

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Indução da Expressão e Caracterização de uma possível fosfatase ácida
ligada à membrana produzida por *Burkholderia* sp.**

Tiago Henrique Rombola
Biomédico

**JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
2008**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Expressão e Caracterização da fosfatase ácida ligada à
membrana produzida por *Burkholderia* sp.**

Dissertação apresentada à faculdade de
ciências agrárias e veterinárias FCAVJ-
UNESP para obtenção do Grau de
Mestre em Microbiologia Agropecuária.

Tiago Henrique Rombola

Orientador: Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
2008

R762i Rombola, Tiago Henrique
Indução da Expressão e Caracterização de uma possível
fosfatase ácida ligada à membrana produzida por *Burkholderia* sp. /
Tiago Henrique Rombola. – Jaboticabal, 2008
iv, 36 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior
Banca examinadora: Pietro Ciancaglini, Maria Inês Tiraboschi Ferro
Bibliografia

1. Fosfatase ácida. 2. Parâmetros Cinéticos. 3. Purificação. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.461.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TIAGO HENRIQUE ROMBOLA – nascido em Jaboticabal – SP aos 12 de Novembro de 1982, filho de Luiz Carlos Rombola e Maria Aparecida Lopes Rombola. Graduado em Biomedicina pelo Centro Universitário de Araraquara –UNIARA- em Araraquara no ano de 2005.

SUMÁRIO

	Página.
1. Introdução.	1
1.1 Objetivos	7
2 Materiais e Métodos.	8
2.1 Isolamento e identificação da bactéria <i>Burkholderia sp.</i>	8
2.2 Meio de Manutenção do Microrganismo .	8
2.3 Meio de indução da produção de Fosfatase Ácida.	8
2.4 Obtenção da possível fosfatase ácida ligada à membrana.	8
2.5 Obtenção da fração de membrana .	8
2.6 Determinação de atividade fosfomonohidrolase da Fosfatase ácida. .	9
2.7 Determinação da atividade de pirofosfatase da fosfatase ácida ligada à membrana.	9
2.8 Dosagem de Proteínas	9
2.9 Efeito do pH sobre a atividade da fosfatase ácida	9
2.10 Estabilidade da Amostra	10
2.11 Efeito da concentração do substrato sobre o pH na atividade da fosfatase ácida	10
2.12 Efeito da Temperatura sobre a Fosfatase ácida ligada à membrana	10
2.13 Inativação térmica da fosfatase ácida ligada à membrana	10
2.14 Efeito de diferentes inibidores sobre a atividade da fosfatase ácida Purificada	11
2.15 Determinação dos parâmetros cinéticos.	11
3 Resultados	12
4 Discussão	24
5 Conclusões	27
6 Bibliografia	28

ABREVIACÕES UTILIZADAS.

AMPOL

Km

n

PNFF

Tris

v

V

2- amino- 2- metil- 1- propanol

Constante de Michaelis

Coeficiente de Hill

P-nitrofenilfosfato

Tris-(hidroximetil)-aminometano

Velocidade inicial

Velocidade máxima.

Expressão e Caracterização da fosfatase ácida ligada à membrana produzida por *Burkholderia* sp.

ROMBOLA, T.H¹., PEDRINHO, E.A.N¹., LEMOS, E.G.M¹., PIZAUAUO, J.M¹.

¹Depto. Tecnologia, FCAVJ-UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900 - Jaboticabal-SP-Brasil. jpizauro@fcav.unesp.br; tiago_hr@yahoo.com.br.

Espécies de *Burkholderia* filogeneticamente distantes do complexo *B. cepacia*, são versáteis solubilizadores de minerais insolúveis, através da produção de ácidos, viabilizando nutrientes para as plantas. Descrevemos a purificação e caracterização da fosfatase ácida ligada à membrana, produzida pela bactéria do gênero *Burkholderia*, isolada de solo agrícola em Ponta grossa-PR-BRASIL, e identificada através da análise do 16s rDNA. A expressão da enzima se mostrou estritamente dependente ao fósforo (expressão ótima a 5 mM). A enzima ligada à membrana foi purificada por ultracentrifugação a 100.000g por 1 hora a 4°C e testada com atividade enzimática para p-nitrofenilfosfato (PNFF) e Pirofosfato. O pH ótimo da enzima foi 6 e não foi afetado pela concentração de PNFF. Em pH 6 a hidrólise do PNFF seguiu os seguintes parâmetros cinéticos com $n=1.5$, $V_m= 103.8 \text{ U.mg}^{-1}$ e $K_{0.5}=0,06 \text{ mM}$ em uma faixa de 0,003 e 10 mM de PNFF. Estudos do pH sobre os parâmetros cinéticos demonstraram 26 pontos de variação na faixa de 3,5 a 6 e em seguida diminui até pH 8 enquanto $K_{0.5}$ não mostrou variação nesta faixa. O ΔH para hidrólise do PNFF foi de $5,74 \text{ kcal.mol}^{-1}$. A atividade PNFFase foi inibida pelo arsenato e Cálcio, mas não por levamisol, EDTA, zinco e cobalto. A hidrólise do pirofosfato na presença de 2 mM de MgCl_2 seguiu os parâmetros cinéticos de "Michaelis-Menten" com $K_m= 0.142 \text{ mM}$ e $V_m= 237 \text{ U.mg}^{-1}$. Os resultados sugerem que a produção da fosfatase ácida ligada à membrana pode ser um mecanismo de solubilização de fosfato mineral por essa bactéria.

Palavras chave: Fosfatase ácida; pirofosfatase ; p-nitrofenilfosfato.

Suporte financeiro: FAPESP, CNPq e CAPES.

INDUCTION OF EXPRESSION AND KINETIC CHARACTERIZATION OF MEMBRANE-BOUND ACID PHOSPHATASE PRODUCED BY BURKHOLDERIA.

ROMBOLA, T.H.¹, PEDRINHO, E.A.N.¹, LEMOS, E.GM.¹, PIZAURO, J.M.¹

¹Depto.Tecnologia, FCAVJ-UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n,
14884-900 - Jaboticabal-SP-Brasil. jpizauro@fcav.unesp.br, tiago_hr@yahoo.com.br.

Burkholderia species phylogenetically greatly distant from the *B. cepacia* complex species are versatile organisms that solubilize insoluble minerals through the production of acids, increasing the availability of nutrients to plants. Here we describe the purification and characterization a membrane-bound acid phosphatase produced by bulkholderia isolated from an agricultural soil in Ponta grossa-PR-BRASIL and identified through analysis of the 16S rDNA gene. The expression of this enzyme was demonstrated to be strictly regulated by phosphorus (optimal expression at 5 mM). The membrane bound enzyme was purified by centrifugation at 100.000g for 1 h at 4°C and the enzyme was assayed for p-Nitrophenyl phosphatase (PNPPase) and pyrophosphatase activities. The optimal pH (6.0) was not affect by p-Nitrophenyl phosphate concentration. At pH 6.0 the hydrolysis of PNPP following a cooperative kinetics with $n = 1.5$, $V_m = 103.8 \text{ U.mg}^{-1}$ and $K_{0.5} = 0.60 \text{ mM}$ in the range between 0.003 and 10 mM. Studies of pH effects on kinetics parameters revealed a 26-folds variation in the range of pH 3.5 to 6 following decreases until pH 8.0, wile $K_{0.5}$ and cooperativity did not varied considerably in this range. The ΔH for hydrolysis of PNPP was $5,74 \text{ kcal.mol}^{-1}$. PNPPase activity was inhibited by arsenate, phosphate and calcium, but not for levamisole, EDTA, zinc, magnesium and cobalt. The hydrolysis of pyrophosphate in presence of 2 mM MgCl_2 follows "Michaelis-Menten" kinetics with $K_m = 0.142 \text{ mM}$ and $V_m = 237 \text{ U.mg}^{-1}$. Our results suggesting that the production of membrane-bound acid phosphatase might be one mechanism of mineral phosphate solubilization by this genus of Bacterium.

Key-words: acid phosphatase, pyrophosphatase, p-nitrophenyl phosphate.

1- Introdução

Estudos da sequência do rRNA16S, valores de homologia do DNA-DNA da composição dos ácidos graxos e lipídios celulares e características fenotípicas mostraram que o gênero *Pseudomonas* era constituído por organismos filogeneticamente muito distintos e que eles poderiam ser dividido em 5 grupos (Yabuuchi et al., 1992). O grupo I foi o único aceito como o verdadeiro gênero *Pseudomonas* e novos gêneros foram criados. Sete espécies do gênero *Pseudomonas spp* foram transferidas para o novo gênero denominado *Burkholderia*, incluindo *Burkholderia cepacia* (Palleroni e Holmes 1981), *Burkholderia caryophylli* (Burkholder, 1942), *Burkholderia gladioli* (Severini, 1913), e *Burkholderia solanacearum* (Smith, 1911). as espécies do grupo III são atualmente incluídas dentro dos gêneros *Acidovorax* (*Acidovorax delafieldii*, *Acidovorax facilis*), *Comamonas* (*Comamonas testosteroni*), *Delftia* (*Delftia acidovorans*) ou *Pelomonas* (*Pelomonas saccharophila*); as espécies do grupo IV foram reclassificadas dentro do gênero *Brevundimonas* (*Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas vesicularis*); e a única espécie do grupo V é atualmente denominada *Stenotrophomonas maltophilia* (YABUUCHI et al., 1995; COENYE e VANDAMME, 2003).

Desde sua criação em 1992, a lista de espécies do gênero *burkholderia* mudou varias vezes. Muitas espécies foram removidas (Yabuuchi et al., 1995) e outras foram inseridas (Gillis et al., 1995; Viallard et al., 1998).

Filogeneticamente, o gênero *Burkholderia* pertence ao grupo β - Proteobactérias e inclui mais de 30 espécies que ocupam nichos ecológicos distintos desde o solo ao trato respiratório do homem. O complexo da *Burkholderia cepacia*, constituído de 9 genovares, encontra-se amplamente distribuído na natureza e tem sido encontrado no solo, na água (incluindo água do mar), rizosfera de plantas, nos seres humanos e em diversas espécies animais e no ambiente hospitalar. (COENYE e VANDAMME, 2003).

Tradicionalmente, as espécies de *Burkholderia* são conhecidas como patógenos de plantas e bactérias do solo, infelizmente, algumas espécies estão envolvidas em infecções humanas, e por questões relativas à segurança, estas infecções humanas são o que dificultam as aplicações biotecnológicas, à maioria das espécies *Burkholderia*. Atualmente

são conhecidas como bactérias do solo, que apresentam diferentes tipos de interações não-patogênicas com plantas. (COENYE e VANDAMME, 2003).

Interações entre *Burkholderias* e seres humanos ou aos animais são atribuídas as cepas, *B. mallei* e *B. pseudomallei*. Que causam mormo em cavalos, mulas e burros, e foi utilizada como uma das primeiras armas biológicas do século 20, sendo usado pela Alemanha durante a Primeira Guerra Mundial (WHEELIS, 1998; COENYE e VANDAMME, 2003). Mormo nos seres humanos é adquirido a partir de animais infectados ou pelo contacto com os organismos que causam mormo através da ingestão ou inalação (PALLERONI, 1984; COENYE e VANDAMME, 2003). *Burkholderia pseudomallei* é o agente etiológico da mieloidose em seres humanos e animais, e é endêmica a Ásia do Sudeste, Norte da Austrália e de regiões temperadas que a fronteira do equador (DANCE, 2000; COENYE e VANDAMME, 2003). Entretanto, as maiorias das burkholderias não são patogênicas e podem promover o crescimento em plantas pela fixação biológica do nitrogênio e produção de fitoônmonios. Além disso, varias espécies tem sido utilizadas em biorremediação, controle biológico e na industria para a produção de biopolímeros.

Várias espécies de *Burkholderia* desenvolveram interações benéficas com as plantas, sendo capazes de colonizar raízes, caule e folhas. Nesse sentido tais bactérias têm sido exploradas no biocontrole, bioremediação e na promoção de crescimento de planta. A capacidade de fixar nitrogênio atmosférico é atribuída a diversas Burkholderias, incluindo espécies, como *Burkholderia vietnamiensis* e *Burkholderia kururiensis*. O nome *B.kururiensis* foi proposto a uma única cepa isolada de um aquífero poluído com tricloroetileno (ZHANG et al., 2000; GILLIS et al., 1995; MAGALHÃES CRUZ et al., 2001; ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2001; COENYE e VANDAMME, 2003), algumas espécies denominadas como *Burkholderia tropicalis* e *Burkholderia brasiliensis*, e outras que ainda não foram classificadas como representantes de cepas de novas espécies (ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2001; COENYE e VANDAMME, 2003).

Cepas do complexo *Burkholderia cepacia* tem sido utilizadas no controle de doenças de raiz e mudas “in vitro”. Além disso, testes de campo demonstraram que essas estirpes podem colonizar a rizosfera de diversas culturas, incluindo milho, arroz, ervilha, girassol e rabanete, e assim, aumentam significativamente o rendimento agrícola (Parke et

al., 1991; MCLOUGHLIN et al., 1992; BOWERS e PARKE, 1993; HEBBAR et al., 1998; TRAN VAN et al., 2000; COENYE e VANDAMME, 2003).

A versatilidade metabólica do complexo *B. cepacia* e estirpes que pertencem a outras espécies de *Burkholderia* vêm sendo utilizadas para fins de biorremediação. Constituintes de óleos brutos [incluindo compostos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos], herbicidas (incluindo ácido 2,4-diclorofenoxiacético e ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, o principal componente do Agente Laranja) e derivados de éter utilizados como aditivos na gasolina podem ser degradados por cepas de *Burkholderia* isoladas (KIL BANE et al., 1982; FOLSOM et al., 1990; KRUMME et al., 1993; BHAT et al., 1994; COENYE e VANDAMME, 2003).

Embora filogeneticamente bem definido, o gênero *Burkholderia* é um gênero funcionalmente diverso. O conteúdo molecular e fisiológico desta diversidade e sua adaptabilidade são em grande parte desconhecidos (COENYE e VANDAMME, 2003). Além disso, pouco se sabe sobre os fatores que determinam a virulência, sugerindo que uma identificação correta pode representar a primeira fase para a avaliação de risco e controle da infecção. A maioria dos genomas de espécies de *Burkholderia* (incluindo o complexo de espécies *B. cepacia*, *B. glumae*, *B. glathei*, *B. gladioli* e sp. LB400) consistem de dois a quatro replicas circulares (CHENG E LESSIE, 1994; RODLEY et al., 1995; LESSIE et al., 1996; WIGLEY e BURTON, 2000; PARKE e GURIAN-SHERMAN, 2001; COENYE e VANDAMME, 2003).

Além disso, várias espécies *Burkholderia* abrigam uma ampla gama de inserções genéticas, que podem estar envolvidos em rearranjos genômicos e na regulação da expressão genética (LESSIE et al., 1996; TYLER et al., 1996; COENYE e VANDAMME, 2003).

Várias cepas de *Burkholderia* possuem potenciais de aplicações em biorremediação são extremamente bem estudadas, mas biotecnologicamente e taxonomicamente ainda não estão perfeitamente caracterizadas (COENYE e VANDAMME 2003).

As espécies *Burkholderia* colonizam diversos nichos ecológicos, desde plantas, solos contaminados e seres humanos. Apresentam interações patogênicas e simbióticas com plantas, entretanto em algumas circunstâncias atuam como agentes patogênicos oportunistas em seres humanos. Apesar de não ser considerados importantes agentes

patogênicos para a população humana algumas são consideradas graves ameaças para pacientes com fibrose cística, estas incluem todas as espécies do complexo *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli* e *Burkholderia fungorum*. (COENYE e VANDAMME, 2003). Atualmente novas espécies de *Burkholderia* fixadoras de nitrogênio e filogeneticamente distante das espécies do complexo *Burkholderia cepacia*, tem sido descobertas e consideradas candidatas promissoras para aplicações biotecnológicas, embora sua distribuição ambiental e possível aplicações agro-biotecnológico são poucos conhecido. (COENYE e VANDAMME, 2003).

B. cepacia foi a primeira espécie descrita como causadora de podridão em casca de cebola. Algumas estirpes de *Burkholderia sp* têm sido estudadas como microorganismos solubilizadores de fosfato, *Burkholderia cepacia* CC-A174 foi capaz de solubilizar fosfato tricálcico, devido à sua produção de ácidos orgânicos. Há relatos que cepas de *Burkholderia cepacia* estão envolvidas na remoção de fosfatos e acúmulo de poli fosfatos, sob condições de baixo pH, (MULLAN et al, 2002).

O Fósforo participa em muitas reações que mantém as plantas e os animais vivos, ele é parte de compostos essenciais na fotossíntese dos vegetais, para transformações energéticas e para a atividade de alguns hormônios tanto nos animais como nas plantas (DINKELAKER e MARSCHNER. 1992).

Naturalmente encontrado no solo, mas comparado com a maioria dos outros nutrientes, o fósforo é de longe o menos disponível para os vegetais (KLUG. e TIEDJE, 1994). O fosfato é encontrado em duas diferentes formas, inorgânica e orgânica, seus níveis diminuem pelo fato dele ser absorvido pelas partículas ou lavado por chuvas em excesso. As águas nos solos usualmente contêm cerca de 0,05 mg/L de fósforo em solução, isto é equivalente a 15g dele em um hectare, concentração essa muito baixa se comparada com as necessidades das plantas (DAHAL, 1977).

O processo tradicional de se usar fertilizantes fosforados é considerado indesejável ultimamente, devido liberação de alguns contaminantes relacionados a esses produtos que apresentam um grande potencial de se contaminar as águas e o ar, sendo assim grandes poluidores do meio ambiente (VASSILEV e VASSILEVA 2003).

Através de reações de solubilização do fósforo inorgânico e mineralização do fósforo orgânico, os microrganismos formam fosfato solúvel para o desenvolvimento das plantas (BERTOM et al, 1997).

Bactérias têm várias enzimas capazes de desfosforilar compostos orgânicos, que desempenham papéis essenciais ou acessórios na fisiologia celular (Uerkvitz , 1988).

Estima-se que a população de microrganismos solubilizadores de fosfatos existente nos solos está entre 10^4 e 10^7 g⁻¹ de solo (SILVA FILHO, 1998). Os microrganismos responsáveis por essa solubilização do fósforo são aqueles que produzem enzimas genericamente conhecidas pelo nome de fosfatases (FEDER, 1973), ou a fazem através da produção de ácidos secretados no meio (MULLAN et al, 2002).

Quase todos os processos bioquímicos no meio ambiente envolvem microrganismos, que têm um papel único no funcionamento do ecossistema e manutenção da sustentabilidade na biosfera. Os microrganismos são muito conhecidos por sua habilidade de realizar reações bioquímicas, e por disponibilizar elementos nutricionais para as plantas e animais (PAUL e CLARK 1989).

Fosfatases ácidas não específicas Bacterianas, são enzimas secretadas, produzidas como proteínas periplasmáticas solúveis ou como lipo-proteínas ligadas à membrana, que geralmente são capazes de desfosforilar uma ampla variedade de substratos estruturalmente independentes e exibem atividade catalítica ótima em valores de pH ácidos e neutros. (ROSSOLINI et al., 1998). São proteínas monoméricas ou oligoméricas contendo polipeptídeos componentes com um tamanho de 25-30 kDa, baseado na seqüência de aminoácidos relatados. (ROSSOLINI et al., 1998).

As fosfatases bacterianas são enzimas secretadas, produzidas como proteínas periplasmáticas solúveis ou proteínas ligadas à membrana, que geralmente são capazes de desfosforilar uma estrutura de um substrato e exibir uma atividade catalítica (ROSSOLINI et al, 1994). Muitas das enzimas fosfatases microbianas são secretadas para fora da membrana plasmática, onde são liberadas em forma solúvel, outras são mantidas ligadas a membrana (BEACHAM, 1979; WANNER, 1996) e outras ainda encontradas no citoplasma e estão envolvidas em reações de desfosforilação que ocorrem durante sinais de transdução e vias metabólicas dos microrganismos (STOCK et al 1995).

A classificação das fosfatases, incluindo as bacterianas é baseada em critérios bioquímicos e biofísicos da enzima, como pH ótimo (ácido, alcalino ou neutro), substrato (específico ou não específico) e no tamanho molecular. Seguindo critério de pH ótimo as fosfatases são divididas em dois grandes grupos, o das fosfatases alcalinas, com pH ótimo na faixa de 8 a 10,5 e o das fosfatases ácidas com pH ótimo de 2,5 a 6 (DVORAK et al, 1988). Como, exemplo de fosfatases ácidas temos a fosfatase ácida da *Escherichia coli* com pH ótimo em 2,5 (TOUATI e DANCHIN 1987), a de *Mycobacterium tuberculosis* pH 6,5 (SALEH e BELISLE 2000), a de *Streptococcus equisimilis* com pH 5 (MALKE, 1998) e a da *Escherichia blattae* com pH 6,0 (ISIKAWA, et al, 2000). E de acordo com peso molecular as fosfatases podem apresentar diferenças, possuindo alto ou baixo peso molecular (BAIROCH et al, 1995). Alguns estudos demonstram que diferentes bactérias apresentam a produção de fosfatases ácidas contendo um baixo peso molecular (25 a 30 Kda), mesmo essas pertencendo a gêneros diferentes (THALLER et al, 1995), como a fosfatase ácida da *E. coli* com 25 Kda (DVORAK et al, 1988), a de *Salmonella entéric* e *S. typhimurium*, ambas com 25 Kda (KIER et al, 1977; UERKVITZ, 1988) e a de *Prevotella intermédia* com 28 Kda (CHEN, et al, 1999).

Portanto, muitos pesquisadores têm procurado uma maneira de se utilizar esses microrganismos na produção de biofertilizantes, para suprir o esta necessidade de fósforo por meio destes microrganismos solubilizadores, sendo esta uma possível saída para cessar o uso de fertilizantes poluentes (BANIK, 1983; BERTHELIN ET AL, 1991), por isso, durante anos, microrganismos despertam os interesses de microbiologistas e ecólogos, por apresentarem uma opção diferente para a solubilização do fósforo (GOLDSTEIN et al, 1993).

O interesse em fosfohidrolases bacterianas não está apenas relacionado às suas múltiplas funções na biologia das células de procarióticos e para a suas participações ocasionais na patogenicidade microbiana, mas também para a possibilidade de explorar estas enzimas como instrumentos de investigação em enzimologia (KIM e WYCKOFF, 1991; OStanin et al , 1992; ROSSOLINI et al., 1998), na regulação dos genes expressão (Makino et al, 1994; Touati et al, 1987; ROSSOLINI et al., 1998); paradigmas para a evolução molecular (COCKS e WILSON, 1972; DASSA et al 1990; ROSSOLINI et al., 1998) ; marcadores para a taxonomia bacteriana e de identificação (SHIBATA et al 1986,

THALLER et al 1992, ROSSOLINI et al., 1998) ; marcadores em imunologia e biologia molecular(AVRAMEAS 1969; ROSSOLINI et al., 1998); ferramentas para a biorremediação em microbiologia ambiental (MACASKIE, 1990; MACASKIE et al, 1992; ROSSOLINI et al., 1998).

Por isso, o estudo das fosfatases microbianas, continua a ser um campo ativo, com relevância para os diversos aspectos da fisiologia microbiana e biotecnologia (ROSSOLINI et al., 1998).

1.1. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram os de expressar e caracterizar cineticamente uma possível fosfatase ácida ligada à membrana produzida pela bactéria do gênero *Burkholderia*

2. Materiais e Métodos:

2.1. Isolamento e identificação da bactéria *Burkholderia sp.*

O microrganismo utilizado no presente trabalho foi isolado da raiz de uma plântula de *Zea mays* da região de Ponta Grossa-PR, e identificado através do sequenciamento do gene 16s rDNA, como sendo do gênero *Burkholderia* (SILVEIRA et al., 2006; PEREIRA et al., 2006).

2.2. Meio de Manutenção do Microrganismo.

O microrganismo foi mantido em placas de petri com meio de cultura sólido contendo glicose (2 g/L), peptona (1,5 g/L), extrato de levedura (2 g/L), KH_2PO_4 (0,5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L), ácido glutâmico (1,5 g/L), agar (9g/L), pH em 6,8, em estufa B.O.D a 30° C.

2.3. Meio de indução da produção de Fosfatase Ácida.

Para a indução da fosfatase, o microrganismo foi cultivado em meio líquido constituído de glicose (20 g/L), $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (1 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,25 g/L), KCl (0,2 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0 g/L), em pH 6,8., contendo diferentes concentrações de fósforo solúvel (0 a 5mM).

2.4. Obtenção da possível fosfatase ácida ligada à membrana.

Após 3 dias de incubação a 30° C em agitação (140 rpm), as bactérias foram recuperadas através de centrifugação a 10.000 x g, a 4°C, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as células bacterianas foi resuspendido, em uma proporção de uma parte de precipitado para oito de tampão acetato 0.059M pH 6,0, submetido à ultra sonicação, no aparelho Branson sonifier 250, a 50 micropulsos por minuto com ciclos de 30 segundos para rompimento das células.

2.5. Obtenção da fração de membrana:

Após o rompimento a amostra foi centrifugada a 10.000 x g, 4°C, durante 10 minutos, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi centrifugado a 100000 x g, 4°C, por 1 hora. Findo tal período o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi resuspendido

em tampão acetato 0.059 M, pH 6,0 com o auxílio de um homogeneizador tipo Potter, dividido em alíquotas de 1 mL, congelado em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C , para posterior estudos de estabilidade térmica e caracterização cinética.

2.6. Determinação de atividade fosfomonohidrolase da possível Fosfatase ácida.

A atividade paranitrofenilfosfatásica da fosfatase ácida foi determinada descontinuamente, a 37°C , em meio de reação contendo tampão acetato 0,059M, em pH 6,0 e PNFF 10 mM, MgCl_2 100 mM e água, em um volume final de 1mL. A reação foi iniciada pela adição da fração de membrana (0,08mg/mL) e interrompida pela adição de 1mL de NaOH 1M em tempos previamente estabelecidos. O p-nitrofenolato ($\epsilon = 17.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pH 13) liberado foi quantificado pela leitura da absorbância em 410 nm em um espectrofotômetro Hitachi U-2000.

2.7. Determinação da atividade de pirofosfatase da possível fosfatase ácida ligada à membrana.

A atividade de pirofosfatase (Ppiase) da fosfatase ácida ligada à membrana foi determinada descontinuamente a 37°C , através da dosagem do fosfato liberado segundo o método de Heinonen and Lahti (1981). A reação foi iniciada pela adição da fração de membrana (0,08mg/mL) no meio de reação contendo tampão acetato 0,059 M, em pH 6 e MgCl_2 100mM em um volume final de 1 mL. Em tempos pré-estabelecidos a reação foi interrompida pela adição de 0.5 mL de solução gelada de ácido tricloroacético (TCA) 50% (p/v). Em cada experimento foram incluídos controles, sem a enzima, para se estimar a hidrólise espontânea do substrato.

Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida arbitrariamente como sendo 1 nmol de fosfato liberado por minuto, nas condições padrões do teste.

2.8. Dosagem de Proteínas:

As determinações de concentração de proteína foram realizadas pelo método de Lowry, modificado por Hartree (1972). As determinações foram feitas, sempre em duplicata, utilizando-se soro albumina bovina fração IV como padrão. A concentração de proteína foi estimada a partir da regressão linear dos valores da curva padrão.

2.9. Efeito do pH sobre a atividade da possível fosfatase ácida ligada à membrana.

O estudo do efeito do pH ótimo aparente sobre a atividade da fosfatase ácida da bactéria *Burkholderia*, foi realizado utilizando-se tampão acetato 0,059M (pH 3,5 a 6,5), Tris 0,059M (pH7,0), AMPOL 0,059 M (pH 9 e 10), e em concentração de PNFF 100 mM. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio de reação e a atividade paranitrofenilfosfatásica foi determinada conforme descrito em 2.6.

2.10. Estabilidade da Amostra:

As amostras de fração de membrana foram submetidas à estocagem a 4°C e a -20°C, por um período de 30 dias.

2.11. Efeito da concentração do substrato sobre o pH na atividade da possível fosfatase ácida ligada à membrana:

O efeito da concentração do PNFF sobre a atividade da fosfatase ácida foi estudado utilizando-se tampão acetato 0,059M (pH 3,5 a 6,5), Tris 0,059M (pH7,0), AMPOL 0,059 M (pH 9 e 10). A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio de reação contendo tampão adequado 0.059M e concentrações de PNFF compreendidas entre 0,001 a 10 mM sendo interrompida pela adição de 1mL de NaOH 1M em tempos previamente estabelecidos. A atividade de fosfomonohidrolase da enzima foi determinada através da formação do íon p-nitrofenolato ($\epsilon = 17.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 410nm, pH 13).

Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de fosfatase ácida que hidrolisa 1 nM de PNF por minuto, a 37°C.

2.12. Efeito da Temperatura sobre a atividade da possível Fosfatase ácida ligada à membrana.

O estudo foi realizado em tampão acetato 0,059 mM em pH 6,0 contendo MgCl_2 2mM e concentrações de PNFF compreendidas entre 0,001 a 10 mM, para temperaturas entre 25 a 70° C, e calculado o ΔH de ativação através da equação de Arrhenius.

A reação foi iniciada pela adição de 40 μl (0,08 mg/ mL) da enzima em meio reacional e a atividade foi determinada conforme descrito em 2.6.

2.13. Inativação térmica da possível fosfatase ácida ligada à membrana.

O estudo de inativação térmica da fosfatase ácida ligada à membrana foi realizado em tampão acetato 0.059 mM, pH 6, contendo MgCl_2 100 mM e PNFF 100 mM. A enzima (2 mg/ml), em tampão acetato 0.059 mM, pH 6, foi incubada em temperaturas compreendidas entre 50 e 70°C e em tempos previamente estabelecidos, foram retiradas alíquotas de 40 μl (0,08 mg/mL) que foram mantidas em banho de gelo durante um minuto. Finalmente, a atividade para PNFFase foi determinada conforme descrito em 2.6.

2.14. Efeito de diferentes inibidores sobre a atividade da possível fosfatase ácida Purificada.

A ação de diferentes inibidores sobre a atividade da fosfatase ácida foi estudada utilizando-se concentrações de inibidores compreendidas entre 1 e 10 mM. As soluções dos inibidores foram preparadas em tampão acetato 0,059 M em pH 6. A atividade residual foi determinada após a incubação da enzima a 37° C com os inibidores nas concentrações descritas por 1 hora, e realizadas conforme descrito em 2.6..

2.15. Determinação dos parâmetros cinéticos.

A determinação dos parâmetros cinéticos foi realizada através do programa Sigrafw (Windows version 2.0) de autoria de LEONE, F.A., BARANAUSKAS, J.A., FURRIEL, R.P.M. e BORIN, I.A., departamento de química da, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3. Resultados

O estudo do efeito da concentração de fósforo na produção da possível enzima por burkholderia é mostrado na (**Figura 1**). Conforme pode ser observado a concentração ideal de fósforo para a produção da enzima foi de 5 mM, sugerindo que a produção é dependente da concentração de fósforo no meio de cultivo.

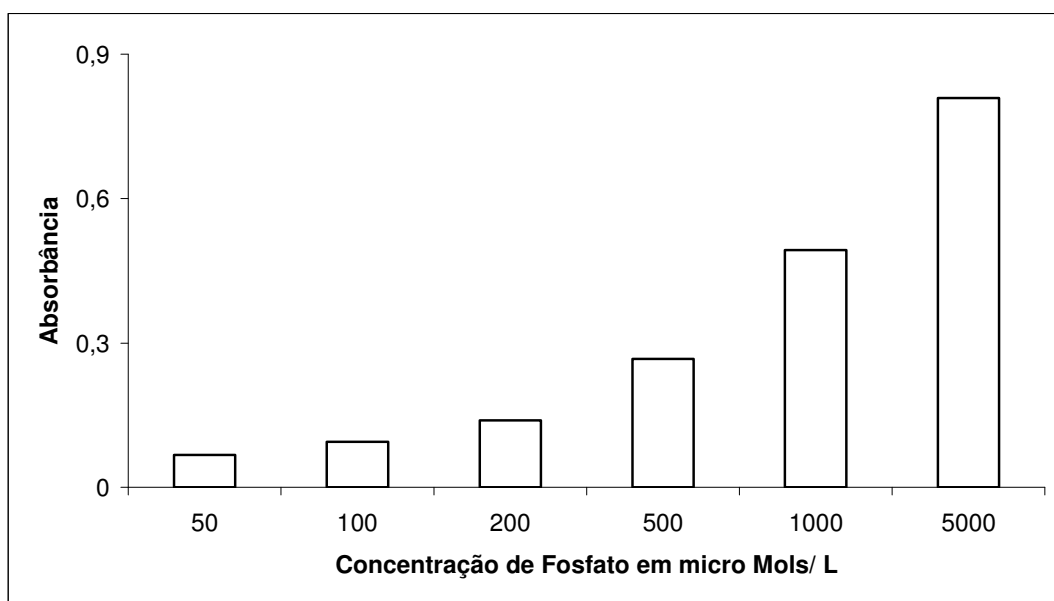


Figura 1: Produção da enzima em diferentes concentrações de fosfato (0 a 5 mM), atividade determinada em tampão acetato 0,059 M a 37°C em pH 6 e iniciada pela adição da fração de membrana (0,03mg de proteína).

A obtenção da fração de membrana da bactéria foi feita através de centrifugações. As células do meio de cultivo foram obtidas intactas por centrifugação a 10.000xg, por 10 minutos, a 4°C. A seguir o precipitado obtido foi resuspendido em tampão acetato 0,059 mM, e as células foram rompidas pelo processo de ultrasonicação, centrifugadas a 10.000 g para retirar aquelas que não foram rompidas e o sobrenadante foi centrifugação a 100 000g a 4°C por 1 hora. Finalmente a membrana presente no precipitado foi ressuspendida em tampão acetato e utilizada em todos os experimentos do presente trabalho. Na Tabela I são mostrados os valores de proteína total, atividade PNFFase da fosfatase acida, fator de recuperação e de purificação obtidos durante o procedimento de obtenção da enzima ligada á membrana.

Tabela I: Purificação da fosfatase ácida ligada a membrana por meio de centrifugação.

Etapas	Proteína total (mg/ml)	Atividade U/mg (nmoles/minutos/mg)	(%) Recuperação em atividade	Fator
Extrato Bruto	12.3	125.20	100	1.0
sobrenadante 100000 g	3.5	0.01	2.8	0,1
precipitadoa 100 000g	9.3	139.38	75.5	1.1

O estudo da estabilidade térmica da atividade PNFFásica da enzima ligada a membrana foi estudada armazenando-se as diferentes formas da em diferentes temperaturas (4 e -20 ° C)(Figura 2), por um período de 30 dias (**Figura 2.**)

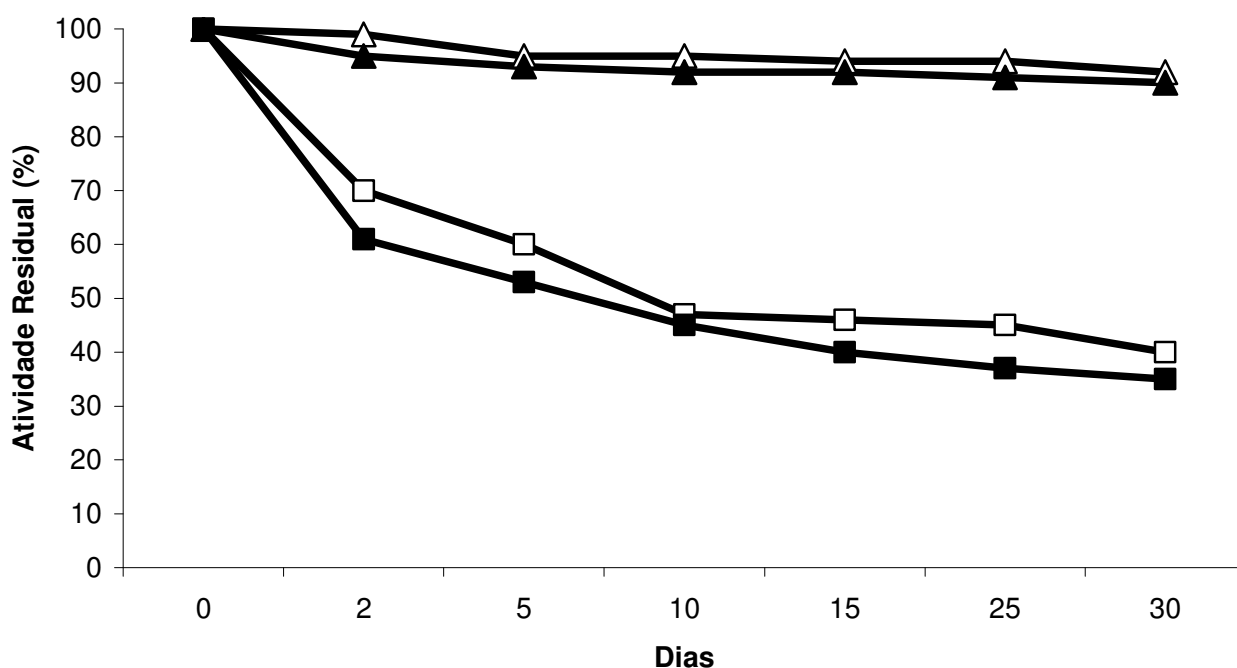


Figura 2: Estabilidade da possível fosfatase ácida: Δ fração de membrana purificada a 4 °C, ▲ fração de membrana purificada a -20°C, □ fração bruta de membrana a 4°C, ■ fração bruta de membrana a -20°C, atividade determinada em tampão acetato 0,059 M a 37°C em pH 6 e iniciada com a adição da fração de membrana (0,08mg/ml).

Como pode se observar à enzima ligada à membrana manteve-se estável por um período maior do que a amostra bruta recém obtida, apresentando mais de 90% de manutenção para sua atividade enzimática por todo o período de 30 dias de armazenamento, enquanto a amostra bruta mostrou-se inalterável perdendo sua atividade rapidamente nos primeiros dois dias e a partir daí o perda da atividade mais lenta, chegando a pouco mais de 40% de sua atividade inicial, sugerindo um comportamento bifásico de enzima de membrana.

O estudo para o pH de atuação da enzima ligada a membrana foi realizado em diferentes pHs (**Figura 3**), variando-se também as diferentes espécies de tampão.

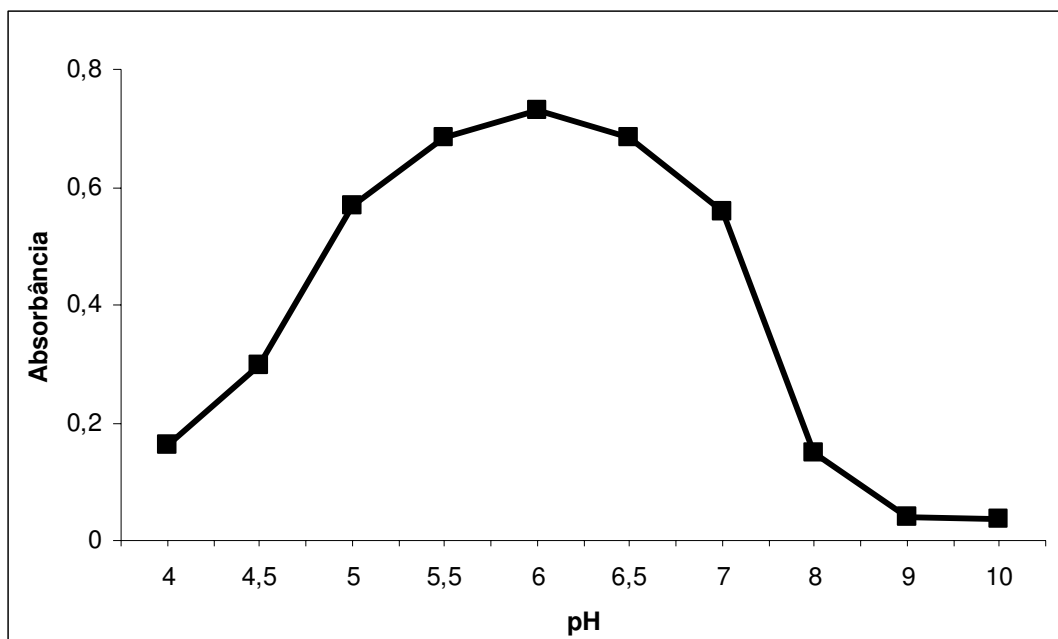


Figura 3: Efeito do pH sobre a atividade da possível fosfatase ácida ligada a membrana. A reação foi iniciada com a adição da fração da enzima (0,08mg/ml) ao meio de reação e interrompida com NaOH.

Observa-se que a atividade enzimática da putativa fosfatase ácida ligada à membrana possui um ótimo de atuação em pH 6. Os resultados obtidos no estudo do efeito da concentração de substrato (PNFF) sobre a atividade da possível fosfatase ácida ligada à membrana (**Figura 4**) confirmou este pH ótimo de atuação e mostrou que a enzima apresenta comportamento “Michaeliano” para a hidrólise desse substrato em todos os pHs estudados. No que tange ao estudo da temperatura os resultados obtidos mostram que apenas a velocidade máxima de atuação [e influenciada pela temperatura, enquanto os valores de k e n permanecem inalterados, enquanto o pH influenciou tanto o K como o V_m .

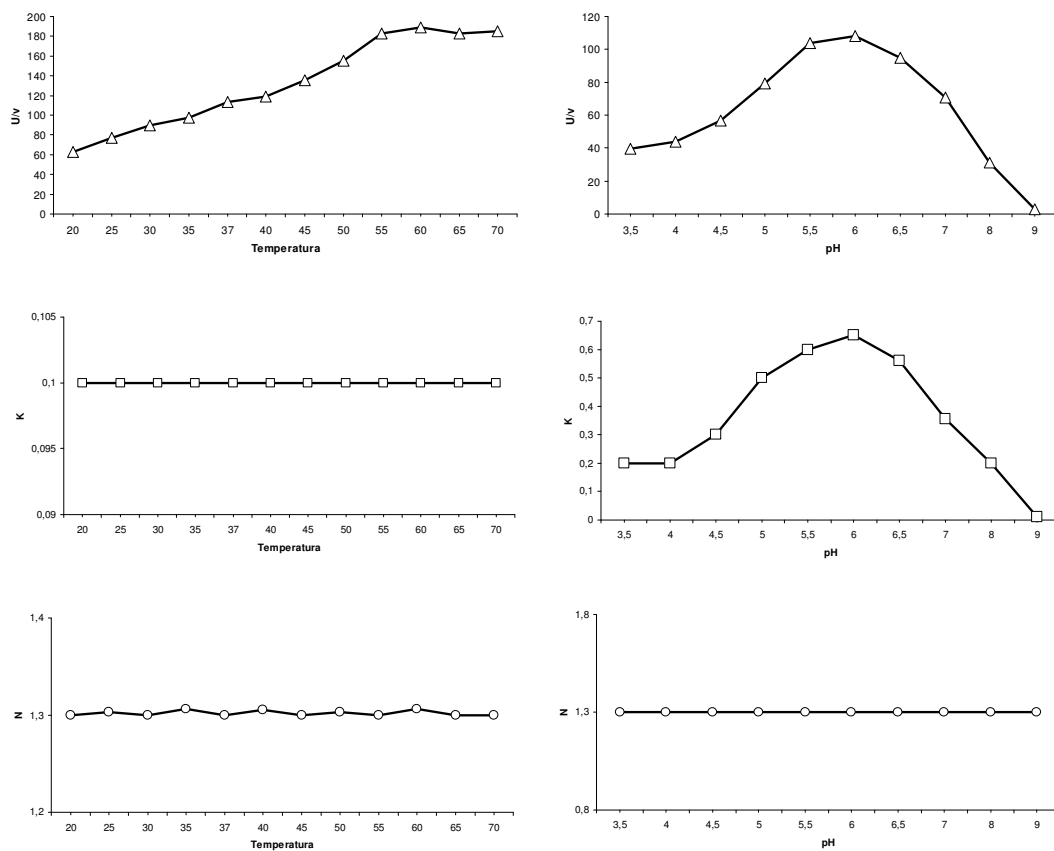


Figura 4: Efeito da Temperatura e pH sobre a concentração de substrato e parâmetros cinéticos da putativa fosfatase ácida purificada: Δ variação da velocidade de reação, $\square$ variação do K e $\circ$ variação do N. Atividade determinada em tampão acetato 0,059 M iniciada com a adição de 0,08mg de fração de membrana, e interrompida com NaOH.

O estudo da concentração do PNFF **Figuras 5** e do Pirofosfato **Figuras** , sobre a atividade da enzima ligada à membrana em seu pH ótimo de atuação revelou que a hidrólise destes ésteres de fosfato ocorre através de uma única classe de sítios de fixação do substrato. A análise dos parâmetros cinéticos obtidos mostra comportamento “Michaeliano” para a hidrólise de ambos os substrato. Esse estudo revelou ainda, que p pirofosfato foi o substrato que apresentou a maior velocidade máxima e o menor valor de Km **Tabela II**.

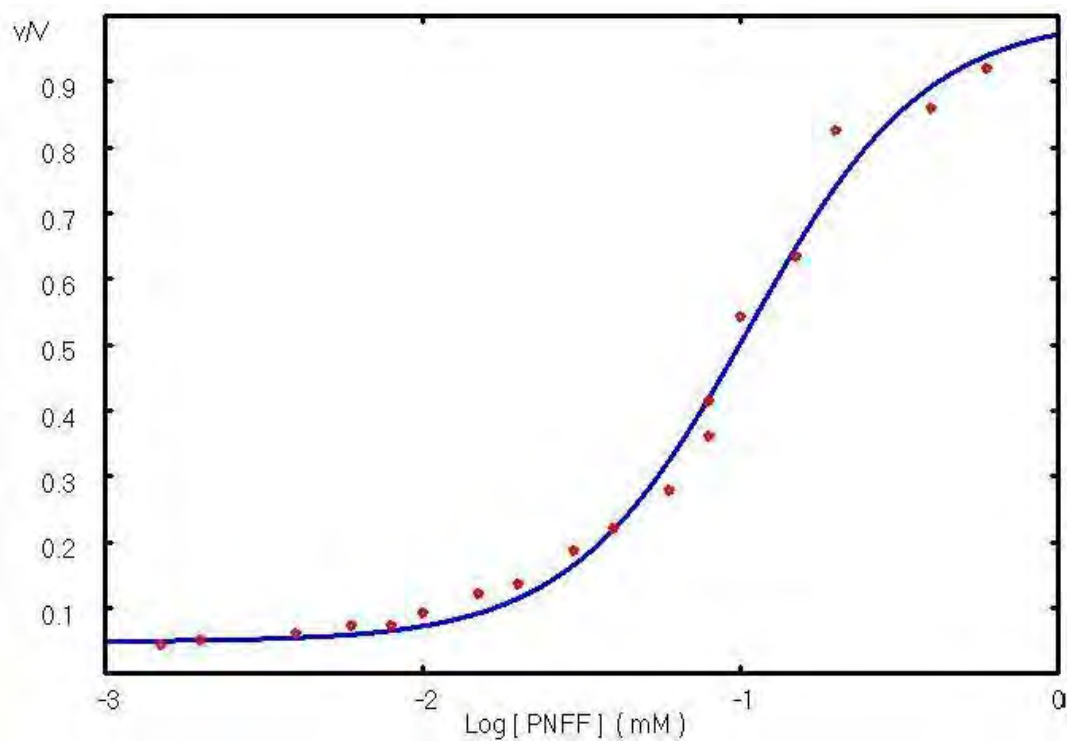


Figura 5: Efeito da concentração de PNFF sobre a putativa fosfatase ácida ligada à membrana em pH 6 a 37°C, atividade determinada em tampão acetato 0,059 mM iniciada com a adição da fração de membrana (0,08mg/ml), e interrompida com NaOH.

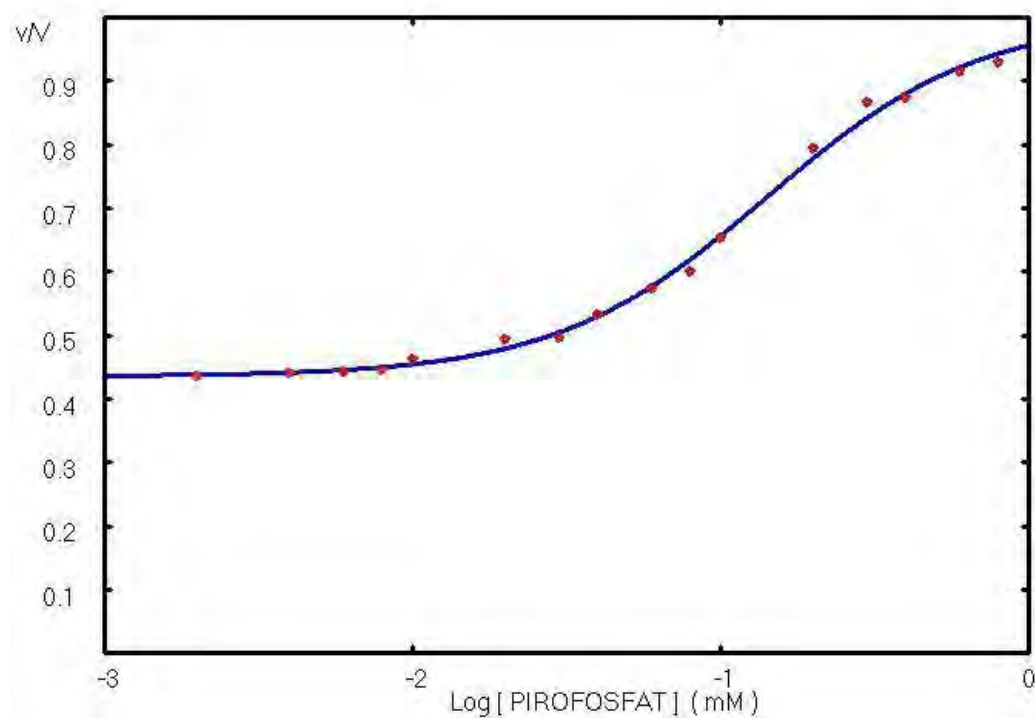


Figura 6: Efeito da concentração de Pirofosfato sobre a putativa fosfatase ácida ligada à membrana em pH 6 a 37°C, atividade determinada em tampão acetato 0,059 mM iniciada com a adição da fração de membrana (0,08mg/ml), e interrompida com NaOH.

Tabela II: Dados cinéticos da enzima frente aos substratos: PNFF e Pirofosfato.

Substrato	pH	V(U.mg ⁻¹)	n _h	K _{0,5} (mM)
PNFF	3,5	39,7	1,3	0,2
PNFF	4,0	44,0	1,3	0,2
PNFF	4,5	56,8	1,3	0,3
PNFF	5,0	79,5	1,3	0,5
PNFF	5,5	103,8	1,3	0,6
PNFF	6,0	113,5	1,3	0,65
PNFF	6,5	95,1	1,3	0,55
PIROFOSFATO	6,0	237	1,3	0,14

A representação de Arrhenius determinada no estudo do efeito da temperatura sobre a hidrólise do PNFF pela fosfatase ácida ligada à membrana revelou um ΔH de 5,74 kcal.mol⁻¹ (Figura 6).

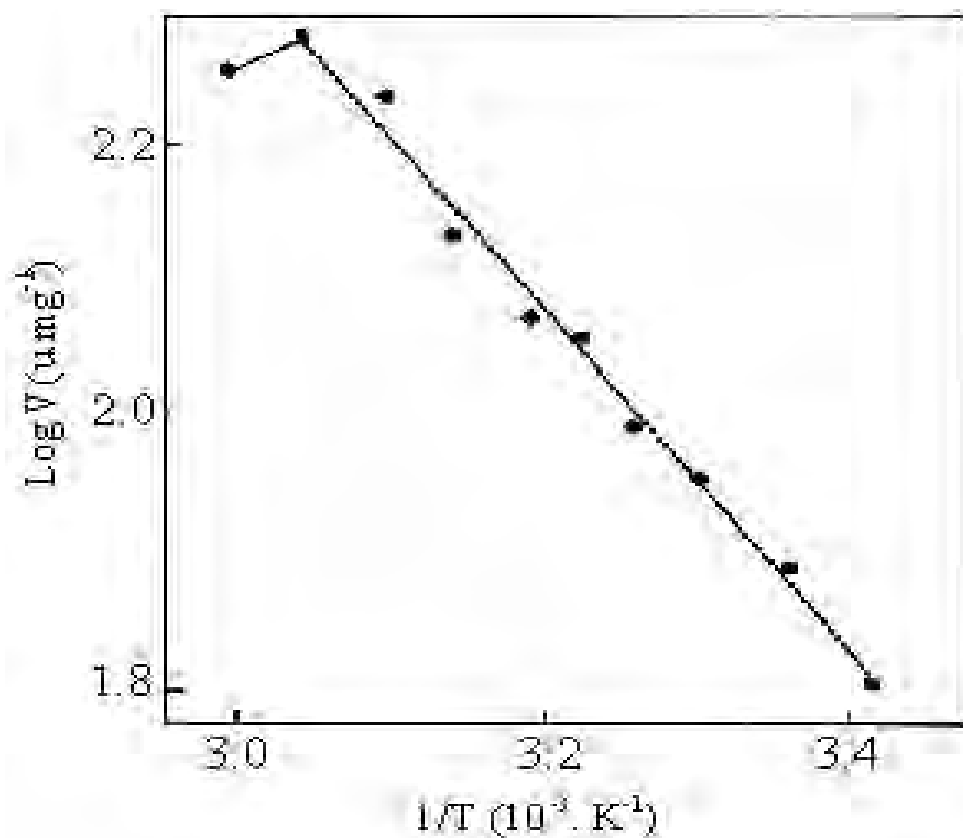


Figura 6: Representação de Arrhenius para a hidrólise do PNFF pela putativa fosfatase ácida ligada à membrana.

O estudo da inativação térmica da possível fosfatase ácida ligada à membrana é demonstrado na Figura 7. As constantes de inativação térmica da putativa fosfatase ácida ligada à membrana e os correspondentes tempos de meia vida são apresentados na tabela III.

I.

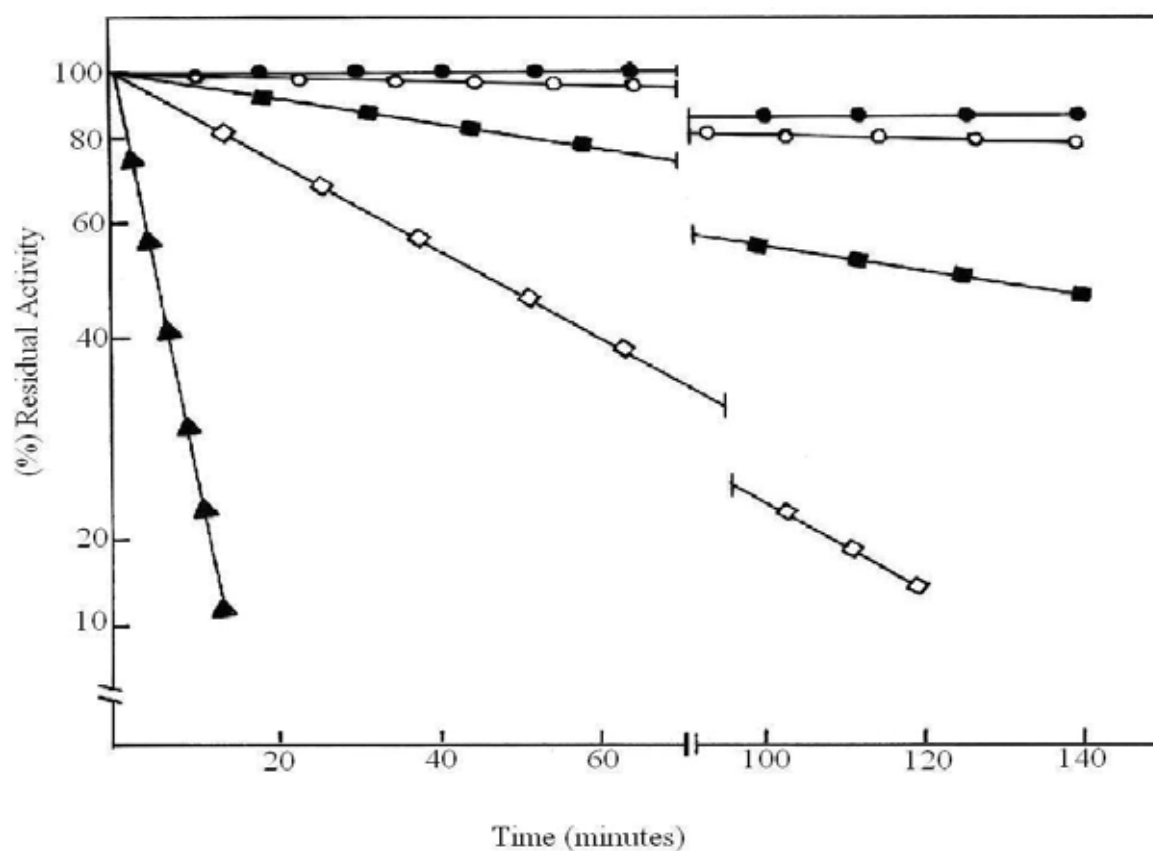


Figura 7: Inativação térmica da possível fosfatase ácida ligada à membrana: (●) 25°C; (○) 55°C; (■) 60°C; (□) 65°C; (▲) 70°C. A atividade residual foi obtida através da adição da fração de membrana e incubada na temperatura e passada ao banho de gelo em meio reacional contendo tampão acetato 0,059 M em pH 6 e incubada novamente a 37°C por 10 minutos e interrompida com NaOH.

Observa-se a enzima é estável a 55°C e que a partir desta temperatura a enzima é instável e aumenta com o aumento da temperatura até 70°C, temperatura ocorre

uma grande diminuição significativa da atividade, diminuição do tempo de meia vida e aumento na constante inativação.

Tabela III: Constantes de inativação térmica da fosfatase ácida ligada à membrana e respectivos tempos de meia vida.

Temperatura (°C)	$K \cdot 10^{-4}$ (min)	$T_{0,5}$ (min)
55	5	1380
60	115,5	60
65	173,2	40
70	13860	5

O estudo do efeito de diferentes inibidores sobre a atividade da possível fosfatase ácida ligada à membrana é mostrado na Tabela IV.

Tabela IV: Efeito de diferentes reagentes sobre a atividade da possível fosfatase ácida ligada à membrana. Os valores são dados em porcentagem da atividade da enzima, onde nenhum inibidor foi adicionado, esses valores foram obtidos pela adição da enzima após 1 hora de incubação em meio reacional contendo o respectivo inibidor.

Inibidores	Atividade Residual (%)	
	1 mM	10 mM
Nenhum	100 %	100 %
Fosfato solúvel	88%	38 %
EDTA	91 %	86 %
Arsenato	14%	3 %
Cloreto de cálcio	82%	69%
Cloreto de Zinco	87%	90%
Cloreto de Cobalto	90%	90%
Levamisol	88%	93%
Ácido tricloroacético	90%	90%
Tartarato do sódio	98%	71%

Os obtidos resultados mostram claramente que o arsenato é o inibidor mais eficiente, mesmo em concentração final de 1 mM (**Tabela IV**), enquanto que o fosfato

apresentou uma leve inibição a 10 mM (Tabela IV). A enzima é resistente à ação do tartarato de sódio mesmo em concentração de 100 mM, onde apresentou uma atividade residual de aproximadamente 40%.

O estudo da concentração dos inibidores arsenato e fosfato sobre a atividade PNFFásica da enzima revelou que o arsenato, um análogo estrutural do fosfato apresenta uma inibição do tipo mista (figura 8) enquanto que o fosfato atua como um inibidor não competitiva (figura 9).

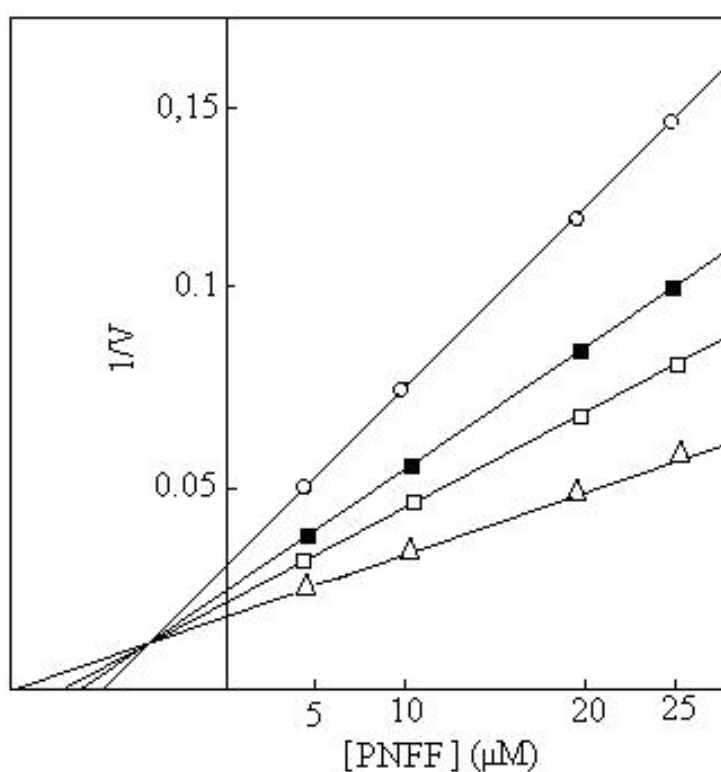


Figura 8: Inibição da atividade PNFFase da putativa fosfatase ácida ligada à membrana pelo arsenato. As concentrações utilizadas de arsenato foram: (Δ) controle sem inibidor, (□) 0,05 mM, (■) 0,1 mM, (○) 0,5 mM. Reação efetuada em tampão acetato pH 6 contendo MgCl_2 100mM e interrompida com NaOH.

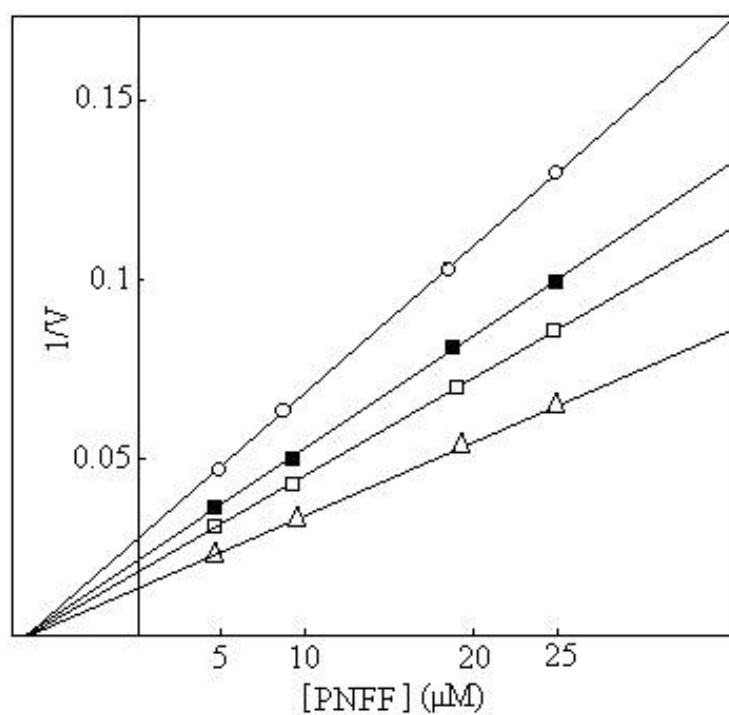


Figura 9: Inibição da atividade PNFFase da fosfatase ácida ligada à membrana pelo fosfato. As concentrações utilizadas de Fosfato foram: (Δ) controle sem inibidor, ($\square$) 0,05 mM, ($\blacksquare$) 0,1 mM, ($\circ$) 0,5 mM. Reação efetuada em tampão acetato pH 6 contendo MgCl_2 100mM e interrompida com NaOH.

4. Discussão:

Fósforo é um nutriente essencial requerido em alto nível pelos seres vivos para o seu crescimento e desenvolvimento (EHRlich, 1990), participa da formação de metabólicos fosforilados durante o processo anabólico e catabólicos das funções de crescimento e diferenciação celular, da composição do DNA, RNA, dos fosfolipídios, do ATP, da regulação da atividade de várias enzimas e do controle gênico (DINKELAKER e MARSCHNER, 1992). Apesar de o fósforo ser um elemento químico relativamente abundante no solo, geralmente é encontrado na forma de fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), praticamente insolúvel e, portanto, não disponível para as plantas (HAYMAN, 1975), somente uma fração muito pequena de fósforo solúvel de cerca de 1 ppm ou menos tem sido encontrado no solo (FERNANDEZ e NOVO, 1988). O processo tradicional produção de fertilizante é prejudicial ao meio ambiente devido a emissão de poluentes aquíferos e ambientais prejudiciais aos seres vivos (SONG et al, 2008). Há mais de um século os microbiologistas agrícolas e os ecólogos microbianos vêm investigando a habilidade de alguns microrganismos em dissolver fosfato mineral indisponível as plantas tais como fosfato de tri-cálcio e/ou a hidroxiapatita na forma de biofertilizante (KLOEPPER et al, 1988; KLOEPPER et al, 1989) visando encontrar um produto ideal sem acarretar contaminação ambiental (SUSLOV, 1982). O principal mecanismo de solubilização de fósforo mineral presente no solo é através da produção de ácidos orgânicos, como cítrico, butírico, láctico, succínico, málico, gluconico, acético, fumarico, 2-cetogluconicos (GLICK, et al, 1998) ou pela quitação (GLICK, et al, 1998; KLOEPPER, 1994). Essa suposição é suportada pelo fato de que há evidências experimentais que apóia o papel de ácidos orgânicos na solubilização do fosfato mineral (RODRIGUEZ E FRAGA 1999). HALDER et al. mostraram que os ácidos orgânicos isolados de uma cultura de *Rhizobium leguminosarum* solubilizaram uma quantidade de P_i equivalente àquela produzida pela cultura inteira. Entretanto, alguns autores admitem que os fungos não produzam ácidos em quantidade suficientes para solubilização de fósforo. Estudos realizados por vários autores mostraram que a liberação de H^+ para o meio externo por um mecanismo de troca e captação de cátions através da atuação de uma H^+ ATPase, poderia constituir em um mecanismo alternativo para a solubilização do fósforo. Estudos nesse sentido têm sido

realizados em nosso laboratório. Tem sido demonstrado que bactérias do gênero *Burkholderia* estão envolvidas na solubilização e remoção do fosfato em condições de baixo pH, através da solubilização por formação de ácidos (MULLAN et al., 2002), enquanto a fosfatase ácida é a responsável pela mineralização de fósforo no solo (RODRIGUEZ E FRAGA 1999). Entretanto alguns autores admitem que tais bactérias são indispensáveis para a liberação de fósforo para as plantas regulando seu crescimento e desenvolvimento (RODRIGUEZ E FRAGA 1999).

A fim de satisfazer as suas necessidades de crescimento, os microrganismos desenvolveram um sistema que os capacita obter fósforo quando as quantidades de fosfato inorgânico do meio estão indisponíveis ou limitantes (LUGTENBERG, 1975). Tem sido demonstrado ainda que em altas concentrações de fosfato inorgânico atue como um repressor da produção de fosfatases e que em condições limitantes de fósforo esses microrganismos responde a essa condição sintetizando fosfatases denominadas de Pi-repressível. Nesse sentido, parece razoável admitir que a fosfatase produzida pela *Burkholderia* (figura 1) em condições limitante de pi é um enzima repressível e sua expressão se mostrou diretamente dependente da concentração de fosfato no meio até 5 mM. É importante destacar que altas concentrações de bactérias solubilizadoras de fósforo tem sido encontradas na rizosfera de plantas quando comparada com os valores encontrados no solo não rizosférico (RODRIGUEZ E FRAGA 1999). A fração de membrana contendo a enzima foi obtida através ruptura da bactéria por sonicação e por centrifugação diferencial. Os resultados da tabela 1 mostram que cerca de 99% da enzima se encontra associada à membrana e o baixo fator de recuperação obtido sugere que a única forma de enzima presente no extrato bruto é a enzima de membrana, uma vez que a centrifugação diferencial a 100000 x g é um processo simples mas utilizado com sucesso por vários autores para se obter frações de membranas (KUNDING e ROSEMAN, 1970; KATAKURA e KOBAYASHI, 1988).

A fosfatase ácida ligada à membrana se mostrou estável ao armazenamento por 30 dias a temperaturas de estocagem de 4 e -20°C (**Figura 2**), entretanto o mesmo não aconteceu quando o extrato bruto foi armazenado nas mesmas condições, sugerindo que a presença de proteases nesse extrato poderia ser a principal causa da perda de atividade.

O pH ótimo atuação 6 A fosfatase ácida ligada à membrana apresenta (figura 3), é similar aquele observado para enzimas que apresenta pH ótima na faixa de pH de 2,5 a

6 (DVORAK et al, 1967) e de fosfatase obtidas de *Escherichia battle* (ISIKAWA et al, 2000), a fosfatase ácida de *Shigella flexneri* (UCHIYA et al, 1996).

O estudo da concentração de PNFF sobre pH (**Figura 4**) revelou que a fosfatase ácida ligada à membrana apresentou comportamento cinético Michaeliano (tabela 2 e figura 5) para a hidrólise de PNFF e para a hidrólise do pirofosfato (**Tabela 2 e Figura 5**), comportamento esse semelhante a de outras fosfatase acidas de bactérias como: *Morganella morganii*, K_m 117 (mM) e V_{max} 6.09 U/mg; *Providencia stuartii*, K_m 156 (mM) e V_{max} 6.21 u/mg; *Klebsiella planticola*, K_m 231 (mM) e V_{max} 2.65 u/mg (MIHARA et al, 2001) e *Escherichia battle*, K_m 200 (mM) e V_{max} 2.78 u/mg (ISIKAWA et al, 2000).

A representação de Arrhenius para a hidrólise do PNFF pela fosfatase ácida ligada à membrana apresentou um ΔH de 5,74 kcal.mol⁻¹ (figura 6), comparável com aquele obtido para a fosfatase acida de *Yersinia sp* de 6 kcal.mol⁻¹ (ZANG et al, 1992).

O ensaio de inativação térmica da enzima (**Figura 7**) revelou que a fosfatase ácida ligada à membrana mostrou estável até 55°C com um $t_{0,5}$ de 1380 minutos (tabela 3), mas a partir os 60°C sua atividade começa a cair atingindo um tempo de meia vida menor ($t_{0,5}$ = 60minutos). É importante destacar que as curvas de inativação obtidas não apresentam quebras, sugerindo que não se trata de uma enzima transmembranar e que a mudança de fase de membrana não afeta seu comportamento. Além disso, parece razoável admitir que sua interação com a membrana pode ser através da ligação ao glicocalix, visto que a adição de tunicamycin ao meio de cultivo induz a síntese e a secreção de uma enzima solúvel, modificação a sua forma de glicoproteína ligada a membrana via glicocalise para excretada no meio na forma solúvel (KONDO et al 1996).

A o estudo do efeito de diferentes compostos sobre a atividade PNFFásica da provável fosfatase ácida ligada à membrana demonstrou que o arsenato (**Tabela 4**) foi o mais o inibidor mais potente e apresentou uma inibição do tipo mista (**Figura 8**), enquanto que a inibição pelo fosfato foi menos eficiente (**Tabela 4**) e do tipo não competitiva (**Figura 9**). Tendo em vista que o arsenato é um análogo estrutural do fosfato ainda não temos uma explicação para mudança da inibição de mista para não competitiva.

5. Conclusões

Foi padronizado um método rápido e eficiente para a produção e purificação da fosfatase ácida ligada à membrana Pi-repressível produzida por *Burkholderia*, sendo 5 mmoles a melhor concentração de fosfato no meio de cultivo.

A fosfatase ácida ligada à membrana apresenta um pH ótimo de atuação em pH 6, é estável ao quando armazenada a 4 e -20°C.

A enzima ligada apresenta comportamento cinético de “Michaeliano” para a hidrólise do PNFF ($V_m = 113,5$) e do pirofosfato ($V_m = 237$).

A energia de ativação para a hidrólise do PNFF pela fosfatase ácida ligada à membrana obtida é de 5,74 kcal.mol⁻¹.

O estudo da estabilidade térmica revelou que a enzima é estável até 55 °C e partir daí é inativada rapidamente.

A inibição da atividade PNFF pela enzima ligada à membrana pelo arsenato é do tipo mista enquanto que a do fosfato é do tipo não competitiva.

A fosfatase ácida ligada à membrana produzida por esta bactéria pode representar um mecanismo de solubilização do fosfato mineral no solo tornando disponível para as plantas favorecendo um melhor desenvolvimento das plantas, diferentemente de outras bactérias do mesmo gênero, espécies diferentes, que fazem esta disponibilização através da produção de ácidos.

6. Bibliografia:

AVRAMEAS S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* 6: 43–52, 1969.

BAIROCH, A.; BUCHER, & HOFMANN, K. The prosite database. *Nucleic acid res.*, 24, 189-196, 1995.

BANIK, S. “Variation in potentiality of phosphate solubilizing soil microorganisms with phosphate and energy source.” *Zentralbl. Mikrobiol.*, 138, , 209-216, 1983

BEACHAM, I.R. Periplasmic enzymes in gram negative bacteria. *Int J. Biochem*, 10, 877- 883, 1979.

BERTHELIN, F.; LEYVAL, C.; LAHEURTE, F. & DE-GIUDICI, “Involvements of roots and *Rhizospere microflora* in the chemical weathering of soil minerals.” In *Plant Root Growth; an Ecological Perspective*, special Publication series of the British Ecological Society, N. 10, Black-well Scientific, Oxford. 1991.

BERTON, R.S.; PRATT, P.F. & FRANKENBERGER, W.T. “Phosphorus availability in soils amended with organic materials, estimated by three chemical methods and two enzyme activities”. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.21, n.4, 617-624, 1997.

BHAT, M.A., TSUDA, M., HORIIKE, K., NOZAKI, M., VAIDYANATHAN, C.S., e NAKAZAWA, T. Identification e characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90. *Appl Env Microbiol* 60: 307–312, 1994.

BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, H.J. “Improved silver staining of plant proteins RNA and DNA in polyacrylamide gels electrophoresis”, 8, 93-99, 1987.

BOWERS, J., e PARKE, J. Epidemiology of *Pythium* damping-off e *Aphanomyces* root rot of peas after seed treatment with bacterial agents for biological control. *Phytopathology* 83: 1466–1473, 1993.

BURKHOLDER, W. H. Three bacterial plant pathogens: *Phytomonas caryophylli* sp.n., *Phytomonas alliicola* sp.n., and *Phytomonas manihotis* (Arthaud-Berthet et Bondar) Viegas. *Phytopathology*, 32, 141-149, 1942.

CHEN, X., ANSAI, T.; AWANO, T.I.; BARIK, S. & TAKEHARA, T. "Isolation, Cloning and Expression of an Acid Phosphatase Phosphotyrosyl Phosphatase Activity from *Prevotella intermedia*." *Journal of Bacteriology*, 7107-7114, 1999.

CHENG, H.P., e LESSIE, T.G. Multiple replicons constituting the genome of *Pseudomonas cepacia* 17616. *J Bacteriol* 176: 4034–4042, 1994.

COCKS G. T. E WILSON A. C. Enzyme evolution in the *Enterobacteriaceae*. *J. Bacteriol.* 110: 793–802, 1972.

COENYE, T. & VANDAMME, "Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches." *Environmental Microbiology*, 5, 719-729, 2003.

COENYE, T.; LAESENS, S.; WILLEMS, A.; OHLÉN, M.; HANNANT, W. & GOVAN, J.R.W. " *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples." *Int J Syst Evol Microbiol*, 51, p.1099–1107, 2001.

DAHAL, R.C. "Soil organic phosphorus. *Advances in Agronomy*." 28, 1977, 83-117.

DANCE, D.A. Ecology of *Burkholderia pseudomalle* e the interactions between environmental *Burkholderia* spp. and human-animal hosts. *Acta Trop* 74: 159–168, 2000.

DASSA J., MARCK C. E BOQUET P. The complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gene *appA* reveals significant homology between pH 2.5 acid phosphatase and glucose-1-phosphatase. *J. Bacteriol.* 172: 5497–5500, 1990.

DAVIS, B.J. "Disc electrophoresis – Method and application to human serum proteins". *Ann N.Y. Acad. Science*, 121, 404-427, 1964.

DINKELAKER, B. & MARSCHNER, H. "*In vivo* demonstration of acid phosphatase activity in the rhizosphere of soil-grown plants." *Plant Soil*, 144, 199-205, 1992.

DVORAK, H.F.; BROCKMAN, R.W. & HEPPEL, L.A. " Purification and properties of two acid phosphatase fractions isolated from osmotic shock fluid of *E. Coli*." *Biochemistry*, 6, 1743- 1751, 1988.

EHRlich, H.L. Mikrobiologische and biochemische Verfahrenstechnik. In Einsele A, Finn RK, Samhaber w, editors. *Geomicrobiology*, 2 , Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft, 1990.

EL BANNA, N. e WINKELMAN, G. "Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia* antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes." J. appl Microbiol, 85, 69-78. , 1998

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTABLES, R. & CABALLERO-MELLADO, J. "Burkholderia, a genus rich in plant – associated nitrogen fixers with wide enviromental and geographic distribution." Appl environmental microbiology, 67, 2790-2798, 2001.

FEDER, J. The phosphatases. In: GRIFITH, E.J.; BECTEN, A.; SPENCER, J.M.; MITCHEL, D.T. Environmental phosphorus handbook. New York: John Wiley, 475-507, 1973.

FERNANDEZ, C., NOVO, R. Vida Microbiana en el Suelo, II. La Habana : Editorial pueblo y educación , 1988.

FOLSOM, B.R., CHAPMAN, P.J., e PRITCHARD, P.H. Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates. *Appl Env Microbiol* 56: 1279–1285, 1990.

GILLIS, M.; VAN VAN, T.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR,& WILLEMS, A. "Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam". *Int J Sys Bacteriol*, 45, 274–289, 1995.

GLICK, B.R., PENROSE, D.M. e LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J Theor Biol*, 190, 63-68, 1998.

GOLDSTEIN, A.H.; ROGERS, R.D. & MEAD, G. "Separating phosphite from ores via bioprocessing". *Bioresour. Technol.*, 11, 1250-1254, 1993

HALDER, A.K., MISHRA, A.K., BHATTACHARYYA, P. e CHAKRABARTTY P.K. Solubilization of rock phosphate by *Rhizbium* and *Bradyrhizobium* . *J. Gen appl microbiol*, 36, 81-92, 1990.

HANTKE, K.. "Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant." *Mol. Gen. Genet.*, 288–292, 1981.

HAYATSU, M.; HIRANO, M. e TOKUDA, S. "Involvement of two plasmids in fenitrothion degradation by *Burkholderia* sp. strain NF100". *Appl Environ Microbiol.* 66, 1737–1740, 2000.

HAYMAN, D.S., JOHNSON, A.M. E RUDDLESDIN, I., The influence of phosphate and crop species on endogone spores and vesicular arbuscular mycorrhiza under field conditions . Plant and soil, 43, 489 – 495, 1975.

HEBBAR, P.K., MARTEL, M.H., e HEULIN, T. Suppression of pre- and postemergence damping-off in corn by *Burkholderia cepacia*. *Eur J Plant Path* 104: 29–36, 1998.

HEINONEN, J.K. & LAHTI, R.J. “A new convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay inorganic pyrophosphatase.” *Analyt Biochem*, 133, 313-317, 1981.

ISHIKAWA, K.; MIHARA, Y.; GONDOH, K.; SUZUKI, E. A e ASANO, Y. “X-ray structures of a novel acid phosphatase from *Escherichia blattae* and its complex with the translation-state analog molybdate.” *The EMBO journal*, 19, 2412-2423, 2000.

KATAKURA, K.& KOBAYASHI, A. “Acid Phosphatase Activity of Virulent and Avirulent Clones of *Leishmania donovani* Promastigotes.” *Infection and Immunity*, 56, 2856-2860, 1988.

KIER, L.D.; WEPPELMAN, R. e AMES, B.N. “Resolution and purification of three periplasmic phosphatases of *Salmonella typhimurium*.” *J. Bacteriol*, 130, 399-410, 1977.

KILBANE, J.J., CHATTERJEE, D.K., KARNS, J.S., KELLOGG, S.T., e CHAKRABARTY, A.M. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. *Appl Env Microbiol* 44: 72–78, 1982.

KIM E. E WYCKOFF H. W. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. *J. Mol. Biol.* 218: 449–464, 1991.

KLOEPPER J.W. Plant growth promoting bacteria (other systems). CRC press, 137-154, 1994.

KLOEPPER J.W., LIFSHITZ K. E ZABLOTOWICZ, R.M. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotchnol*, 7, 39-43, 1989.

KLOEPPER, J.W., LIFSHITZ, K e SCHROTH M.N. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production . *ISI Atlas Sci Anim Plant Sci*, 60-40, 1988.

KLUG, M. & TIEDJE, J. “Response of microbial communities to changing environmental conditions: chemical and physiological approaches”. 371-78 in R. Guerrero,

R. and C. Pedros-Alio, C. (eds.) Trends in Microbial Ecology, Barcelona: Spanish Society for Microbiology, 1994.

KONDO E, KURATA T, NAIGOWIT P E KANAI K. Evolution of cell-surface acid phosphatase of *Burkholderia pseudomallei*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 27, 592-599, 1996.

KRUMME, M.L., TIMMIS, K.N., e DWYER, D.F. Degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 and the constitutive mutant strain G4, 5223 PR1 in aquifer microcosms. *Appl Env Microbiol* 59: 2746–2749, 1993.

KUNDIG, W. & ROSEMAN, S. “Characterization Of Constitutive Membrane-Bound Enzymes Ii Of The *Escherichia coli* Phosphotransferase System.” The Journal of Biological Chemistry, 246, 1407-1418, 1971

LESSIE, T.G., HENDRICKSON, W., MANNING, B.D., e DEVEREUX, R. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. *FEMS Microbiol Lett* 144: 117–128, 1996.

LUGTENBERG, B., J. MEIERS, R. PETERS, P. VAH DER HOEK, e L. VAN ALPHEN. Electrophoretic resolution of the "major outer protein" of *Escherichia coli* K12 into four bands. *FEBS Lett.* 58:254-258. 1975.

MACASKIE L. E. An immobilized cell bioprocess for the removal of heavy metals from aqueous flows. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 49: 357–379, 1990.

MACASKIE L. E., EMPSON R. M., CHEETHAM A. K., GREY C. P. E SKARNULIS A. J. Uranium bioaccumulation by a *Citrobacter* sp. as a result of enzymatically mediated growth of polycrystalline $\text{H}_2\text{UO}_2\text{PO}_4$. *Science* 257: 782–784, 1992.

MAGALHAES CRUZ, L., DE SOUZA, E.M., WEBER, O.B., BALDANI, J.I., DOBEREINER, J., e PEDROSA FDE, O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Appl Environ Microbiol* 67: 2375– 2379, 2001.

MAKINO K., AMEMURA M., KIM S.-K., NAKATA A. E SHINAGAWA H. Mechanism of transcriptional activation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. In: Phosphate in Microorganisms. Cellular and Molecular Biology, pp. 5–12, Torriani- Gorini A. M., Yagil E. and Silver S., ASM Press, Washington DC, 1994.

MALKE, H. "Cytoplasmic Membrane Lipoprotein os *Streptococcus equisimilis* Functions as na Acid Phosphatase." Applied and enviromental Microbiolgy, 2439 – 2442, 1998.

MCLOUGHLIN, T.J., QUINN, J.P., BETTERMANN, A., E BOOKLAND, R. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. *Appl Env Microbiol* 58: 1760–1763, 1992.

MIHARA, Y.; UTAGAWA, T.; YAMADA, H. e ASANO Y. "Acid Phosphotransferases from Enteric Bacteria." Journal of Bioscience and Bioengineering, vol 92, 50-54, 2001.

MULLAN, A.; QUINN, J.P. e MCGRATH, J.W. "Enhanced phosphate uptake and polyphosphate accumulation in *Burkholderia cepacia* grown under low pH conditions." *Microb. Ecol*, 44, 69-77, 2002

OSTANIN K., HARMS E. H., STEVIS P. E., KUCIEL R., ZHOU M.-M. E VAN ETTEN R. L. Overexpression, site-directed mutagenesis and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* 267: 22830–22836, 1992.

PALLERONI, N. J. e B. HOLMES. *Pseudomonas cepacia* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31, 479-481, 1981.

PARKE, J.L., E GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annu Rev Phytopathol* 39: 225–258, 2001.

PARKE, J.L., RAND, R.E., JOY, A.E., E KING, E.B. Biological control of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P. fluorescens* to seed. *Plant Dis* 75: 987–992, 1991.

PAUL, E.A. e CLARK, F.E. "Soil microbiology and biochemistry". Academic Press, 273, 1989.

PEREIRA, R. M.; SILVEIRA, E. L. da; SCAQUITTO, D. C.; PEDRINHO, E. A. N.; VAL-MORAES, S. P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L. M.; LEMOS, E. G. M.. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 439-447, 2006.

POMPEI R., CORNAGLIA G., INGIANNI A. E SATTA G. Use of a novel phosphatase test for simplified identification of the tribe *Proteeae*. J. Clin. Microbiol. 28: 1214–1218, 1990.

RODLEY, P.D., ROMLING, U., e TUMMLER, B.A. Physical genome map of the *Burkholderia cepacia* type strain. *Mol Microbiol* **17**: 57–67, 1995.

ROSSOLINI G. M., SCHIPPAB S., RICCIOA M. L., BERLUTTIB F., MACASKIEC L. E. e THALLERD M. C. Bacterial nonspecific acid phosphohydrolases: physiology, evolution and use as tools in microbial biotechnology CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 54 833–850, 1998.

SALEH, M.T. e BELISLE, J.T. “Secretion of an Acid Phosphatase (SapM) by *Mycobacterium tuberculosis* That Is Similar to Eukaryotic Acid Phosphatases.” Journal Of Bacteriology, 6850–6853, 2000.

SCHNAITMAN, C. A.. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. J. Bacteriol, 545–552, 1971.

SEVERINI, G. Una bacteriosi dell’*Ixia maculata* e del *Gladiolus Colvilli*. Ann. Bot. (Rome) 11, 413424, 1913.

SHIBATA K., TOTSUKA M. E WATANABE T. Phosphatase activity as a criterion for differentiation of oral mycoplasmas. J. Clin. Microbiol. 23: 970–972, 1986.

SILVEIRA, E. L. da; PEREIRA, R. M.; SCAQUITTO, D. C.; PEDRINHO, E. A. N.; VAL-MORAES, S. P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L. M.; LEMOS, E. G. M.. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 41, 1507-1516, 2006

SMITH, E.F. Bacteria in Relation to Plant Diseases. Washington: Carnegie Institute Publications, pp.1–368, 1911.

SONG, O. I; LEEI S.; LEEI Y.; LEEI S.; KIMII K.; CHOII Y. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. Brazilian Journal of Microbiology, 39, 2008.

STOCK, J.B.; SURETTE, M.G.; LEVIT, M. e PARK,“ Two component signal transduction systems: structure function relationships and mechanisms of catalysis in two component signal transduction.” ASM press, 25-51, 1995

SUSLOV, T.V. Role of root colonizing bacteria in plant growth. Academic press, 187-223, 1982.

THALLER M. C., BERLUTTI F., RICCIO M. L. E ROSSOLINI G. M. A species-specific DNA probe for *Probidencia stuartii* identification. Mol. Cell. Probes 6: 417–422, 1992.

THALLER, M.C.; BERLUTTI, F.; SCHIPPA, S.; IORI, P.; PASSARIELLO, C. e ROSSOLINI, G.M. “Heterogeneous patterns of acid phosphatases containing low-molecular-mass polypeptides in members of the family Enterobacteriaceae.” Int. J. Syst. Bacteriol, 45, 255-261, 1995.

TOUATI E., DASSA E., DASSA J. E BOQUET P. L. Acid phosphatase (pH 2.5) of *Escherichia coli*: regulatory characteristics. In: Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in Microorganisms, pp. 31–40, Torriani-Gorini A. M., Rothman F. G., Silver S., Wright A. and Yagil E., ASM Press, Washington DC, 1987.

TOUATI, E. e DANCHIN, A. “The structure of promoter and amino terminal region of the pH 2,5 acid phosphatase gene of E. coli: a negative control of transcription mediated by cyclic AMP.” Biochimie, 69, 215- 221, 1987.

TRAN VAN, V.; BERGE, O.; NOGO, K.S.; BALANDREAU, J. e HEULIN, T. “Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam.” Plant soil, 218, 273- 284 , 2000

TYLER, S.D., ROZEE, K.R., E JOHNSON, W.M. Identification of IS1356, a new insertion sequence, and its association with IS402 in epidemic strains of *Burkholderia cepacia* infecting cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 34: 1610–1616, 1996.

UCHIYA, K., TOHSUJI, M., NIKAI, T., YOSHI SUGIHARA H. e SASAKAWA, C. “Identification and Characterization of *phoN-Sf*, a Gene on the Large Plasmid of *Shigella flexneri* 2a Encoding a Nonspecific Phosphatase.” Journal of Bacteriology, 4548–4554, 1996.

UERKVITZ W. “Periplasmic non specific acid phosphatase II from *Salmonella typhimurium* LT2.” J. Biol. Chem, 263, 15823–15830, 1988.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M. “Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes”. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 435-440, 2003

VIALARD, V., POIRIER, I., COURNOYER, B., HAURAT, J., WIEBKIN, S., OPHEL-KELLER, K., e BALANDREAU, J. *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] *phenazinum*, [*Pseudomonas*] *pyrrocinia* and [*Pseudomonas*] *glathei* as *Burkholderia*. *Int J Syst Bacteriol*, 48, 549–563, 1998.

WANNER, B.L. “ Phosphorous assimilation and control of phosphate regulon in E.coli and Salmonella.” *Cellular an molecular Biology* , 2° ed,1367- 1381, 1996.

WHEELIS, M. First shots fired in biological warfare. *Nature* **395**: 213, 1998.

WIGLEY, P., E BURTON, N.F. Multiple chromosomes in *Burkholderia cepacia* and *B. gladioli* and their distribution in clinical and environmental strains of *B. cepacia*. *J Appl Microbiol* 88: 914–918, 2000.

YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., YANO, I., HOTTA, H., E NISHIUCHI, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen nov. proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol Immunol* 39: 897–904, 1995.

ZHANG, H.; HANADA, S.; SHIGEMATSU, T.; SHIBUYA, K.; KAMAGATA, Y.; KANAGAWA, T. e KURANE, R. “*Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE) - degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE.” *Int J Syst Evol Microbiol*, 50, 743–749, 2000.

ZOLG, W. E; OTTOW, J.C.G. “*Pseudomonas glathei* sp. nov., a new nitrogen scavenging rod isolated from acid lateritic relicts in Germany”. *Z Allg Mikrobiol*, 15, 287–299, 1975.