua atividade enzimática segundo a nomenclatura do NCIUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*).

3. Resultados e Discussão

3.1. Cinética de fermentação sob estresse oxidativo

Ensaio em biorreator de bancada foram realizados para conhecer o comportamento cinético da bactéria sob duas condições distintas de suprimento de oxigênio para o meio de cultivo. Na condição controle, a concentração de oxigênio dissolvido (OD) foi mantida em aproximadamente 20% da saturação a partir de 2,5 h de fermentação, momento do processo em que estes valores eram naturalmente alcançados em função do metabolismo respiratório. Neste caso, considerou-se que a bactéria não esteve submetida à limitação de oxigênio em nenhum momento do cultivo, conforme anteriormente relatado para outras

espécies em situações semelhantes (Castan *et al.*, 2002; Berbert-Molina *et al.*, 2008; Boniolo *et al.*, 2012). Em contraste, visando avaliar o impacto de uma transferência de oxigênio mais intensa e ativa sobre o cultivo, a concentração de oxigênio dissolvido foi elevada para 100% da saturação e mantida neste valor a partir deste mesmo ponto, utilizando-se oxigênio puro em lugar de ar para injeção no biorreator. Esta estratégia leva à geração de maior quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO), impondo um maior estresse oxidativo à biomassa em comparação com o controle (Castan *et al.*, 2002; O'Donnell *et al.*, 2007; Baez *et al.*, 2013). Dois parâmetros de processo, o consumo de glicose e a produção de biomassa, foram utilizados para avaliar os resultados.

Conforme mostra a Figura 1, os perfis das curvas de crescimento foram coincidentes nas 3 primeiras horas de processo, comportamento coerente com as condições empregadas, que eram idênticas até 2,5 h, quando o sistema de controle para manutenção dos valores desejados de OD foi ativado. Ambas as curvas apresentaram uma fase *lag* de 30 min, aproximadamente, refletindo a quase imediata adaptação da bactéria às condições de cultivo e a adequação da metodologia usada no preparo de inóculos. A fase *lag* foi seguida de uma fase exponencial, quando as velocidades específicas de crescimento são máximas, e de uma fase linear, caracterizada por velocidades de crescimento constantes (Berbert-Molina *et al.*, 2008). No entanto, no ensaio realizado com OD 100% observou-se forte queda na velocidade de crescimento a partir de 5 h, com impacto no perfil da fase linear, que até então seguia o mesmo comportamento verificado no controle. Por outro lado, ficou evidente que a biomassa foi capaz de se readaptar à condição de estresse imposta pelo ambiente, e, apesar da desaceleração do crescimento, voltar a crescer e alcançar a fase estacionária no mesmo tempo de processo do ensaio controle (~7 h). Da mesma forma, pode-se inferir que mecanismos de combate ao excesso de ERO, gerados pela elevada transferência de oxigênio puro, foram acionados na bactéria, impedindo um prejuízo ainda maior na produção de biomassa, cuja diferença em relação ao controle foi da ordem de 38%.

Com relação ao metabolismo de glicose, verificou-se que, independentemente da condição de transferência de oxigênio empregada, o substrato foi completamente consumido em pouco mais de 4 horas de fermentação, com velocidades idênticas. Isto permite inferir que, com OD 100%, as vias de

degradação do açúcar estavam funcionais neste intervalo, o que também justifica o perfil de crescimento encontrado no mesmo período. Por outro lado, embora os produtos de fermentação não tenham sido quantificados, é possível deduzir que a bactéria produziu ácidos orgânicos em ambas as condições, uma vez que houve consumo contínuo, e idêntico, de NaOH para o controle de pH no valor desejado.

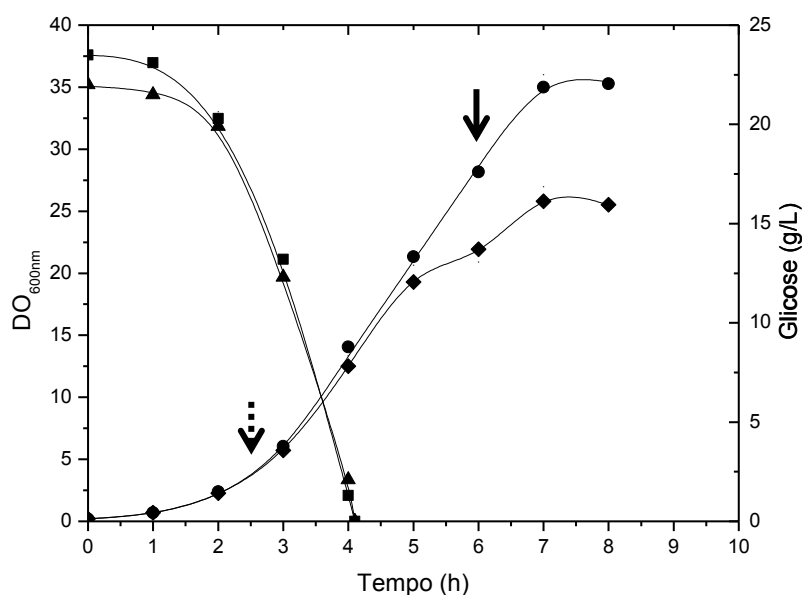


Figura 1: Cinética da fermentação de *E. cloacae* UENF P7 em meio GYS e concentração de oxigênio dissolvido (OD) em 20% [DO=●; glicose=■] ou em 100% [DO=◆; glicose=▲] da saturação. Setas pontilhadas: ativação do controle automático de OD. Setas contínuas: retirada de amostras para análise proteômica.

Em meios compostos com glicose e fontes complexas de nutrientes, como extrato de levedura, algumas bactérias utilizam a energia gerada na oxidação do carboidrato para incorporar compostos nitrogenados aportados pelo nutriente (Mignone e Avignone-Rossa, 1996; Berbert-Molina *et al.*, 2008). Este parece ser o caso de *E. cloacae* UENF P7, uma vez que, no ensaio controle, a velocidade de crescimento permaneceu constante após o esgotamento de glicose, não havendo qualquer inflexão da curva de crescimento e indícios de diauxia (Figura 1). Neste caso, é possível afirmar também que extrato de levedura foi fundamental para o crescimento da bactéria, uma vez que a produção de biomassa aumentou expressivamente entre 4 h (DO=12,5) e 7 h (DO=36), quando toda a glicose já havia sido consumida. De fato, extrato de levedura é uma importante fonte de carbono e energia para o crescimento bacteriano, pois contém altas

concentrações de precursores da síntese de biomassa (Mignone e Avignone-Rossa, 1996; Downs, 2006), como proteínas, aminoácidos livres e oligopeptídeos, além de vitaminas, nucleotídeos, sais minerais e polissacarídeos (Sacksinchai *et al.*, 2001; Yamatsu *et al.*, 2006). Vitaminas fornecidas por extrato de levedura também mostraram papel essencial na formação de diferentes produtos de fermentação (Leclerc *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011).

Em diversos processos fermentativos realizados com bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, visando à obtenção de altas densidades celulares, o emprego de elevadas taxas de aeração e/ou altas frequências de agitação do meio não são suficientes para satisfazer a demanda de oxigênio durante o cultivo (Riesenberg e Guthke, 1999). O enriquecimento do ar de entrada no biorreator com oxigênio puro compreende uma das estratégias empregadas para contornar este problema (Plihon *et al.*, 1995; Marin-Iniesta *et al.*, 1988, O'Donnell *et al.*, 2007). O uso de oxigênio puro proporciona concentrações mais elevadas de oxigênio na fase gasosa, em comparação com ar, e aumenta significativamente a transferência de massa para o sistema (Rodríguez *et al.*, 2010). No entanto, o aumento das concentrações de oxigênio dissolvido também leva a um aumento das concentrações de ERO, geradas majoritariamente no processo de produção de energia, via fosforilação oxidativa (Lushchak, 2011). O excesso intracelular de ERO pode levar a danos irreversíveis nos componentes celulares e influenciar a viabilidade celular e os resultados de processo fermentativos (Colepicolo *et al.*, 1992; Voulgaris *et al.*, 2011; Baez *et al.*, 2013). Diferentes respostas fisiológicas e variações de parâmetros de processo têm sido relatadas para diversas espécies bacterianas, verificando-se que, em muitos casos, o uso de oxigênio puro proporcionou efeitos positivos sobre alguns aspectos do desenvolvimento celular. São encontrados exemplos em que tanto a velocidade de crescimento quanto a produção de biomassa foram incrementadas (Castan *et al.*, 2002; Shang *et al.*, 2003; Voulgaris *et al.*, 2011), com detrimento (Voulgaris *et al.*, 2011) ou não (Castan *et al.*, 2002; Baez *et al.*, 2013) da formação do produto de interesse. Há relatos também que mostram o aumento de eficiência em sistemas de tratamentos de efluentes (Rodríguez *et al.*, 2010) e de produção de bioinseticidas (Bonio *et al.*, 2012). Em cultivo de *E. coli* AB1157, em sistema descontínuo usando ar enriquecido com oxigênio puro, Baez *et al.* (2013) não verificaram diferenças na velocidade de crescimento e na produção final de células quando

OD foi elevado de 30 para 300% durante o processo. Este resultado difere do verificado no presente trabalho, o que pode estar relacionado não apenas às características inerentes a cada espécie, mas também às diferenças nas condições de processo empregadas. No nosso caso, o gás de entrada no reator era oxigênio puro, enquanto no trabalho de Baez *et al.* (2013), para obter OD 300%, a concentração de oxigênio no gás de entrada foi de 63%.

3.2. Análise proteômica da biomassa obtida na fermentação

Foram identificadas 372 proteínas em resposta ao estresse oxidativo causado pela elevada concentração de oxigênio na condição usada no tratamento (100% OD). Dentre essas, 335 não variaram (unchanged) e 36 foram diferencialmente abundantes. Destas, 21 foram menos abundantes (down) e 15 mais abundantes (up) (Tabela 1). As proteínas foram classificadas funcionalmente com base na ontologia de genes (GO). Essa categoria de GO é dividida em três classes distintas, nomeadas como *processo biológico* (BP), *função molecular* (MF) e *componente celular* (CC) (Qing *et al.*, 2017).

As proteínas mais abundantes (*up*) foram classificadas nas 3 classes, divididas, em número: processo biológico (12), função molecular (13) e componente celular (12) (Figura 2A). No entanto, dentre as 21 proteínas menos abundantes (*down*), 3 não foram classificadas funcionalmente. As demais proteínas foram todas classificadas como função molecular (18). Dentre essas, algumas foram classificadas em processo biológico (12) e componente celular (11).

As proteínas mais abundantes classificadas na classe Processo Biológico foram subclassificadas em 17 funções (Figura 2A). Para a classe função molecular, foram subclassificadas em 8 funções (Figura 2B) e para a classe componente celular, foram subclassificadas em 6 funções (Figura 2C). As proteínas menos abundantes classificadas em processo biológico foram subclassificadas em 13 funções (Figura 2A). Para a classe função molecular, foram subclassificadas em 13 funções (Figura 2B) e para a classe componente celular, foram subclassificadas em 5 funções (Figura 2C).

Das 36 proteínas diferencialmente abundantes, 22 tiveram o número EC identificado (Tabela 2). Dentre as proteínas mais abundantes (15), 11 tiveram o número EC identificado e foram classificadas em três classes enzimáticas: EC 1-Oxidoredutases (7 proteínas); EC 2-Transferases (3 proteínas); e EC 3-Hidrolases (1 proteína). Dentre as proteínas menos abundantes (21), 11 tiveram o número EC identificados e foram classificadas em cinco classes enzimáticas: EC 1-Oxidoredutases (3); EC 2-Transferases (3); EC 3-Hidrolases (3); EC 5-Isomerasas (1); e EC 6-Ligases (1). Deste modo, constatou-se que, dentre as seis classes enzimáticas previstas, a única não identificada entre as proteínas diferencialmente abundantes foi a classe EC 4, que engloba as Liases.

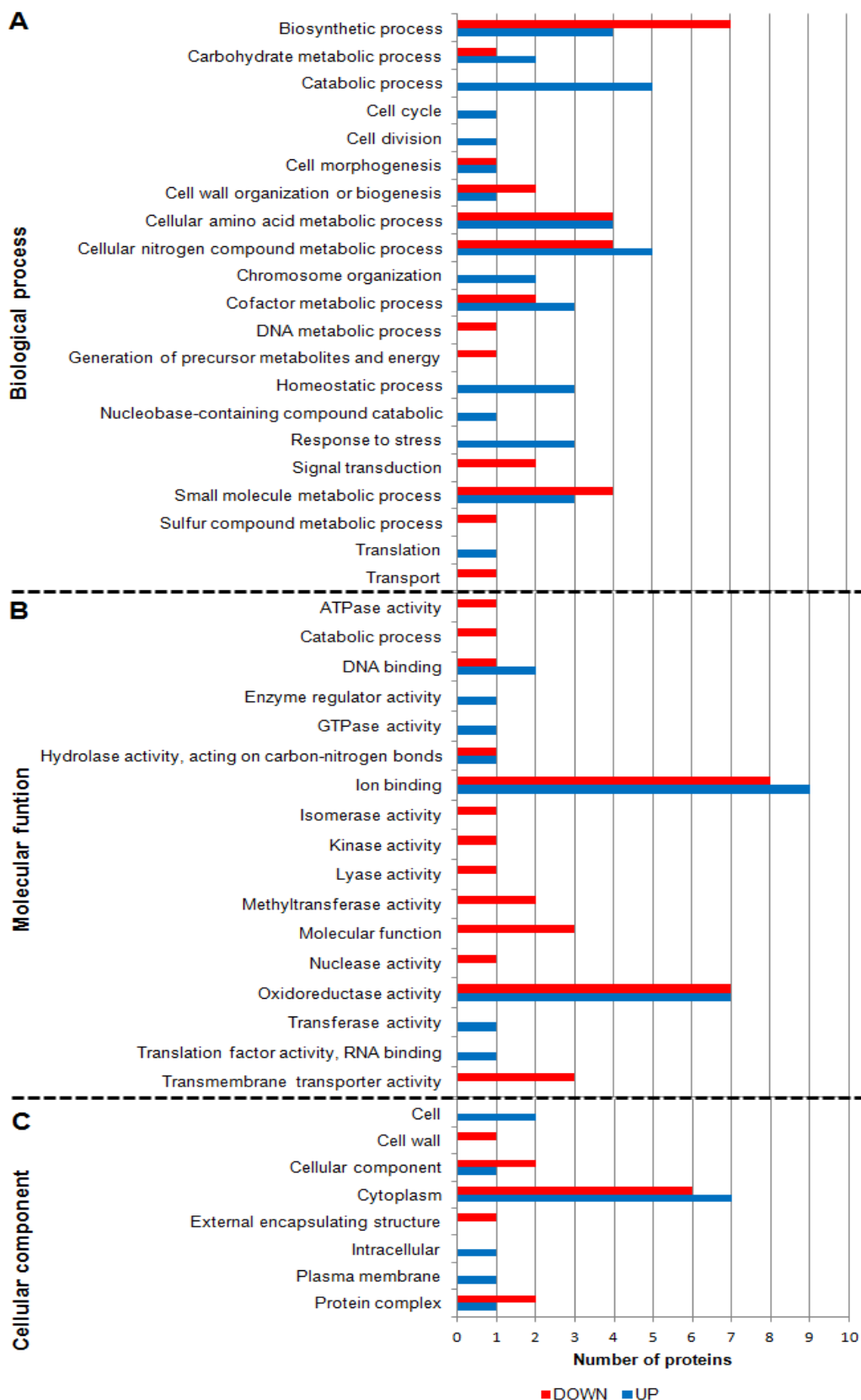


Figura 2: Número de proteínas abundantes identificadas em biomassa de *E. cloacae* UENF P7 obtida em processo fermentativo realizado com concentração de oxigênio dissolvido (OD) em 100% da saturação, em comparação com OD em 20%, de acordo com a classificação funcional baseada na categoria de GO. Processos Biológicos (A), Funções Moleculares (B) e Componentes Celulares (C).

Tabela 1: Proteínas abundantes identificadas em biomassa de *E. cloacae* UENF P7 obtida em processo fermentativo realizado com concentração de oxigênio dissolvido (OD) em 100% da saturação, em comparação com OD em 20%.

Protein description	Subcellular localization	Asseccion protein	Score	Max Fold change	Level of abundance	Peptide count
2,3-butanediol dehydrogenase, S-alcohol forming, (R)-acetoin-specific (EC 1.1.1.4) / Acetoin (diacetyl) reductase (EC 1.1.1.5)	Citoplasma	scaffold00168_1572_2342	169,8	2,58	Up	16
Translation elongation factor G	Citoplasma	scaffold00029_6619_8721	39,6	2,36	Up	5
Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (EC 1.3.99.1)	Membrana celular interna	scaffold00220_972_2738	45,9	2,13	Up	7
Pyruvate dehydrogenase E1 component (EC 1.2.4.1)	Citoplasma	scaffold00103_8639_7164	36,4	2,13	Up	6
Non-specific DNA-binding protein Dps / Iron-binding ferritin-like antioxidant protein / Ferroxidase (EC 1.16.3.1)	Citoplasma	scaffold00245_2473_2258	59,7	2,12	Up	5
Acetolactate synthase, catabolic (EC 2.2.1.6)	Citoplasma	scaffold00168_31_1551	182,5	2,07	Up	22
Proteinase inhibitor I11, ecotin precursor	Periplasma	scaffold00034_14158_14661	63,1	1,83	Up	10
Ribosome recycling factor	Citoplasma	scaffold00073_9295_9852	70,2	1,68	Up	9
Manganese superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)	Citoplasma	scaffold00013_9046_8426	93,8	1,68	Up	12
Dihydrolipoamide dehydrogenase of pyruvate dehydrogenase complex (EC 1.8.1.4)	Membrana celular interna Citoplasma	scaffold00103_5075_3651	200,3	1,68	Up	26
Uncharacterized membrane protein YqjD	Membrana celular interna	scaffold00058_5462_5157	71,7	1,67	Up	7
Non-specific DNA-binding protein Dps / Iron-binding ferritin-like antioxidant protein / Ferroxidase (EC 1.16.3.1)	Citoplasma	scaffold00245_2760_2470	39,6	1,66	Up	4
Ornithine carbamoyltransferase (EC 2.1.3.3)	Citoplasma	scaffold00001_23234_24238	92,5	1,63	Up	14

UDP-N-acetylglucosamine carboxyvinyltransferase (EC 2.5.1.7)	1-	Citoplasma	scaffold00466_2775_1516	15,9	1,57	Up	3
Cytidine deaminase (EC 3.5.4.5)		Periplasma	scaffold00085_7224_8108	41,0	1,51	Up	5
hypothetical protein		Periplasma	scaffold00034_9224_9583	14,4	6,08	Down	3
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-- homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.14)		Citoplasma	scaffold00410_622_1374	15,5	3,22	Down	3
Type I restriction-modification system, methyltransferase subunit M (EC 2.1.1.72)	DNA-	Citoplasma	scaffold00053_3652_4446	17,0	2,32	Down	3
Pectinesterase (EC 3.1.1.11)		Membrana celular externa	scaffold00017_6256_7140	18,1	2,14	Down	3
GTP cyclohydrolase I (EC 3.5.4.16) type 1		Citoplasma	scaffold00641_870_388	35,7	2,09	Down	5
TonB-dependent receptor; Outer membrane receptor for ferrienterochelin and colicins		Membrana celular externa	scaffold00329_3689_2721	25,8	2,02	Down	5
4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.262)		Citoplasma	scaffold00377_1250_1681	41,6	1,99	Down	5
L,D-transpeptidase YbiS		Periplasma	scaffold00059_5029_5697	40,1	1,91	Down	6
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR		Citoplasma	scaffold00412_1612_698	42,0	1,83	Down	7
Phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase (EC 5.3.1.16)		Citoplasma	scaffold00025_13509_12688	54,9	1,79	Down	7
Oxidoreductase		Citoplasma	scaffold00528_5_772	56,8	1,70	Down	8
Cytochrome O ubiquinol oxidase subunit II (EC 1.10.3.-)		Membrana celular interna	scaffold00227_1722_2459	60,1	1,69	Down	8
Outer membrane vitamin B12 receptor BtuB		Membrana celular externa	scaffold00033_9558_8638	54,7	1,60	Down	8
Cystine ABC transporter, ATP-binding protein		Membrana celular interna	scaffold00112_4240_2300	51,6	1,60	Down	8
Predicted outer membrane lipoprotein YfeY		Membrana	scaffold00001_2774_1173	51,2	1,56	Down	9

cellular interna						
Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	Citoplasma	scaffold00059_2545_560	61,2	1,55	Down	10
N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase (EC 1.2.1.38)	Citoplasma	scaffold00312_2309_3229	73,1	1,53	Down	10
Glucose dehydrogenase, PQQ-dependent (EC 1.1.5.2)	Membrana celular interna	scaffold00149_756_1760	93,0	1,53	Down	11
Putative sugar ABC transporter precursor	Citoplasma	scaffold00125_1292_228	97,2	1,52	Down	14
hypothetical protein	Citoplasma	scaffold00005_10262_9234	110,9	1,52	Down	15
D-alanine--D-alanine ligase B (EC 6.3.2.4)	Citoplasma	scaffold00356_2240_390	175,0	1,51	Down	23

Tabela 2: Nomenclatura enzimática das proteínas abundantes identificadas em biomassa de *E. cloacae* UENF P7 obtida em processo fermentativo realizado com concentração de oxigênio dissolvido (OD) em 100% da saturação, em comparação com OD em 20%.

Número de classe	Classe enzimática	Propriedade bioquímica	Nível de abundância	Código enzimático	Nome da enzima	Reação enzimática
1	Oxidoredutase	Agem em muitos grupos químicos, adicionando ou removendo hidrogênio	Up	EC 1.1.1.4	<i>(R,R)</i> -butanediol dehydrogenase	$(R,R)\text{-butane-2,3-diol} + \text{NAD}^+ = (R)\text{-acetoin} + \text{NADH} + \text{H}^+$
				EC 1.1.1.5	<i>diacetyl reductase [(R)(S)-acetoin forming]</i>	$(R)(S)\text{-acetoin} + \text{NAD}^+ = \text{diacetyl} + \text{NADH} + \text{H}^+$
				EC 1.2.4.1	<i>Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)</i>	$\text{pyruvate} + [\text{dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase}] \text{lipoyllysine} = [\text{dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase}] \text{S-acetyldihydrolipoyllysine} + \text{CO}_2$
				EC 1.3.99.1	<i>Succinate dehydrogenase (quinone)</i>	$\text{succinate} + \text{a quinone} = \text{fumarate} + \text{a quinol}$
				EC 1.8.1.4	<i>dihydrolipoyl dehydrogenase</i>	$\text{protein N}^6\text{-(dihydrolipoyl)lysine} + \text{NAD}^+ = \text{protein N}^6\text{-(lipoyl)lysine} + \text{NADH} + \text{H}^+$
			EC 1.15.1.1	<i>Superoxide dismutase</i>	$2 \text{ superoxide} + 2 \text{ H}^+ = \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	
			EC 1.16.3.1	<i>ferroxidase</i>	$4 \text{ Fe(II)} + 4 \text{ H}^+ + \text{O}_2 = 4 \text{ Fe(III)} + 2 \text{ H}_2\text{O}$	
			Down	EC 1.1.1.262	<i>4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase</i>	$4\text{-phosphonoxy-L-threonine} + \text{NAD}^+ = 3\text{-amino-2-oxopropyl phosphate} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$
				EC 1.1.5.2	<i>glucose 1-dehydrogenase (PQQ,quinone)</i>	$D\text{-glucose} + \text{ubiquinone} = D\text{-glucono-1,5-lactone} + \text{ubiquinol}$
				EC 1.2.1.38	<i>N-acetyl-γ-glutamyl-phosphate reductase</i>	$N\text{-acetyl-L-glutamate 5-semialdehyde} + \text{NADP}^+ + \text{phosphate} = N\text{-acetyl-L-glutamyl 5-phosphate} +$

					<i>NADPH + H⁺</i>	
2	Transferase	Transferem grupos funcionais entre moléculas doadoras e moléculas aceptoras	<i>Up</i>	EC 2.1.3.3	<i>Ornithine carbamoyltransferase</i>	<i>carbamoyl phosphate + L-ornithine = phosphate + L-citrulline</i>
				EC 2.2.1.6	<i>Acetolactate synthase</i>	<i>2 pyruvate = 2-acetolactate + CO₂</i>
				EC 2.5.1.7	<i>UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase</i>	<i>phosphoenolpyruvate + UDP-N-acetyl-α-D-glucosamine = phosphate + UDP-N-acetyl-3-O-(1-carboxyvinyl)-α-D-glucosamine</i>
			<i>Down</i>	EC 2.1.1.14	<i>5-methyltetrahydropteroyltri-L-homocysteine S-methyltransferase</i>	<i>5-methyltetrahydropteroyltri-L-glutamate + L-homocysteine = tetrahydropteroyltri-L-glutamate + L-methionine</i>
				EC 2.1.1.72	<i>site-specific DNA-methyltransferase</i>	<i>S-adenosyl-L-methionine + DNA adenine = S-adenosyl-L-homocysteine + DNA 6-methylaminopurine</i>
				EC 2.7.4.6	<i>Nucleoside-diphosphate kinase</i>	<i>ATP + nucleoside diphosphate = ADP + nucleoside triphosphate</i>
3	Hidrolase	Adicionam água a uma ligação, hidrolizando-a	<i>Up</i>	EC 3.5.4.5	<i>Cytidine deaminase</i>	<i>(1) cytidine + H₂O = uridine + NH₃ (2) 2'-deoxycytidine + H₂O = 2'-deoxyuridine + NH₃</i>
			<i>Down</i>	EC 3.1.1.11	<i>Pectinesterase</i>	<i>pectin + n H₂O = n methanol + pectate</i>
				EC 3.1.1.1	<i>Carboxylesterase</i>	
				EC 3.5.4.16	<i>GTP cyclohydrolase I</i>	<i>GTP + H₂O = formate + 7,8-dihydroneopterin 3'-triphosphate</i>
4	Liase	Adicionam água, amônia ou dióxido de carbono a				

		duplas ligações, ou removem estes elementos para produzirem duplas ligações				
5	Isomerase	Catalisam uma variedade de reações de isomerização: do tipo L para D, reações de mutação (troca de grupos químicos) entre outras	Down	EC 5.3.1.16	<i>1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase</i>	<i>1-(5-phospho-β-D-ribosyl)-5-[(5-phospho-β-D-ribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide = 5-[(5-phospho-1-deoxy-β-D-ribulos-1-ylamino)methylideneamino]-1-(5-phospho-β-D-ribosyl)imidazole-4-carboxamide</i>
6	Ligase	Catalisam reações em que dois grupos químicos são unidos utilizando energia fornecida pelo ATP	Down	EC 6.3.2.4	<i>D-alanine-D-alanine ligase</i>	<i>ATP + 2 D-alanine = ADP + phosphate + D-alanyl-D-alanine</i>

Os perfis cinéticos da fermentação empregando oxigênio puro (Figura 1) mostraram que *E. cloacae* P7 foi capaz de contornar parcialmente o estresse oxidativo gerado e produzir concentrações de biomassa relativamente elevadas. De modo a explorar mais profundamente os mecanismos utilizados pela bactéria para superar o ambiente agressivo, e justificar o desempenho alcançado, foi realizada análise de proteômica da biomassa obtida nesta condição de fermentação (OD 100%) e no processo controle (OD 20%). As amostras foram recolhidas no tempo de 6 horas, utilizando-se como critério o intervalo de evidente diferença nos perfis de crescimento, a qual foi verificada em ensaios preliminares. No ensaio com OD 100%, este momento do processo representava o início da retomada do crescimento, após a abrupta diminuição na velocidade de crescimento observada 1 hora antes. Na condição controle, o cultivo ainda estava em plena atividade e ainda distante da fase estacionária.

Em bactérias, a presença de várias oxidoredutases é necessária para manutenção do equilíbrio redox (McLeod *et al.*, 2011). Os resultados da análise proteômica mostraram que, dentre as proteínas mais abundantes em *E. cloacae* UENF P7, o número de oxiredutases foi o maior entre as três classes enzimáticas identificadas, podendo-se supor que estas participaram da mitigação dos efeitos negativos do O₂ puro. Três enzimas encontradas entre as mais abundantes, uma *Manganese superoxide dismutase* (Mn-SOD) e duas *Non-specific DNA-binding protein Dps/Iron-binding ferritin-like antioxidant protein/Ferroxidase* (Tabela 2), estão envolvidas na resposta ao estresse oxidativo em bactérias (Imlay, 2013; De Martino *et al.*, 2016).

As superóxido dismutases (SOD) constituem uma importante defesa antioxidante em células bacterianas expostas ao oxigênio, sendo responsáveis pela dismutação de íons superóxido (O₂⁻) em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que é então, reduzido à água e oxigênio por ação de enzimas como catalase, hidroperóxido-redutase de alquilo e tiol peroxidase (Imlay, 2013). Em *E. cloacae* UENF P7, a proteína Mn-SOD foi 1,68 vezes mais abundante em resposta ao estresse oxidativo gerado pelo excesso de O₂⁻ no meio (Tabela 1). Outros autores constataram alta expressão de SOD sob estresse oxidativo e seu papel essencial na eliminação de ERO para sobrevivência microbiana (Matsamura *et al.*, 1993; O'Donnell *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2008; Baez *et al.*, 2013).

Matsamura *et al.* (1993) demonstraram que, em *E. coli*, a expressão gênica de *sodA*, cujo produto é Mn-SOD, foi positivamente regulada pelo oxigênio, ao contrário de *sodB* (Fe-SOD), evitando redução na produção de biomassa. Em trabalho mais recente, Baez *et al.* (2013) avaliaram o efeito de oxigênio molecular na resposta ao estresse oxidativo por uma cepa mutante de *E. coli*, deficiente nos genes *sodA* e *sodB*. Ao incrementar a concentração de oxigênio dissolvido no meio de 30 para 300% após 2 h de cultivo (DO=1), a velocidade específica de crescimento (μ_x) foi drasticamente reduzida (de $0,75 \text{ h}^{-1}$ para $0,32 \text{ h}^{-1}$). Comportamento diverso foi verificado no cultivo da cepa parental, *E. coli* AB1157, que apresentou valores praticamente idênticos de μ_x ($\sim 1,08 \text{ h}^{-1}$) após a mudança de OD, realizada nas mesmas condições. O melhor desempenho da cepa parental foi atribuído à ativação da proteína reguladora de estresse oxidativo SoxRS (Imlay 2013), em resposta ao aumento da concentração de O_2^- intracelular, levando à superexpressão de Mn-SOD. Em cultivo de *E. coli* BW25113 com valores de OD mantidos entre 35 e 40% durante o processo, Rahman *et al.* (2008) verificaram a ativação de SoxRS durante a fase linear de crescimento, em decorrência do maior estresse oxidativo provocado pelas elevadas velocidades de respiração da bactéria.

DNA-binding protein (Dps) desempenha um papel protetor crucial durante a exposição de bactérias a diversos tipos de estresse, incluindo o oxidativo, contribui para a manutenção da integridade do DNA e viabilidade celular (De Martino *et al.*, 2016). A proteína pode se ligar ao DNA, formando uma estrutura cristalizada que fornece blindagem mecânica contra agentes estressores (Meyer e Grainger, 2013). Sob condições de estresse, Dps torna-se altamente regulada e pode reorganizar massivamente o cromossomo bacteriano, influenciando rapidamente a sua compactação e proteção, com colapso abrupto na síntese de DNA (Vtyurina *et al.*, 2016).

Dps também possui atividade de ferroxidase, o que contribui significativamente para sua capacidade protetora, por meio do sequestro de ferro ferroso, que em reação com H_2O_2 leva à formação de radical hidroxila (HO^\cdot) (Zhao *et al.*, 2002). Radical HO^\cdot é a mais importante das espécies reativas de oxigênio, causando danos indiscriminados a macromoléculas celulares (Imlay, 2008). Nair e Finkel (2004) demonstraram que a regulação de Dps é necessária para a sobrevivência de *E. coli* em resposta a uma grande

variedade de estresses, bem como na ligação e sequestro de ferro. Células que não possuem gene para Dps são mais sensíveis ao estresse oxidativo, apresentando viabilidade reduzida (Shangl *et al.*, 2014).

A composição do meio de cultura pode ter um efeito no sequestro de metais pela célula bacteriana (Gómez-Sagasti *et al.*, 2014). No caso de ferro, nutriente essencial para muitos processos biológicos (Fadéau *et al.*, 2011), quando as concentrações são muito baixas, as bactérias sintetizam e secretam sideróforos, compostos de baixa massa molecular com alta especificidade e afinidade por ferro insolúvel (Fe^{3+}) (Neilands, 1995; Vraspir e Butler, 2009), a forma predominante em condições aeróbicas (Grass 2006). A função primária dos sideróforos é fornecer ferro solúvel para crescimento microbiano (Saha *et al.*, 2016). As bactérias usam diferentes sistemas de transporte de ferro mediados por sideróforos. Em Gram-negativas, o transporte pode ser realizado por receptores de membrana externa TonB-dependentes, que reconhecem os complexos sideroformo- Fe^{3+} (Krewulak e Vogel, 2008). Dentre as proteínas menos abundantes em *E. cloacae* UENF P7, foi observada a proteína *TonB-dependent receptor*, o que sugere que não havia necessidade de captação de ferro para as células por meio desta via. É provável que o Fe^{3+} gerado pela atividade ferroxidase de Dps estava sendo estocado na célula, pela ação como *Iron-binding ferritin-like antioxidant protein*.

No presente trabalho, o crescimento de *E. cloacae* UENF P7 foi inibido durante parte do processo fermentativo com OD 100% (Figura 1), o que poderia sugerir que a concentração de ROS excedeu a capacidade das células para confrontá-los, pelo menos nos primeiros momentos após a introdução de oxigênio puro no biorreator. No entanto, nos testes realizados para avaliação qualitativa da produção endógena de ERO não foi possível visualizar emissão de fluorescência em nenhum dos momentos analisados (Figura 3), que incluíram o intervalo de grande impacto na cinética de crescimento. Assim, constata-se que bactéria foi capaz de adaptar-se, pelo menos parcialmente, às novas condições, induzindo a síntese de enzimas necessárias para manter o equilíbrio redox. Apesar da expressiva redução da velocidade de crescimento a partir de 5 h, as células não demonstraram estar próximas de uma situação de falência, a qual teria sido evidenciada pela entrada nas fases estacionária e/ou de declínio. Ao contrário, a continuidade do crescimento mostra coerência com

a resposta antioxidante proporcionada tanto por SOD quanto por *Non-specific DNA-binding protein Dps*.

Em bactérias, os reguladores de genes respondem a estresses ambientais específicos estimulando ou inibindo a transcrição, tradução ou algum outro evento na expressão gênica (Ramos *et al.*, 2001). Os resultados da análise proteômica também evidenciaram o comprometimento de uma série de funções biológicas importantes em *E. cloacae* UENF P7 relacionadas, sobretudo, às fases finais de crescimento, como as fases de transição e estacionária. Dentre essas, incluem-se as alterações ribossômicas, as quais estão relacionadas a várias proteínas de resposta a estresses e que são, portanto, importantes para que as bactérias sobrevivam em ambientes hostis (Yoshida *et al.*, 2012). Dentre as proteínas mais abundantes exibidas por *E. cloacae* P7 na condição de estresse oxidativo, três estão relacionadas às funções ribossômicas: *Ribosome recycling factor* (RRF), *Translation elongation factor G* (EF-G) e *Uncharacterized membrane protein YqjD* (Tabela 1).

Os ribossomos podem representar até 45% da massa total de células bacterianas em organismos como *E. coli* durante a fase exponencial e sintetizam ativamente todas as proteínas celulares necessárias (Yoshida *et al.*, 2012). A biossíntese de proteínas envolve quatro etapas consecutivas, designadas iniciação, alongamento, terminação e reciclagem do complexo ribossômico (Hirokawa *et al.*, 2006). Em bactérias, no estágio pós-terminação, os ribossomos 70S são dissociados em subunidades estáveis por ação cooperativa de três fatores de tradução: fator de reciclagem do ribossomo (RRF), fator de alongamento G (EF-G) e fator de iniciação 3 (IF3) (Hirokawa *et al.*, 2005). RRF desempenha um papel essencial na quarta etapa de síntese protéica em procariotos (Das *et al.*, 2017), sendo usado juntamente com o fator EF-G para reciclar as subunidades ribossômicas 30S e 50S para a próxima rodada de tradução, por meio da dissociação da subunidade ribossômica (Pathak *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2015). Desta forma, a maior abundância das proteínas RRF e EF-G em *E. cloacae* UENF P7 na condição de estresse pelo oxigênio pode estar relacionada com a manutenção do crescimento demonstrada pela bactéria durante o período de maiores concentrações de íons superóxido no meio. Para *E. coli*, verificou-se que a expressão da proteína RRF é essencial para o crescimento celular, sendo sua eliminação letal para a

bactéria (Janosi *et al.*, 1994). Adicionalmente, RRF é uma proteína multifuncional que pode evitar erros ao longo do processo de tradução (Janosi *et al.*, 1996).

Outra estratégia importante para a sobrevivência de bactérias sob condições de estresse é a formação do ribossomo 100S, um dímero do ribossomo 70S formado pela ligação do fator de promoção da hibernação (HPF) a ribossomos (Yoshida *et al.*, 2009). O ribossomo 100S é expresso durante a fase estacionária, sendo o principal responsável pela supressão da síntese proteica em *E. coli* (Maki *et al.*, 2000; Ueta *et al.*, 2005). Dentre as proteínas mais abundantes em *E. cloacae* UENF P7 foi verificada a presença da proteína *Uncharacterized membrane protein YqjD*. Em *E. coli* esta proteína é descrita como uma proteína hipotética encontrada na membrana interna e em associação com ribossomos 70S e 100S. A bactéria começa a expressar YqjD no início da fase estacionária de crescimento, sendo a expressão regulada pelo fator sigma de resposta ao estresse RpoS. A superexpressão de YqjD leva à inativação dos ribossomos pela ligação da proteína na região N-terminal, causando a inibição do crescimento de *E. coli* (Yoshida *et al.*, 2012). Desta forma, sugere-se que YqjD desempenhou um papel fundamental para a sobrevivência da *E. cloacae* UENF P7 em um ambiente cada vez mais oxidante e pode ter sido responsável por parte da diminuição da produção de biomassa.

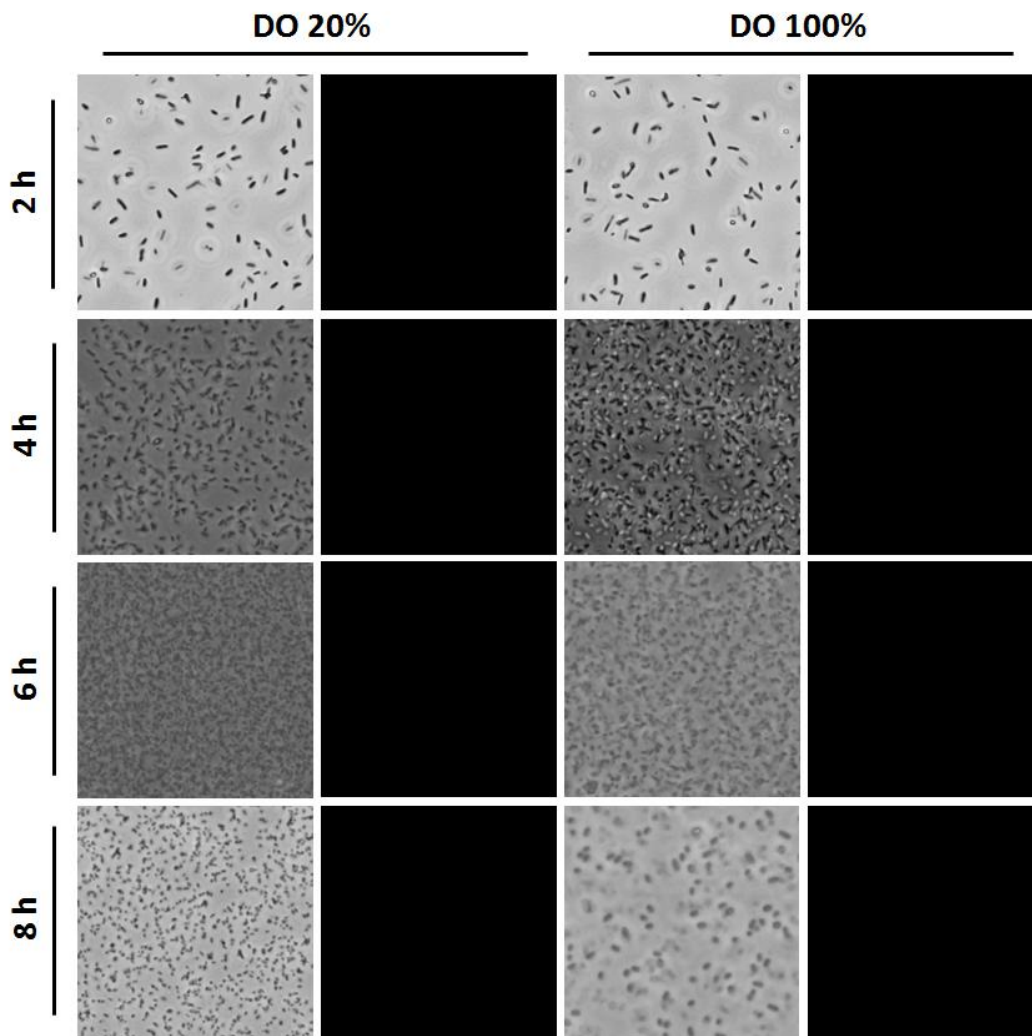


Figura 3: Detecção endógena da produção de ERO em biomassa de *E. cloacae* UENF P7 obtida em diferentes tempos do processo fermentativo realizado com concentração de oxigênio dissolvido (OD) em 20 e 100% da saturação. Análise por microscopia de fluorescência (direita) e de campo claro (esquerda). Em t=8h, com OD 100%, a amostra foi diluída 1:2.

4. Conclusão

Os resultados obtidos no trabalho mostraram que *E. cloacae* UENF P7 sofre impacto negativo pelo estresse gerado por elevada concentração de oxigênio dissolvido, caracterizado por queda na velocidade de crescimento e produção total de biomassa. No entanto, a bactéria possui mecanismos eficientes de defesa antioxidante, o que lhe permite contornar parcialmente os danos provocados pela geração excessiva de ERO.

5. Referências

Acker, H.V., and Coenye, T., 2016. The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. *Trends Microb.* 1-11.

Berbert-Molina, M.A., Prata, A.M.R., Pessanha, L.G., Silveira, M.M., 2008. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentrations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1397-1404.

Bhattacharya, S., 2015. Free Radicals in Human Health and Disease. 17-29.

Boniolo, F.S., Rodrigues, R.C., Prata, A.M.R., López, M.L., Jacinto, T., Silveira, M.M., Berbert-Molina, M.A., 2012. Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and delta-endotoxin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 3, 625-36.

Calderan-Rodrigues, M.J., Jamet, E., Bonassi, M.B.C.R., Guidetti-Gonzalez, S., Begossi, A.C., Setem, L.V., Franceschini, L.M., Fonseca, J.G., Labate, C.A., 2014. Cell wall proteomics of sugarcane cell suspension cultures. *Proteom.* 14, 738-749.

Castan, A., Näsman, A., Enfors, S.O., 2002. Oxygen enriched air supply in *Escherichia coli* processes: production of biomass and recombinant human growth hormone. *Enz. Microb. Technology* 30, 847-854.

Dalton, T. P., Shertzer, H. G., Puga, A., 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 67-101.

Das, D., Samanta, D., Bhattacharya, A., Basu, A., Das, A., Ghosh, J., Chakrabarti, A., Das Gupta, C., 2017. A Possible Role of the Full-Length Nascent Protein in Post-Translational Ribosome Recycling. *J. PLOS ONE.* 1, 1-17.

De Martino, M., Ershov, D., Van Den Berg, P.J., Tans, S.J., and Meyer., A.S., 2016. Single-Cell Analysis of the Dps Response to Oxidative Stress. *J. Bact.* 11, 1662-74.

Dhir, B., Srivastava, S., 2013. Heavy metal tolerance in metal hyperaccumulator plant, *Salvinia natans*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 720–724.

Dhir, B., Srivastava, S., 2011. Heavy metal removal from a multi-metal solution and wastewater by *Salvinia natans*. *Ecol. Eng.*, 37, 893-896.

Fardeau, S., Mullié, C., Dassonville-Klimpt, A., Audic, N., Sasaki, A., and Sonnet, P., 2011. Bacterial Iron Uptake: A Promising Solution against Multidrug Resistant Bacteria. *Sci. Against Microb. Pat.* 695-705.

Foyer, C. H., e Noctor, G., 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* 119, 355-364.

Gómez-sagasti, M.T., Becerril, J. M., Marttín, I., Epelde, L., Garbisu, C., 2014. cDNA Microarray Assessment of Early Gene Expression Profiles in *Escherichia coli* Cells Exposed to a Mixture of Heavy Metals. *Cell Biol. Tox.* 207-32.

Grainger, D.C., Goldberg, M.D., Lee, D. J. and Busby, S.J.W., 2008. Selective Repression by Fis and H-NS at the *Escherichia Coli* Dps Promoter. *Mol. Microb.* 6, 1366-1377.

Grass, G., 2006. Iron transport in *Escherichia coli*: all has not been said and done. *Biometals.* 19, 159-72.

Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C., 2006. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Clarendon Press, 4 Oxford.

Hirokawa, G., Demeshkina, N., Iwakura, N., Kaji, H. e Kaji, A., 2006. *Trends Biochem. Sci.* 31, 143-149.

Hirokawa, G., Nijman, R.M., Raj, V.S., Kaji, H., Igarashi, K. e Kaji, A., 2005. The role of ribosome recycling factor in dissociation of 70S ribosomes into subunits. *RNA. Soc.* 11, 1317-1328.

Hu, Z.Y.; Du, G.C. Hua, Z.Z.; Chen, J., 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on PVA degradation in a mixed culture and PVA degradation mechanism. *J. Food Sci. Biotechnol.* 6, 73-78.

Imlay, J.A., 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 755–776.

Imlay, J.A., 2014. *Oxidative stress : lessons from a model bacterium (Vol. 11).*

Imlay. J.A., 2013. The Molecular Mechanisms and Physiological Consequences of Oxidative Stress: Lessons from a Model Bacterium. *Nat. Rev. Microb.* 7, 443-54.

Janosi, L., Ricker, R., Kaji, A., 1996. Dual functions of ribosome recycling factor in protein biosynthesis: disassembling the termination complex and preventing translational errors. *Biochimie*. 78, 959-969.

Janosi, L., Shimizu, I., Kaji, A., 1994. Ribosome recycling factor (ribosome releasing factor) is essential for bacterial growth. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4249-4253.

Joseph, B., Sikora, A., Bordignon, E., Jeschke, G., Cafiso, D.S. and Prisner, T.F., 2015. Distance Measurement on an Endogenous Membrane Transporter in *E. coli* Cells and Native Membranes Using EPR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int.* 54, 6196-6199.

Korshunov, S., and Imlay. J.A., 2010. Two Sources of Endogenous Hydrogen Peroxide in *Escherichia Coli*. *Mol. Microb.* 6, 1389-1401.

Krewulak, K., Vogel, H.J., 2008. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim. Biophys.* 1781-1804.

Leclerc, M.; Elfoul-Bensaid, L.; Bernalier, A., 1998. Effect of yeast extract on growth and metabolism of H²-utilizing acetogenic bacteria from the human colon. *Current Microb.* 37, 166-171.

Lushchak, V.I., 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp. Bioch. Physiol.* 153, 175-190.

Marin-Iniesta, F., Nasri, M., Dhulster, P., Barbotin, J-N, Thomas, D., 1988. Influence of oxygen supply on the stability of recombinant plasmid pTG201 in immobilized *E. coli* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 455-462.

Meyer AS, Grainger DC. 2013. The *Escherichia coli* nucleoid in stationary phase. *Adv. Appl. Microbiol.* 83, 69-86.

Mignone, C.F.; Avignone-Rossa, C. 1996. Analysis of glucose carbon fluxes in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnol.* 46, 78 -84.

Nair, S., and Finkel, S. E., 2004. Dps Protects Cells against Multiple Stresses during Stationary Phase. *J. Bact.* 13, 4192-4198.

Nanda, A.K., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N., Dunand, C., 2010. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J. Integr. Plant. Biol.* 52, 195-204.

Oosterhuis, N.M.G., Groesbeek, N.M., Kossen, N.W.F., Schenk, E.S., 1985. Influence of dissolved oxygen concentration on the oxygen kinetics of *Gluconobacter oxydans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21, 42-49.

Plihon, F., Taillandier, P., Strehaiano, P., 1995. Oxygen effect on batch cultures of *Leuconostoc mesenteroides*: relationship between oxygen uptake, growth and end-products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 117-122.

Rahman, M., Hasan, M.R., Shimizu, K., 2008. Growth phase-dependent changes in the expression of global regulatory genes and associated metabolic pathways in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.*, 5, 853-860.

Resende, M.L.V., Salgado, S.M.L., Chaves, Z.M., 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopat. Bras.*, 28, 123-130.

Riesenberg, D., Guthke, R., 1999. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 422-430.

Rodríguez, F.A., Martínez-Toledo, M.V., González-López, J., Hontoria, E., Poyatos, J.M., 2010. Performance of bench-scale membrane bioreactor under real work conditions using pure oxygen: viscosity and oxygen transfer analysis. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 33, 885-892.

Ryu, H.W., Cho, K.S., Kim, B.S., Chang, Y.K., Chang, H.N., Shim, H.J., 1999. Mass production of poly (3-hydroxybutyrate) by fed-batch cultures of *Ralstonia eutropha* with nitrogen and phosphate limitation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 751-756.

Sacksinchai, S.; Suphantharika, M.; Verduyn, C., 2001. Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*: a physiological study. *W. J. Microb. Biotechnol.* 17, 307-316.

Saha, M., Sarkar S., Sarkar, B., Sharma, B.K, Bhattacharjee, S., Tribedi, P., 2016. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ. Sci. Pollut.* 5, 3984-99.

Shang, L., Jiang, M., Ryu, C.H., Chang, H.N., Cho, S.H., Lee, J.W., 2003. Inhibitory effect of carbon dioxide on the fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*: evaluation by CO₂ pulse injection and autogenous CO₂ *Methods. Biotechnol. Bioeng.* 3, 312-20.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M., 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stress ful Conditions. *J. Botany*, 1-26.

Ueta, M., Yoshida, H., Wada, C., Baba, T., Mori, H., Wada, A., 2005. Ribosome binding proteins YfiA and YhbH have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli*. *Genes Cells*. 10, 1103-1112.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44-84.

Van Acker, H., Coenye, T., 2016. The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. *Trends Microbiol.* 25, 456-466.

Vtyurina, N.N., Dulin, D., Docter, M.W., Meyer, A.S, Dekker, N.H., Abbondanzieria, E.A., 2016. Hysteresis in DNA Compaction by Dps Is Described by an Ising Model. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 18, 4982-4987.

Wiedenheft, B., Mosolf, J., Willits, D., Yeager, M., Dryden, K., Young, M., Douglas, T., 2005. An archaeal antioxidant: characterization of a Dps-like protein from *Sulfolobus solfataricus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10551-10556.

Yadav, S., Karthikeyan, S., 2015. Structural and Biochemical Characterization of GTP Cyclohydrolase II from *Helicobacter pylori* Reveals Its Redox Dependent Catalytic Activity. 192, 100-115.

Yamatsu, A.; Matsumi, R. Atomi, H.; Imanaka, T., 2006. Isolation and characterization of a novel poly (vinyl alcohol)-degrading bacterium, *Sphingopyxis* sp. PVA3. *Appl. Microb. Biotechnol.* 4, 804-811.

Yoshida H, Ueta M, Maki Y, Sakai A, Wada A., 2009. Activities of *Escherichia coli* ribosomes in IF3 and RMF change to prepare 100S ribosome formation on entering the stationary growth phase. *Genes Cells*. 14, 271-280.

Zeng, H., Guo, G., Mao, X.H., De Tong, W., Zou, Q.M., 2008. Proteomic Insights into *Helicobacter pylori* Coccoid Forms Under Oxidative Stress. *Curr Microb.* 57, 281-86.

Zhang, J., Hu, Q., Xu, C., Liu, S., and Li, C., 2016. Key Microbiota Identification Using Functional Gene Analysis during Pepper (*Piper nigrum* L .) Peeling. *Key Microb. Funct. Genes.* 1-12.

Zhang, L., Alfano, J.R., and Becker, D.F., 2015. Proline metabolism increases katG expression and oxidative stress resistance in *Escherichia Coli*. *J. Bact.* 3, 43-440.

Zhao, G.H., Ceci, P., Ilari, A., Giangiacomo, L., Laue, T.M., Chiancone, E., Chasteen, N.D., 2002. Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells—a ferritin-like DNA binding protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 277, 27689-27696.