



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO - CTC
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS - EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIAS INTEGRADAS - InteLab**

ALENCAR CABRAL

**Bioprospecção *in silico* da capacidade adaptativa e do potencial
biotecnológico da *Erythrobacter citreus* LAMA 915**

**Florianópolis - SC
Junho de 2016**

Alencar Cabral

**Bioprospecção *in silico* da capacidade adaptativa e do potencial
biotecnológico da *Erythrobacter citreus* LAMA 915**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador:
Prof. Dr. Luismar Marques Porto.

Coorientador:
Prof. Dr. André Oliveira de Souza Lima

Florianópolis - SC
Junho de 2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cabral, Alencar

Bioprospecção *in silico* da capacidade adaptativa e do potencial biotecnológico da *Erythrobacter citreus* LAMA 915 / Alencar Cabral ; orientador, Luísmar Marques Porto ; coorientador, André Oliveira de Souza Lima. - Florianópolis, SC, 2016.

85 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Saúde.

Inclui referências

1. Saúde. 2. *Erythrobacter citreus*. 3. Mar profundo. 4. Bioprospecção. 5. Biotecnologia. I. Porto, Luísmar Marques. II. Lima, André Oliveira de Souza. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Saúde. IV. Título.

Bioprospecção *in silico* da capacidade adaptativa e do potencial biotecnológico da *Erythrobacter citreus* LAMA 915

Por

Alencar Cabral

Dissertação julgada para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de Concentração de Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Orientador / Presidente

Prof. Dr. André Oliveira de Souza Lima
Coorientador

Profª. Dra. Cíntia Soares
Coordenadora

Banca Examinadora:

Profª. Dra. Andréa de Lima Pimenta
Membro Externo

Dr. Marco Di Luccio
Membro Externo

Prof. Dr. Marcus Adonai Castro da Silva
Membro Externo

Dedico este trabalho aos meus pais, minha esposa,
minha filha e a meus irmãos que estiveram
comigo em todos os momentos
deste curso.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que sempre me guiou para que eu seguisse os caminhos certos.

Ao carinho, amor e paciência que minha esposa Juliane e filha Ana Júlia tiveram durante a realização deste trabalho.

Minha profunda gratidão aos meus pais, irmãos e cunhadas que sempre acreditaram em mim, por todos os seus esforços, para que o meu sonho pudesse se concretizar.

Ao meu amigo Professor Luismar Marques Porto pela orientação, ensinamentos e amizade. Em especial, à meu amigo Professor André Oliveira de Souza Lima, por sua coorientação, amizade e parceria, sempre.

Aos meus amigos Rafael Medeiros Sperb e André Silva Barreto, por suas amizades, incentivos e pelas oportunidades concedidas.

Ao meu amigo Professor Marcus Adonai Castro da Silva, pela parceria e fornecimento do material para a realização deste trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora, que aceitaram avaliar e contribuir para o aperfeiçoamento do trabalho.

Aos amigos do LibGeo, Simone, Tadeu, Mariana, Rafaela, Renata, Tiago pela paciência e apoio quando eu precisava me ausentar do Laboratório. Ao meu amigo Gustavo que já deixou o laboratório.

Aos amigos do LAMA, Tiago, Cesar e Maria Carolina.

A todo o Grupo do Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab): Andréa, Fernanda Berti, Karina, Guilherme, Julia, Camila, Charles, Samara, Emily, Maikon, José Octávio, Karla, pelos companheirismo. Às colegas Drielle, Isla e Ericka, Lya que já deixaram o laboratório.

RESUMO

Os oceanos consistem no maior habitat para a vida microbiana. Para sobreviver a estes diferentes ambientes, as bactérias sofreram adaptações em suas estruturas químicas, físicas e biológicas. As enzimas derivadas de organismos marinhos, especialmente aqueles de águas profundas, têm se tornado interessante para a indústria biotecnológica devido à sua superior adaptação a condições extremas (tais como a resistência a *stress* osmótico, pressão e temperatura). Atualmente, o sequenciamento do genoma é uma das abordagens que permite conhecer o potencial genético do microrganismo com baixo custo. *Erythrobacter citreus* LAMA 915, uma Alphaproteobacteria oligotrófica facultativa foi isolada de amostras de água do mar, coletadas a 3600 metros de profundidade, na Elevação de Rio Grande, a uma temperatura de 2,5°C. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo e sequenciar o genoma de *E. citreus* LAMA 915 e identificar os genes envolvidos na resposta ao *stress* ambiental e quanto ao potencial biotecnológico. Uma vez sequenciado o genoma e montado, obteve-se um genoma com de 3,09 Mbp em 28 *contigs*, 2959 ORF e 52 RNA. Foram encontrados quais os genes envolvidos na resposta a *stress* osmótico, térmico, pressão hidrostática bem como na de privação de nutrientes. Além disso, genes de relevância industrial foram prospectados na *E. citreus* LAMA 915. Os genes envolvidos no metabolismo de alcanos descritos classificam a *E. citreus* LAMA 915 como potencial agente de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo. Foram encontradas duas rotas metabólicas de produção de polihidroxicanoatos (PHA), uma sendo clássica, que envolve os genes *phaA* e *phaB*; e uma segunda rota, está relacionada à via de β -oxidação devido à proximidade do gene *phaC* com o gene *tesb* 1. Além disso, este microrganismo também apresentou um grupo genes envolvidos na produção de lipases (fosfolipase A2, fosfolipase B, fosfolipase C e fosfolipase D), as quais podem ser usadas na indústria (produção de biodiesel). Em resumo, foram encontrados os genes que conferem a *E. citreus* LAMA 915 a valiosa habilidade de colonizar habitats extremos. Além disso, este microrganismo apresenta um repertório genético de relevância para indústria biotecnológica.

Palavras-chave: Bioprospeção; Mar profundo; Extremófilo; *Erythrobacter citreus*

ABSTRACT

The deep sea environments shelter in the largest volume of life on Earth. To survive in such different environments, bacteria need to adapt its chemical, physical and biological structures. Enzymes derived from marine organisms, particularly from deep sea environments, have drawn the interest of the biotechnological industry due to their intrinsic features such as osmotic resistance. Nowadays, genome sequencing is one of the approaches used for bioprospection analysis. *Erythrobacter citreus* LAMA 915, a facultative oligotrophic Alphaproteobacteria, was isolated from sea water collected at 3600 meters depth at 2.5°C at Rio Grande Raise. In this context, the present study aimed at sequencing of the genome of *E. citreus* LAMA 915 and identification of genes involved in the environmental stress response and potential biotechnology process. Its genome was sequenced and the assembly produced a genome with 3.09 Mbp, 28 contigs, 2959 ORF and 52 RNA. Genes involved in environmental response to osmotic stress, thermal stress, hydrostatic pressure and also starvation was found. Further, *E. citreus* LAMA 915 presented genes related to potential biotechnology process, including genes of interest to industry. As example, we can mention genes involved in metabolism of alkanes, which have impact on oil spill and classify *E. citreus* as a potential bioremediation agent for petroleum contaminated areas. Regarding to polyhydroxyalkanoates (PHA), a biopolymer, we found two possible routes: the classical route, which involves the *phaA* and *phaB* genes; and a second one, that can be linked to via β -oxidation due to proximity of the *phaC* gene with the *tesb 1* gene. *E. citreus* LAMA 915 also presented a set of lipase (phospholipase A2, phospholipase B, and phospholipase C and phospholipase D), which can be used in biodiesel yield. In summary, we found a set of genes that confers to *E. citreus* LAMA 915 the ability to colonize habitats with different available nutrients. In addition, its genetic repertoire indicates their potential to be used in different biotechnology areas.

Keywords: *Erythrobacter citreus*; deep sea environments; Bioprospection

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Topografia da Elevação do Rio Grande com aumento no vertical: (A) Modelo digital de elevação (Mohriak <i>et al.</i> , 2010). (B) Vista lateral do assolho oceânico, com o eixo X, referente à distância, está expresso em quilômetros (km) e o eixo Y, referente à altitude, está expresso em metros (m).	28
Figura 2 - Padrão de circulação das massas águas profundas do Oceano Atlântico Sul.....	29
Figura 3 - A) Cultura de <i>E. citreus</i> LAMA 915 em meio sólido, B) cultura em meio líquido após 48 de incubação.....	32
Figura 4 - Relação entre as estratégias de sobrevivência aos extremos e resistência.	41
Figura 5 - Infográfico sobre o derramamento de petróleo provocado pelo navio tanque Exxon Valdez no Alasca.....	43
Figura 6 – Local de clivagem das enzimas PLA ₁ , PLA ₂ , PLC e PLD, sobre o fosfolípido Sítios de ação das fosfolipases. R1 e R2 referem-se aos ácidos graxos nas posições C1 e C2 dos fosfolípidios numerados estereoespecificamente. As ligações hidrolisadas por outras fosfolipases, denominadas de acordo com suas especificidades, também estão indicadas (Adaptado de SELISTRE-DE-ARAÚJO; de SOUZA, 2007).	47
Figura 7 - Diagrama simplificado contendo as etapas abordadas no presente estudo.	50
Figura 8 - Vista geral do genoma: Contendo os contig, regiões codificante e localização das regiões de interesse biotecnológico.	54
Figura 9 - Organização genômica da região contendo os genes, envolvidos na via metabólica da degradação de alcanos. O sentido das setas representa o sentido de leitura no genoma.	61
Figura 10 - Via aeróbica de degradação de n-alcanos por oxidação terminal e subterminal que fornecem acil-CoA para β -oxidação e acido carboxílico para o TCA: os genes envolvidos são os da AH alcano	

hidroxilase, AD álcool desidrogenase, ALD aldeído desidrogenase, ACS acil-Coa sintase. 62

Figura 11 - Parte do genoma da *E. citreus* LAMA 915 formando um agrupamento de genes com a *tesb*, *phac*, Enoil-CoA hidratase, permeases e Acido graxo desaturase. O sentido das setas representa o sentido de leitura no genoma. 64

Figura 12 – Sugestão da via metabólica de síntese e degradação de PHA: O (S)-3-hidroxiacil-CoA, produzido via β -oxidação de Acil-CoA, é isomerizado em (R)-3-hidroxiacil-CoA pela *fadB*. O (R)-3-hidroxiacil-CoA é convertido pela *tesB* em 3-HAA e com a *phaC* em polihidroxialcanoatos. 66

Figura 13 – A síntese de carotenoides em *E. citreus* LAMA 915, ocorre através da rota MEP/DOXP formando o geranyl-geranyl difosfato o qual é o metabólito precursor para a rota dos carotenoides que é formdas pelos genes *crtb*, *crti*, *crty* e *crtz*. 68

Figura 14 - Comparação da disposição dos genes envolvidos na degradação de lignina presentes nos genomas do *E. citreus* LAMA 915, *N. aromaticivorans* (Picart *et al.*, 2014)e *S. paucimobilis* (Hara *et al.*, 2003). O sentido das setas representa o sentido de leitura dos genes.... 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação da características descritas e as evidências genômicas encontradas no genoma de <i>E. citreus</i> LAMA 915.....	55
Tabela 2 – Orf’s que conferem resistência e reposta a queda da temperatura. CSP resistencia à queda temperatura e HSP resistencia ao aumento da temperatura.	57
Tabela 3 – Orf’s que conferem resistência e reposta <i>stress</i> osmótico ...	58
Tabela 4 – Orf’s que conferem resistência à variação da pressão hidrostática	58
Tabela 5 - Genes envolvidos na degradação de alcanos.....	60
Tabela 6 – Genes relacionados com síntese de PHA.....	63
Tabela 7 - Lista de orf’s encontrados na <i>E. citreus</i> LAMA 915 envolvidos na síntese de carotenoides.....	67
Tabela 8 – Orf’s envolvidos na degradação de lignina.....	69
Tabela 9 - Genes encontrados no genoma da <i>E. citreus</i> LAMA 915 com atividade de lipase.	71
Tabela 10 - ORF envolvidas na assimilação de Nitrato e produção de aminoácidos	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16S	Ribossomo subunidade 16
50S	Ribossomo subunidade 50
AABW	<i>Antartic Bottom Water</i> - Água de Fundo do Antártico
Acil-CoA	Ácido graxo com CoA conjugada
ACS	Acil-CoA sintetase
AD	Álcool desidrogenase
AH	alcano hidroxilase
ALD	Aldeído desidrogenase
<i>alkb</i>	Alcano 1-monooxigenase
<i>alks</i>	Regulador da Transcrição de alcanos tipo S
ATPase	Decomposição de ATP em ADP
bdh	D-β-hidroxiacetato desidrogenase
bp	Pares de base
BVM	Monooxigenases (família)
CoA	Coenzima A
<i>crib</i>	Fitoeno sintase
<i>cri</i>	Fitoeno desidrogenase, Fitoeno desaturase
<i>crtY</i>	Licopeno ciclase
<i>crtZ</i>	β-caroteno hidroxilase
<i>csp</i>	cold shock protein - Proteína expressa no choque térmico em queda de temperatura
<i>cspa</i>	CSP tipo A
<i>cspd</i>	CSP tipo D
CYP153A7	Citocromo P450 alcano hidroxilase 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dnaj	Chaperona tipo HSP40
dnak	Chaperona tipo HSP70
doxp	D-Gliceraldeído-3-fosfato
dxr	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato reduto isomerase
dxs	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase
echa	Enoil-CoA hidratase
fadb	3- hidroxiacil -CoA epimerase

<i>galp</i>	4-oxalomesaconato tautomerase FldA
<i>groel</i>	HSP60
<i>hadh</i>	3-hidroxiacil-CoA desidrogenase
<i>hbd</i>	3-hidroxiButiril-CoA desidrogenase / 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase
<i>hrca</i>	Regulador da expressão de HSP <i>Heat shock protein</i> - Proteína expressa no choque térmico em aumento de temperatura
<i>hsp</i>	
<i>hsp33</i>	HSP tipo 33
<i>idsa</i>	geranil difosfato sintase
<i>ispb</i>	Octaprenil-difosfato sintase
<i>ispdf</i>	2-C-metil-D-eritritol 2, 4-ciclodifosfato sintase
<i>ispe</i>	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol kinase
<i>ispg</i>	1-hidroxi-2-metil-2- (E)-butenil 4-difosfato sintase
<i>isph</i>	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato redutase
KCl	Cloreto de Potássio
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
km	Kilometro
<i>liga</i>	Protocatecuato 4,5-dioxigenase unidade alfa
<i>ligb</i>	Protocatecuato 4,5-dioxygenase unidade beta
<i>ligc</i>	4-carboxi-2-hidroxiuconato-6-semialdehide desidrogenase
<i>ligi</i>	2-pirone-4, 6-dicarboxilato hidrolase
<i>ligj</i>	4-oxalomesaconate hidratase
<i>ligk</i>	4-carboxi-4-hidroxi-2-oxoadipate aldolase
<i>ligr</i>	Regulador da transcrição, família LysR
m	metros
Mbp	Milhões pares de base
MEP	Piruvato
MPa	Mega pascal
Na	Ions de sódio
NADW	<i>North Atlantic Deep Water</i> , Água Profunda do Atlântico Norte
NCBI	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine
<i>nhaa</i>	Transporte de Na ⁺ /H ⁺
ORF	Sequência aberta de leitura (<i>Open Read Frame</i>)

<i>osmp</i>	Protéina extracelular osmo regulada
<i>oxct</i>	3-oxoacid0 CoA-transferase
P45	Proteina com 45 kilo dalton
PCA	Rota meta Protocatecuato
PCA45	Protocatecuato
PHA	Polihidroxialcanoato
<i>phaa</i>	3-ketoacil-CoA tiolase / Acetil-CoA acetiltransferase
<i>phac</i>	PHA sintase
<i>phaz</i>	Intra-celular PHA/PHB despolimerase
PHB	Poli hidroxibutirato
<i>phbb</i>	Acetoacetil-CoA redutase
<i>phbf</i>	Repressor da PhaC
<i>pla₁</i>	Fosfolipase A1
<i>pla₂</i>	Fosfolipase A2
<i>pla₂</i>	Fosfolipase A2
<i>plb</i>	Fosfolipase B
<i>plc</i>	Fosfolipase C
<i>pld</i>	Fosfolipase D
RAST	Rapid Annotation using Subsystem Technology
<i>tesb</i>	Acil-CoA tioesterase tipo 1
β-caroteno	Beta caroteno
β-HB	Beta hidroxibutirato

GLOSSÁRIO

Artemis	Software para visualização e edição de genomas
BioProject	Descrição biológica do organismo NCBI
BioSample	Base de dados de informações biológicas contendo descrição do material biológico utilizado para sequencia o organismo
BLOSUM-62	Matrix de Similaridade
Clusters	Agrupamento de genes
Contig	Fragmento do genoma
E-value	Expect value - Valor esperado, parâmetro estatístico que descreve a probabilidade do resultado estar correto
EC	Enzyme Commission, classificação de enzimas baseadas na reação química
GAP	Espaço a vazio numa sequencia de aminoácido por causa da ausência do aminoácido
GenBank	Base de dados de genes
K-mer	Fragmentação virtual de read utilizado por softwares de montagem de genomas
KO	KEGG ORTHOLOGY - categorização de genes baseada na reação e via metabólica
LAMA	Laboratório de Microbiologia Aplicada da UNIVALI
Montagem	Alinhamento das reads para formar uma única sequencia consenso
Nr	Banco de dados com informações de genômicas não redundantes do NCBI
Read	Fragmento de DNA lido por um sequenciador
SeqyClean	Software para remover possíveis contaminantes do sequenciamento
tbl2asn	Software para validação de genomas anotados
Velvet	Software para montagem de genoma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	JUSTIFICATIVA	31
1.2	OBJETIVOS	33
1.2.1	Objetivo Geral.....	33
1.2.2	Objetivos Específicos.....	33
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	35
2.1	VARIÁVEIS AMBIENTAIS	35
2.1.1	Fontes de carbono	35
2.1.2	Fontes de nitrogênio.....	36
2.1.3	Efeito da pressão osmótica.....	37
2.1.4	Efeito da temperatura.....	38
2.1.5	Efeito da pressão Hidrostática	39
2.2	GENES E VIAS METABÓLICAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO.....	41
2.2.1	Biorremediação	42
2.2.2	Biopolímeros.....	43
2.2.3	Pigmentos Carotenoides.....	44
2.2.4	Compostos Aromáticos.....	45
2.2.5	Lipases e Fosfolipases.....	46
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1	ORGANISMO, EXTRAÇÃO DO DNA E SEQUENCIAMENTO	49
3.2	MONTAGEM <i>Denovo</i>	51
3.3	ANOTAÇÃO DO GENOMA	51
3.4	CURADORIA MANUAL.....	51
3.5	GENES DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO	52
3.6	CAPACIDADE ADAPTATIVA.....	52
3.7	DEPÓSITO DO GENOMA E ORF NO NCBI.....	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1	MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA	53

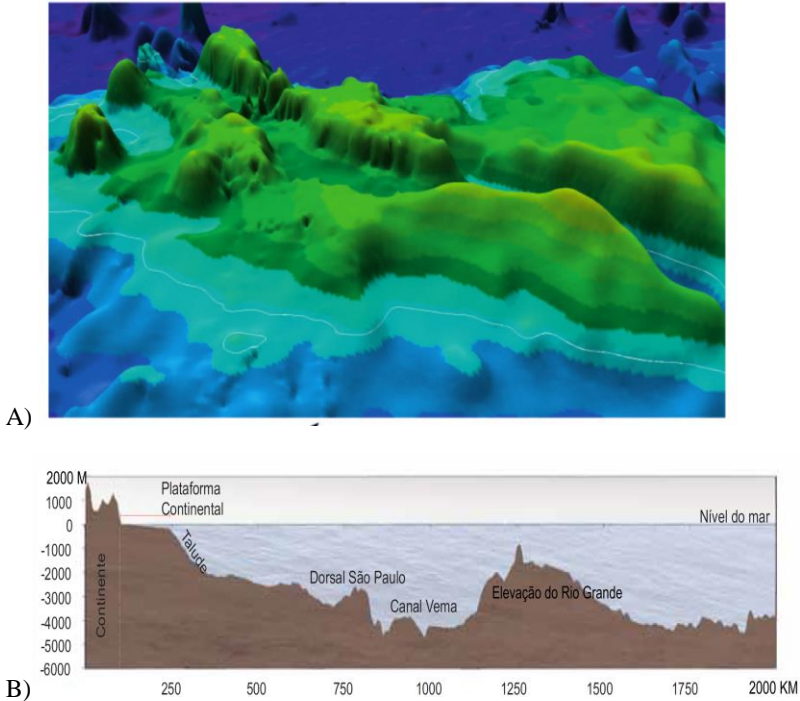
4.2	RESULTADOS GERAIS.....	53
4.3	RESPOSTA AMBIENTAL.....	56
4.4	GENES E VIAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO .	59
4.4.1	Degradação de Alcanos (Biorremediação).....	59
4.4.2	PHA (Produção de Biopolímeros).....	63
4.4.3	Carotenoides (Produção de Pigmentos).....	67
4.4.4	Compostos Aromáticos.....	68
4.4.5	Lipases e Fosfolipases (Produção de Enzimas Lipolíticas) ..	70
5	CONCLUSÕES	73
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTÚROS.	75
7	BIBLIOGRAFIA.....	77
8	ANEXOS	85
8.1	ANEXO A	85
8.2	ANEXO B.....	85

1 INTRODUÇÃO

Os oceanos ocupam 71% da superfície terrestre e compreendem o maior *habitat* para a vida microbiana. Se definirmos como limite superior do oceano profundo a linha imediatamente abaixo da zona fótica, teremos um *habitat* que compreende o maior volume da biosfera existente e caracteriza-se por pressões acima de 100 MPa, podendo chegar a uma profundidade de 11000 m nas Fossas Marianas (Bartlett, 2002; Tyler, 2003). A temperatura no oceano profundo é praticamente estável em aproximadamente 4°C, podendo passar de 100°C em locais distintos como afloramento vulcânico (Karl, 2007; Picard e Daniel, 2013). No ambiente marinho o tipo e a quantidade de nutriente disponível variam muito de região, mas predominando em águas profundas nutrientes de difícil assimilação (Silva, 2014). Os oceanos como um todo são um ambiente aeróbio, porém existem determinadas regiões anaeróbicas que estão associadas aos sedimentos, interior de partículas suspensas, tapetes microbianos e regiões com barreiras físicas que impedem a entrada de oxigênio na coluna d'água (Sarmiento e Gruber, 2006; Silva, 2014). A combinação destes fatores abióticos cria uma diversidade de ambientes distintos.

O Oceano Atlântico é o segundo maior oceano no planeta, com uma taxa de crescimento devido ao deslocamento de placas tectônicas de aproximadamente 2,5 cm ao ano. Ele é cortado ao meio no sentido norte sul pela Cordilheira Meso-Oceânica estendendo-se por mais de 16.000 km. Além disso, próximo da linha do Equador e da Fossa Romanche tem-se a separação do Oceano Atlântico em Dorsal do Atlântico Norte e Dorsal do Atlântico Sul. A Dorsal do Atlântico Sul por sua vez, é cortada transversalmente pela Cordilheira Walvis no lado do Continente Africano e cortada pela elevação do Rio Grande no lado do continente americano. A elevação do Rio Grande está cerca de 1.300 km da costa brasileira, localizada entre as bacias oceânicas da Argentina e do Brasil, constitui a maior feição batimétrica submarina positiva localizada no Atlântico Sul, e eleva-se até a zona fotótica a, aproximadamente, 1.000 m de profundidade com média de 4.000 m (Mohriak *et al.*, 2010) (Figura 1a e Figura 1b).

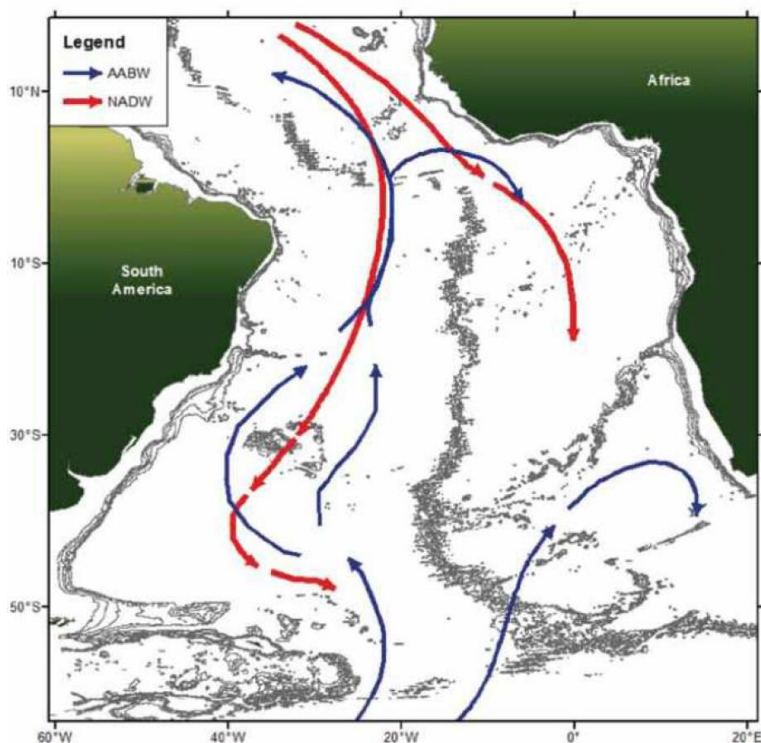
Figura 1 - Topografia da Elevação do Rio Grande com aumento no vertical: (A) Modelo digital de elevação (Mohriak *et al.*, 2010). (B) Vista lateral do assolho oceânico, com o eixo X, referente à distância, está expresso em quilômetros (km) e o eixo Y, referente à altitude, está expresso em metros (m).



Fonte: A) (Mohriak *et al.*, 2010), B) (IBGE, 2011)

O deslocamento das massas de água na região da Elevação do Rio Grande na sua porção mais inferior está associada à massa de Água de Fundo do Antártico – *Antarctic Bottom Water*, AABW (Figura 2) – que flui em direção ao norte através das bacias da Argentina e do Brasil e, caracteriza-se por altas concentrações de oxigênio, nutrientes e por ter uma baixa temperatura e salinidade. No sentido oposto a massa de Água Profunda do Atlântico Norte (*North Atlantic Deep Water*, NADW), a qual desloca-se do Atlântico Norte rumo ao sul e passa por cima da AABW (Gage e Tyler, 1991; Levin e Gooday, 2003).

Figura 2 - Padrão de circulação das massas águas profundas do Oceano Atlântico Sul.



Fonte: (Silva, 2013)

Os microrganismos representam o maior volume de vida no ambiente marinho e estão amplamente distribuídos nos oceanos, sendo encontrados em diferentes profundidades, temperaturas, concentrações salinas, em diferentes condições de aerobiose e metabolizando os mais diversos tipos de substratos. Os microrganismos podem ser classificados como extremófilos: quando adaptados para sobreviver a uma determinada condição físico-química que exceda os limites toleráveis para a maioria dos organismos, podendo ser extremófilos obrigatórios ou facultativos.

Existe nomenclatura específica segundo o tipo de condição extrema suportada: a) quanto à temperatura, são chamados termófilos (quando suportam temperaturas acima de 60 °C) e psicrófilos (quando

sobrevivem a temperaturas inferiores a 4°C) (Silva, 2014; Sugawara e Nikaido, 2011); b) quanto à pressão, são classificados como piezófilos quando suportam pressões acima de 10 MPa (Silva, 2014; Sugawara e Nikaido, 2011); c) quanto à salinidade, podem ser classificados como halófilo, quando adaptados ao *stress* osmótico salino (Silva, 2014; Sugawara e Nikaido, 2011) d) Oligotrófico quando está adaptado a sobreviver em ambientes pobres de nutrientes como as fontes de carbono e nitrogênio (Sugawara e Nikaido, 2011).

Os microrganismos precisaram desenvolver diferentes adaptações para sobreviver aos diferentes fatores abióticos dos ecossistemas marinhos. Estas adaptações possuem objetivo de reduzir os efeitos físico-químicos impostos pelos fatores abióticos, com intuito de manter a difusibilidade de moléculas e a integridade das enzimas e da célula. Isto ocorre através de modificações na estrutura das enzimas e da parede celular e/ou da produção de compostos como biossurfactantes, chaperonas, lipídios (Blunt *et al.*, 2016; Sugawara e Nikaido, 2011). Devido a isso, a biota dos ecossistemas marinhos apresenta o potencial de fornecer microrganismos, enzimas e moléculas com relevância para a indústria biotecnológica, contendo propriedades como robustez, resistência a solventes ou especificidade sobre diferentes substratos (Behera *et al.*, 2015; Kato *et al.*, 1998; López-López, Cerdán e González Siso, 2014). No período de 2010 a 2014 foram descobertos mais de 5600 novos compostos produzidos por organismos marinhos. Dentre estes, destacam-se fármacos, moléculas antitumorais, biossurfactantes, anti-incrustantes (Blunt *et al.*, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016)

O difícil acesso ao oceano profundo é um dos grandes impedimentos para a compreensão desses ecossistemas, da fisiologia dos microrganismos e obtenção de amostras. Outro fator relevante é a estimativa de que apenas que apenas 1% dos microrganismos do oceano profundo sejam cultiváveis em condições normais de laboratório ou mantenham a mesma fisiologia devido à falta de reprodutibilidade das condições ambientais extremas (Mota *et al.*, 2013; Silva, 2013). Entretanto, a abordagem através de metodologias independentes de cultivo é uma alternativa para estudo de organismos que não crescem ou mudam sua fisiologia devido à mudança das características ambientais. Uma dessas metodologias envolve o sequenciamento do genoma, o qual permite identificar funções de genes desconhecidos, através de análises comparativa dos genes, permitindo conhecer potenciais não observados nas condições de cultivo, por falta de simulação das condições ambientais.

Um dos poucos esforços realizados com objetivo de caracterizar a Elevação do Rio Grande foi uma expedição que ocorreu durante os dias 08/11/2011 e 17/11/2011 com o do navio oceanográfico Antares, da Marinha do Brasil. Nesta expedição, foram coletadas 16 amostras de água, das quais foram isoladas 138 tipos de bactérias pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada da UNIVALI (Silva, 2013). Uma das bactérias isoladas foi a *Erythrobacter citreus* LAMA 915, a qual estava a 3600 m de profundidade numa temperatura de 2,5 °C. *E. citreus* é descrito como microrganismo oligotrófico, resistente a temperatura acima de 30 °C e viável a pressão atmosférica (Denner *et al.*, 2002). Ensaio laboratoriais mostraram que essa bactéria apresenta alta atividade lipolítica, sendo facultativa a presença de íons Na para o seu cultivo (Silva, 2013). O objetivo desta dissertação é avaliar os genes presentes no genoma de *E. citreus* LAMA 915 que permitem ela suportar ambientes extremos, com as mais variadas temperaturas, pressão e fatores abióticos, utilizando uma das técnica de sequenciamento de genoma e análises comparativas. Pretende-se avaliar o potencial biotecnológico dessa bactéria e contribuir para um melhor entendimento da ecologia do ambiente marinho da Elevação do Rio Grande.

1.1 JUSTIFICATIVA

Devido às diferentes características ambientais que a *E. citreus* está adaptada a sobreviver (como escassez de nutrientes, alta pressão, variação de temperatura e salinidade), o genoma deve possuir genes que a permitam a adaptação deste organismo. Além disso, é conhecido o alto poder lipolítico desta bactéria e a produção de carotenoides, os quais possuem aplicação biotecnológica na indústria de alimentos, combustíveis e farmacêutica.

A linhagem *Erythrobacter citreus* LAMA 915 (Figura 3) foi isolada a partir de amostras de água coletada em 11/11/2011, durante o cruzeiro do navio Antares da Marinha do Brasil, próximo à elevação do Rio Grande à profundidade de 3600. Após o isolamento da colônia bacterina procedeu-se a identificação da espécie através da análise do gene 16S (Silva, 2013).

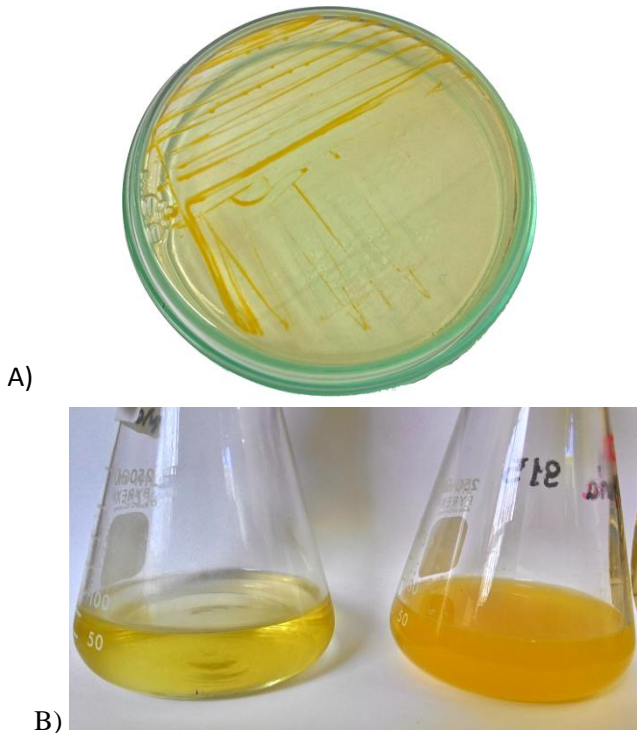


Figura 3 - A) Cultura de *E. citreus* LAMA 915 em meio sólido, B) cultura em meio líquido após 48 de incubação.

A despeito destas informações, não existem estudos genômicos de *E. citreus* que permitam conhecer os genes envolvidos na produção de lipases e carotenoides, tampouco os que permitem que este organismo suporte diferentes condições ambientais. Esse conhecimento ajudaria na compreensão de aspectos fisiológicos, tornando-a potencial agente biotecnológico nos processos acima descritos. Por isso, este trabalho objetiva conhecer o genoma de *E. citreus* LAMA 915 fim de verificar possíveis aplicações em processo industriais. A comparação do genoma de *E. citreus* LAMA 915 com as outras bactérias do gênero é essencial para o conhecimento das características do organismo. A anotação e classificação das proteínas destas espécies através de estudos de homologia são fundamentais para analisar seu potencial biotecnológico. O uso de ferramentas de bioinformática para estudo do potencial genético está sendo amplamente utilizado devido ao baixo custo quando comparados as técnicas tradicionais e devido ao poder de evidenciar características que podem ficar ocultas em métodos tradicionais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo geral prospectar genes de *Erythrobacter citreus* LAMA 915 com potencial biotecnológico.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Montar o genoma de *E. citreus* LAMA 915 .
- Identificar os genes do genoma de *E. citreus* LAMA 915 .
- Avaliar quais os genes de *E. citreus* LAMA 915 envolvidos na adaptação a pressão, salinidade e temperatura.
- Identificar no genoma de *E. citreus* LAMA 915 genes e vias metabólicas de interesse biotecnológico relacionados com produção de pigmentos, biopolímeros, lipases, biorremediação e degradação de fragmentos de lignina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 VARIÁVEIS AMBIENTAIS

A combinação de fatores abióticos como salinidade, temperatura, pressão/profundidade, oxigênio e nutrientes disponíveis (fonte de carbono ou de nitrogênio), constituem os principais fatores para a grande diversidade marinha de microrganismos e formação de ecossistemas distintos (Chester e Jickells, 2012; Silva, 2014). As adaptações desenvolvidas por microrganismos para suportar ambientes extremos, ocorrem através das mudanças estruturais presentes na membrana celular e nas enzimas. Entretanto, isto pode limitar e inviabilizar a sua sobrevivência fora destes ambientes (Kato *et al.*, 1998; Oger e Cario, 2013; Silva, 2014). Desse modo, alguns microrganismos desenvolveram a capacidade de perceber as condições ambientais e isso lhes permite adaptar seus estados fisiológicos e ampliar os possíveis ecossistemas habitáveis (López-López, Cerdán e González Siso, 2014; Sponga *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2015).

2.1.1 Fontes de carbono

Com exceção das fontes hidrotermais existentes no oceano profundo e ressuspensão do sedimento, quase todas as fontes de carbono que aportam no oceano profundo são provenientes da zona eufótica (Chester e Jickells, 2012; Sarmiento e Gruber, 2006). O aporte de nutrientes nos oceanos é realizado através das fontes fluviais, precipitação atmosférica, a produção primária oceânica proveniente de organismos fixadores de carbono (Chester e Jickells, 2012; Sarmiento e Gruber, 2006). As fontes de carbono, apesar de serem abundantes no planeta, possuem sua disponibilidade variável, de acordo com a forma na qual está armazenada (Silva, 2014).

A matéria orgânica está disponível basicamente de duas formas: dissolvida e particulada. A matéria orgânica dissolvida tem seu consumo associado às águas superficiais e pode ser dividida em três grupos: a fração super lábil, são compostos não estruturais e nem de reserva, como aminoácidos e carboidratos livres, os quais são consumidos dentro de uma hora e repostos pelos produtores primários. No segundo grupo, por sua vez, estão os compostos lábeis estruturais, como proteínas, ou de reserva, como os polissacarídeos, cujo tempo de consumo leva de quatro a sete dias. No último grupo estão os compostos recalcitrantes (Silva, 2014). A matéria orgânica particulada (MOP), por outro lado, atravessa

a coluna d'água verticalmente até aportar no sedimento. Durante este percurso, a MOP sofre influência do ciclo biogeoquímico, no qual organismos especializados secretam substâncias e/ou enzimas capaz de quebra-la, liberando matéria orgânica. O que não foi mineralizado será a base para as cadeias tróficas bênticas ou se tornará sedimento (Silva, 2014). Os microrganismos existentes nas regiões mais profundas possuem um metabolismo versátil capaz de se adaptar à heterogeneidade do tipo de matéria orgânica que pode aportar na sua camada d'água (Sugawara e Nikaido, 2011).

Outra grande fonte de carbono que aporta nos oceanos é a mistura de hidrocarbonetos existentes nos depósitos de petróleo. O aporte pode ser pelo do derramamento ou afloramento natural por falhas e poros existentes nos reservatórios subterrâneos (Manilla-Pérez *et al.*, 2010; Muyzer e Kraan, van der, 2008). Nesse caso, tem-se como exemplo algumas bactérias do gênero *Erythrobacter*, que são conhecidas por suas capacidades de degradar hidrocarbonetos (Widdel, Boetius e Rabus, 2014).

2.1.2 Fontes de nitrogênio

O nitrogênio está amplamente distribuído nos oceanos, e disponível em diversas formas como: nitrogênio livre, nitrito, nitrato, amônia e compostos orgânicos nitrogenados (Sarmiento e Gruber, 2006; Silva, 2014). O aporte de nitrogênio nos oceanos segue o mesmo padrão dos compostos orgânicos. Há uma elevada demanda por nitrato nas camadas superficiais devido ao consumo biológico (Silva, 2014), logo a concentração se reestabelece conforme a profundidade aumenta, estando isto relacionado com a precipitação da matéria particulada (Chester e Jickells, 2012).

As águas do oceano profundo possuem uma maior concentração de nitrato disponível quando comparado aos compostos orgânicos nitrogenados (Sugawara e Nikaido, 2011). Este fato está relacionado à preferência dada pelos organismos existentes ao longo da coluna d'água para assimilação de compostos nitrogenados, pois estes compostos são de rápida assimilação e utilização quando comparados com o nitrato (Sarmiento e Gruber, 2006; Silva, 2014). Portanto, assimilar o nitrato e utilizar como fonte de nitrogênio é uma estratégia adotada em ambientes oligotróficos (Sugawara e Nikaido, 2011).

2.1.3 Efeito da pressão osmótica

Os microrganismos halófilos são constantemente expostos ao *stress* osmótico e à toxicidade de íons específicos existentes neste meio ambiente (Yancey, 2005). Para lidar com a variação da concentração de soluto extracelular, os microrganismos halófilos desenvolveram alguns mecanismos celulares e/ou estratégias bioquímicas para sobreviver nestas condições extremas, o que resulta na mudança do estado e/ou a atividade celular, deslocamento, secreção, produção de enzimas e expressão de genes (Nath e Bharathi, 2011; Silva, 2014).

A característica básica dos microrganismos halófilos é possuir um mecanismo eficiente de transporte de íons sódio (Na) para o exterior da célula (Mesbah e Wiegel, 2012). Além desta, outras duas estratégias são amplamente utilizadas: a primeira é utilizada pela família Halobacteriaceae que acumula KCl em altas concentrações para balancear o Na presente no meio; a outra estratégia seria armazenar osmólitos (solutos orgânicos) como glicerol ou polihidroxibutirato (PHB), o que contribui para a estabilização celular, mantendo baixa a concentração de Na e equilibrando a pressão osmótica no interior da célula (Maderm, Ebel e Zaccari, 2000; Oren, 2011; Silva, 2014).

Ensaio realizado com o organismo de oceano profundo *Photobacterium profundum* mostrou que a variação de pressão e da concentração de NaCl resultou em acúmulo de β -hidroxibutirato (β -HB) e oligômeros compostos por unidade de β -HB. Isso sugere que o acúmulo de polihidroxibutirato é sensível à pressão e tem função osmótica (Martin, Bartlett e Roberts, 2002). Todavia, apesar de não estar elucidada a ação do β -HB sob efeito da pressão, as adaptações desenvolvidas por organismos para sobreviver à salinidade têm favorecido a sobrevivência em alta pressão, propondo que os mesmos osmólitos podem ajudar a proteger contra ambos *stress* (Kaye *et al.*, 2004; Kish *et al.*, 2012). Resultado semelhante foi observado em *Methylophilus marina* e *Methylophilus terricola* os quais são organismos halófilos moderados, que apresentaram acúmulo de PHB de até 40% do peso seco celular (Trotsenko, Doronina e Tourova, 2000).

Uma resposta secundária ao *stress* osmótico é a expressão de chaperonas com a função de envolver as enzimas para reduzir os efeitos da variação osmótica. Este fenômeno foi observado em *Haloarcula marismortui* e *Salinibacter ruber* quando cultivadas na condição de hiposalinidade resultando na produção da proteína P45 com atividade de chaperona, auxiliando no correto enovelamento da enzima halofílica

malato desidrogenase, reduzindo da taxa de desnaturação (Madern e Zaccari, 2004; Nath e Bharathi, 2011).

A resposta ao *stress* osmótico está além da osmorregulação. São necessários mecanismos para manter a integridade da célula, como o reparo da parede celular, viabilidade do material genético e estabilidade das proteínas (Mesbah e Wiegel, 2012; Nath e Bharathi, 2011). Neste sentido, tanto *Halobacillus dabanensis* quanto *Listeria monocytogenes*, quando expostas ao *stress* osmóticos, iniciam a super expressão de genes envolvidos no reparo geral da célula, como manutenção da membrana, do DNA e, por fim, ativação de chaperonas do tipo DnaK e DnaJ (Mota *et al.*, 2013; Nath e Bharathi, 2011).

2.1.4 Efeito da temperatura

A temperatura é um fator limitante ao crescimento microbiano e tem seus efeitos associados à desnaturação de proteínas, danos à membrana celular, instabilidade do DNA e fluidez da membrana (Peng e Jiao, 2010; Silva, 2014). Organismos termófilos (acima de 60 °C) possuem os mesmos tipos enzimas e vias metabólicas que os demais organismos, o que confere a eles resistência térmica é o maior número de subunidades e composição de aminoácidos da proteína e a presença de chaperonas que ajudam a manter a conformação das enzimas (Nath e Bharathi, 2011; Sugawara e Nikaido, 2011). Por outro lado, o efeito da baixa temperatura como limitante para o crescimento bacteriano, ainda não está completamente elucidado. No entanto, há indicações de que esteja relacionada com à redução da fluidez da membrana, o que resulta na diminuição do transporte de nutrientes e de força motriz de próton (Silva, 2014; Sugawara e Nikaido, 2011). Para isto, os organismos adaptados à baixa temperatura possuem uma maior concentração de lipídeos insaturados de cadeia curta em suas membranas (Margesin, Moertelmaier e Mair, 2013; Silva, 2014).

Os organismos marinhos estão sujeitos à mudança de temperatura tanto pela precipitação, através da coluna d'água e da movimentação das massas de água (Silva, 2013; Simonato *et al.*, 2006). Em resposta ao *stress* térmico sofrido pelo microrganismo são encontrados além do sistema genérico de reparo celular, outros dois tipos distintos de respostas. O primeiro tipo chama-se a CSP (*cold shock protein*) e responde à queda de temperatura; possui a função contornar os efeitos causados pelo decréscimo da temperatura e, proporcionalmente, a queda da taxa de difusão de compostos orgânicos, diminuição da disponibilidade de compostos hidrofóbicos, bem como a diminuição da

volatilidade e da solubilidade de muitos outros compostos e o aumento da viscosidade do meio. Sistemas de resposta ao frio (*cspA* e *cspD*), chaperonas (*DnaK*), lipase desaturase que promovem instauração dos lipídios e fosfolipídios de membrana, crioprotetores e produção de exopolissacarídeos (Poli, Anzelmo e Nicolaus, 2010; Zhang *et al.*, 2015). O segundo se chama HSP (*heat stress protein*), que por sua vez, é o tipo de resposta ao aumento da temperatura; geralmente está associada a expressão de chaperonas para envelopar proteínas como a *DnaK*(HSP70), *DnaJ*, *GroEL*(HSP60) e impedir a desnaturação e reparo do DNA (Nath e Bharathi, 2011; Sugawara e Nikaido, 2011). É importante ressaltar que as proteínas dessas classes são produzidas enquanto a condição de *stress* existir (Chen e Zhang, 2015; Nath e Bharathi, 2011)

2.1.5 Efeito da pressão Hidrostática

O efeito da pressão hidrostática sobre o equilíbrio do processo físico-químico é governado pela mudança do volume do processo, a pressão causa aumento do equilíbrio a favor do estado com menor volume (Boonyaratanakornkit, Park e Clark, 2002). O efeito sobre os microrganismos marinhos de profundidade, por sua vez, está relacionado com a estrutura da membrana celular, conformação da proteína e o ciclo celular (Silva, 2014; Yano *et al.*, 1998).

A variação da pressão altera o grau de compressão do soluto sobre a proteína (Eisenmenger e Reyes-De-Corcuera, 2009). Dependendo da construção da proteína a contração do soluto diminui a estabilidade das interações iônicas e das pontes de hidrogênio, provocando a sua desnaturação (Boonyaratanakornkit, Park e Clark, 2002). Entretanto em alguns casos a pressão hidrostática pode aumentar a atividade e/ou estabilidade de inúmeras enzimas (Abe e Horikoshi, 2001; Martins *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 1999). O sistema de resposta ao *stress* ativado pela mudança de pressão, está ligado diretamente à resposta ao *stress* osmótico, térmico, uma vez que os efeitos físico-químicos induzidos são semelhantes aos dos demais *stress* (Nath e Bharathi, 2011; Zhang *et al.*, 2015).

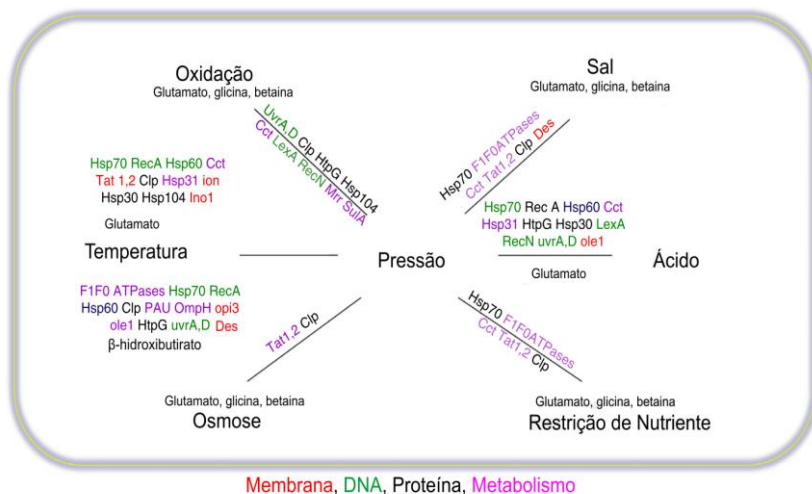
Os lipídios, em particular os fosfolipídios, são os principais constituintes da membrana celular, sendo estes mais sensíveis aos efeitos da pressão do que proteínas (Oger e Cario, 2013). Além disso, possuem uma relação direta com aumento da rigidez da membrana celular quando há aumento da pressão (Bartlett, 2002). A diferença entre a membrana celular dos organismos de profundidade para os demais

organismos está na composição lipídica, contendo uma maior concentração de lipídios insaturados ou poli-insaturados (Silva, 2014). Muitos organismos piezófilos são vulneráveis à baixa pressão, devido à fluidez adquirida pela membrana. Entretanto, outros organismos adaptam sua membrana através da expressão de lipase desaturase (Bartlett, 2002; Nath e Bharathi, 2011; Zhang *et al.*, 2015).

A influência da pressão sobre as enzimas depende do microrganismo e, também, da própria enzima. Os microrganismos piezófilos possuem tanto enzimas piezófilas quanto enzimas que são ativas independentemente da pressão. Enquanto que os piezotolerantes, além de enzimas ativas independentemente da pressão, podem possuir mais de uma cópia para o mesmo gene onde que os genes são expressos em faixas de pressões diferentes (Bartlett, 2002; Nath e Bharathi, 2011; Sun *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2015)

O mecanismo de resposta aos *stress* é complexo e altamente regulado por uma cascata de eventos desencadeada para realizar o reparo e proteção celular. As respostas podem ser cruzadas entre os tipos de *stress* e pode haver sinergia entre as respostas (Figura 4). Como exemplo, o CSP que está presente nos psicrófilos, é também ativa nos halófilos, possibilitando com isto, resistência tanto à baixa temperatura quanto salinidade.

Figura 4 - Relação entre as estratégias de sobrevivência aos extremos e resistência.



Fonte: (Zhang *et al.*, 2015)

2.2 GENES E VIAS METABÓLICAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

Os microrganismos adaptados a suportar altas pressões, baixa temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes, têm chamado atenção para os possíveis potenciais biotecnológicos devido às características intrínsecas deste ambiente (Jha e Zi-rong, 2004; Laurienzo, 2010; López-López, Cerdán e González Siso, 2014). Estes microrganismos são fontes de novos compostos, enzimas, e o próprio microrganismo como agente transformador (Blunt *et al.*, 2016; Carvalho, De e Fernandes, 2010; Nath e Bharathi, 2011; Silva, 2014).

Enzimas ativas à baixa temperatura resultam em processos biotecnológicos com uma menor demanda energética. Importantes para processos sensíveis à variação ou que ocorrem em baixa temperatura, como a indústria de alimentos ou biorremediação de solos ou água (López-López, Cerdán e González Siso, 2014; Silva, 2013).

2.2.1 Biorremediação

Devido às características ambientais do oceano profundo, tanto pelo aporte de nutrientes quanto pelo afloramento dos depósitos petrolíferos, diversos microrganismos desenvolveram a capacidade de metabolizar os alcanos constituintes de petróleo (Nie *et al.*, 2014). Os alcanos representam até 50% dos hidrocarbonetos existentes no petróleo, podendo ser usado como fonte de carbono, mas sendo geralmente convertidos em reservas de carbono (Sugawara e Nikaido, 2011). Membros dos gêneros *Alcanivorax* e *Marinobacter* utilizam os alcanos a fonte preferencial de carbono (Jurelevicius *et al.*, 2012; Manilla-Pérez *et al.*, 2010; Margesin, Moertelmaier e Mair, 2013).

A biodegradação de alcanos é fortemente influenciada por sua solubilidade no meio, que decresce, conforme sua massa molecular aumenta (Margesin, Moertelmaier e Mair, 2013; Nie *et al.*, 2014; Peixoto, Vermelho e Rosado, 2011). A sua presença reduz drasticamente a biodisponibilidade de compostos nitrogenados e fósforo, limitando com isto, a sua degradação por microrganismos (Sugawara e Nikaido, 2011). A degradação aeróbica em microrganismos ocorre através da ação de monoxigenases localizadas na membrana celular (Biebl e Wagner-Döbler, 2006), com potencial de metabolizar n-alcanos entre C8 e C16 e, em alguns casos, chegando a C32 (Beilen, van *et al.*, 2006; Nie *et al.*, 2014).

A bactéria *Alcanivorax borkumensis* é conhecida por metabolizar os alcanos até Acil-CoA (Kuhn, Bellicanta e Pellizari, 2009; Manilla-Pérez *et al.*, 2010). O Acil-CoA é utilizado para a produção de reservas de carbono, podendo ser, ceras, triacilgliceróis, ácidos graxos livres e poli-hidroxiclcanoatos (PHA) (Kuhn, Bellicanta e Pellizari, 2009; Manilla-Pérez *et al.*, 2010; Sabirova *et al.*, 2006).

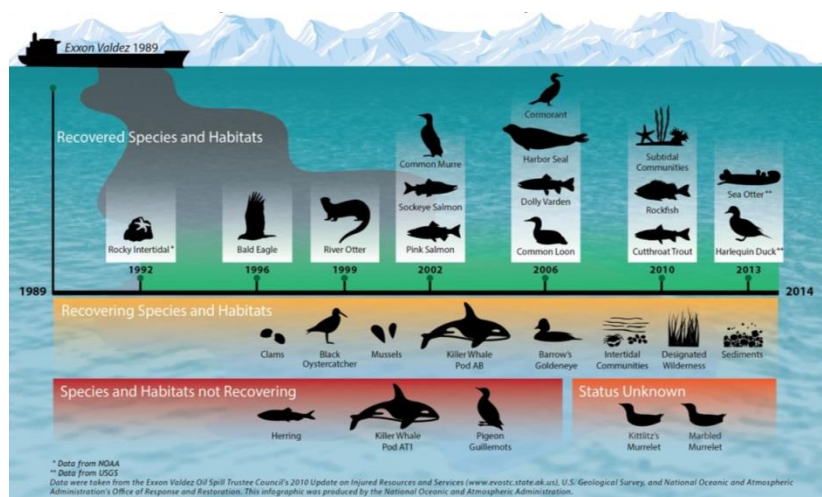
As enzimas *tesB* (Acil-CoA tioesterase 1) e a PHA sintase (*phaC*) em *A. borkumensis* são expressas na presença de alcanos no meio e competem pelo mesmo substrato (Sabirova *et al.*, 2006). O produto de ambas enzimas são depositados externamente a célula externamente, com a função de reserva de carbono e emulsificar o meio com isto, solubilizando os alcanos (Manilla-Pérez *et al.*, 2010; Sabirova *et al.*, 2006).

A habilidade de sobreviver e de degradar hidrocarbonetos torna estes microrganismos potenciais agentes de biorremediação na recuperação de ambientes impactados por derramamento de petróleo (Rojo, 2009), também produtores de surfactantes para a emulsificação dos hidrocarbonetos (Widdel, Boetius e Rabus, 2014), pois os

biossurfactantes, além de aumentar taxa de assimilação de alcanos, também possuem a capacidade de sequestrar compostos tóxicos e servir de estoque de energia (Manilla-Pérez *et al.*, 2010; Rojo, 2009).

Por fim, um dos maiores vazamentos da história, foi o de 11 milhões de litros de petróleo, provocado pelo navio tanque Exxon Valdez, no Alasca e, passados 26 anos o ambiente ainda não se recuperou do impacto ambiental provocado (Figura 5) (Sharma, 2010; Venosa e Zhu, 2003). Quando possível o uso de microrganismos para degradação de petróleo ou uso de biossurfactantes produzidos por estes organismos para facilitar a recuperação do óleo, são estratégias geralmente não tóxicas ao meio ambiente e aceleram o processo de recuperação ambiental (Manilla-Pérez *et al.*, 2010; Sharma, 2010; Sugawara e Nikaido, 2011).

Figura 5 - Infográfico sobre o derramamento de petróleo provocado pelo navio tanque Exxon Valdez no Alasca



Fonte: <http://oceanservice.noaa.gov/podcast/mar14/mw122-exxonvaldez.html>

2.2.2 Biopolímeros

Dentre os possíveis polímeros de reserva de carbono produzidos por procaríotos, os mais comuns são o glicogênio e os polihidroxialcanoatos (PHA). O PHA é uma família de biopolímeros que possui propriedades semelhantes ao plástico produzido através de

derivados de petróleo, dependendo da cadeia molecular possui característica de termoplástico ou de elastômero (Rehm e Steinbüchel, 1999). Algumas das vantagens dos PHA é que são compostos renováveis e biodegradação. Sendo que em ambientes aeróbios, a degradação do PHA até gás carbônico pode levar 60 semanas e, em contrapartida, em ambiente anaeróbio este tempo é reduzido para 6 semanas (CARMINATTI et al., 2006).

O PHA é comumente observado em procariotos formando grânulos de reserva interno, mas alguns procariotos podem secretar o PHA o que facilita sua recuperação por não precisar romper a parede celular para obter o PHA (Salgaonkar e Bragança, 2015; Silva, 2014).

A principal rota metabólica de síntese do PHA é mediada por 3 genes, sendo eles: o *phaA*, *phaB* e *phaC*, a partir da condensação de duas moléculas acetil-CoA (MADISON e HUISMAN, 1999). Em organismos produtores de PHA é comum encontrar estes genes agrupados no *operon* *phaCAB* (Rehm e Steinbüchel, 1999). Entretanto, essa não é uma regra geral, pois os genes podem estar separados, como exemplo: a bactéria *Alcanivorax borkumensis* possui em seu genoma uma segunda cópia da *phaC* fora do *operon*, mas associada com o gene *TesB* (Acil-CoA tioesterase 1) (Manilla-Pérez et al., 2010; Sabirova et al., 2006).

2.2.3 Pigmentos Carotenoides

Carotenoide é uma classe de biomoléculas, pertencente à família do terpenóides, possuindo mais de 600 tipos já caracterizados, com coloração do amarelo até o vermelho, sendo produzidos por animais, plantas, algas e microrganismos. As funções dos carotenoides estão relacionadas com a prevenção da oxidação através de seu poder antioxidante (Sugawara e Nikaido, 2011). Os terpenóides constituem a maior família de produtos naturais composta por mais de 40.000 estruturas, promovendo sabor, cheiro e cor a muitos organismos. A via metabólica central dos terpenóides é composta pelas rotas do mevalonato e pela rota MEP/DXOP do não mevalonato (Tong, 2013).

Dentre as diversas funções biológicas conhecidas dos carotenoides estão a prevenção de certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares e melhora no sistema imunológico como um todo (Blunt et al., 2014). Estudos realizados sobre a ingestão diária de alimentos suplementados com carotenoides, indicam que estes compostos promovem melhoras na resposta do sistema imunológico sobre doenças degenerativas e a reações da radiação ultravioleta (Bone

et al., 2003; González et al., 2003; Granado et al., 2003). Os carotenoides são utilizados amplamente na indústria de alimentos como corante visando repor, promover e realçar as cores dos alimentos (Bigliardi e Galati, 2013; Sáiz-Abajo *et al.*, 2013).

O β -caroteno é o mais conhecido dentre os carotenos e sendo responsável por mais de 70% da ingestão de Vitamina A, devido a sua atividade pró-vitáminica. E o consumo regular, auxilia na prevenção do foto-envelhecimento da pele e as queimaduras de sol. O licopeno é um pigmento de coloração avermelhada, é o principal carotenoide de frutas como tomate e melancia e possuindo um papel importante, devido a proteção de doenças cardiovasculares e degenerativas, câncer de próstata, estômago e pulmão. A zeaxantina, têm uma maior ação na prevenção da degeneração macular relacionadas a idade. Entretanto o fitoeno é um carotenoide incolor, presente em folhas e frutos verdes (Ambrósio, Campos e Faro, 2006; Britton, Liaaen-Jensen e Pfander, 2012; Fraser e Bramley, 2004; Lima e Vianello, 2013).

2.2.4 Compostos Aromáticos

Os hidrocarbonetos aromáticos como fenóis e benzoatos, são tóxicos a diversos organismos. São encontrados como de parte constituinte do petróleo. Organismos como *Sphingomonas paucimobilis* e *Comamonas testosteroni* desenvolveram a capacidade de metabolizar distintos compostos aromáticos. A degradação utiliza enzimas específicas para cada tipo de composto aromático e é realizada a partir da clivagem inicial do anel aromático. Após a clivagem inicial, a degradação pode seguir distintos caminhos como a via de degradação das catecolaminas ou do protocatecuato PCA.

A rota do protocatecuato PCA está entre vias de degradação de compostos aromáticos, dentre eles fragmentos de lignina, vanilato, hidroxibenzoatos, benzeno, fenóis e hidrocarbonetos aromáticos de petróleo (Hara *et al.*, 2003; Margesin, Moertelmaier e Mair, 2013; Ni *et al.*, 2013; Sonoki *et al.*, 2014). A metabolização é realizada com auxílio dioxigenases através da clivagem do anel aromático e a rota é chamada de PCA45 quando a clivagem ocorre na posição meta 4,5 (Johnson e Beckham, 2015; Kamimura, Takamura, *et al.*, 2010). Em *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 e *Comamonas testosteroni* BR6020 a metabolização ocorre através da PCA45, mas a organização dos genes dentro destes genomas é diferente e formando dois padrões de agrupamentos (Kamimura, Aoyama, *et al.*, 2010; Kamimura, Takamura, *et al.*, 2010; Ni *et al.*, 2013). Os compostos intermediários gerados

através da rota PCA são compostos que podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de biopolímeros, tais como adesivos (Bugg e Rahmanpour, 2015; Kamimura, Takamura, *et al.*, 2010). Apesar da metabolização da lignina ter como destino principal o fornecimento de piruvato e oxaloacetato para a célula (Hara *et al.*, 2003), organismos como *Rhodococcus jostii* RHA1, *Pseudomonas fluorescens*, *Amycolatopsis* sp. e *Streptomyces coelicolor*, dentre outros, acumulam compostos intermediários que são precursores da síntese de vanilina (baunilha sintética) e ácido ferúlico utilizado na indústria alimentícia (Bugg e Rahmanpour, 2015).

Devido à robustez das enzimas provenientes de microrganismos marinhos, estes são potenciais fornecedores de enzimas para a indústria de papel e celulose na degradação dos fragmentos de lignina, bem como no tratamento de efluentes de industriais por conter elevada salinidade e matérias primas à produção de resinas, plásticos e combustíveis (Johnson e Beckham, 2015; Picart *et al.*, 2014; Ragauskas *et al.*, 2014).

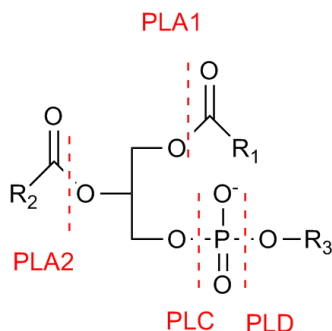
2.2.5 Lipases e Fosfolipases

Lipases são enzimas que estão envolvidas no metabolismo de lipídios, são amplamente distribuídas na natureza e podem ser isoladas de animais, vegetais e microrganismos (Eisenmenger e Reyes-De-Corcuera, 2009). Atuam na hidrólise de óleos e gorduras formando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (Cesarini *et al.*, 2014; Eisenmenger e Reyes-De-Corcuera, 2009). Desse modo são de interesse biotecnológico, pois clivam os mais diversos tipos de lipídeos e ésteres, que por sua vez, são utilizados nas indústrias de transformação de alimentos, medicamentos, cosméticos e biocombustíveis (Cesarini *et al.*, 2014; Jha e Zi-rong, 2004; Zhang e Kim, 2010). As enzimas lipolíticas produzidas por organismos psicrófilos, têm apresentado novas oportunidades de uso devido a alta atividade enzimática ou especificidade em baixas temperaturas, tendo seu uso em reações de biocatalíticas para transformação de compostos sensíveis ao aquecimento. Outras características de lipases provenientes de organismo extremófilos são a tolerância aos sais e estabilidade em solventes orgânicos (López-López, Cerdán e González Siso, 2014; Pascale, De *et al.*, 2008).

Fosfolipase é um importante grupo de enzimas que hidrolisam fosfolipídios e podem ser subdivididas em 5 grupos, fosfolipase A1 (PLA₁), fosfolipase A2 (PLA₂), fosfolipase C (PLC), fosfolipase D (PLD). A fosfolipase B (PLB) exerce função tanto de PLA₁ quanto de

PLA₂ (Casado *et al.*, 2012). Cada tipo de enzima deste grupo é responsável por hidrolisar uma determinada posição do fosfolipídio, conforme apresentado na Figura 6. A ação das fosfolipases sobre o substrato pode formar uma variedade de produtos, mas a ação de todas as fosfolipases sobre o mesmo substrato produz dois ácidos graxos livres, diacilglicerol, fosfato e um éster (Maria, De *et al.*, 2007).

Figura 6 – Local de clivagem das enzimas PLA₁, PLA₂, PLC e PLD, sobre o fosfolipídio. Sítios de ação das fosfolipases. R1 e R2 referem-se aos ácidos graxos nas posições C1 e C2 dos fosfolipídios numerados estereoespecificamente. As ligações hidrolisadas por outras fosfolipases, denominadas de acordo com suas especificidades, também estão indicadas (Adaptado de SELISTRE-DE-ARAÚJO; de SOUZA, 2007).



A produção de biodiesel a partir de óleos vegetais, tais como óleo de soja, canola e girassol é uma das áreas de interesse biotecnológico para aplicação das lipases. A transesterificação enzimática de triacilgliceróis para produção de biodiesel possui algumas vantagens em relação ao processo de transesterificação alcalina como: maior rendimento, maior tolerância à água e ausência de reação paralela. Entretanto, quando comparado com o processo alcalino, os processos enzimáticos para a produção de biodiesel ainda apresentam custos elevados, os quais estão ligados à fixação da lipase ou reposição de enzimas no processo (Cesarini *et al.*, 2014). Todavia o óleo não refinado possui impurezas como os fosfolipídios que correspondem entre 2 e 3% do volume total e persistem após a transesterificação, causando problemas para o estoque do biodiesel, pois forma uma borra nos reservatórios, acumulam água e a concentração de fósforo ultrapassa o limite legal de 10 ppm. Porém um estudo demonstrou recentemente o aumento da produtividade e redução do custo de produção de biodiesel,

a partir do óleo vegetal não refinado. A estratégia consistiu em fazer uma mistura de lipase com as fosfolipases, PLA₁, PLA₂ e PLC. A hidrólise dos fosfolipídios é realizada pelas PLA₁ e PLA₂ formando ácido graxo livre e glicerol fosfato, permitindo o aumento da produção em torno de 2,5%. Além disso, formaram-se duas fases devido à alta polaridade do glicerol-fosfato e conseqüente concentração do fosfato na fase do glicerol-fosfato e mantendo o fósforo abaixo do limite legal (Cesarini *et al.*, 2014).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ORGANISMO, EXTRAÇÃO DO DNA E SEQUENCIAMENTO

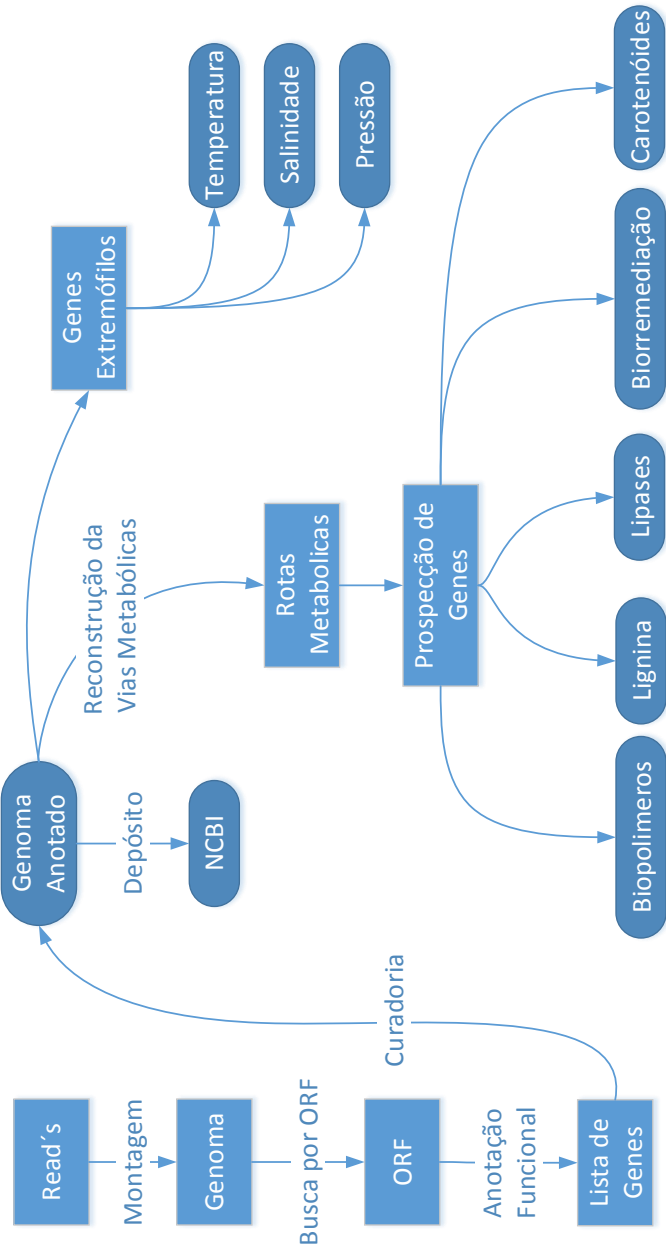
A linhagem *Erythrobacter citreus* LAMA 915 foi isolada a partir de amostras de água coletada em 11/11/2011, durante o cruzeiro do navio Antares da Marinha do Brasil, próximo à elevação do Rio Grande à profundidade de 3600. Após o isolamento da colônia bacterina procedeu-se a identificação da espécie através da análise do gene 16S (Silva, 2013).

Para extração do DNA, cultivou-se a *E. citreus* LAMA 915 por 48 horas em meio marinho e o seu material genômico foi extraído com o DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Com esta metodologia, obteve-se 5,26 µg de DNA e proporção de pureza na ordem 1,85.

O sequenciamento do DNA de *E. citreus* LAMA 915 foi realizado pela empresa Macrogen (Seoul, Korea) utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2000 System (Paired-End 100bp) *pcr free*, produzindo um total de 16.781.394 *reads*.

Esta etapa foi realizada por (Silva, 2013) e portanto a descrição detalhada não faz parte do escopo dessa dissertação. A partir dos dados obtidos, seguiu-se as análises descritas a seguir e cujo fluxograma geral é apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Diagrama simplificado contendo as etapas abordadas no presente estudo.



3.2 MONTAGEM *Denovo*

Com as leituras geradas pelo sequenciamento, foi feita a remoção das *reads* de baixa qualidade através da ferramenta *SeqyClean* 1.5.2 (Zhbannikov, Hunter e Settles, 2013). Para isto, escolheu-se *score* de qualidade 24 e tamanho mínimo do fragmento de 70 pb.

Para realizar a montagem do genoma da bactéria foi utilizado o *software* montador de genomas *Velvet* – versão 1.2.10 (Zerbino e Birney, 2008) – com o comprimento do inserto foi definido em 500 pb e cobertura esperada de 400 vezes, conforme o padrão dos dados gerados pelo sequenciamento. Para uso do *software Velvet*, foram testados diferentes valores do parâmetro *k-mer*(tamanho do fragmento das leituras) variando entre 49 e 95, tendo sido escolhido o valor de *k-mer* 81 para a montagem final. Este conjunto de parâmetros gerou *contigs* mais longos e em menor quantidade sendo então o padrão adotado para a montagem final.

3.3 ANOTAÇÃO DO GENOMA

A partir do genoma montado foi realizada a predição de ORF / anotação gênica utilizando o *software RAST* – versão 1.5 (Aziz *et al.*, 2008). Em seguida, o arquivo contendo as ORF preditas pelo RAST foi confrontado contra o banco de dados “nr” do NCBI através da ferramenta *BLASTp* com *k-mer* de 6 e matriz de substituição BLOSUM-62, o GAP 11/1, *e-value* 10^{-6} e identidade 60% gerando a segunda anotação.

Para verificar as rotas metabólicas existentes, as ORF foram confrontadas contra o banco de dados do KEGG através da ferramenta *BLASTp* com matriz de substituição BLOSUM-62 e de identidade 60%.

Os resultados gerados para as anotações do *RAST*, NCBI/nr e KEGG foram combinados em uma única tabela. As ORF que apresentaram mais de uma anotação tiveram redundância removida, permanecendo a anotação que melhor representava o gene, com prioridade das seguintes informações: nome do gene, função biológica e reação química.

3.4 CURADORIA MANUAL

A curadoria manual foi realizada com o auxílio do *software* visualizador de genomas *Artemis* versão 16, utilizado para analisar

visualmente a disposição dos genes anotados no genoma de *E. citreus* LAMA 915 . Quando necessário, deslocou-se o códon de início e fim para posições mais apropriadas (Rutherford *et al.*, 2000).

A fim de garantir a qualidade da anotação, ORF com anotação inconclusiva ou que remetesse a genes pouco comuns em bactérias, foram submetidas a busca por similaridade nos bancos de dados de domínios conservados do NCBI ou *InterProScan* (Jones *et al.*, 2014; Marchler-Bauer *et al.*, 2015). ORF que não foram preditas pela anotação automática ou não apresentaram similaridade com outras proteínas foram consideradas como proteínas hipotéticas.

3.5 GENES DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

Para construção do mapa das vias metabólicas, foram utilizados os resultados da curadoria como o número EC (*Enzyme Commission*), KO (KEGG Orthology), nome do gene e, quando necessário, um *BLASTp* da sequência na base de dados KEGG. Foram selecionadas somente as rotas que continham todos os genes necessários para o seu funcionamento.

Para a caracterização das possíveis rotas metabólicas/genes com potencial biotecnológico industrial ou biorremediação, foram selecionadas e curadas manualmente as vias que foram classificadas pelo KEGG como vias envolvidas na metabolização de lipídeos, fragmentos de lignina e alcanos, bem como vias de síntese de biopolímeros e pigmentos.

3.6 CAPACIDADE ADAPTATIVA

Com objetivo de estudar a capacidade adaptativa de *E. citreus* LAMA 915 foram selecionadas e curadas manualmente os genes que foram classificados pelo KEGG envolvidos com resposta ambiental relacionada à pressão, salinidade, temperatura.

3.7 DEPÓSITO DO GENOMA E ORF NO NCBI

O genoma e os genes anotados foram depositados em 13/02/2015 no banco de dados do GenBank no NCBI (publicados em 05/08/2015) sob o nome *Erythrobacter citreus* LAMA 915, número BioProject PRJNA193448 e endereço eletrônico <http://www.NCBI.nlm.nih.gov/bioproject/193448>.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA

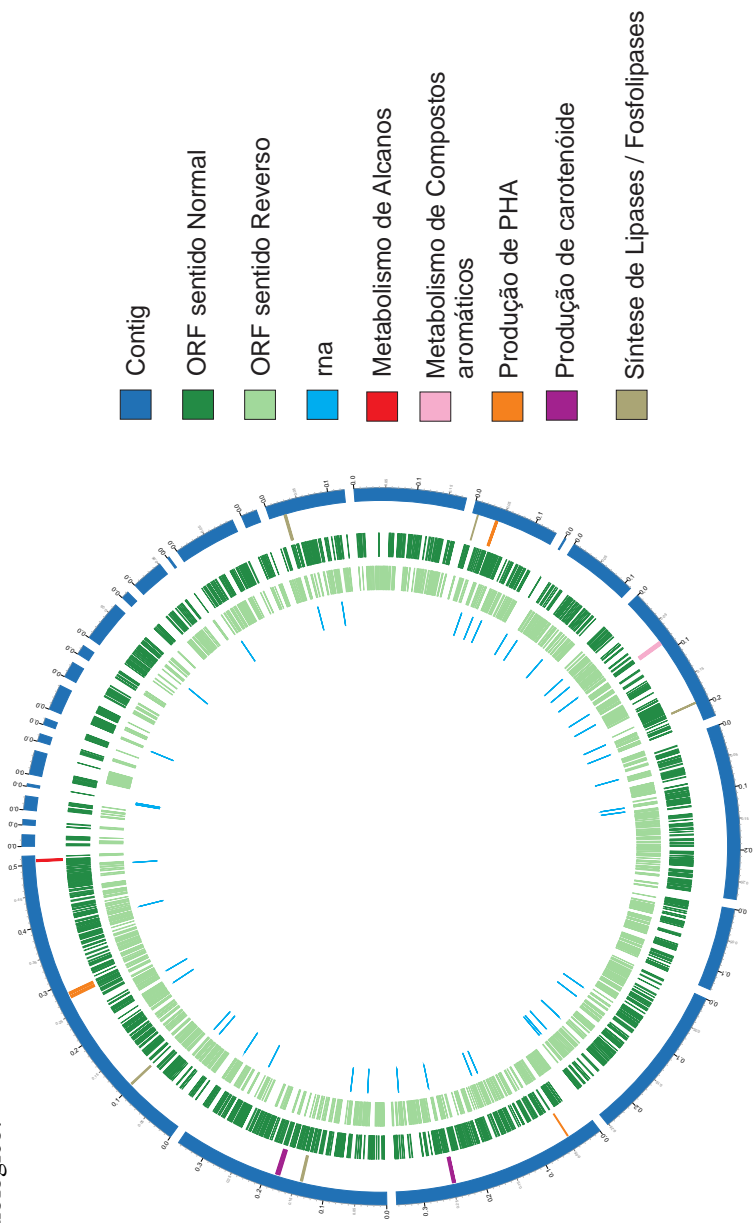
Foram descartados 3,02% das *reads* que não atenderam o filtro de qualidade estabelecido e identificou-se que 14,7% das *reads* não estavam pareadas. As *reads* restantes permitiram a montagem do genoma de 3,09 Mbp, contendo 64% de conteúdo G/C o que condiz com o esperado para o gênero *Erythrobacter* (Widdel, Boetius e Rabus, 2014). Um total de 28 *contigs* sendo o maior *contig* de 514.723 bp (Figura 8). A descoberta por regiões codificantes permitiu mapear 2959 ORF cobrindo 88% do genoma, das quais 46 eram tRNAs e 2395 ORF apresentaram função predita. Inicialmente, RAST e NCBI/nr geraram 771 e 840 regiões hipotéticas, respectivamente. Entretanto, através do cruzamento resultados gerados por ambas estratégias, apenas 518 ORF não tiveram sua função determinada.

4.2 RESULTADOS GERAIS

Embora tenha sido descrita como um organismo não móvel (Denner *et al.*, 2002), o genoma de *E. citreus* LAMA 915 apresentou todos o genes necessários para a síntese do motor flagelar e da construção do flagelo. Esse dado foi validado experimentalmente através da confecção de uma lâmina histológica e observação microscópica. Os motivos dessa motilidade não ter sido relatada anteriormente podem estar relacionados às condições de cultivo, que inibiram o funcionamento ou construção do flagelo, ou às linhagens diferirem quanto a esta capacidade (Eloe *et al.*, 2008).

Os genes encontrados (Anexo A) corroboram dados da literatura no que diz respeito a capacidade oligotrófica facultativa de *E. citreus* LAMA 915 . Compostos lábeis (tais como glicose e lipídios), bem como compostos de difícil assimilação (como fragmentos de lignina, alcanos e PHA) podem ser utilizados no metabolismo de *E. citreus* LAMA 915 . Desse modo, os genes encontrados estão relacionados com a capacidade metabólica de *E. citreus* LAMA 915 em adaptar-se à ambientes onde a disponibilidade de carbono é variável, bem como distintas profundidades

Figura 8 - Vista geral do genoma: Contendo os contigs, regiões codificante e localização das regiões de interesse biotecnológico.



Quanto ao metabolismo do nitrogênio, foi possível identificar uma diversidade de genes que confere a *E. citreus* LAMA 915 certa versatilidade na capacidade de utilização de diferentes fontes desse nutriente. No genoma de *E. citreus* LAMA 915 foram encontrados genes de assimilação de compostos orgânicos nitrogenados, via metabólica de assimilação e incorporação de nitrato, bem como rotas para a síntese dos 20 aminoácidos essenciais (Anexo B). Esta capacidade facilita o cultivo de *E. citreus* LAMA 915, uma vez que possui capacidade de crescimento em meios de cultura controlado (com baixa complexidade na composição nutricional do meio), reduzindo custos para a indústria.

A Tabela 1, apresenta um comparativo sobre o que já se conhecia de *E. citreus* LAMA 915 com base nos dados fenotípicos descritos na literatura e o que foi encontrado como base na análise das evidências genômicas, chamando a atenção para as possíveis rotas de degradação de alcano, fragmentos de lignina, produção de lipases e PHA. Estas rotas serão melhor exploradas nos capítulos que seguem.

Tabela 1 - Comparação da características descritas e as evidências genômicas encontradas no genoma de *E. citreus* LAMA 915

Característica	Evidências fenotípicas	Evidências genômicas
Atividade lipolítica	(Silva, 2013)	encontrado
Stress osmótico	(Denner <i>et al.</i> , 2002)	encontrado
Variação de temperatura	(Denner <i>et al.</i> , 2002; Silva, 2013)	encontrado
Variação de pressão	(Denner <i>et al.</i> , 2002; Silva, 2013)	encontrado
Redução de Nitrato	(Denner <i>et al.</i> , 2002)	encontrado
d-Glucose	(Denner <i>et al.</i> , 2002)	encontrado
Propionato	(Denner <i>et al.</i> , 2002)	encontrado
cis-Aconitato	(Denner <i>et al.</i> , 2002)	encontrado
trans-Aconitato	(Denner <i>et al.</i> , 2002)	encontrado
dl-3-Hidroxi butirato	(Denner <i>et al.</i> , 2002)	encontrado
l-Aspartato	(Denner <i>et al.</i> , 2002)	encontrado
l-Prolina	(Denner <i>et al.</i> , 2002)	encontrado
Carotenoide	(Denner <i>et al.</i> , 2002)	encontrado
Produção PHA	Não reportado	encontrado
Degradação de Lignina	Não reportado	encontrado
Degradação de alcano	Não reportado	encontrado

É importante ressaltar que o potencial de produção de PHA, e de degradação de lignina e alcanos, constituem novidades trazidas por esse trabalho e, embora ainda não tenham sido validadas experimentalmente,

possuem interesse biotecnológico e por isso serão melhor exploradas nos tópicos que se seguem.

4.3 RESPOSTA AMBIENTAL

Foram encontrados genes de resistência a *stress* térmico (CSP e HSP) (Tabela 2). As ORF 1198, 1962 e 1125 codificam genes que são expressos durante a condição de baixa temperatura (Nath e Bharathi, 2011). As ORF 1401, 2757 e 10 codificam ácido graxo desaturase, enzima expressa à baixa temperatura, envolvida na manutenção da fluidez da membrana celular de bactérias tais como *Desulfotales psychrophila* e *Colwellia psychrerythraea* 34H (Nath e Bharathi, 2011). A ORF 29, por sua vez, é uma chaperona do tipo Dnak que auxilia na estabilização de proteínas da bactéria *Shewanella oneidensis* (Nath e Bharathi, 2011; Sugawara e Nikaido, 2011). Além destes, outros genes que não participam diretamente da resistência ao *stress* a baixas temperaturas, e sim aos demais *stress* suportados por *E. citreus* LAMA 915, podem auxiliar nessa termorresistência.

Os genes *groes*, *dnaj*, *dnak*, *grpe*, *groel* e *hsp33* encontrados no genoma, possuem a função de chaperona e têm como objetivo manter a conformação do DNA e proteínas, tendo sua expressão associada com aumento da temperatura (Nath e Bharathi, 2011; Sugawara e Nikaido, 2011; Zhang *et al.*, 2015). A ORF 35 codifica o gene *hrca*, que regula a expressão de chaperonas envolvidas no choque térmico de *Chlamydia trachomatis* (Hanson e Tan, 2015). A ORF 1314, por sua vez, está associada na reciclagem da unidade 50S do ribossomo, mantendo a capacidade transcricional (Simonato *et al.*, 2006; Sugawara e Nikaido, 2011). Os genes de resposta ao *stress* térmico encontrados em *E. citreus* LAMA 915, auxiliam na capacidade adaptativa de sobreviver a variação de temperatura. Temperaturas estas que variam de 2,5°C (Silva, 2013) até 37°C (Denner *et al.*, 2002).

Tabela 2 – Orf's que conferem resistência e reposta a queda da temperatura. CSP resistencia à queda temperatura e HSP resistencia ao aumento da temperatura.

Contig	Orf	Nome Proteína / Gene	Tipo estres
13	1198	<i>cspg</i>	CSP
21	1962	<i>csp</i>	CSP
12	1125	<i>cspa</i>	CSP
13	1401	Ácido graxo desaturase	CSP
25	2757	Ácido graxo desaturase, tipo 2	CSP
1	10	Ácido graxo desaturase	CSP
1	29	<i>dnak</i>	CSP / HSP
1	228	<i>groes</i>	CSP / HSP
1	229	<i>groel</i>	CSP / HSP
1	230	16 kDa HSP	HSP
8	854	<i>dnaj</i>	HSP
13	1195	<i>hsp33</i> chaperonina	HSP
13	1232	<i>dnaj</i>	HSP
22	2329	16 kDa hsp	HSP
13	1283	<i>dnaj</i>	HSP
13	1314	hsp associada na reciclagem da unidade 50S do ribossomo	HSP
13	1629	<i>groel I</i>	CSP / HSP
13	1630	<i>groes</i>	CSP / HSP
1	28	<i>dnaj</i>	HSP
1	34	<i>grpe</i>	HSP
1	35	Regulador da transcrição tipo <i>hrca</i>	HSP

Quanto às variações na pressão osmótica, em *E. citreus* LAMA 915 foram identificados 11 genes capazes de responder a este *stress* (Tabela 3). As ORF 137, 47, 1573 e 2070 são genes expressos em condição de *stress* osmótico porém não apresentam função conhecida (Bartlett, 2002; Zhang *et al.*, 2015). Foram também encontrados genes que auxiliam na osmorregulação através do transporte transmembrana de íons de Na em *Escherichia coli* – ORF 1717, 651 1238, 1090 e 762 (Sugawara e Nikaido, 2011; Zajc *et al.*, 2014).

Trabalhos anteriores reportam variações na concentração de íons Na em diferentes profundidades e localidades (Chester e Jickells, 2012), sendo devido à movimentação natural das massas de água (Sarmiento e Gruber, 2006). Assim, os genes estudados que conferem resistência a variação da pressão osmótica corroboram os achados de *E. citreus* LAMA 915 em diferentes profundidades (3600 m e 40 m) onde há possibilidade de existir variações na concentração iônica.

Tabela 3 – Orf’s que conferem resistência e reposta *stress* osmótico

Contig	ORF	Nome Proteína / Gene
1	137	Osmp Proteína extracelular osmo regulada
1	47	Osmp Proteína extracelular osmo regulada
13	1573	Osmp Proteína extracelular osmo regulada
21	2070	Osmp Proteína extracelular osmo regulada
14	1717	NhaA Bomba de cátion Na ⁺ /H ⁺
8	651	NhaA Bomba de cátion Na ⁺ /H ⁺
13	1238	NhaA Bomba de cátion Na ⁺ /H ⁺
12	1090	NhaA Bomba de cátion Na ⁺ /H ⁺
8	762	Bomba de Sódio/Alanina
1	17	Família de proteínas de resposta ao <i>stress</i>
18	1886	<i>dnak</i>

Os genes da lipídio desaturase, *dnak*, *dnaj*, *groel*, *cspa* (Tabela 4), que foram identificados no genoma de *E. citreus* LAMA 915 promovem resistência ao aumento da pressão hidrostática em diferentes organismos, tais como *Shewanella piezotolerans* e *P. profundum* (Nath e Bharathi, 2011; Sugawara e Nikaido, 2011; Zhang *et al.*, 2015). Como o aumento da pressão hidrostática ocasiona diminuição da fluidez da membrana plasmática (Nath e Bharathi, 2011) e alterações no enovelamento proteico (Sugawara e Nikaido, 2011), os genes encontrados em *E. citreus* LAMA 915 permitem aclimação que independe da profundidade.

Tabela 4 – Orf’s que conferem resistência à variação da pressão hidrostática

Contig	ORF	Nome da Proteína / Gene
12	1125	<i>cpsa</i>
13	1401	Ácido graxo desaturase
25	2757	Ácido graxo desaturase, tipo 2
1	10	Ácido graxo desaturase
13	1629	<i>groel I</i>
1	28	<i>dnaj</i>
1	29	<i>dnak</i>

A resposta aos *stress* ambientais estão ligados a uma complexa rede regulatória e é conhecido o envolvimento de genes em mais de um tipo de reposta ambiental (Nath e Bharathi, 2011). Isso ocorre, por exemplo com as chaperonas *dnaj*, *dnak* que foram encontradas no

genoma da *E. citreus* LAMA 915, estão envolvidas na resistência à variações da pressão osmótica, pressão hidrostática, *stress* iônico e aos extremos de temperatura (Sugawara e Nikaido, 2011).

A ORF 1125 que expressa uma *cspa* está envolvida na resistência tanto a baixas temperaturas quanto ao *stress* osmótico (Nath e Bharathi, 2011; Simonato *et al.*, 2006). Os canais de Na⁺/H⁺ (bomba de cátion) estudadas no genoma da *E. citreus* LAMA 915 conferem resistência ao *stress* osmótico e alcalino (Bartlett, 2002; Nath e Bharathi, 2011; Sugawara e Nikaido, 2011).

Somente em piezófilos foi reportada a indução simultânea de CSP e HSP, promovendo sua adaptação a diferentes pressões hidrostáticas (Kato e Qureshi, 1999; Nath e Bharathi, 2011; Zhang *et al.*, 2015). Os genes de *E. citreus* LAMA 915 que estão relacionados à resistência a diferentes *stress* podem agir sinergicamente, uma vez que esses atuam em pontos-chave do metabolismo celular e embora causem danos distintos, apresentam resposta semelhante (exemplo: alteração da conformação proteica causada pelos *stress* bórico, osmótico e térmico). Assim, essa sinergia permite a *E. citreus* LAMA 915, a capacidade de sobreviver a diferentes profundidades (entre 0 até 3600 m), ser facultativa quanto à presença de Na no meio, e suportar temperaturas ente 2,5°C e 37°C.

4.4 GENES E VIAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Foram encontrados genes de potencial biotecnológico no genoma de *E. citreus* LAMA 915, os quais estão relacionados à síntese e/ou degradação de PHA, carotenoides, fragmentos de lignina e alcanos. Além disso, diversas lipases e fosfolipases com potencial biotecnológico.

4.4.1 Degradação de Alcanos (Biorremediação)

Genes envolvidos com a rota de degradação de alcanos foram encontrados em *E. citreus* LAMA 915 (Tabela 5) e já foi reportado que membros da família Erythrobacteraceae são agentes de biorremediação por possuírem a capacidade de degradar hidrocarbonetos provenientes de derramamento de petróleo (Widdel, Boetius e Rabus, 2014).

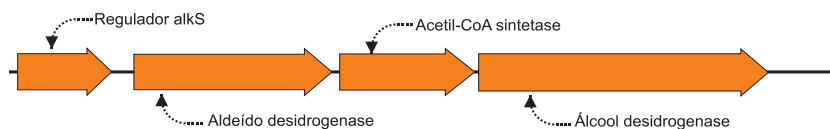
Tabela 5 - Genes envolvidos na degradação de alcanos.

Contig	ORF	Gene	Nome	Número EC
10	1006	<i>ad</i>	Álcool desidrogenase	EC 1. 1. 1. 1
8	750	<i>bvm</i>	Monoxigenases (família)	
2	316	<i>ad</i>	Álcool desidrogenase	EC 1. 1. 1. 1
22	2143	<i>ad</i>	Álcool desidrogenase	EC 1. 1. 1. 1
22	2185	<i>ad</i>	Álcool desidrogenase	EC 1. 1. 1. 1
13	1436	<i>ah</i>	Citocromo P450 alcano hidroxilase 1 CYP153A7	EC 1.14.15.3
13	1443	<i>ah</i>	Alcano 1-monooxigenase <i>alkB</i>	
13	1460	<i>acs</i>	Acil-CoA sintetase	
13	1680	<i>alks</i>	Regulador da Transcrição	
13	1681	<i>ald</i>	Aldeído desidrogenase	
13	1682	<i>ad</i>	Álcool desidrogenase	EC 1. 1. 1. 1
13	1683	<i>acs</i>	Acetil-CoA sintetase	EC 6. 2. 1. 1
15	1760	<i>ad</i>	Álcool desidrogenase	EC 1. 1. 1. 1

Em *E. citreus* LAMA 915 a ORF 1436 apresentou 83% de homologia/similaridade ao gene CYP153A7 (Citocromo P450 alcano hidroxilase 1) e a ORF 1443 apresentou 89% de homologia/similaridade ao gene *alkB* (Alcano-1-monooxigenase), ambas codificam monoxigenases do tipo de alcano hidroxilase (AH) (Beilen, van *et al.*, 2006; Nie *et al.*, 2014).

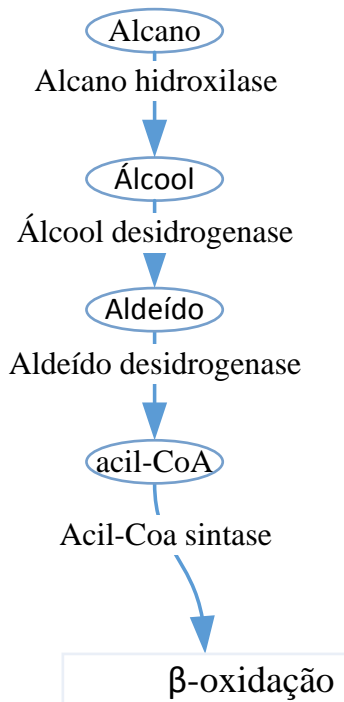
Observa-se a existência de um agrupamento de genes em *E. citreus* LAMA 915, cotendo as ORF 1680, 1681, 1682, 1683, estando elas no mesmo sentido de leitura (Figura 9). Neste agrupamento pode-se encontrar genes envolvidos na via metabólica da degradação de alcanos. A ORF 1680 apresentou 76% de homologia/similaridade ao regulador da transcrição que pertence à família de genes *alks*, a sua expressão está associada com a presença de n-alcanos e possui a função de regular a expressão dos genes como *aklb* e CYP153A7 (Beilen, van *et al.*, 2006; Janssen *et al.*, 2005; Rojo, 2009). As ORF 1681, 1682, por sua vez, codificam os genes aldeído desidrogenase e álcool desidrogenase, respectivamente. Estes genes estão envolvidos no metabolismo de intermediários da rota de degradação de alcanos (Manilla-Pérez *et al.*, 2010; Rojo, 2009; Sabirova *et al.*, 2006).

Figura 9 - Organização genômica da região contendo os genes, envolvidos na via metabólica da degradação de alcanos. O sentido das setas representa o sentido de leitura no genoma.



Com base nos genes encontrados na *E. citreus* LAMA 915 envolvidos na degradação de alcanos (Tabela 5) sugere-se que a rota de degradação de alcanos na *E. citreus* LAMA 915 (Figura 10) contendo genes similares aos descritos em trabalhos prévios (Rojo, 2009). A primeira etapa de degradação na *E. citreus* LAMA 915 começa com a atuação da enzima alcano hidroxilase sobre as moléculas de n-alcanos, transformando-os nos seus respectivos álcoois. Os álcoois são então metabolizados em intermediários, até a formação de Acil-CoA (ácidos graxos com molécula CoA conjugada) pela Acil-CoA sintetase. Através da β -oxidação, a molécula de Acil-CoA, então pode ser precursora de PHA e ácidos graxos livres (Rojo, 2009; Sabirova *et al.*, 2006).

Figura 10 - Via aeróbica de degradação de n-alcenos por oxidação terminal e subterminal que fornecem acil-CoA para β -oxidação e ácido carboxílico para o TCA: os genes envolvidos são os da AH alcano hidroxilase, AD álcool desidrogenase, ALD aldeído desidrogenase, ACS acil-Coa sintase.



Fonte: (Rojo, 2009).

Microorganismos com capacidade de degradação de alcanos têm potencial como agentes na recuperação de ambientes impactados por derramamento de petróleo. Desse modo, a presença da rota de degradação de alcanos em *E. citreus* LAMA 915 sugere que esta bactéria possa ser utilizada como um agente de biorremediação. Além disso, a capacidade de assimilar nitrato pela *E. citreus* LAMA 915 é uma vantagem, pois este composto possui alta solubilidade e maior disponibilidade na presença de alcanos quando comparado com outras fontes de nitrogênio (Jurelevicius *et al.*, 2012; Rojo, 2009).

4.4.2 PHA (Produção de Biopolímeros)

Foram encontrados genes envolvidos na síntese e na degradação de PHA pela *E. citreus* LAMA 915 (Tabela 6).

Tabela 6 – Genes relacionados com síntese de PHA

Contig	ORF	Gene	Nome	KO	EC
01	21	<i>phbf</i>	Repressor da PhaC		
08	778	<i>hadh</i>	3-hidroxiacil-CoA desidrogenase	K00022	EC 1. 1. 1. 35
13	1467	<i>phbb</i>	Acetoacetyl-CoA redutase	K00023	EC 1. 1. 1. 36
13	1478	<i>echa</i>	Enoil-CoA hidratase	K01692	EC 4. 2. 1. 17
13	1487	<i>phaa</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase (atob atob2)	K00626	EC 2. 3. 1. 16, EC 2. 3. 1. 9
13	1488	<i>phaz</i>	Intracelular PHA/PHB despolimerase	K05973	EC 3. 1. 1. 75
13	1496	<i>phaa</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase	K00626	EC 2. 3. 1. 9
21	2049	<i>hbd</i>	3-hidroxiButiril-CoA desidrogenase	K00074	EC 1. 1. 1. 157
22	2218	<i>bdh</i>	3-hidroxiacil-CoA desidrogenase D-β-hidroxi butirato desidrogenase	K00019	EC 1. 1. 1. 30
22	2285	<i>phaa</i>	3-ketoacil-CoA tiolase Acetyl-CoA acetyltransferase	K00626	EC 2. 3. 1. 16, EC 2. 3. 1. 9
23	2408	<i>fadb</i>	3- hidroxiacil -CoA epimerase	K01825	EC 5. 1. 2. 3
23	2420		Butiril-CoA Desidrogenase		EC 1. 3. 8. 1
25	2732		Butiril-CoA Desidrogenase	K00248	EC 1. 3. 8. 1
25	2742		Acil-CoA tioesterase 1 (TesB)		
25	2748		Enoil-CoA hidratase		EC 4. 2. 1. 17
25	2751	<i>phac</i>	polihidroxi alcanoatos sintase	K03821	EC-2. 3. 1-
25	2789	<i>oxct</i>	3-oxoacid CoA-transferase	K01028	EC 2. 8. 3. 5

No genoma da *E. citreus* LAMA 915, a ORF 1488 foi identificada como *phaz*. Este gene codifica a PHA despolimerase intracelular, sendo o principal gene envolvido na despolimerização de PHA. Ao lado da ORF *phaz*, encontra-se a ORF 1487 que foi identificada como *phaa*. As ORF 2218 e 2789, por sua vez, codificam respectivamente D-β-hidroxi butirato desidrogenase e 3-oxoacido CoA-transferase e estão envolvidas na metabolização de intermediários da degradação de PHA. Os genes *phaa*, *bdh*, *oxct* e *phaa* estão envolvidos na reciclagem de PHA formando acetoaceto, acetoacetyl-CoA e acetyl-CoA, dentre outras funções (Handrick *et al.*, 2004).

A ORF 21 do genoma da *E. citreus* LAMA 915 foi identificada como gene *phbf*, sendo este gene um repressor da síntese do gene da Phac (Polihidroxiálcanoatos sintase). A ORF 21 está localizada dentro de uma região no genoma que contém diversos genes relacionados a reparos e proteção celular contra o choque térmico decorrente do aumento da temperatura. Além disso, sugere-se que o aumento de temperatura faça com que a *E. citreus* LAMA 915 interrompa a síntese de *phac* e conseqüente interrupção da produção de PHA. Condição que deve estar associada a aclimatação em diferentes faixas de temperatura.

A localização do gene *phac* parece não apresentar relação com os genes *phaa*, *phab*, os quais também estão envolvidos na síntese do PHA. Isto difere, por exemplo, da disposição encontrada nas bactérias *Alcaligenes latus* e *Cupriavidus necator* e estão contidos num *operon* (Rehm e Steinbüchel, 1999). Entretanto, organismos produtores de PHA como a *Methylobacterium extorquens* e a *Nocardia corallina* possuem o gene *phac* separado dos genes *phaa* e *phaa* (Rehm e Steinbüchel, 1999). Além disso, em *E. citreus* LAMA 915, *phac* foi encontrado em um agrupamento que contém *tesb1*, *echa*, permeases e a *Acd* (Figura 11).

Figura 11 - Parte do genoma da *E. citreus* LAMA 915 formando um agrupamento de genes com a *tesb*, *phac*, Enoil-CoA hidratase, permeases e Acido graxo desaturase. O sentido das setas representa o sentido de leitura no genoma.



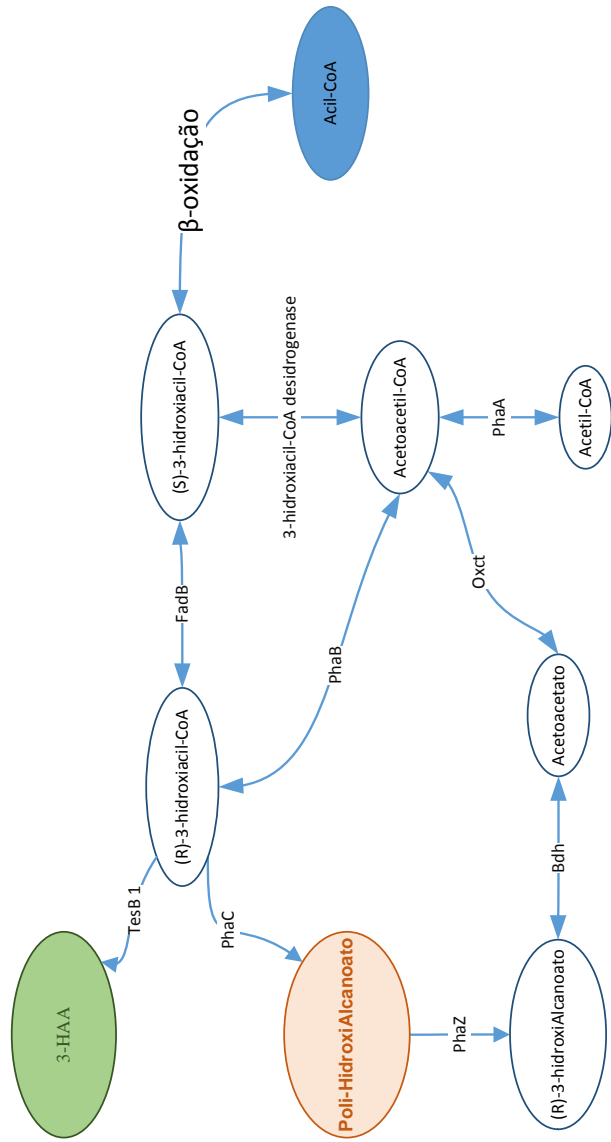
Estudos anteriores indicam que a *tesB* e a uma *phaC* sintase da *Alcanivorax borkumensis* SK2 são concomitantemente expressas na presença de alcanos no meio, onde ambas enzimas competem pelo composto 3-hydroxyacyl-CoA provenientes da rota de degradação de alcanos (Sabirova *et al.*, 2006). Logo, devido à proximidade dos genes *phac*, *tesB* e com genes envolvidos na β -oxidação e a presença de genes para metabolização de alcano, sugere-se que a produção de PHA pela *E. citreus* LAMA 915 ocorra através de uma rota alternativa proveniente da degradação de alcanos via β -oxidação.

De forma semelhante ao descrito em *A. borkumensis* (Manilla-Pérez *et al.*, 2010) que produz e secreta PHA e lipídios livres, sugere-se que a rota de síntese e de degradação de PHA em *E. citreus* LAMA 915

segue esse mesmo padrão (Figura 12). Desse modo, os genes envolvidos na rota de PHA, tornam *E. citreus* LAMA 915 um candidato para a produção de biopolímeros.

Todavia a falta da reprodução das condições ambientais e/ou a possível exportação para o meio são os possíveis fatores que dificultam a detecção do PHA nesta bactéria. Sugere-se em estudos futuros o teste em diferentes condições ambientais e fontes de carbono para comprovar a existência ou não da habilidade de produzir PHA.

Figura 12 – Sugestão da via metabólica de síntese e degradação de PHA: O (S)-3-hidroxiacil-CoA, produzido via β -oxidação de Acil-CoA, é isomerizado em (R)-3-hidroxiacil-CoA pela fadB. O (R)-3-hidroxiacil-CoA é convertido pela tesB em 3-HAA e com a phaC em poli-hidroxiálcanoato.



4.4.3 Carotenoides (Produção de Pigmentos)

Foram encontrados genes que compõem a rota de síntese de carotenoides (Tabela 7). Os genes *dxs*, *dxr ispe*, *ispdf*, *ispg*, *isph*, *ispB* e *idsa* identificados no genoma da *E. citreus* LAMA 915 compõem a rota MEP/DOXP. Esta rota pertence à via metabólica de síntese de terpenóides, a qual produz diversos intermediários, dentre geranyl-geranyl difosfato que é um dos precursores para a via metabólica de síntese de carotenoides.

Os genes *crtB*, *crtI*, *crtY* e *crtZ* que foram mapeados no genoma da *E. citreus* LAMA 915, pertencem a via metabólica de síntese de carotenoides. Quanto à composição de carotenoides, com base nos genes, pode-se afirmar que a pigmentação amarelada característica da *E. citreus* é proveniente da mistura de β -caroteno, licopeno, zeaxantina, fitoeno e γ -caroteno (Matsumura *et al.*, 1997; Widdel, Boetius e Rabus, 2014).

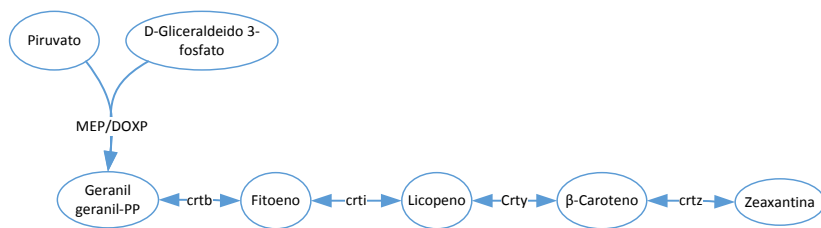
Tabela 7 - Lista de orf's encontrados na *E. citreus* LAMA 915 envolvidos na síntese de carotenoides

Cont ig	ORF	gene	Nome	KO	EC
13	1423	<i>dxs</i>	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase	K01662	EC2.2.1.7
2	375	<i>dxr</i>	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato reduto isomerase	K00099	EC1.1.1.267
22	2244	<i>ispe</i>	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol kinase	K00919	EC2.7.1.148
22	2379	<i>ispdf</i>	2-C-metil-D-eritritol 2, 4-ciclodifosfato sintase	K12506	EC2.7.7.60
26	2879	<i>ispg</i>	1-hidroxi-2-metil-2- (E)-butenil 4-difosfate sintase	K03526	EC1.17.7.1
8	596	<i>isph</i>	4-hidroxi-3-metilbut-2-enyl difosfato redutase	K03527	EC1.17.1.2
2	440	<i>ispb</i>	Octaprenil-difosfato sintase	K02523	EC2.5.1.90
1	145	<i>idsa</i>	Geranyl difosfato sintase	K13787	EC2.5.1.1 EC2.5.1.10 EC2.5.1.29
8	769	<i>crtb</i>	Fitoeno sintase	K02291	EC2.5.1.32
8	767	<i>crti</i>	Fitoeno desidrogenase, Fitoeno desaturase	K10027	EC 1.3.99.26 EC1.3.99.28 EC1.3.99.29 EC1.3.99.31
8	766	<i>crtY</i>	Licopeno ciclase	K06443	EC: 5.5.1.19
23	2472	<i>crtZ</i>	β -caroteno hidroxilase	K15746	EC:1.14.13. 129

Com base nos genes envolvidos na síntese de carotenoides na Tabela 7 é apresentada sua via metabólica (Figura 13).

Embora não se possa confirmar a composição correta dos carotenoides produzidos pela *E. citreus* LAMA 915, estes são de interesse tanto da indústria alimentícia quanto a farmacêutica, devido à produção de pigmentos para alimentos de origem animal, vitaminas e na saúde humana (Nègre-Sadargues, Castillo e Segonzac, 2000).

Figura 13 – A síntese de carotenoides em *E. citreus* LAMA 915, ocorre através da rota MEP/DOXP formando o geranyl-geranyl difosfato o qual é o metabólito precursor para a rota dos carotenoides que é formada pelos genes *crtb*, *crti*, *crtj* e *crtz*.



4.4.4 Compostos Aromáticos

Os genes envolvidos na rota metabólica de PCA45 encontrados no genoma de *E. citreus* LAMA 915 possuem potencial de degradar fragmentos de lignina ou compostos aromáticos (Tabela 8) e são similares aos genes encontrados na *S. paucimobilis* SYK-6, (Hara *et al.*, 2003; Masai *et al.*, 2012). A presença da rota PCA45 e de genes para degradação de fenóis e benzoatos evidencia o potencial de capacidade *E. citreus* LAMA 915 ser um instrumento de recuperação de ambientes ou fornecer enzimas para indústria de transformação.

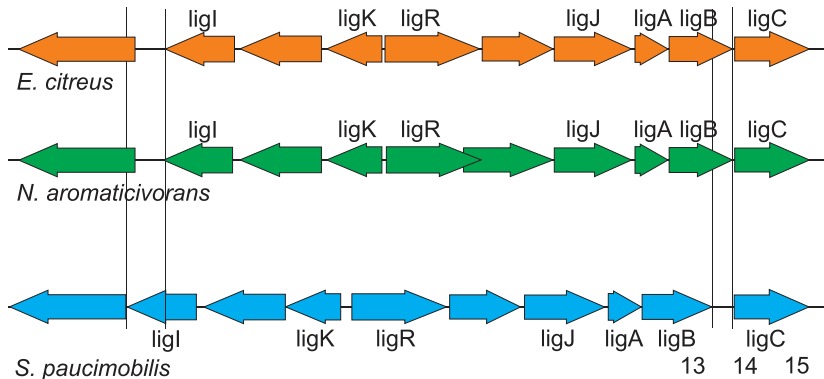
Tabela 8 – Orf's envolvidos na degradação de lignina

Contig	Orf	Gene	Função	KO	Número EC
2	298		Amido hidrolase		
2	299	Ligi	2-pirone-4, 6-dicarboxilato hydrolase	K10221	EC:3.1.1.57
2	300	gald	4-oxalo mesaconato tautomerase	K16514	EC:5.3.2.8
2	301	ligk	4-carboxi-4-hidroxi-2-oxoadipate aldolase	K10218	EC 4.1.3.17
2	302	ligr	Regulador da transcrição, família LysR		
2	303		3-hidroxi-isobutirato desidrogenase, β -hidroxi-ácido-desidrogenase		
2	304	ligj	4-oxalomesaconate hidratase	K10220	EC 4.2.1.83
2	305	liga	Protocatecuato 4,5-dioxygenase unidade alfa	K04100	EC1.13.11.8
2	306	ligb	Protocatecuato 4,5-dioxygenase unidade beta	K04101	EC1.13.11.8
2	307	ligc	4-carboxi-2-hidroxiuconato-6-semialdeide desidrogenase	K10219	EC1.1.1.312

No genoma da *E. citreus* LAMA 915 os genes que fazem parte da rota PCA45, estão agrupados (Figura 14) sendo o tamanho, a ordem e o sentido de leitura dos genes deste agrupamento, similares ao padrão existente neste agrupamento da rota PCA45 de *S. paucimobilis* SYK-6 (Hara *et al.*, 2003; Masai *et al.*, 2012) e de *Novosphingobium aromaticivorans* (Picart *et al.*, 2014). Dentre esses genes, encontra-se ligR que pertence à família LysR de reguladores da expressão gênica, responsável por regular positivamente a expressão deste agrupamento de genes em *S. paucimobilis* SYK-6 (Hara *et al.*, 2003; Masai *et al.*, 2012) e em *Novosphingobium aromaticivorans* (Picart *et al.*, 2014).

Os genes *liga* e *ligb* presentes em *E. citreus* LAMA 915 são os primeiros a atuar na quebra dos compostos aromáticos (Masai *et al.*, 2012). Os genes *ligi*, *ligk*, *ligj*, *ligc* também existentes no genoma, por sua vez, realizam sucessivas clivagens até formação de duas moléculas de piruvato (Masai *et al.*, 2012).

Figura 14 - Comparação da disposição dos genes envolvidos na degradação de lignina presentes nos genomas do *E. citreus* LAMA 915, *N. aromaticivorans* (Picart *et al.*, 2014) e *S. paucimobilis* (Hara *et al.*, 2003). O sentido das setas representa o sentido de leitura dos genes.



Além de estarem associadas à degradação de hidrocarbonetos aromáticos de petróleo (Margesin, Moertelmaier e Mair, 2013), as enzimas encontradas no genoma de *E. citreus* LAMA 915 possuem um potencial para o aproveitamento de resíduos da indústria de combustível com potencial participação na produção de etanol de segunda geração (Sanchez-Amat, Solano e Lucas-Elío, 2010). Um aspecto importante, refere-se ao fato de enzimas provenientes de organismos extremófilos serem resistentes a presença de íons e solventes, tornando-as candidatas ao tratamento de efluentes industriais. (Ragauskas *et al.*, 2014; Zakzeski *et al.*, 2010).

4.4.5 Lipases e Fosfolipases (Produção de Enzimas Lipolíticas)

Os estudos genômicos de *E. citreus* LAMA 915 prospectou ORF com função lipolítica (Tabela 9). As orf's que somente apresentaram similaridade com os domínios proteicos, foram descritas como esterase/lipase. Isto ocorre porque as lipases possuem baixa similaridade com a estrutura primária, porém são altamente conservadas quanto a sua estrutura terciária ou quaternária (López-López, Cerdán e González Siso, 2014). Foram identificadas 7 regiões que codificam fosfolipases (Tabela 9), tendo sido encontrados os 4 tipos distintos de fosfolipases e a Fosfolipase B (PLB) que atua como os tipos PLA₁ ou PLA₂.

Tabela 9 - Genes encontrados no genoma da *E. citreus* LAMA 915 com atividade de lipase.

Contig	ORF	Gene	Função
2	263	PLD	Fosfolipase D
26	2853	PLD	Fosfolipase D
13	1659	PLC	Fosfolipase C
8	601	PLB	Fosfolipase B
23	2556	PLA ₁	Fosfolipase A1
25	2840	PLA ₂	Fosfolipase A2
26	2926	PLA ₂	Fosfolipase A2
2	318		Esterase/lipase
10	992		Esterase/lipase
12	1112		Esterase/lipase
13	1208		Esterase/lipase
13	1397		Esterase/lipase
14	1697		Esterase/lipase
18	1822		Esterase/lipase
22	2163		Esterase/lipase
22	2169		Esterase/lipase
22	2224		Esterase/lipase
23	2545		Esterase/lipase

Cesarini e colaboradores (2014) utilizaram um conjunto de fosfolipases comerciais para incrementar a produção de biodiesel. No entanto, existem algumas limitações devido à inibição das enzimas por íons presentes no meio. E as fosfolipases prospectadas no genoma *E. citreus* LAMA 915, possuem potencial para substituir as atuais enzimas, uma vez que são enzimas similares às testadas por Cesarini (2014) e suportam condições adversas como a toxicidade de íons ou solventes, uma vez que derivam de organismo extremófilo.

Através de ensaios enzimáticos, Silva (2013) relatou uma alta atividade lipolítica extracelular da *E. citreus* LAMA 915, que pode está relacionado ao grande número de lipases prospectadas no genoma deste organismo. Além disso, outras possíveis características das lipases encontradas no genoma da *E. citreus* LAMA 915, é que as lipases derivadas de microrganismos extremófilos podem hidrolisar diferentes lipídios, suportar maiores pressões de trabalho, ser ativas em baixa temperatura, o que são características importantes para o uso industrial em processos sensíveis ao aquecimento (Zhang e Kim, 2010).

5 CONCLUSÕES

O genoma da *E. citreus* LAMA 915 possui 3,09 mbp, com 2.959 *ORF*. A montagem do genoma possibilitou conhecer genes e estruturas ainda não observadas em *E. citreus*. O que permitiu observar a existência de flagelo e genes envolvidos na assimilação de nitrato e diferentes tipos de fontes de carbonos, que confere o caráter de microrganismo oligotrófico facultativo, dados estes que contribuem para o melhor entendimento da ecologia dos ambientes marinhos e da fisiologia de seus habitantes, provendo desta forma subsídios para estudos futuros.

Foi possível detectar ao nível genômico adaptações da *E. citreus* LAMA 915 ao ambiente extremos profundo, tais como temperatura, pressão, privação de nutrientes e tolerância a variação da salinidade. E genes relacionados à construção do flagelo comprovando a sua motilidade, até então não descrita na literatura.

A partir da análise comparativa do genoma foi possível concluir que *E. citreus* LAMA 915 possui um amplo potencial biotecnológico, dentre eles: como agente biorremediador em ambientes impactados por petróleo, na síntese de polihidroxicarboxilatos para produção de biopolímeros, reaproveitamento de lignina para indústria de etanol e no tratamento de efluentes indústrias, a exemplo dos efluentes da indústria têxtil, com a produção dos carotenoides licopeno, β -caroteno e zeaxantina, fornecedor de lipases e fosfolipases para indústria de energia renovável, isto é, como a produção de biodiesel.

Neste sentido, a *E. citreus* LAMA 915 mostra-se um organismo promissor, devido ao seu potencial biotecnológico, suportando ambientes extremos, como as mais variadas temperaturas, pressão, bem como outros fatores abióticos.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.

Sugere-se, para o desenvolvimento de trabalhos futuros, a avaliação dos seguintes aspectos:

- Reconstrução metabólica *in silico* de *E. citreus* LAMA 915, a partir dos genes anotados;
- Determinar experimentalmente qual a concentração e quais tipos de alcanos que *E. citreus* é capaz de metabolizar;
- Definir em qual condição de cultivo de *E. citreus* produz PHA;
- Analisar a especificidade das lipases.

7 BIBLIOGRAFIA

- ABE, F.; HORIKOSHI, K. **The biotechnological potential of piezophiles.** Trends in Biotechnology, v. 19, n. 3, p. 102–108, mar. 2001.
- AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. DE A. C. E S.; FARO, Z. P. DE. **Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A.** Revista de Nutrição, v. 19, n. 2, p. 233–243, abr. 2006.
- AZIZ, R. K. et al. **The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology.** BMC genomics, v. 9, n. 1, p. 75, jan. 2008.
- BARTLETT, D. H. **Pressure effects on in vivo microbial processes.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, v. 1595, n. 1–2, p. 367–381, mar. 2002.
- BEHERA, B. K. et al. **Draft Genome Sequence of the Extremely Halophilic Bacterium Halomonas salina Strain CIFRI1, Isolated from the East Coast of India.** Genome announcements, v. 3, n. 1, p. 13-14, 26 jan. 2015.
- BEILEN, J. B. VAN et al. **Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases.** Applied and environmental microbiology, v. 72, n. 1, p. 59–65, jan. 2006.
- BIEBL, H.; WAGNER-DÖBLER, I. **Growth and bacteriochlorophyll a formation in taxonomically diverse aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in chemostat culture: Influence of light regimen and starvation.** Process Biochemistry, v. 41, n. 10, p. 2153–2159, 2006.
- BIGLIARDI, B.; GALATI, F. **Innovation trends in the food industry: The case of functional foods.** Trends in Food Science & Technology, v. 31, n. 2, p. 118–129, jun. 2013.
- BLUNT, J. W.; B. COPP; R. KEYZERS. **Marine natural products.** Nat. Prod. Rep., v. 29, n. 2, p. 144–222, 2012.
- BLUNT, J. W.; B. COPP; R. KEYZERS. **Marine natural products.** Nat. Prod. Rep., v. 30, n. 2, p. 237–323, 2013.
- BLUNT, J. W.; B. COPP; R. KEYZERS. **Marine natural products.** Natural Product Reports, v. 31, n. 2, p. 160, 2014.
- BLUNT, J. W.; B. COPP; R. KEYZERS. **Marine natural products.** Nat. Prod. Rep., v. 32, n. 2, p. 116–211, 2015.
- BLUNT, J. W.; B. COPP; R. KEYZERS. **Marine natural products.** Nat. Prod. Rep., v. 33, n. 3, p. 382–431, 2016.
- BOONYARATANAKORNKIT, B. B.; PARK, C. B.; CLARK, D. S. **Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins.** Biochimica et biophysica acta, v. 1595, n. 1–2, p. 235–249, 2002.
- BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. **Carotenoids: Handbook.** [s.l.] Birkhäuser Basel, 2012.
- BUGG, T. D.; RAHMANPOUR, R. **Enzymatic conversion of lignin into renewable chemicals.** Current opinion in chemical biology, v. 29, p. 10–17, dez. 2015.

- CARVALHO, C. C. C. R. DE; FERNANDES, P. **Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment.** *Marine Drugs*, v. 8, n. 3, p. 705–727, 2010.
- CASADO, V. et al. **Phospholipases in Food Industry: A Review.** In: [s.l.: s.n.], p. 495–523.
- CESARINI, S. et al. **Combining phospholipases and a liquid lipase for one-step biodiesel production using crude oils.** *Biotechnology for biofuels*, v. 7, n. 1, p. 29, 2014.
- CHEN, X.; ZHANG, Y. **Identification and characterization of NADPH-dependent cytochrome P450 reductase gene and cytochrome b₅ gene from *Plutella xylostella*: possible involvement in resistance to beta-cypermethrin.** *Gene*, v. 558, n. 2, p. 208–14, 10 mar. 2015.
- CHESTER, R.; JICKELLS, T. D. **Marine Geochemistry.** 3. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2012.
- DENNER, E. B. M. et al. ***Erythrobacter citreus*.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, p. 1655–1661, 2002.
- EISENMENGER, M. J.; REYES-DE-CORCUERA, J. I. **High pressure enhancement of enzymes: A review.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, n. 5, p. 331–347, nov. 2009.
- ELOE, E. A. et al. **The deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 utilizes separate flagellar systems for swimming and swarming under high-pressure conditions.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 20, p. 6298–6305, 2008.
- FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. **The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids.** *Progress in Lipid Research*, v. 43, n. 3, p. 228–265, 2004.
- GAGE, J. D.; TYLER, P. A. **Deep-sea biology: a natural history of organisms at the deep-sea floor.** 1. ed. [s.l.] Cambridge University Press, 1991.
- HANDRICK, R. et al. **The “intracellular” poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases.** *Journal of bacteriology*, v. 186, n. 21, p. 7243–53, nov. 2004.
- HANSON, B. R.; TAN, M. **Transcriptional regulation of the *Chlamydia* heat shock stress response in an intracellular infection.** *Molecular Microbiology*, v. 97, n. 6, p. 1158–1167, set. 2015.
- HARA, H. et al. **Characterization of the 4-Carboxy-4-Hydroxy-2-Oxo adipate Aldolase Gene and Operon Structure of the Protocatechuate 4,5-Cleavage Pathway Genes in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6.** *Journal of Bacteriology*, v. 185, n. 1, p. 41–50, 1 jan. 2003.
- IBGE. **Atlas geográfico das zonas costeiras e oceânicas do Brasil.** [s.l.: s.n.].
- JANSSEN, D. B. et al. **Bacterial degradation of xenobiotic compounds: Evolution and distribution of novel enzyme activities.** *Environmental Microbiology*, v. 7, n. 12, p. 1868–1882, 2005.

- JHA, R. K.; ZI-RONG, X. **Marine Drugs**. *Marine Drugs*, v. 2, n. 1, p. 123–146, 2004.
- JOHNSON, C. W.; BECKHAM, G. T. **Aromatic catabolic pathway selection for optimal production of pyruvate and lactate from lignin**. *Metabolic Engineering*, v. 28, p. 240–247, 2015.
- JONES, P. et al. InterProScan 5: **Genome-scale protein function classification**. *Bioinformatics*, v. 30, n. 9, p. 1236–1240, 2014.
- JURELEVICIUS, D. et al. **Distribution of alkane-degrading bacterial communities in soils from King George Island, Maritime Antarctic**. *European Journal of Soil Biology*, v. 51, p. 37–44, 2012.
- KAMIMURA, N.; TAKAMURA, K.; et al. **Regulatory system of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway genes essential for lignin downstream catabolism**. *Journal of Bacteriology*, v. 192, n. 13, p. 3394–3405, 2010.
- KAMIMURA, N.; AOYAMA, T.; et al. **Characterization of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway operon in *comamonas sp.* strain e6 and discovery of a novel pathway gene**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 24, p. 8093–8101, 2010.
- KARL, D. M. **Microbial oceanography: paradigms, processes and promise**. *Nature reviews. Microbiology*, v. 5, n. 10, p. 759–769, out. 2007.
- KATO, C. et al. **Extremely Barophilic Bacteria Isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a Depth of 11,000 Meters**. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, n. 4, p. 1510–1513, 1 abr. 1998.
- KATO, C.; QURESHI, M. H. **Pressure response in deep-sea piezophilic bacteria**. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, v. 1, n. 1, p. 87–92, ago. 1999.
- KAYE, J. Z. et al. ***Halomonas neptunia sp. nov.*, *Halomonas sulfidaeris sp. nov.*, *Halomonas axialensis sp. nov.* and *Halomonas hydrothermalis sp. nov.*: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments**. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 54, 2004.
- KISH, A. et al. **High-pressure tolerance in *Halobacterium salinarum* NRC-1 and other non-piezophilic**. *Prokaryotes*, p. 355–361, 2012.
- KUHN, E.; BELLICANTA, G. S.; PELLIZARI, V. H. **New alk genes detected in Antarctic marine sediments**. *Environmental microbiology*, v. 11, n. 3, p. 669–73, mar. 2009.
- LAURIENZO, P. **Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: An overview**. *Marine Drugs*, v. 8, n. 9, p. 2435–2465, 2010.
- LEVIN, L. A.; GOODAY, A. J. **The deep Atlantic Ocean**. In: **Ecosystems of the deep oceans**. [s.l: s.n.]. p. 111–178.
- LIMA, G. P. P.; VIANELLO, F. (EDS.). **Food Quality, Safety and Technology**. Vienna: Springer Vienna, 2013.
- LÓPEZ-LÓPEZ, O.; CERDÁN, M. E.; GONZÁLEZ SISO, M. I. **New extremophilic lipases and esterases from metagenomics**. *Current protein & peptide science*, v. 15, n. 5, p. 445–55, 2014.
- MADERN, D.; EBEL, C.; ZACCAI, G. **Halophilic adaptation of enzymes**. *Extremophiles : life under extreme conditions*, v. 4, n. 2, p. 91–98, 2000.

- MADERN, D.; ZACCAI, G. **Molecular adaptation: the malate dehydrogenase from the extreme halophilic bacterium *Salinibacter ruber* behaves like a non-halophilic protein.** *Biochimie*, v. 86, n. 4–5, p. 295–303, jan. 2004.
- MANILLA-PÉREZ, E. et al. **Occurrence, production, and export of lipophilic compounds by hydrocarbonoclastic marine bacteria and their potential use to produce bulk chemicals from hydrocarbons.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 86, n. 6, p. 1693–1706, 2010.
- MARCHLER-BAUER, A. et al. **CDD: NCBI's conserved domain database.** *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. D1, p. D222–D226, 28 jan. 2015.
- MARGESIN, R.; MOERTELMAIER, C.; MAIR, J. **Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains.** *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 84, p. 185–191, out. 2013.
- MARIA, L. DE et al. **Phospholipases and their industrial applications.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, n. 2, p. 290–300, 2007.
- MARTIN, D. D.; BARTLETT, D. H.; ROBERTS, M. F. **Solute accumulation in the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum*.** *Extremophiles*, v. 6, n. 6, p. 507–514, 2002.
- MARTINS, A. et al. **Photoprotective bioactivity present in a unique marine bacteria collection from Portuguese deep sea hydrothermal vents.** *Marine Drugs*, v. 11, n. 5, p. 1506–1523, 2013.
- MASAI, E. et al. **Complete Genome Sequence of *Sphingobium* sp. Strain SYK-6, a Degradar of Lignin-Derived Biaryls and Monoaryls.** *Journal of Bacteriology*, v. 194, n. 2, p. 534–535, 15 jan. 2012.
- MATSUMURA, H. et al. **Cloning, sequencing and expressing the carotenoid biosynthesis genes, lycopene cyclase and phytoene desaturase, from the aerobic photosynthetic bacterium *Erythrobacter longus* sp. strain Och101 in *Escherichia coli*.** *Gene*, v. 189, n. 2, p. 169–174, abr. 1997.
- MESBAH, N. M.; WIEGEL, J. **Life under multiple extreme conditions: diversity and physiology of the halophilic alkalithermophiles.** *Applied and environmental microbiology*, v. 78, n. 12, p. 4074–82, 15 jun. 2012.
- MOHRIAK, W. U. et al. **Geological and geophysical interpretation of the Rio Grande Rise, south-eastern Brazilian margin: extensional tectonics and rifting of continental and oceanic crusts.** *PETROLEUM GEOSCIENCE*, v. 16, n. 3, p. 231–245, 2010.
- MOTA, M. J. et al. **Microorganisms under high pressure--adaptation, growth and biotechnological potential.** *Biotechnology advances*, v. 31, n. 8, p. 1426–34, dez. 2013.
- MUYZER, G.; KRAAN, G. M. VAN DER. **Bacteria from hydrocarbon seep areas growing on short-chain alkanes.** *Trends in Microbiology*, v. 16, n. 4, p. 138–141, 2008.

- NATH, I. V. A.; BHARATHI, P. A. L. **Diversity in transcripts and translational pattern of stress proteins in marine extremophiles.** Extremophiles, mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21210167>>. Acesso em: 5 maio. 2015
- NÈGRE-SADARGUES, G.; CASTILLO, R.; SEGONZAC, M. **Carotenoid pigments and trophic behaviour of deep-sea shrimps (Crustacea, Decapoda, Alvinocarididae) from a hydrothermal area of the Mid-Atlantic Ridge.** Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, v. 127, n. 3, p. 293–300, nov. 2000.
- NI, B. et al. **Assimilation of aromatic compounds by *Comamonas testosteroni*: Characterization and spreadability of protocatechuate 4,5-cleavage pathway in bacteria.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 97, n. 13, p. 6031–6041, 2013.
- NIE, Y. et al. **Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments.** Scientific Reports, v. 4, p. 4968, 15 maio 2014.
- OGER, P. M.; CARIO, A. **Adaptation of the membrane in Archaea.** Biophysical chemistry, v. 183, p. 42–56, 15 dez. 2013.
- OREN, A. **Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations.** Environmental Microbiology, v. 13, n. 8, p. 1908–1923, ago. 2011.
- PASCALE, D. DE et al. **The cold-active Lip1 lipase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 is a member of a new bacterial lipolytic enzyme family.** Extremophiles, v. 12, n. 3, p. 311–323, 2008.
- PEIXOTO, R. S.; VERMELHO, A B.; ROSADO, A S. **Petroleum-degrading enzymes: bioremediation and new prospects.** Enzyme research, v. 2011, p. 475193, 2011.
- PENG, Z.; JIAO, N. **Influences of light and temperature on membrane potential and respiratory viability of an aerobic anoxygenic phototrophic bacterium *erythrobacter* sp. JL475.** African Journal of Microbiology Research, v. 4, n. 10, p. 964–968, 2010.
- PICARD, A.; DANIEL, I. **Pressure as an environmental parameter for microbial life - A review.** Biophysical Chemistry, v. 183, p. 30–41, 2013.
- PICART, P. et al. **From Gene Towards Selective Biomass Valorization: Bacterial β -Etherases with Catalytic Activity on Lignin-Like Polymers.** ChemSusChem, v. 7, n. 11, p. 3164–3171, nov. 2014.
- POLI, A.; ANZELMO, G.; NICOLAUS, B. **Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: Production, characterization and biological activities.** Marine Drugs, v. 8, n. 6, p. 1779–1802, 2010.
- RAGAUSKAS, A. J. et al. **Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery.** Science (New York, N.Y.), v. 344, n. 6185, p. 1246843, 2014.
- REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. **Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 25, n. 1–3, p. 3–19, jun. 1999.

- ROJO, F. **Degradation of alkanes by bacteria.** Environmental Microbiology, v. 11, n. 10, p. 2477–2490, out. 2009.
- RUTHERFORD, K. et al. **Artemis: sequence visualization and annotation.** Bioinformatics (Oxford, England), v. 16, n. 10, p. 944–945, 2000.
- SABIROVA, J. S. et al. **Mutation in a “tesB-like” hydroxyacyl-coenzyme A-specific thioesterase gene causes hyperproduction of extracellular polyhydroxyalkanoates by *Alcanivorax borkumensis* SK2.** Journal of Bacteriology, v. 188, n. 24, p. 8452–8459, 2006.
- SÁIZ-ABAJO, M.-J. et al. **Thermal protection of β -carotene in re-assembled casein micelles during different processing technologies applied in food industry.** Food Chemistry, v. 138, n. 2–3, p. 1581–1587, jun. 2013.
- SALGAONKAR, B. B.; BRAGANÇA, J. M. **Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Halogeometricum boriunquense* strain E3.** International journal of biological macromolecules, 17 abr. 2015.
- SANCHEZ-AMAT, A.; SOLANO, F.; LUCAS-ELÍO, P. **Finding new enzymes from bacterial physiology: A successful approach illustrated by the detection of novel oxidases in *Marinomonas mediterranea*.** Marine Drugs, v. 8, n. 3, p. 519–541, 2010.
- SARMIENTO, J. L.; GRUBER, N. **Ocean Biogeochemical Dynamics.** 1. ed. Princeton: Princeton, 2006.
- SHARMA, S. K. Research Trends and Applications. [s.l: s.n.].
- SILVA, M. A. C. DA. **Identificação filogenética e atividade hidrolítica de bactérias isoladas de águas da região da elevação do rio grande e sedimentos do leste do atlântico sul.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.
- SILVA, M. A. C. DA. **Microbiologia Marinha.** 1. ed. Itajai: UNIVALI, 2014.
- SIMONATO, F. et al. **Piezophilic adaptation: a genomic point of view.** Journal of Biotechnology, v. 126, n. 1, p. 11–25, 2006.
- SONOKI, T. et al. **Enhancement of protocatechuate decarboxylase activity for the effective production of muconate from lignin-related aromatic compounds.** Journal of Biotechnology, v. 192, p. 71–77, dez. 2014.
- SPONGA, F. et al. **Biodiversity and potentials of marine-derived micro organisms.** Progress in Industrial Microbiology, v. 35, n. C, p. 65–69, 1999.
- SUGAWARA, E.; NIKAIDO, H. **Extremophiles Handbook.** Tokyo: Springer Japan, 2011. v. 58
- SUN, M. M. et al. **Pressure-induced thermostabilization of glutamate dehydrogenase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*.** Protein science : a publication of the Protein Society, v. 8, n. 5, p. 1056–63, maio 1999.
- SUN, M. M. et al. **Mechanism of pressure-induced thermostabilization of proteins: studies of glutamate dehydrogenases from the hyperthermophile *Thermococcus litoralis*.** Protein science : a publication of the Protein Society, v. 10, n. 9, p. 1750–7, set. 2001.

- TONG, W.Y. **Biotransformation of Terpenoids and Steroids**. Natural Products.: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 2733–2759.
- TROTSENKO, Y. A.; DORONINA, N. V.; TOUROVA, T. P. *Methylarcula marina* nov., sp. nov. and *Methylarcula terricola* sp. nov.: novel aerobic, moderately halophilic, facultatively methylotrophic bacteria from coastal saline environments. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 50, n. 5, p. 1849–1859, 1 set. 2000.
- TYLER, P. A. **Ecosystems of the Deep Oceans**. Amsterdam: Elsevier, 2003.
- VENOSA, A. D.; ZHU, X. **Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands**. Spill Science and Technology Bulletin, v. 8, n. 2, p. 163–178, 2003.
- WIDDEL, F.; BOETIUS, A.; RABUS, R. **The Prokaryotes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014.
- YANCEY, P. H. **Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses**. The Journal of experimental biology, v. 208, n. Pt 15, p. 2819–30, 1 ago. 2005.
- YANO, Y. et al. **Adaptive Changes in Membrane Lipids of Barophilic Bacteria in Response to Changes in Growth Pressure**. Appl. Envir. Microbiol., v. 64, n. 2, p. 479–485, 1 fev. 1998.
- ZAJC, J. et al. **Osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus, *Wallemia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl**. Applied and environmental microbiology, v. 80, n. 1, p. 247–56, 1 jan. 2014.
- ZAKZESKI, J. et al. **The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals**. Chemical Reviews, v. 110, n. 6, p. 3552–3599, 9 jun. 2010.
- ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. **Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs**. Genome Research, v. 18, n. 5, p. 821–829, 2008.
- ZHANG, C.; KIM, S.-K. **Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects**. Marine drugs, v. 8, n. 6, p. 1920–1934, 2010.
- ZHANG, Y. et al. **Current developments in marine microbiology: high-pressure biotechnology and the genetic engineering of piezophiles. Current opinion in biotechnology**, v. 33, p. 157–164, 13 mar. 2015.
- ZHBANNIKOV, I. Y.; HUNTER, S. S.; SETTLES, M. L. **SeqyClean User Manual**, 2013. Disponível em: <https://bytebucket.org/izhbannikov/seqyclean/raw/SeqyClean_UserManual.pdf>

8 ANEXOS

8.1 ANEXO A

Lista de genes existentes em *E. citreus* LAMA 915 pode ser acessada através do endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/914607448?report=genbank>

8.2 ANEXO B

Tabela 10 - ORF envolvidas na assimilação de Nitrato e produção de aminoácidos

Contig	ORF	Nome	EC
1	190	Nitrogen regulation protein NtrY	
25	2722	Regulador da transcrição nitrogen fixation FixJ	
13	1201	amidohydrolase	
22	2353	nitrogen fixation protein fixg	
22	2381	Nitrogen regulation protein NR(II)	
22	2383	Nitrogen regulation protein NtrY	
12	1151	PTS permease (IIAMan), nitrogen regulatory IIA	
10	961	Serine/threonine protein kinase	
10	954	Response regulator NasT	
10	955	Nitrate ABC transporter, nitrate-binding protein	
10	960	Nitrate/nitrite transporter	
10	962	Assimilatory nitrate reductase large subunit	EC:1.7.99.4
10	963	Nitrite reductase [NAD(P)H] small subunit	EC 1.7.1.4
10	964	Nitrite reductase [NAD(P)H] large subunit	EC 1.7.1.4
1	51	mfs Nitrate/nitrite transporter	
8	576	Nitrogen regulatory protein P-II	
8	577	glutamine synthetase	
13	1204	ammonium transporter	
13	1205	nitrogen regulatory protein p-ii 1	
13	1332	Ferredoxin-dependent glutamate synthase	EC 1.4.7.1
13	1457	glutamate-ammonia ligase adenyltransferase	
13	1479	dihydropyrimidine dehydrogenase subunit a	
13	1480	glutamate synthase	
13	1528	pii uridylyl-transferase	
1	18	Glutamate synthase [NADPH] large chain	EC 1.4.1.13