

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES *acrA* E *acrB* EM
Gluconacetobacter diazotrophicus PAL5 NA RESPOSTA A
ESTRESSES ABIÓTICOS E NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO
VEGETAL

LUCIANO DE SOUZA VESPOLI

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO - 2016

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES *acrA* E *acrB* EM
Gluconacetobacter diazotrophicus PAL5 NA RESPOSTA A
ESTRESSES ABIÓTICOS E NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO
VEGETAL

LUCIANO DE SOUZA VESPOLI

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Genética e Melhoramento
de Plantas.”

Orientador: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO - 2016

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES *acrA* E *acrB* EM
Gluconacetobacter diazotrophicus PAL5 NA RESPOSTA A
ESTRESSES ABIÓTICOS E NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO
VEGETAL

LUCIANO DE SOUZA VESPOLI

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Genética e Melhoramento
de Plantas.”

Aprovada em 30 de março de 2016.

Comissão Examinadora:

Dr. Jean Luiz Simões de Araújo (D.Sc., Ciências Biológicas) – EMBRAPA

Prof. Vanildo Silveira (D.Sc., Biotecnologia) – UENF

Prof^a. Aline Chaves Intorne (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UENF

Prof. Gonçalo A. de Souza Filho (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UENF
(Orientador)

*À minha mãe, Ana Lúcia
Ao meu pai, Expedito Vespoli, in memoriam,
dedico.*

“The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existing. One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery every day. Never lose a holy curiosity.

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao CNPq, Capes, Finep, Faperj e INCT, pelo apoio financeiro.

À UENF e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela estrutura, pela concessão da bolsa, pelo apoio e pela oportunidade de realizar esse curso.

À Capes, pela concessão da bolsa para a realização do doutorado sanduíche.

À Texas A&M University, pela incrível oportunidade de realizar o doutorado sanduíche, pelo apoio e pela estrutura.

Ao professor Gonçalo Apolinário, meu orientador, pela amizade, pela orientação, pelos conselhos e pelos ensinamentos.

Aos meus conselheiros, professora Rosana Rodrigues e professor Vanildo Silveira, pelos conselhos, ajuda e disponibilidade em todo o período de doutorado.

À professora Aline Chaves Intorne, pela amizade, pelos conselhos, pelos ensinamentos e pelo incentivo.

Ao professor Fábio Olivares, pela amizade, pelos ensinamentos e pela parceria.

À professora Marília, por todo carinho, pelo apoio e pelos ensinamentos.

Ao professor Eliemar Campostrini, pelo suporte e disponibilização do laboratório para realização das análises de área foliar.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelo ensinamento e pela disponibilidade em sempre ajudar.

Ao secretário Daniel, pela disponibilidade e atenção de sempre.

Aos professores Vanildo Silveira, Aline Chaves Intorne e pesquisador Jean Luiz, por aceitarem fazer parte da banca examinadora desta tese de doutorado.

Aos pesquisadores Libo Shan e Ping He, pelos ensinamentos, pela paciência e pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche.

Aos amigos e colegas de laboratório, especialmente, Suzane, Patrícia, Roberta, Leandro, Mariana, Tamires e Gabriel, pela amizade, pelo apoio, pelas contribuições no desenvolvimento dos trabalhos, pelo ótimo ambiente no laboratório e pelos ensinamentos.

Aos amigos e colegas da UENF, especialmente, Cynthia, Verônica, Fernando, Samy, Guilherme, Rodrigo, Pedro e Régis, pela amizade e pelo apoio.

Aos amigos da Texas A&M University, especialmente, Marcos, Ana Márcia, Kevin, Guangyuan Xu, Xiangzong Meng, Bo Li, Baoming Feng, Gustavo e Anderson, pela amizade, pelo apoio e pelos ensinamentos.

Aos professores, técnicos e alunos do LBT, LMGV e laboratório de Fisiologia Vegetal, que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Ana Lúcia, minha mãe, pelo exemplo, pelo amor, pelo apoio, pelo incentivo, pela preocupação e por ter sempre acreditado em mim.

A meu pai, Expedito, pelo exemplo e pela força que me dá para caminhar, mesmo não estando mais presente.

A Thâmara, minha namorada, pelo amor, pela paciência e pelo companheirismo.

Ao meu tio Juninho, pelo exemplo, pelo seu amor incondicional, pela preocupação em todos os momentos e pelos conselhos.

Aos meus irmãos, por sempre acreditarem em mim.

Aos meus sobrinhos, pela amizade e pela preocupação.

Aos meus tios, especialmente, Marta, Fiiinha, Cidinha, Márcio, Hilda e José Antônio, pelo apoio e pelo incentivo.

Aos meus primos, especialmente, Deir, Priscila, Gabriela, Tati, Paulinha e Douglas, pela amizade e pela preocupação.

Aos amigos de república, Douglas(s) pela amizade, pelo apoio e excelente convívio.

Aos amigos do CSF, Víctor, Goiano, Matheuzinho, Gilberto e Mateus, pela amizade de sempre e pelo apoio.

Aos amigos do G7, em especial, Gut, PH, Pedrinho, Gugu, pelo apoio e pela grande amizade.

Aos meus grandes amigos, Felipe, Fernando, Cacá, Ronaldo, Hugo, pela amizade e pelo apoio.

A Geralda, pela ajuda e companheirismo de sempre.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão de mais essa etapa profissional.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1. Bactérias promotoras do crescimento vegetal e seus mecanismos de ação	6
3.2. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	12
3.3. Estresses em bactérias e a importância dos mecanismos de resposta para as bactérias promotoras do crescimento vegetal	15
3.4. Bombas de efluxo multidrogas e seu importante papel em bactérias.....	19
3.5. <i>A. thaliana</i> : modelo para estudos de interação bactéria-planta	24
3.6. Mutagênese insercional como ferramenta de estudos em genômica funcional de <i>G. diazotrophicus</i>	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. Micro-organismos e condições de cultivo	29
4.2. Organização genômica dos genes <i>acrA</i> e <i>acrB</i> em <i>G. diazotrophicus</i> PAL5	30
4.3. Análises filogenéticas das proteínas AcrA, AcrB e OprM	31
4.4. Obtenção do perfil de crescimento das estirpes selvagem e mutantes	32
4.5. Avaliação da resistência a antibióticos em <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 selvagem e mutantes	32
4.6. Avaliação da tolerância das estirpes selvagem e mutantes a metais pesados.....	33

4.7. Caracterização da tolerância à variações de temperatura e à H ₂ O ₂ nas bactérias.....	33
4.8. Ensaio de solubilização de zinco e fósforo	34
4.9. Ensaio de fixação biológica de nitrogênio.....	34
4.10. Material vegetal e condições de crescimento	35
4.11. Inoculação de plantas de <i>A. thaliana</i> com estirpes selvagem e mutantes	35
4.12. Análise da promoção do crescimento vegetal	36
4.13. Análises estatísticas	36
5. RESULTADOS	37
5.1. Organização genômica dos genes <i>acrA</i> e <i>acrB</i> em <i>G. diazotrophicus</i> PAL5	37
5.2. Organização genômica do operon <i>acrAB-oprM</i> e seus homólogos em outras espécies de bactérias	38
5.3. Presença de outros operons de transportadores RND no genoma de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5.....	40
5.4. Similariade das proteínas do transportador multidrogas AcrAB-OprM com seus homólogos em espécies relacionadas e com outras proteínas de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5.....	41
5.5. Efeito das mutações Δ <i>acrA</i> e Δ <i>acrB</i> na multiplicação celular em meio líquido.....	44
5.6. A importância da bomba de efluxo multidroga AcrAB-OprM na resistência à ampicilina em <i>G. diazotrophicus</i> PAL5	46
5.7. O sistema de efluxo multidrogas AcrAB-OprM é importante para a tolerância a zinco, cobalto e cádmio, em <i>G. diazotrophicus</i> PAL5	47
5.8. Participação do sistema de efluxo multidrogas AcrAB-OprM na resposta à variações de temperatura em <i>G. diazotrophicus</i> PAL5	48
5.9. As mutações Δ <i>acrA</i> e Δ <i>acrB</i> conferem tolerância à H ₂ O ₂ em <i>G. diazotrophicus</i> PAL5.....	49
5.10. AcrAB-OprM não participa dos processos de solubilização de nutrientes e da FBN em <i>G. diazotrophicus</i> PAL5.....	50
5.11. O sistema de efluxo multidrogas AcrAB-OprM é essencial para a promoção do crescimento vegetal de <i>A. thaliana</i>	52
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÕES	64
8. PERSPECTIVAS.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

RESUMO

VESPOLI, Luciano de Souza; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Março, 2016; Caracterização funcional dos genes *acrA* e *acrB* em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 na resposta a estresses abióticos e na promoção do crescimento vegetal. Orientador: Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Conselheiros: Rosana Rodrigues e Vanildo Silveira.

Bactérias promotoras do crescimento vegetal são uma alternativa ao uso excessivo de fertilizantes químicos e agrotóxicos na agricultura, auxiliando a preservação do ambiente. O sucesso da interação entre essas bactérias e plantas é influenciado por sua resistência aos estresses ambientais enfrentados durante os processos de inoculação, bem como àqueles aos quais as plantas inoculadas possam estar expostas durante seus cultivos. Um dos mecanismos utilizados por bactérias para enfrentar esses estresses é o uso de bombas de efluxo multidrogas, capazes de evitar o acúmulo de compostos tóxicos no citoplasma bacteriano. *Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria endofítica, promotora do crescimento vegetal, capaz de tolerar diferentes tipos de estresses ambientais. No entanto, o papel das bombas de efluxo multidrogas na resposta a estresses abióticos e promoção do crescimento vegetal nessa bactéria ainda não foi descrito. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a importância da bomba de efluxo multidrogas AcrAB-OMP (*Outer Membrane Protein*), em *G. diazotrophicus* PAL5, na tolerância a estresses abióticos e na promoção do crescimento vegetal. Análises *in silico* mostraram que esses genes estão organizados em um operon, que inclui o gene *oprM*, configurando, portanto,

o operon *acrAB-oprM*. Análises filogenéticas revelaram alta similaridade das proteínas AcrA e AcrB com proteínas homólogas já caracterizadas em outras espécies, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Essas análises mostraram que a proteína de membrana externa (OMP) em *G. diazotrophicus* PAL5, cujo gene está presente no operon *acrAB-oprM*, é OprM, apresentando alta similaridade com a proteína homóloga em *P. aeruginosa*. Outras bombas de efluxo multidrogas identificadas em *G. diazotrophicus* PAL5 também foram analisadas, mas apresentaram baixa similaridade com AcrA, AcrB e OprM. A avaliação do crescimento dos mutantes Δ *acrA* e Δ *acrB* na presença de diferentes antibióticos revelou sua sensibilidade à ampicilina, confirmando o envolvimento da bomba AcrAB na resistência ao antibiótico. Ao comparar o crescimento desses mutantes com a estirpe selvagem, na presença de diferentes metais pesados (cádmio, zinco e cobalto), foi possível observar que a mutação no gene *acrA* aumentou fortemente a sensibilidade da bactéria aos metais cádmio e zinco, havendo também maior sensibilidade a cobalto, todavia menos pronunciada. A mutação no gene *acrB* provocou menor aumento na sensibilidade a cádmio e zinco, e não afetou a sensibilidade a cobalto. A inoculação de *Arabidopsis thaliana* com os mutantes e a estirpe selvagem permitiu verificar que as mutações nos genes *acrA* e *acrB* prejudicaram a habilidade da bactéria em promover o crescimento de plantas de *A. thaliana*. Nossos resultados mostram que a bomba AcrAB-OprM em *G. diazotrophicus* PAL5 é importante na resistência ao antibiótico ampicilina e aos metais cádmio, zinco, cobalto. A relevância das mutações em *acrA* e *acrB* para a promoção do crescimento vegetal de *A. thaliana* sugere a participação de bombas de efluxo multidrogas na interação planta-*G. diazotrophicus* PAL5 e seu efeito no sucesso da associação.

Palavras chave: estresses ambientais; bomba de efluxo multidrogas; PGPB; bactérias endofíticas; *A. thaliana*

ABSTRACT

VESPOLI, Luciano de Souza; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; march, 2015; Functional characterization of *acrA* and *acrB* genes in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 in response to abiotic stress and to plant growth promoting. Advisor: Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Counselors: Rosana Rodrigues and Vanildo Silveira.

Plant growth promoting bacteria (PGPB) are an alternative to the excessive use of chemical fertilizers and agrotoxics in agriculture, helping the environmental preservation. The success of the plant-bacteria interaction is influenced by the bacterial resistance to environmental stresses faced during the inoculation process, as well as the stresses that the inoculated plants may be exposed during their cultivation. One of the mechanisms used by bacteria to face these stresses is the use of multidrug efflux pumps, which is able to prevent the accumulation of toxic compounds in the bacterial cytoplasm. *Gluconacetobacter diazotrophicus* is an endophytic bacterium, plant growth promoting, able to tolerate different kinds of environmental stresses. However, the role of multidrug efflux pumps in response to abiotic stresses and plant growth promoting in this bacterium is unknown yet. In this sense, this study aimed to evaluate the importance of the multidrug efflux pump AcrAB-OMP (Outer Membrane Protein), in *G. diazotrophicus* PAL5, in abiotic stresses tolerance and plant growth promoting. In silico analyzes showed that these genes are organized in an operon which includes the gene *oprM*, setting therefore the operon AcrAB-OprM. Phylogenetic analyses revealed high similarity of AcrA and AcrB proteins with homologous proteins, that have been

already characterized in other species such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Interestingly, these analyzes demonstrated that the outer membrane protein in *G. diazotrophicus* PAL5 is OprM, showing high similarity to homologous protein in *P. aeruginosa*. In addition, we observed low similarity of AcrA, AcrB and OprM with protein components of others multidrug efflux pumps identified in *G. diazotrophicus* PAL5. The evaluation of the growth of Δ acrA and Δ acrB mutants in presence of different antibiotics revealed its ampicillin sensitivity, confirming the involvement of the AcrAB pump in antibiotic resistance. Comparing the growth of these mutants with the wild type strain in the presence of heavy metals (cadmium, zinc and cobalt), it was possible to observe that mutation in *acrA* gene greatly increased the sensitivity of bacterium to cadmium and zinc, presenting also increased sensitivity to cobalt, however, less highlighted. The mutation in *acrB* gene caused a smaller increase in sensitivity to cadmium and zinc, and did not affect sensitivity to cobalt. Inoculation of *Arabidopsis thaliana* with mutants and wild strain had shown that mutations in *acrA* and *acrB* genes impaired the ability of this bacterium to promote growth of *A. thaliana*. Our results showed that the AcrAB-OprM efflux pump, in *G. diazotrophicus* PAL5, is important in resistance to ampicillin antibiotic and resistance to cadmium, zinc, cobalt. The relevance of mutations in *acrA* and *acrB* to promote growth of *A. thaliana* suggests the participation of multidrug efflux pumps in the plant-bacterium interaction and its effect on the success of the association.

Keywords: environmental stresses; multidrug efflux pump; PGPB; endophytic bacteria; *A. thaliana*

1. INTRODUÇÃO

A agricultura atual depende cada vez mais do uso massivo de fertilizantes químicos e defensivos agrícolas. Estima-se que o consumo de fertilizantes esteja em torno de 200 milhões de toneladas/ano (IFA, 2013). A utilização excessiva desses produtos representa um aumento nos custos de produção, além de causar impactos ambientais e efeitos prejudiciais à saúde (Glick, 2012). No intuito de minimizar esses danos e contribuir para a sustentabilidade agrícola, o uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal, PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*), surge como alternativa interessante e promissora.

As PGPB favorecem o desenvolvimento da planta por meio de diferentes mecanismos, destacando-se a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a solubilização de nutrientes, a produção de fitormônios e o controle biológico (Glick, 2012). Contudo, o sucesso da interação bactéria-planta é influenciado, principalmente, por estresses abióticos e pela capacidade dessas bactérias em responder aos mecanismos de defesa desenvolvidos pelas plantas (Souza *et al.*, 2015). Entre esses estresses, destacam-se a variação de temperatura, a seca, a salinidade e, a presença de metais pesados em altas concentrações e de outros compostos tóxicos (Nies, 1999; Wood *et al.*, 2001; Perez-Pantoja *et al.*, 2013; Sévin *et al.*, 2016).

Algumas bactérias desenvolveram mecanismos importantes na resposta a estresses abióticos, como a utilização de bombas de efluxo multidrogas. Essas bombas participam do transporte de substâncias antimicrobianas e diversos

compostos tóxicos, como corantes, detergentes e hidrocarbonetos (Sulavik *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2007; Poole, 2007). O envolvimento de algumas dessas bombas também já foi identificado na resposta a estresses oxidativo, osmótico e por metais pesados, participando ainda na interação bactéria-plantas (Aendekerk *et al.*, 2002; Nishino *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2009).

A participação de bombas de efluxo multidrogas da família RND (*Resistance-Nodulation-Division*) foi relatada na resistência aos metais pesados cobre, zinco e vanádio em *Salmonella enterica* e *Pseudomonas aeruginosa* (Aendekerk *et al.*, 2002; Nishino *et al.*, 2007). As bombas MdtABC, MdtUVW e AcrAB, de *Erwinia amylovora* e MexAB-OprM, de *Pseudomonas syringae*, são descritas como estando envolvidas com o estabelecimento de doenças em plantas (Vargas *et al.*, 2011; Pletzer e Weingart, 2014). Em algumas interações benéficas entre rizóbios e plantas hospedeiras, bombas da família RND estão envolvidas no processo de nodulação (Eda *et al.*, 2011; Takeshima *et al.*, 2013).

Entre as bactérias que se associam de forma benéfica com plantas, destaca-se *Gluconacetobacter diazotrophicus* que já foi isolada de diferentes espécies vegetais (Tapia-Hernandez *et al.*, 2000; Madhaiyan *et al.*, 2004; Muthukumarasamy *et al.*, 2005). Essa bactéria é endofítica e tem capacidade de promover o crescimento vegetal por meio da FBN, da produção de fitormônios, da atividade no controle biológico, e da solubilização de nutrientes (Saravanan *et al.*, 2008). Além disso, *G. diazotrophicus* apresenta características interessantes de resistência aos estresses abióticos seca, variações de temperatura, excesso de metais pesados, sacarose e sais de sulfato (Cavalcante e Döbereiner, 1988; Tejera *et al.*, 2003; Intorne *et al.*, 2012; de Oliveira *et al.*, 2016b).

O genoma de *G. diazotrophicus* foi sequenciado (Bertalan *et al.*, 2009), possibilitando estudos de genômica funcional dessa bactéria. Alguns trabalhos de mutagênese insercional têm permitido a caracterização funcional de genes de *G. diazotrophicus*. Como exemplo, têm-se *gumD*, envolvido na produção de exopolissacarídeos (Meneses *et al.*, 2011); *tonB*, na produção de sideróforos e formação de biofilme (de Paula Soares *et al.*, 2015); *IsdA*, na tolerância a NaCl e sacarose (Velazquez-Hernandez *et al.*, 2011); *pqqB*, *C* e *E*, na solubilização de zinco e fósforo (Intorne *et al.*, 2009); e *czcA*, na resistência a metais (Intorne *et al.*, 2012).

A proteína CzcA é reconhecida por promover resistência a cádmio, cobalto e zinco em alguns micro-organismos, tendo sido, recentemente, identificada e caracterizada em *G. diazotrophicus* (Intorne *et al.*, 2012). Embora informações acerca do genoma permitam identificar genes de bombas de efluxo multidrogas, ainda não é conhecido o papel dessas bombas na tolerância a estresses abióticos em *G. diazotrophicus* e também no processo de interação bactéria-planta.

Diante desse contexto, no presente estudo, foram utilizados os mutantes $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$, previamente isolados por nosso grupo de pesquisa. Tais mutantes foram utilizados no intuito de avaliar a importância da bomba de efluxo multidrogas AcrAB-OMP (*Outer Membrane Protein*) na tolerância a estresses abióticos e na promoção do crescimento de plantas de *Arabidopsis thaliana*. Para isso, foi primeiramente realizada uma análise do crescimento desses mutantes em diferentes antibióticos para confirmar o envolvimento dessa bomba no transporte desses compostos. Em seguida, a importância da bomba de efluxo multidrogas AcrAB para resistência a estresses ambientais foi avaliada, pela exposição dos mutantes $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$ a diferentes agentes estressores.

Adicionalmente, ferramentas de bioinformática foram utilizadas para avaliar o contexto genômico desses genes e comparar com o observado em outras espécies de bactérias. Análises filogenéticas foram realizadas visando a confirmar sua similaridade com proteínas homólogas já caracterizadas em outras espécies, bem como para verificar sua similaridade com outras bombas de efluxo presentes no genoma de *G. diazotrophicus*.

A participação da bomba de efluxo multidrogas AcrAB nos processos de interação bactéria-planta foi avaliada pela inoculação da bactéria selvagem e dos mutantes de $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$ em plantas de *Arabidopsis thaliana* e verificação do efeito das mutações na promoção do crescimento vegetal.

Deste modo, este estudo abre interessantes perspectivas para a elucidação de mecanismos de resposta a estresses ambientais em *G. diazotrophicus* PAL5, bem como dos mecanismos que influenciam na capacidade dessa bactéria em promover o crescimento vegetal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a importância dos genes *acrA* e *acrB* na tolerância a estresses abióticos em *G. diazotrophicus* PAL5 e na sua capacidade de promover o crescimento em plantas de *A. thaliana*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a organização genômica de *acrA* e *acrB* em *G. diazotrophicus* PAL5, pela comparação com genes homólogos em outras bactérias e também com outros genes de bombas de efluxo multidrogas presentes no seu genoma;
- ✓ Confirmar a similaridade das proteínas componentes da bomba de efluxo AcrAB de *G. diazotrophicus* PAL5 com proteínas homólogas em outras espécies, bem como verificar a similaridade com outras bombas de efluxo multidrogas presentes no seu genoma, pelo alinhamento e análises filogenéticas das sequências de aminoácidos.
- ✓ Verificar a participação da bomba AcrAB no efluxo de drogas pela avaliação dos mutantes $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$, em comparação com a estirpe selvagem, quando expostos aos antibióticos ampicilina, estreptomicina, espectinomicina e gentamicina;

- ✓ Verificar o efeito das mutações nos genes *acrA* e *acrB* no perfil de crescimento da bactéria pela obtenção e comparação de curvas de cultivo da estirpe selvagem e dos mutantes \DeltaacrA e \DeltaacrB ;
- ✓ Avaliar a participação da bomba de efluxo AcrAB-OMP na resposta a estresses ambientais, pela comparação da resistência da estirpe selvagem e dos mutantes \DeltaacrA e \DeltaacrB , quando expostos a metais pesados (cádmio, cobalto e zinco) e a variações de temperatura e H₂O₂;
- ✓ Verificar a importância da bomba de efluxo AcrAB-OMP para a capacidade de solubilização de zinco e fósforo e para fixação biológica de nitrogênio, pela comparação da estirpe selvagem e dos mutantes \DeltaacrA e \DeltaacrB ;
- ✓ Avaliar o papel do transportador multidroga AcrAB-OMP na capacidade de *G. diazotrophicus* PAL5 em promover o crescimento vegetal pela comparação de plantas de *A. thaliana* inoculadas com a estirpe selvagem e com os mutantes \DeltaacrA e \DeltaacrB ;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Bactérias promotoras do crescimento vegetal e seus mecanismos de ação

A população mundial atingiu 7 bilhões de habitantes em 2012, e estima-se que esse número aumente nas próximas décadas, acarretando aumento da demanda por alimentos e energia (FAO, 2013). No entanto, as práticas agrícolas atuais, que visam a um aumento na produtividade de alimentos, incluem o uso de fertilizantes químicos, herbicidas, fungicidas e inseticidas, que são algumas das maiores fontes de contaminação dos recursos naturais, além de representarem alto custo na produção (Von Blottnitz *et al.*, 2006; Glick, 2012; IFA, 2013). Sendo assim, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas na busca por alternativas sustentáveis e ambientalmente corretas visando a atender à crescente necessidade por alimentos. As PGPB surgem como uma interessante ferramenta biotecnológica, que pode minimizar os danos causados pela utilização excessiva de agroquímicos.

As PGPB são consideradas micro-organismos benéficos, uma vez que, mediante diversos mecanismos, conseguem proporcionar melhor desenvolvimento para as plantas (Dimkpa *et al.*, 2009b; Grover *et al.*, 2011; Glick, 2012). Essas bactérias habitam, preferencialmente, as regiões rizosféricas e o rizoplano, onde há acúmulo de carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos, que são exsudados pelas raízes e são fontes de nutrientes para as bactérias. Além

disso, as PGPB também podem ser encontradas no interior dos tecidos vegetais, sendo, neste caso, denominadas bactérias endofíticas (Walker *et al.*, 2003; Bashan *et al.*, 2004).

O termo endofítico abrange os micro-organismos capazes de colonizar o interior dos tecidos da planta durante uma parte do seu ciclo de vida, sem causar dano aparente ao hospedeiro (Petrini, 1991). Bactérias endofíticas já foram isoladas de diversas culturas de interesse agrícola, como cana-de-açúcar (Cavalcante e Döbereiner, 1988), milho, tomate, pimenta (Xia *et al.*, 2015), sorgo (Mareque *et al.*, 2015), arroz (Chung *et al.*, 2015), batata (Rado *et al.*, 2015), trigo (Robinson *et al.*, 2015), feijão (Lopes *et al.*, 2015), entre outras. As bactérias endofíticas pertencem, principalmente, aos gêneros: *Azoarcus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* (Babalola, 2010).

As PGPB podem promover crescimento vegetal por mecanismos diretos e indiretos. Como mecanismos diretos são conhecidos fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfato, produção de sideróforos, modulação dos níveis de fitormônios. Os mecanismos indiretos abrangem proteção contra estresses ambientais e controle biológico, que pode ocorrer pela produção de antibióticos, enzimas líticas e indução de resistência sistêmica (Glick, 2012).

A FBN é o mecanismo de promoção do crescimento mais bem estudado. O elemento nitrogênio (N) é essencial para a biossíntese de biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos. No entanto, a maior fonte de N na natureza está na forma de nitrogênio atmosférico (N_2), que não é assimilado diretamente pelas plantas. Sendo assim, a FBN é o processo biológico que converte o N_2 em amônia (NH_3), realizado por algumas bactérias, por meio de uma enzima altamente conservada, a nitrogenase. Esta enzima consiste em duas metaloproteínas, a proteína ferro-molibdênio e a proteína de ferro, altamente sensíveis à presença de oxigênio (Gallon, 1981; Newton, 2000; Dixon e Kahn, 2004; Franche *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2015). Na formação e funcionamento do complexo nitrogenase estão envolvidos diversos genes, denominados *nif*. Este conjunto gênico inclui genes estruturais, genes envolvidos na ativação da proteína de ferro, na biossíntese de cofator, e genes regulatórios. Em bactérias fixadoras de nitrogênio, os genes *nif* são normalmente encontrados em operons codificando em torno de 20 proteínas diferentes (Glick, 2012).

Micro-organismos capazes de realizar o processo de FBN recebem o nome de diazotróficos (Döbereiner, 1992). Entre estes micro-organismos, destacam-se os rizóbios, bactérias Gram-negativas, que se associam simbioticamente com plantas leguminosas, induzindo a formação de nódulos radiculares. *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Burkholderia* são alguns dos gêneros aos quais estas bactérias pertencem (Dwivedi *et al.*, 2015). Bactérias endofíticas também são capazes de realizar FBN. Dentro desse grupo, podem ser destacadas as espécies: *Azoarcus* ssp., *Herbaspirillum seropedicae* e *G. diazotrophicus* (Santi *et al.*, 2013). Diversas bactérias endofíticas diazotróficas têm sido isoladas de diferentes culturas. Ikeda e colaboradores (2013) identificaram presença de bactérias pertencentes aos gêneros *Pantoea*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Klebsiella* em raízes de diferentes genótipos de milho. Wei e colaboradores (2014) reportaram o isolamento de *Klebsiella variicola* DX120E de raízes de cana-de-açúcar. Adicionalmente, mostraram a capacidade dessa bactéria colonizar seu hospedeiro, fixar N₂ em associação com a planta e promover o crescimento vegetal.

Nas associações entre bactérias diazotróficas e plantas, o nitrogênio fixado é fornecido para as plantas e elas em troca, fornecem fontes de carbono e outros nutrientes para as bactérias. Além disso, as plantas colonizadas são um local com menor competição, que pode oferecer condições apropriadas para proteger o complexo nitrogenase da presença de oxigênio (Santi *et al.*, 2013).

A solubilização de fosfato é outra característica importante das PGPB, pois o fósforo (P) é um macronutriente essencial para as plantas. Esse elemento é necessário para a síntese dos ácidos nucleicos, dos fosfolipídios e de adenosina trifosfato (ATP), além de ser peça chave em vias metabólicas (Khan *et al.*, 2009; Richardson e Simpson, 2011).

Apesar da grande quantidade de P presente no solo, este se encontra na forma insolúvel, portanto, indisponível para as plantas, limitando o crescimento vegetal (Rodríguez e Fraga, 1999). Logo, a disponibilidade deste nutriente depende da sua solubilidade, que pode ser influenciada pela atividade microbiana.

A solubilização de P inorgânico por bactérias ocorre, basicamente, por meio de dois mecanismos: a síntese de ácidos orgânicos, como ácido glucônico e ácido cítrico, e a liberação de prótons no meio. Ambos os mecanismos provocam

redução do pH e conseqüente aumento da disponibilidade de P para as plantas (Rodríguez e Fraga, 1999; Khan *et al.*, 2009). Neste contexto, diversas bactérias têm sido isoladas e caracterizadas como capazes de solubilizar fosfato, algumas delas pertencentes aos gêneros *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rizhobium*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Erwinia*, *Microccus* e *Gluconacetobacter* (Rodríguez e Fraga, 1999; Intorne *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2015).

O ferro é um micronutriente essencial para as plantas, uma vez que está envolvido em diversos processos biológicos, como fotossíntese, respiração e FBN (Dixon e Kahn, 2004; Kobayashi e Nishizawa, 2012). Assim como P, esse elemento é abundante na maioria dos solos, no entanto, é predominantemente encontrado na forma de Fe^{+3} , muito pouco solúvel, refletindo em uma baixa assimilação pelos organismos (Ma, 2005). Neste sentido, algumas bactérias conseguem sintetizar moléculas de baixo peso molecular, denominadas sideróforos, que atuam como quelantes, tornando o ferro assimilável (Neilands, 1995; Krewulak e Vogel, 2008).

Estudos têm mostrado produção de sideróforos por bactérias associadas às plantas (Da Costa *et al.*, 2013; de Souza *et al.*, 2013; de Souza *et al.*, 2015b). Plantas de feijão inoculadas com *Pseudomonas* sp. GRP3, em condições de limitação de ferro, apresentaram maior quantidade de clorofila e reduzido sintoma clorótico quando comparadas às plantas controle (Sharma *et al.*, 2003). Vansuyt e colaboradores (2007) relataram que o complexo sideróforo-Fe sintetizado por *Pseudomonas fluorescens* foi absorvido por plantas de *A. thaliana*, aumentando a quantidade de ferro no interior da planta, e promovendo crescimento vegetal.

Além do efeito nutricional, a produção de sideróforos pode auxiliar em um melhor desenvolvimento da planta pela inibição do estabelecimento de patógenos, sequestrando o ferro do ambiente (Dimkpa *et al.*, 2009a). Adicionalmente, a produção de sideróforos por bactérias endofíticas pode, ainda, conferir vantagem competitiva no processo de colonização dos tecidos vegetais, uma vez que podem reduzir a disponibilidade desse micronutriente para outros micro-organismos (Loaces *et al.*, 2011).

A produção de fitormônios por PGPB também tem sido descrita como um dos mecanismos para a promoção do crescimento vegetal (Güneş *et al.*, 2014; Egamberdieva *et al.*, 2015; Hussein e Joo, 2015). Algumas PGPB produzem

fitormônios como ácido indolacético (AIA), ácido abscísico (ABA), citocininas, giberelinas, etileno e ainda podem alterar os níveis desses hormônios nas plantas, promovendo o crescimento vegetal e também afetando a resposta contra estresses bióticos e abióticos (Glick, 2012). A produção de giberelina por estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (Boiero *et al.*, 2007) e *Azospirillum brasilense* (Perrig *et al.*, 2007) já foi detectada e quantificada. Strzelczyk e colaboradores (1994) também relataram a capacidade de *Azospirillum* sp. produzir citocinina, crescendo em diferentes fontes de carbono.

A produção de AIA por PGPB tem sido relatada como um mecanismo de grande importância fisiológica na interação bactéria-planta (Spaepen *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2009; Cassan *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009; Masciarelli *et al.*, 2013). Spaepen e colaboradores (2008), utilizando estirpe de *A. brasilense* Sp 245 modificada geneticamente para a produção de AIA, observaram efeito positivo do hormônio produzido pela bactéria na promoção do crescimento de plantas de trigo. No mesmo trabalho, foi evidenciado que a superexpressão do gene *ipdC*, envolvido na biossíntese de AIA em *A. brasilense*, melhorou os efeitos de promoção do crescimento, abrindo perspectivas para a obtenção de novas estirpes ainda mais eficientes na promoção do crescimento vegetal.

Ainda não são conhecidas com detalhes as vias de biossíntese de ABA em bactérias (Spaepen, 2015). No entanto, alguns trabalhos têm mostrado a capacidade de PGPB de produzir esse fitormônio (Boiero *et al.*, 2007; Forchetti *et al.*, 2007; Perrig *et al.*, 2007). Cohen e colaboradores (2008) demonstraram a produção de ABA pela bactéria *A. brasilense* Sp 245. Adicionalmente, eles observaram que plantas de *A. thaliana* inoculadas com essa bactéria apresentaram uma quantidade de ABA duas vezes superior à verificada nas plantas controle.

O etileno é um hormônio gasoso que atua em baixas concentrações e participa da regulação de diversos processos na planta (Shaharoon *et al.*, 2006; Saleem *et al.*, 2007). Esse hormônio é produzido de forma acelerada em resposta a estresses bióticos e abióticos, podendo afetar de forma negativa o crescimento das plantas (Souza *et al.*, 2015). A enzima 1-aminociclopropano 1-carboxilato (ACC) desaminase, encontrada comumente em PGPB, é capaz de regular os níveis de etileno, metabolizando o precursor imediato para sua biossíntese, o ACC. Dessa forma, bactérias capazes de sintetizar ACC desaminase podem

melhorar o desenvolvimento das plantas sob condições de estresse (Arshad *et al.*, 2008; Bal *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2014).

As PGPB podem apresentar como característica de promoção do crescimento vegetal o controle biológico. A síntese de diferentes antibióticos por bactérias pode prevenir o estabelecimento de micro-organismos patogênicos (Haas e Keel, 2003; León *et al.*, 2009; Mazurier *et al.*, 2009). Além disso, bactérias que atuam no biocontrole podem produzir enzimas como quitinases, celulasas, lipases e glucanases, que degradam a parede celular de muitos patógenos (Frankowski *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2008; León *et al.*, 2009).

Adicionalmente, PGPB podem disparar a resistência sistêmica induzida em plantas, ativando mecanismos de defesa. Resistência sistêmica induzida envolve ação de ácido jasmônico e etileno, que estimulam a resposta de defesa contra patógenos (Verhagen *et al.*, 2004; Arencibia *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2015). Jain e colaboradores (2013) observaram indução de resistência sistêmica por *Pseudomonas* sp., em *Glycine max*, contra o fungo patogênico *Fusarium oxysporum*.

Uma outra característica das PGPB, que tem ganho destaque, é a capacidade de essas bactérias tolerarem ambientes com altas concentrações de metais pesados, podendo, assim, ser utilizadas nos processos de biorremediação e fitorremediação (Intorne *et al.*, 2012; Ubalde *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2014; Dourado *et al.*, 2014). Rojas-Tapias e colaboradores (2012b) observaram, em plantas de *Helianthus annuus* inoculadas com *Acinetobacter* sp., redução do efeito tóxico de cobre e maior acúmulo desse elemento pelas plantas.

A Figura 1 sumariza os mecanismos de promoção do crescimento de plantas desempenhados pelas PGPB apresentados nesse tópico. Diante da importância dessas bactérias, entender os mecanismos moleculares envolvidos com suas habilidades em promover o crescimento vegetal torna-se importante na busca de estratégias para melhor utilização dessa tecnologia visando a uma agricultura mais sustentável, justificando os esforços dedicados a seu estudo.

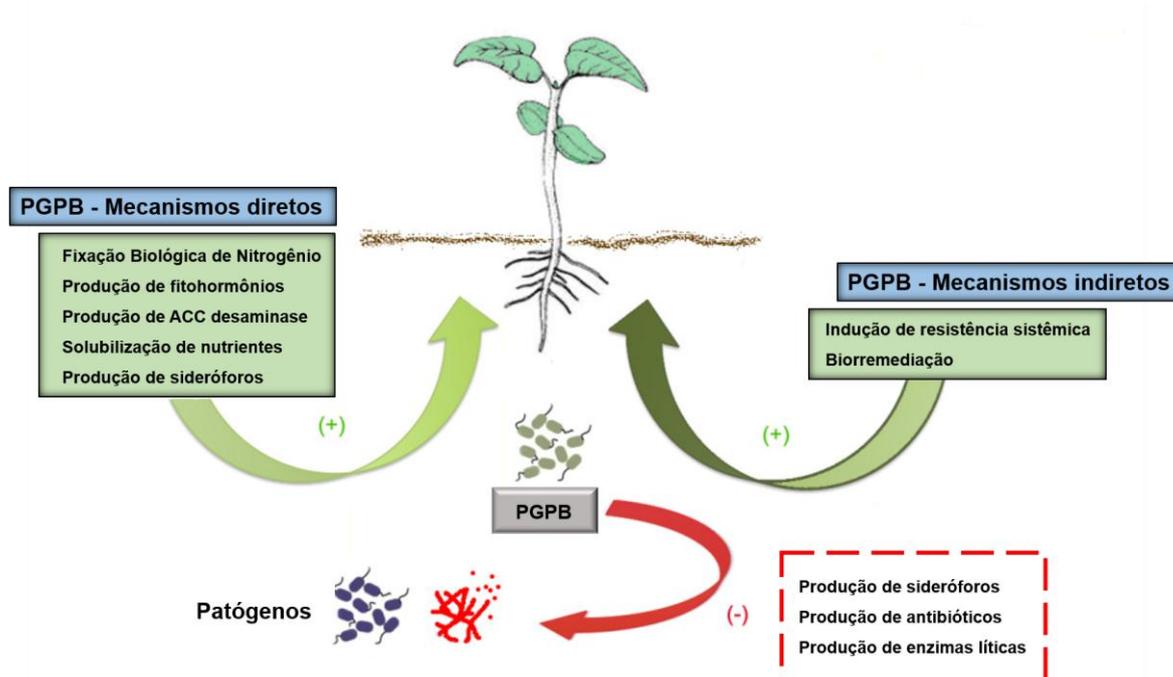


Figura 1. Mecanismos diretos e indiretos de promoção do crescimento vegetal realizados por bactérias. Os sinais (+) representam os mecanismos que atuam de forma positiva sobre as plantas. O sinal (-) representa os mecanismos que atuam de forma negativa sobre patógenos. PGPB: *Plant Growth Promotion Bacteria*. Adaptado de García-Fraile *et al.* (2015).

3.2. *Gluconacetobacter diazotrophicus*

G. diazotrophicus é uma espécie de bactéria diazotrófica, endofítica, pertencente ao filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria, ordem Rhodospirillales, família Acetobacteraceae, gênero *Gluconacetobacter* (Cavalcante e Döbereiner, 1988; Kersters *et al.*, 2006). Essa bactéria foi originalmente nomeada como *Saccharobacter nitrocaptans* (Cavalcante e Döbereiner, 1988), no entanto, após análises filogenéticas de rDNA 16S, foi renomeada para *G. diazotrophicus* (Yamada *et al.*, 1998). *G. diazotrophicus* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica obrigatória, que possui formato de bacilo e se movimenta por meio de flagelos. As células se arranjam como diplobacilos ou estruturas semelhantes a cadeias (Cavalcante e Döbereiner, 1988; Gillis *et al.*, 1989).

G. diazotrophicus é uma bactéria ácido-tolerante, conseguindo se multiplicar em condições de pH muito baixo (3,0), sendo o pH ótimo de crescimento em torno de 5,5. A temperatura ideal de crescimento é de 30 °C, (Cavalcante e Döbereiner, 1988; Gillis *et al.*, 1989; Stephan *et al.*, 1991), podendo

tolerar até 50 °C (Tejera *et al.*, 2003). Além disso, já foi reportada sua resistência aos antibióticos ampicilina, eritromicina, roxitromicina e estreptomicina e sensibilidade à tetraciclina, rifampicina e penicilina (Muthukumarasamy *et al.*, 1999; Mowade e Bhattacharyya, 2000).

A bactéria *G. diazotrophicus* foi inicialmente isolada de raízes e colmos de cana-de-açúcar. Posteriormente, essa bactéria foi isolada também de raízes ou parte aérea de outras plantas como abacaxi (Tapia-Hernandez *et al.*, 2000), banana, manga, mamão, beterraba, cenoura, tomate, sorgo (Madhaiyan *et al.*, 2004), café (Jimenez-Salgado *et al.*, 1997; Madhaiyan *et al.*, 2004), cereal *Eleusine coraca* (Loganathan *et al.*, 1999) e arroz alagado (Muthukumarasamy *et al.*, 2005). Alguns estudos têm ainda reportado a eficiência de colonização por *G. diazotrophicus* em plantas não hospedeiras como arroz (Cocking *et al.*, 2006), feijão (Trujillo-Lopez *et al.*, 2006), trigo (Youssef *et al.*, 2004; Cocking *et al.*, 2006; Luna *et al.*, 2010), milho (Riggs *et al.*, 2001; Cocking *et al.*, 2006) e *A. thaliana* (Cocking *et al.*, 2006; de Souza *et al.*, 2015a).

James e colaboradores (2001) mostraram a localização de *G. diazotrophicus* em cana-de-açúcar após a inoculação. Utilizando um anticorpo específico para a bactéria, foi possível observá-la nos vasos xilemáticos, cavidades subestomatais e espaços intercelulares do colmo de cana-de-açúcar, por meio de microscopia eletrônica. Outros trabalhos utilizando marcadores GUS e GFP identificaram presença de *G. diazotrophicus*, após inoculação, na coifa da raiz e meristema, zonas de emergência de raízes laterais, pelos radiculares e ponta de raízes, em arroz, tomate e trigo (Luna *et al.*, 2010; Rouws *et al.*, 2010; Luna *et al.*, 2012).

Entre as características de *G. diazotrophicus*, destaca-se sua capacidade de promover o crescimento vegetal. Os efeitos benéficos da promoção do crescimento por *G. diazotrophicus* podem ser obtidos por meio de diferentes mecanismos apresentados por essa bactéria. A compensação do déficit de entrada de nitrogênio nos canaviais pode ser atribuída à presença de *G. diazotrophicus*, uma das bactérias mais importantes para o processo de FBN nesses locais (Boddey *et al.*, 1991). A eficiência dessa bactéria no processo de FBN pode ser explicada por: (1) favorecimento da atividade da enzima nitrogenase ao habitar o interior dos tecidos vegetais, um ambiente com baixas tensões de oxigênio; (2) disponibilização direta de compostos para a bactéria,

pela planta; e (3) não competição por nutrientes com outros micro-organismos do solo, por ser uma bactéria endofítica (Hallmann *et al.*, 1997; James e Olivares, 1998; Reinhold-Hurek e Hurek, 1998; Reis e Dobereiner, 1998).

Sevilla e colaboradores (2001) demonstraram que plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *G. diazotrophicus* defectiva para o gene *nifD*, importante para a formação do complexo da enzima nitrogenase, obtiveram crescimento expressivo quando comparadas às plantas controle. Tal fato sugere o envolvimento de outros mecanismos na promoção do crescimento vegetal mediado por essa bactéria. Corroborando essa informação, o fato de *G. diazotrophicus* produzir hormônios promotores do crescimento vegetal, como AIA e giberelinas (Fuentes-Ramirez *et al.*, 1993; Bastian *et al.*, 1998); ser capaz de solubilizar nutrientes como fósforo e zinco (Saravanan *et al.*, 2007b; Intorne *et al.*, 2009); produzir sideróforo (Logeshwaran *et al.*, 2009); atuar no biocontrole de fitopatógenos como *Colletotrichum falcatum* (Muthukumarasamy *et al.*, 2000), *Xanthomonas albilineans* (Piñón *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2010) e *Meloidogyne incognita* (Saravanan *et al.*, 2007a); além de apresentar atividade antagonista contra diversas bactérias Gram-positivas e negativas pela ação antimicrobiana do ácido glucônico (Nieto-Penalver *et al.*, 2014).

Adicionalmente, a tolerância a estresses abióticos é uma característica interessante de *G. diazotrophicus*, que pode ser explorada com cunho biotecnológico. Entre tais estresses, um aspecto de grande relevância é a alta tolerância dessa bactéria ao estresse osmótico, sendo capaz de sobreviver em meio de cultura com até 30% de sacarose (Cavalcante e Döbereiner, 1988). *G. diazotrophicus* tem capacidade de sobreviver no interior de apoplastos de cana-de-açúcar, onde a concentração de sacarose é próxima de 10%. Essa concentração promove uma alta pressão osmótica, responsável pela inibição do crescimento de muitos micro-organismos (Reis e Dobereiner, 1998).

Apesar de apresentar alta tolerância à sacarose, *G. diazotrophicus* é sensível ao estresse salino (Boniolo *et al.*, 2009; Velazquez-Hernandez *et al.*, 2011). No entanto, os danos provocados pelo estresse salino são resultantes de efeito iônico e não osmótico, visto que *G. diazotrophicus* é capaz de se multiplicar em meio contendo elevadas concentrações de sais como Na_2SO_4 e K_2SO_4 (de Oliveira *et al.*, 2016b). Essa bactéria também tolera variações de temperatura conseguindo sobreviver sob temperatura de até 50 °C.

Adicionalmente, já foi reportada sua capacidade em resistir à condição de seca por até 28 dias.

Além disso, essa bactéria apresenta elevada resistência aos metais pesados cádmio, cobalto e zinco (Intorne *et al.*, 2012). Tal característica abre perspectivas para aplicação biotecnológica em processo de biorremediação de ambientes contaminados, além de possivelmente proteger plantas cultivadas nesses locais.

3.3. Estresses em bactérias e a importância dos mecanismos de resposta para as bactérias promotoras do crescimento vegetal

Constantemente, as bactérias enfrentam estresses ambientais, em seus diversos *habitats*, incluindo variação de temperatura, radiação, seca, salinidade, presença de metais pesados em altas concentrações e de outros compostos tóxicos. Essas condições podem gerar estresse oxidativo para a célula (Nies, 1999; Kang *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2011; Perez-Pantoja *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2015; Sévin *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo é gerado por processos metabólicos e também por diversos estresses ambientais (Kohanski *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2011), ocorrendo quando há desbalanço entre produção e detoxificação de ERO (Espécies Reativas de Oxigênio). ERO são moléculas quimicamente reativas produzidas em condições aeróbicas como subproduto de processos metabólicos. O O_2 pode se difundir livremente pela membrana, sendo pouco reativo com as moléculas celulares. No entanto, quando O_2 recebe elétrons, seja pelo transporte de elétrons, reações enzimáticas ou reações de auto-oxidação, são originadas as ERO, que compreendem o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os radicais hidroxila (OH), o oxigênio singleto (1O_2) e o ozônio (O_3) (Scandalios, 2005).

Os lipídios são os maiores alvos do estresse oxidativo em bactérias. Os radicais livres atacam os ácidos graxos polissaturados na membrana e iniciam a reação em cadeia da peroxidação dos lipídios. Consequentemente, ocorre diminuição da fluidez da membrana, alterando suas propriedades, podendo romper ligações com proteínas transmembrana. Com isso, mais radicais livres são formados, ácidos graxos são degradados e diversos produtos são formados,

como aldeídos. Os aldeídos são muito reativos, causam dano às proteínas e ainda podem se difundir e atacar outros alvos na célula (Cabiscol *et al.*, 2000). Outros danos celulares são reportados, como oxidação de proteínas e oxidação do DNA (Ramakrishnan *et al.*, 2007).

Ao final desse processo, em geral, ocorre a lise celular. Então, para garantir a manutenção da homeostase redox intracelular e se protegerem dos efeitos prejudiciais de ERO, as bactérias sintetizam ou absorvem compostos antioxidantes. Estes compostos podem ser enzimáticos como superóxido dismutase e catalase e não enzimáticos como ácido ascórbico, NADPH, NADH e glutathione (Cabiscol *et al.*, 2000).

A presença de altas concentrações de metais pesados no ambiente pode gerar excesso de ERO e conseqüentemente, estresse oxidativo. Além disso, pode provocar alterações na estrutura conformacional de macromoléculas, como DNA e proteínas, comprometendo a sobrevivência das bactérias. A toxicidade dos metais pesados ocorre pela retirada de íons essenciais presentes em moléculas de importância biológica (competição por sítio) ou pela interação com ligantes. Dessa forma, algumas bactérias desenvolveram mecanismos específicos para atenuar o efeito tóxico provocado pelos metais pesados presentes no ambiente, que são: exclusão por barreira de permeabilidade, bombas de efluxo, sequestro intra e extracelular, detoxificação por enzimas e redução da sensibilidade de alvos celulares a íons metálicos (Bruins *et al.*, 2000) (Figura 2). Alguns trabalhos já demonstraram a importância de CzcA, componente de um sistema de efluxo, para a tolerância a metais pesados em estirpes de *P. putida* (Hu e Zhao, 2007), *Caulobacter crescentus* (Hu *et al.*, 2005), *Sinorhizobium meliloti* (Rossbach *et al.*, 2008), *C. metallidurans* (Nies *et al.*, 2006) e *G. diazotrophicus* (Intorne *et al.*, 2012).

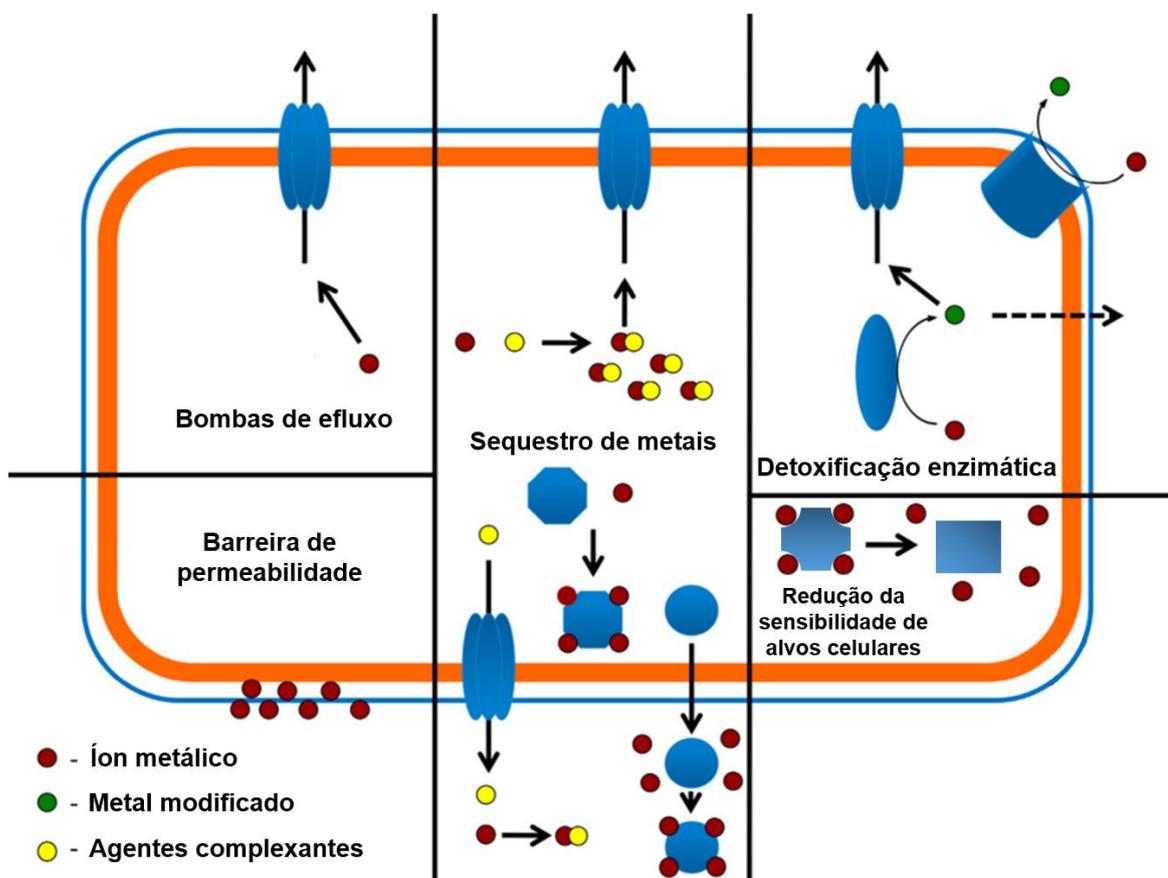


Figura 2. Mecanismos desenvolvidos pelas bactérias para atenuar os efeitos tóxicos provocados por concentrações elevadas de metais pesados. Adaptado de Wheaton *et al.* (2015)

Assim como os metais, compostos xenobióticos e antimicrobianos, como os antibióticos, podem provocar estresse oxidativo em bactérias. Um dos mecanismos importantes desenvolvidos por esses micro-organismos para sobreviver na presença de tais compostos que têm sido caracterizados em diversas espécies, é a utilização de bombas de efluxo multidrogas. Essas bombas transportam os compostos para o meio extracelular, evitando que atuem no alvo dentro da célula, no caso de antimicrobianos, e também evitando danos oxidativos (Sulavik *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2007; Lindemann *et al.*, 2010; Holdsworth e Law, 2012; Segura *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015a).

Os mecanismos de resposta desenvolvidos para tolerar estresses ambientais são de fundamental importância para as PGPB, tanto para o processo de colonização do hospedeiro quanto para a promoção do crescimento vegetal. Com isso, as PGPB conseguem, além de sobreviver, auxiliar um melhor desenvolvimento das plantas sob condições ambientais desfavoráveis para o crescimento (Glick, 2012; Rojas-Tapias *et al.*, 2012b; Souza *et al.*, 2015).

Estresses abióticos, como seca e salinidade, são grandes causas da perda da produtividade agrícola (Vinocur e Altman, 2005). Dessa forma, alguns trabalhos têm mostrado a utilização de PGPB no intuito de atenuar o efeito desses estresses sobre as plantas (Allakhverdiev *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2012; del Amor e Cuadra-Crespo, 2012; Ramadoss *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2014). Rojas-Tapias e colaboradores (2012a) mostraram efeito de atenuação do estresse salino em plantas de milho após a inoculação com estirpes de *Azotobacter*. Outro trabalho mostrou que plantas de trigo em condições de seca, quando inoculadas com estirpes de *A. brasilense* e *Bacillus amyloliquefaciens*, apresentaram melhor desenvolvimento quando comparadas às plantas controle (Kasim *et al.*, 2013).

A produção de osmoprotetores por PGPB pode aliviar o efeito de estresses abióticos em plantas (Glick, 2012). A inoculação de plantas de feijão com *Rhizobium etli* superexpressando trealose possibilitou maior produção de nódulos, maior fixação de nitrogênio e plantas com maior biomassa vegetal quando comparadas a plantas inoculadas com estirpe selvagem (Suárez *et al.*, 2008). De forma similar, plantas de milho inoculadas com *A. brasilense*, superexpressando trealose, mostraram maior resistência à seca do que plantas tratadas com a estirpe selvagem (Rodríguez-Salazar *et al.*, 2009).

Diversos trabalhos têm relatado atenuação dos efeitos tóxicos de metais pesados sobre as plantas por PGPB resistentes a tais elementos (Sheng e Xia, 2006; Mastretta *et al.*, 2009; Touceda-González *et al.*, 2015; Sangthong *et al.*, 2016). Plantas de lentilha inoculadas com *Providencia vermicola*, bactéria resistente a cobre, cresceram melhor em solos contaminados com esse metal. A bactéria atenuou o efeito de toxicidade do metal, aumentando o comprimento radicular, peso seco e área foliar. Além disso, foi possível observar elevada expressão de enzimas envolvidas com a detoxificação de ERO, sugerindo melhora no funcionamento de mecanismos de defesa anti-oxidante da planta (Islam *et al.*, 2016).

Como já mencionado, a bactéria *G. diazotrophicus* mostra ser altamente tolerante a estresses abióticos, apresentando características interessantes de promoção do crescimento vegetal (Saravanan *et al.*, 2007a; Saravanan *et al.*, 2007b; Intorne *et al.*, 2009; Velazquez-Hernandez *et al.*, 2011; Intorne *et al.*, 2012; de Oliveira *et al.*, 2016b). No entanto, até o ano 2000, pouco se sabia a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos com tais características. Diante da

necessidade de informações, foi criado o RioGene, instituto virtual de pesquisa genômica do estado do Rio de Janeiro, possibilitando o sequenciamento do genoma dessa espécie. Ao analisar o genoma completo, foram encontradas 3.938 regiões codificadoras, revelando proteínas envolvidas em processos de fixação de nitrogênio, promoção de crescimento vegetal, metabolismo de açúcares, sistemas de transporte celular, síntese de auxina e produção de bacteriocinas (Bertalan *et al.*, 2009).

Várias regiões que codificam transportadores multidrogas foram encontradas no genoma de *G. diazotrophicus*. No entanto, o papel destes transportadores na resistência a antibióticos ainda não foi elucidado (Muthukumarasamy *et al.*, 1999; Mowade e Bhattacharyya, 2000). Além disso, ainda não foi relatado na literatura se esses transportadores desempenham papéis adicionais na tolerância a estresses abióticos e na promoção do crescimento vegetal.

3.4. Bombas de efluxo multidrogas e seu importante papel em bactérias

As bactérias apresentam tolerância a diversos compostos químicos. Para sobreviver na presença destes compostos, esses micro-organismos desenvolveram mecanismos de resistência, incluindo modificação e degradação de compostos tóxicos, mutação ou modificação do alvos celulares, redução da absorção por meio da membrana e um efluxo ativo por meio de bombas de efluxo multidrogas (Walsh, 2000; Coates *et al.*, 2002; Wilson, 2014).

As bombas de efluxo multidrogas são encontradas em praticamente todas as espécies de bactérias, sendo classificadas de acordo com a composição, número de domínios transmembrana, fonte de energia requerida para o transporte e substrato a ser transportado. Seguindo essas características, as bombas de efluxo multidrogas estão divididas em cinco famílias: RND (*Resistance-Nodulation-Division*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), ABC (*ATP-binding cassette*), SMR (*Small Multidrug Resistance*) e MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) (Putman *et al.*, 2000; Piddock, 2006; Poole, 2007). Os transportadores ABC são dependentes da hidrólise de ATP, enquanto MFS, RND e SMR necessitam de força próton motriz. Já MATE são transportadores que consistem em um sistema antiporte Na^+/H^+ (Martinez *et al.*, 2009).

Com exceção das bombas de efluxo multidrogas do tipo RND, que estão presentes apenas em bactérias Gram-negativas, as demais são amplamente encontrados em espécies de bactérias Gram-positivas e negativas (Sun *et al.*, 2014). Em bactérias Gram-negativas que possuem uma membrana externa associada a lipopolissacarídeos (Silhavy *et al.*, 2010), os transportadores das famílias RND, MFS e ABC requerem presença de duas outras estruturas para formar um sistema de três componentes (de Paula Soares *et al.*, 2015). Estes sistemas tripartes compreendem a presença de um transportador de membrana interna, uma proteína de membrana externa ou OMP (*Outer Membrane Protein*) e uma proteína de fusão de membrana ou MFP (*Membrane Fusion Protein*). As proteínas de membrana interna, tipicamente, pertencem às famílias RND, MFS ou ABC (Du *et al.*, 2015).

Os sistemas de efluxo multidrogas do tipo RND (Figura 3) são os mais bem estudados em procariotos, sendo importantes, principalmente, para resistência a antibióticos (Poole, 2007). AcrAB-TolC em *Escherichia coli* (Ma *et al.*, 1993) e MexAB-OprM em *P. aeruginosa* (Gotoh *et al.*, 1995) são dois exemplos desse tipo de sistema de efluxo.

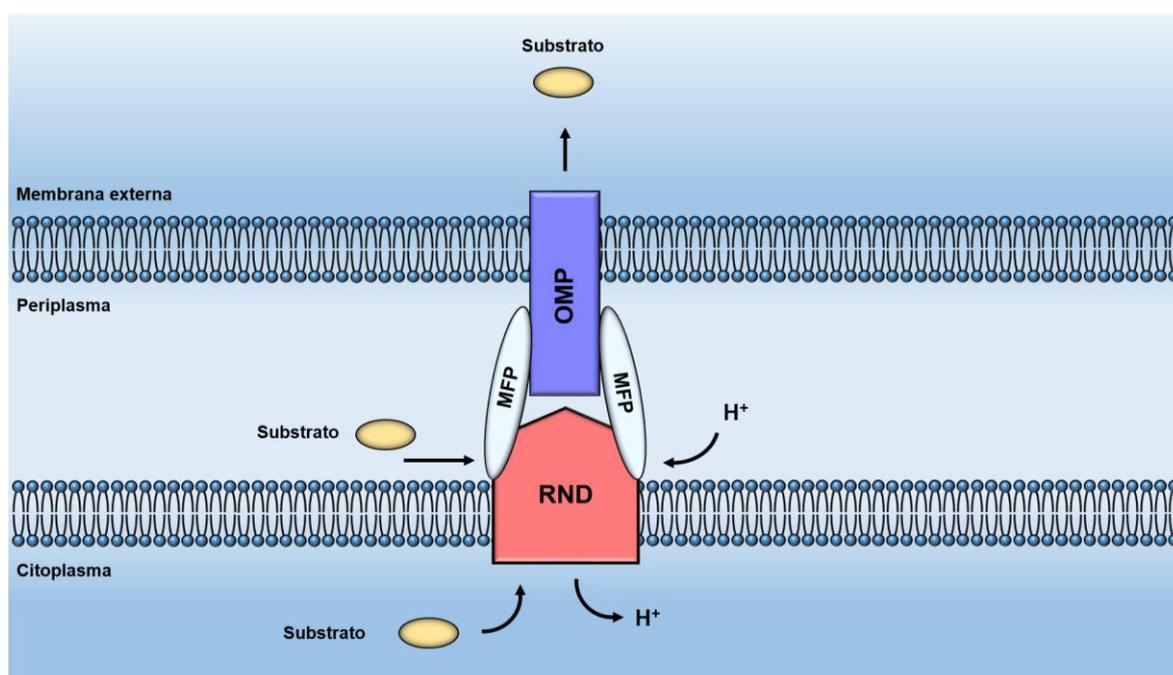


Figura 3. Estrutura e função de bombas de efluxo multidrogas do tipo RND. Este canal formado é responsável por transportar compostos para o exterior da célula. A atividade da bomba é dependente da força próton motriz. Círculos amarelos preenchidos: Substrato a ser transportado; RND: proteína da família *Resistance-Nodulation-Division*; MFP: proteína de fusão de membrana; OMP: proteína de membrana externa. (Lister *et al.*, 2009; Alvarez-Ortega *et al.*, 2013).

O sistema triparte AcrAB-TolC é muito bem caracterizado em *E. coli*, sendo importante para a resistência a diversos agentes inibitórios, como corantes, detergentes e antibióticos. Nessa bactéria, existem pelo menos cinco loci contendo os genes *acr*: os operons *acrRAB*, *acrSEF* e *orfRAB* e os genes isolados *acrD* e *acrZ* (Ma *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1995; Hobbs *et al.*, 2012). No entanto, apenas os produtos do locus *acrRAB* e do gene *acrZ* estão envolvidos com o sistema triparte AcrAB-TolC. Neste sistema, o transportador de membrana interna é a bomba de efluxo AcrB, pertencente à família RND, que possui 12 α -hélices transmembrana, sendo responsável pelo amplo espectro de substrato a ser transportado por esse sistema de efluxo (Murakami *et al.*, 2002). AcrA é a proteína de fusão de membrana, responsável por conectar o transportador de membrana interna e proteína de membrana externa, no espaço periplasmático, sendo indispensável para a montagem do sistema triparte AcrAB-TolC (Ma *et al.*, 1994; Touzé *et al.*, 2004).

O gene *acrR* é responsável por codificar uma proteína repressora similar às proteínas da família TetR de reguladores transcricionais. Essa proteína se liga à região promotora do operon, regulando a expressão de *acrAB* (Li *et al.*, 2007). Recentemente, AcrZ foi descrita como uma pequena proteína que se associa com AcrB, afetando a especificidade de substrato a ser transportado (Hobbs *et al.*, 2012).

AcrD de *E. coli* é uma bomba de efluxo pertencente à família RND, homóloga à AcrB, podendo associar-se com AcrA para transportar substratos específicos (Rosenberg *et al.*, 2000; Aires e Nikaido, 2005). A proteína AcrS regula a expressão do operon *acrEF*, cujos produtos ainda não têm função conhecida. Em relação à proteína OrfR, ainda não se sabe se ela atua como um regulador transcricional de OrfAB, cujo papel funcional também não foi descrito (Ma *et al.*, 1995).

Como mencionado, as bombas de efluxo RND necessitam de uma proteína de membrana externa para realizar o transporte final dos substratos para o meio extracelular. No sistema AcrAB-TolC, em *E. coli*, a proteína de membrana externa é TolC. O gene *tolC* é encontrado em região do genoma distinta do operon *acrAB* (Koronakis *et al.*, 2000; Koronakis *et al.*, 2004). Em outras bactérias, existem proteínas que podem fazer esse mesmo papel de proteínas de membrana externa que TolC (Song *et al.*, 2015). Em *P. aeruginosa*, por exemplo, estão presentes

várias cópias de proteínas homólogas à TolC, como OprM, OprJ e OprN (Hinchliffe *et al.*, 2013).

Diversos estudos têm mostrado que os sistemas de efluxo multidrogas do tipo RND desempenham outros papéis funcionais na célula além de mediar a resistência a antibióticos. Estes papéis incluem o envolvimento na virulência da bactéria (Piddock, 2006), na interação bactéria-planta (Matilla *et al.*, 2007; Takeshima *et al.*, 2013), no transporte de moléculas sinais de *quorum sensing* (QS), no processo de detoxificação de intermediários metabólicos e compostos tóxicos como metais pesados (Aendekerk *et al.*, 2002; Aendekerk *et al.*, 2005; Nishino *et al.*, 2007), solventes (Ramos *et al.*, 2002), antissépticos (Chuanchuen *et al.*, 2001) e antibacterianos produzidos por plantas (Burse *et al.*, 2004).

As bactérias podem utilizar bombas de efluxo para transportar metais pesados para o meio extracelular. Sabe-se que os metais pesados são requeridos em quantidades muito pequenas como cofatores de diversas proteínas bacterianas, conseqüentemente, a regulação da quantidade desses compostos no interior da célula é um fator importante. Na maioria dos casos, as bombas de efluxo que transportam metais pesados apresentam alta especificidade (Saier *et al.*, 1998). No entanto, alguns trabalhos relatam que bombas de efluxo multidrogas podem, além de transportar antibióticos, participar do efluxo de metais (Aendekerk *et al.*, 2002; Perron *et al.*, 2004; Nishino *et al.*, 2007). Nishino e colaboradores (2007) reportaram que as bombas de efluxo multidrogas AcrD e MdtABC, em *S. enterica*, além de contribuírem para a resistência à multidrogas, exercem papel importante na resistência aos metais zinco e cobre.

A comunicação entre as células bacterianas é de grande importância em diversos ambientes, inclusive no interior da planta durante a associação. Um dos sistemas de maior relevância é o de QS, que se baseia na síntese de moléculas sinais (autoindutores) ao longo do crescimento bacteriano. Quando uma determinada concentração é atingida, esses sinais autoindutores interagem com reguladores transcricionais, controlando a densidade populacional. Algumas funções controladas por QS são a biossíntese de peptídeos antimicrobianos, a motilidade e a síntese de polissacarídeos (Jayaraman e Wood, 2008; Boyer e Wisniewski-Dyé, 2009). Um papel chave para o funcionamento do sistema de QS é o transporte dos autoindutores para o meio extracelular. Algumas destas

moléculas passam livremente pela membrana, outras, devido à natureza hidrofóbica, necessitam de transportadores (Martinez *et al.*, 2009).

Alguns trabalhos têm relatado a participação indireta de bombas de efluxo multidrogas no transporte de autoindutores e consequente resposta de QS (Köhler *et al.*, 2001; Aendekerk *et al.*, 2005; Pumbwe *et al.*, 2008). Por exemplo, em *P. aeruginosa*, mutações afetando a expressão de MexAB-OprM influenciam no transporte de 3OC12-HSL, uma molécula autoindutora, para o meio extracelular, afetando a produção de alguns fatores de virulência controlados por QS (Pearson *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1998).

As bombas de efluxo multidrogas podem ter relevante função na interação bactéria-planta, desde a primeira etapa da colonização até a sobrevivência no interior dos tecidos vegetais (Martinez *et al.*, 2009). A análise da expressão gênica de *Pseudomonas putida* na interação com raízes de milho revelou indução de genes, responsáveis por codificar bombas de efluxo multidrogas, no processo de colonização radicular, sugerindo a importância dessas bombas na interação bactéria-planta (Matilla *et al.*, 2007). Em *E. amylovora*, mutantes para os genes *mdtABC*, *mdtUVWA* e também *acrB*, responsáveis por codificar bombas multidrogas, foram defectivos na capacidade de virulência desse fitopatógeno em macieiras (Burse *et al.*, 2004; Pletzer e Weingart, 2014). Em *P. syringae*, a bomba MexAB-OprM está envolvida no processo de estabelecimento dessa bactéria na planta hospedeira (Vargas *et al.*, 2011).

Além da participação dessas bombas no estabelecimento de fitopatógenos, já foi observado que atuam também na interação de plantas com rizóbios. Em *S. meliloti*, a bomba SmeAB está envolvida com o processo de nodulação em plantas de *Medicago sativa* (Eda *et al.*, 2011). Adicionalmente, a deleção de genes codificadores para uma bomba de efluxo multidrogas em *B. japonicum* prejudicou o processo de nodulação e também a capacidade de fixação biológica de nitrogênio (Takeshima *et al.*, 2013). A literatura relata o papel relevante das bombas de efluxo multidrogas na associação de plantas com bactérias simbiotes. Mutantes de *Rizhobium. etli*, simbiote de *Phaseolus vulgaris*, afetados na bomba RmrAB, da família MFS, formaram 40% menos nódulos do que a estirpe selvagem. Além disso, os mutantes foram mais sensíveis a fitoalexinas, flavonoides e ácido salicílico (González-Pasayo e Martínez-Romero, 2000). Em *B. japonicum*, foi reportado envolvimento de bombas

de efluxo multidrogas no processo de FBN e também no estabelecimento da simbiose com *G. max* (Lindemann *et al.*, 2010; Takeshima *et al.*, 2013).

A literatura reporta a participação de bombas de efluxo multidrogas na resposta de bactérias a diversas condições e na interação bactéria-planta. No entanto, não há relatos sobre as funções dessas bombas em *G. diazotrophicus*. Sendo assim, torna-se necessário entender a importância e o papel das bombas de efluxo multidrogas em *G. diazotrophicus*, na tolerância a estresses ambientais e na promoção do crescimento vegetal.

3.5. *A. thaliana*: modelo para estudos de interação bactéria-planta

A bactéria *G. diazotrophicus* possui características interessantes de promoção do crescimento vegetal, no entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos na interação dessa bactéria com plantas. Nesse tipo de estudo, a utilização do hospedeiro natural, cana-de-açúcar, de onde foi primeiramente isolada (Cavalcante e Döbereiner, 1988), não é simples. Essa planta possui ciclo de vida longo e alto porte, dificultando a condução de experimentos em condições controladas, além de ter genoma octaploide e complexo, o que limita a obtenção de mutantes e plantas transgênicas, ferramentas que auxiliam nos estudos moleculares.

Diversos trabalhos têm reportado, também, o uso de *A. thaliana* no estudo dos mecanismos envolvidos na promoção do crescimento por PGPB (Cohen *et al.*, 2015; Kurepin *et al.*, 2015; Maldonado-González *et al.*, 2015; Sukweenadhi *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015b; Zhao *et al.*, 2016). Spaepen e colaboradores (2014) observaram a importância de auxina produzida por PGPB no desenvolvimento radicular de *A. thaliana*. A inoculação com *A. brasilense* selvagem alterou a arquitetura radicular, fato não observado em plantas inoculadas com o mutante FAJ0009 (afetado na capacidade de biossíntese de auxina). E ainda, *A. brasilense* selvagem promoveu crescimento vegetal, além de elevar a concentração de auxina nas plantas. Adicionalmente, a produção de auxina por *A. brasilense* alterou o padrão da expressão de genes relacionados com vias hormonais e de defesa, indicando papel importante desse hormônio na interação *Azospirillum - Arabidopsis*.

A. thaliana é uma espécie vegetal, de pequeno porte, membro da família Brassicaceae, mesma família das mostardas. Essa espécie está distribuída na Europa, Ásia e América do Norte (Meyerowitz e Somerville, 1994). Apesar de não apresentar valor econômico, é amplamente utilizada como organismo modelo para estudos de fisiologia, genética e biologia molecular (Meyerowitz e Somerville, 1994; Pyke, 1994; Meinke *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2014; Meng *et al.*, 2015; de Oliveira *et al.*, 2016a; Meng *et al.*, 2016)

A sua utilização como planta modelo se deve a algumas características particulares, como pequeno porte, ciclo de vida completo em seis semanas, capacidade de crescer sob condições controladas e alta taxa de fecundação. Adicionalmente, *A. thaliana* é facilmente transformada por *Agrobacterium tumefaciens*, possibilitando a condução de experimentos de transgenia de forma fácil e eficiente (Meyerowitz e Pruitt, 1985; Meinke *et al.*, 1998).

Diante da importância dessa espécie como organismo modelo, no início da última década, seu genoma foi sequenciado. Os dados provenientes do sequenciamento mostraram que o genoma de *A. thaliana* é constituído por aproximadamente, 125 Mb distribuídos em cinco cromossomos, tendo 25.498 genes codificadores (Kaul *et al.*, 2000). A disponibilidade de toda essa informação genética juntamente com as características particulares da espécie tornam *A. thaliana* um importante modelo na busca por elucidar os mecanismos moleculares envolvidos no processo de interação entre bactérias e plantas.

Recentemente, nosso grupo demonstrou que *G. diazotrophicus* é capaz de promover crescimento vegetal de *A. thaliana* (de Souza *et al.*, 2015a). Nesse trabalho, foi observado que a inoculação desta bactéria promoveu aumento na massa fresca de parte aérea, além de aumento nas taxas fotossintéticas. Estes resultados abrem excelentes perspectivas para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na interação *A. thaliana* - *G. diazotrophicus*

3.6. Mutagênese insercional como ferramenta de estudos em genômica funcional de *G. diazotrophicus*

Uma das ferramentas amplamente utilizadas no estudo de genômica funcional, na tentativa de elucidar os vários mecanismos de interação e resistência, é a utilização de mutantes de inserção. Tal metodologia consiste na

interrupção de genes por meio de inserção aleatória de transposon (Rouws *et al.*, 2008; Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2014; Busset *et al.*, 2016; Krämer *et al.*, 2016)

Juntamente com as informações genéticas disponíveis, a utilização de mutagênese em *G. diazotrophicus* já permitiu identificar genes importantes para promoção do crescimento vegetal e também para a resposta a estresses abióticos. Meneses e colaboradores (2011) reportaram a importância da produção de exopolissacarídeos para a formação de biofilme e colonização de raízes de arroz. A mutação por transposon Tn5 no gene *gumD* permitiu identificar a importância desse gene na produção de biofilme, na adesão superficial das raízes e na colonização radicular. Os dados obtidos sugerem que o gene *gumD* em *G. diazotrophicus* esteja envolvido na biossíntese de exopolissacarídeos importantes para a produção de biofilme e também para a colonização da planta por essa bactéria.

Alquéres e colaboradores (2013) identificaram a importância dos genes SOD (superóxido dismutase) e GR (glutathione redutase) em *G. diazotrophicus* PAL5 na colonização endofítica de raízes de arroz. Os mutantes *gr::Tn5* e *sod::Tn5* mostraram maior sensibilidade aos estresses causados por paraquat e H₂O₂ em comparação com a estirpe selvagem. Adicionalmente, ao analisar a eficiência de colonização dos mutantes em raízes de plantas de arroz, foi possível observar um número reduzido de bactérias no tecido radicular em comparação com plantas inoculadas com a estirpe selvagem. Esses dados indicam a importância do sistema de detoxificação de ROS em *G. diazotrophicus* na etapa de colonização vegetal

Outro trabalho utilizando mutagênese revelou a importância do gene *tonB*, em *G. diazotrophicus*, no transporte de ferro e sideróforo, formação de biofilme e atividade da nitrogenase. Para isso, foi isolado um mutante com inserção Tn5 na região promotora do gene *tonB*. O mutante mostrou reduzida taxa de crescimento na presença e ausência de ferro. Adicionalmente, o mutante perdeu a capacidade de formação de biofilme e teve a atividade de nitrogenase reduzida (de Paula Soares *et al.*, 2015). Com esses resultados, é possível inferir que o transportador TonB também seja importante para a promoção do crescimento vegetal, uma vez que o mutante perdeu a capacidade de formação de biofilme, característica importante para o processo de colonização (Molina *et al.*, 2005; Meneses *et al.*, 2011), além da reduzida atividade da enzima nitrogenase, afetando a FBN.

Como já mencionado, *G. diazotrophicus* é capaz de promover o crescimento vegetal por meio da produção de AIA. Lee e colaboradores (2004), investigando a importância da produção desse fitormônio para promoção do crescimento vegetal desempenhada por *G. diazotrophicus*, descobriram que produtos dos genes *ccm* são essenciais para a biogênese de citocromo c, e necessários para a produção de 90% de AIA em *G. diazotrophicus*.

Velazquez-Hernandez e colaboradores (2011) identificaram que o gene *lsdA*, que codifica uma levanasucrase, está envolvido na tolerância a NaCl e à sacarose em *G. diazotrophicus*. O mutante para *lsdA* mostrou diminuição de tolerância de 65,5% em concentrações de 50-150 mM de NaCl e de 89% em 876 mM de sacarose. Além disso, foi possível observar a importância da enzima levanasucrase em processos de defesa contra a desidratação e para a formação de biofilme.

Nosso grupo também tem buscado elucidar os mecanismos utilizados por *G. diazotrophicus* na tolerância a estresses ambientais e também no processo de colonização e promoção do crescimento vegetal. Intorne e colaboradores (2012) relataram a resistência a altas concentrações de Cd^{+2} , Co^{+2} e Zn^{+2} nessa bactéria. Adicionalmente, identificaram um mutante incapaz de crescer na presença de ZnO, também altamente sensível aos metais supracitados. O gene mutado foi identificado como *czcA*, que codifica uma proteína envolvida com o efluxo de metal e faz parte do operon *czc*. Os resultados observados revelam a importância do operon *czc* na resistência de *G. diazotrophicus* aos metais pesados cádmio, cobalto e zinco.

Intorne e colaboradores (2009) identificaram quatro mutantes defectivos para a solubilização de zinco e fósforo, ao avaliar uma biblioteca de mutantes de inserção por transposon Tn5. Os genes mutados foram identificados como *pqqB*, *pqqC*, *pqqE*, que participam da via de biossíntese e transporte da molécula pirroloquinolina quinona – PQQ, e *gdhA* que codifica uma glicose desidrogenase. PQQ é cofator da enzima glicose desidrogenase, que converte glicose em ácido glucônico. Os resultados mostram que a produção de ácido glucônico é a via mais importante para a solubilização de tais nutrientes pela bactéria. Adicionalmente, em um trabalho posterior, foi possível observar que os mutantes *pqqB*, *pqqC* e *pqqE* perderam a capacidade de promoção do crescimento vegetal quando inoculados em *A. thaliana*, sugerindo que a via de produção da molécula PQQ é

importante também para a capacidade de *G. diazotrophicus* promover crescimento vegetal (Souza, 2015).

Na busca por elucidar os mecanismos de *G. diazotrophicus* envolvidos na tolerância ao estresse osmótico, De Oliveira (2012) identificou um mutante que, quando exposto a 600 mM de sacarose e a baixas concentrações de K⁺, foi afetado drasticamente no seu crescimento. Ao sequenciar esse mutante, foi verificado que o gene interrompido, *kup*, codifica um transportador de K⁺. Esses resultados revelam a importância de K⁺ para a osmotolerância em *G. diazotrophicus* (de Oliveira, 2012).

Em nossa equipe, um *screening* de uma biblioteca de mutantes de inserção Tn5, na presença de diferentes agentes estressores (osmótico e metais pesados), permitiu selecionar 267 mutantes que apresentam crescimento negativamente afetado quando expostos a tais condições (de Oliveira, 2012; Intorne, 2012). Entre esses mutantes, foram identificados genes que codificam diferentes bombas de efluxo multidrogas, incluindo mutantes nos genes *acrA* e *acrB*, que codificam componentes da bomba de efluxo multidrogas AcrAB-OmpA (Brown *et al.*, 2007; Ruiz e Levy, 2013; Du *et al.*, 2014; Spaniol *et al.*, 2015). O estudo desses mutantes pode auxiliar na elucidação de mecanismos moleculares envolvidos na resposta a estresses abióticos em *G. diazotrophicus* e também na promoção do crescimento vegetal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos e condições de cultivo

A estirpe selvagem de *G. diazotrophicus* PAL5, da Coleção de Culturas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil), foi gentilmente cedida pelo Dr. Fábio L. Olivares, do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT/UENF). Os mutantes GDP28B08 e GDP12H02 de *G. diazotrophicus* PAL5 foram obtidos da coleção de mutantes de inserção de *G. diazotrophicus* PAL5, do laboratório de Biotecnologia da UENF (Intorne *et al.*, 2009). Tal biblioteca foi gerada por mutagenese insercional, utilizando o kit EZ-Tn5 <R6Kyor/KAN-2>Tnp Transposome (Epicentre, Madison, WI, USA). Ao realizar um *screening* desta biblioteca na presença de diferentes estressores, foi selecionado um conjunto de 267 mutantes que tiveram crescimento afetado em pelo menos um desses agentes, compondo uma sub-coleção de mutantes sensíveis a estresses (de Oliveira, 2012; Intorne, 2012). O sequenciamento dos genes afetados em cada um desses mutantes permitiu identificar os mutantes GDP28B08 e GDP12H02, interrompidos nos genes *acrA* e *acrB*, respectivamente.

As estirpes selvagem e mutantes foram cultivadas em meio DYGS (composição em g.L⁻¹: 2,0 glicose; 1,5 peptona bacteriológica; 2,0 extrato de levedura; 0,5 K₂HPO₄; 0,5 MgSO₄.7H₂O; 1,5 ácido glutâmico) com pH ajustado para 6,0 (Döbereiner *et al.*, 1999); meio LGI modificado (LGI_m) (composição em

g.L⁻¹: 10,0 glicose; 0,2 K₂HPO₄; 0,6 KH₂PO₄; 0,2 MgSO₄·7H₂O; 1,32 (NH₄)₂SO₄; 0,02 CaCl₂·2H₂O; 0,002 NaMoO₄·2H₂O e 0,018 FeCl₃·6H₂O) com pH ajustado para 5,5; e meio LGI-P (composição em g.L⁻¹: 100,0 sacarose; 0,2 K₂HPO₄; 0,6 KH₂PO₄; 0,2 MgSO₄·7H₂O; 0,2 CaCl₂·2H₂O; 0,002 Na₂MoO₄·H₂O; 0,01 FeCl₃·6H₂O), com pH ajustado para 5,5, suplementado com 5 mL azul de bromotimol 0.5% em KOH 0,2 M (Cavalcante e Döbereiner, 1988). Ágar (1,6 g.L⁻¹ para meio semissólido e 15 g.L⁻¹ para meio sólido) foi adicionado aos meios de cultura quando necessário. As células foram cultivadas sob constante agitação e temperatura (250 min⁻¹ e 30°C) em *shaker* orbital (C25 Incubator, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA) e em placas de Petri, incubadas em estufa bacteriológica (Heraeus), a 30 °C.

Os estoques das culturas foram mantidos em glicerol 12,5% (v/v) a -80 °C. Para isso, uma colônia isolada de cada estirpe bacteriana foi inoculada em meio DYGS e cultivada até atingir densidade óptica (DO₆₀₀) igual a 1,0. A densidade óptica foi determinada pela utilização de um espectrofotômetro (UV 1800 Shimadzu). Um volume de 750 µL desta cultura foi aliqotado em microtubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 250 µL de glicerol 50%. As culturas estoque foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

4.2. Organização genômica dos genes *acrA* e *acrB* em *G. diazotrophicus* PAL5

As sequências dos genes *acrA* e *acrB* de *G. diazotrophicus* PAL5 (RefSeq: NC_010125.1) e de diferentes espécies relacionadas foram obtidas da base de dados do NCBI (NCBI, 2016). Os genes homólogos a *acrA* e *acrB* das seguintes bactérias também foram incluídos na análise de operon: *Gluconobacter oxydans* 621H (RefSeq: NC_006677.1), uma bactéria próxima filogeneticamente de *G. diazotrophicus* PAL5; *H. seropedicae* SmR1 (NC_014323.1), um outro endófito de cana-de-açúcar; *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (NC_004578.1) e *E. amylovora* CFBP1430 (NC_013961.1), duas espécies de fitopatógenos; *C. metallidurans* CH34 - megaplasmídeo (NC_007974.2), espécie tolerante a metais pesados; *P. aeruginosa* PAO1 (NC_002516.2) e *E. coli* K-12 (NC_000913.3), bactérias onde esses genes já foram estudados (Poole e Srikumar, 2001; Weeks *et al.*, 2014).

Além disso, genes de *G. diazotrophicus* PAL5 responsáveis por codificar transportadores previamente identificados (Alquères, 2010) foram pesquisados no banco de dados do NCBI (NCBI, 2016), e aqueles genes cujos produtos apresentam os mesmos domínios conservados de AcrA (domínio HlyD_3; Código Pfam: PF13437) e de AcrB (domínio ACR_tran; Código Pfam: PF00873) foram selecionados e suas sequências obtidas do banco de dados do NCBI (NCBI, 2016).

As bases de dados BioCyc (Caspi *et al.*, 2014) e MicrobesOnline (Dehal *et al.*, 2010) foram usadas para a predição *in silico* da organização do operon de todos os genes supracitados.

4.3. Análises filogenéticas das proteínas AcrA, AcrB e OprM

As sequências das proteínas AcrA, AcrB e OprM obtidas de *G. diazotrophicus* PAL5 e de proteínas codificadas por genes homólogos organizados em operon, identificados com base no item 4.2, foram utilizadas para as análises filogenéticas. A proteína TolC de *G. diazotrophicus* PAL 5 também foi incluída na análise filogenética das proteínas homólogas de membrana externa, no intuito de comparar com as proteínas OprM e TolC já caracterizadas (Mine *et al.*, 1999; Sharff *et al.*, 2001). Todas as sequências de aminoácidos foram obtidas da base de dados UniProt (UniProt, 2016). Os alinhamentos destas proteínas foram realizados utilizando o programa ClustalW (parâmetro *default*) (Larkin *et al.*, 2007). A proteína HAE de *Methanoregula boonei* 6A8 foi utilizada como grupo externo (Número de acesso do UniProt: A7I766) nas três análises filogenéticas (proteínas contendo os domínios ACR_tran, HlyD_3 e OEP).

Os resultados dos alinhamentos foram submetidos ao programa MEGA versão 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) para gerar as árvores filogenéticas utilizando o método *Neighbor-joining* (NJ). Os parâmetros utilizados foram: os modelos de substituição Dayhoff, para os conjuntos proteicos contendo os domínios ACR_tran e HlyD_3, e de Poisson, para o conjunto proteico contendo o domínio OEP; 1.000 *bootstrap* e deleção parcial de 95%. Os modelos de substituição aplicados foram definidos tendo como base os melhores valores de *bootstrap* obtidos para cada árvore. Os resultados foram visualizados usando o programa MEGA versão 7.0 (Kumar *et al.*, 2016)

4.4. Obtenção do perfil de crescimento das estirpes selvagem e mutantes

Para comparar o perfil de crescimento da estirpe selvagem e dos mutantes $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$, foram obtidas curvas de cultivo. Para isto, pré-inóculos foram preparados, adicionando 750 μL de cultura estoque de cada estirpe e meio LGIm q.s.p 7,5 mL em tubos Falcon de 50 mL. As células foram cultivadas até atingir a $\text{DO}_{600} = 1,0$.

Para o preparo do inóculo, 5 mL do pré-inóculo de cada estirpe bacteriana foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 45 mL de LGIm. Os frascos foram cobertos com mantas de algodão envoltas por gaze e incubados. O crescimento das culturas foi acompanhado, retirando-se alíquotas para determinação da DO_{600} a cada 2 horas (h) nas primeiras 12 h e depois a cada 3 h, até completar 36 h de cultivo.

Após a análise das curvas, foi identificada a $\text{DO}_{600(\text{fe})}$ referente ao ponto médio da fase exponencial de crescimento de cada estirpe bacteriana, que foi utilizada como referência para a condução dos ensaios posteriores, exceto para a avaliação de resistência a antibióticos. Isso foi feito porque a fase exponencial de crescimento reflete uma cultura metabolicamente mais ativa.

4.5. Avaliação da resistência a antibióticos em *G. diazotrophicus* PAL5 selvagem e mutantes

Neste ensaio, os pré-inóculos foram preparados em frascos Erlenmeyers de 50 mL, contendo 300 μL de cultura estoque das estirpes selvagem e mutantes e DYGS q.s.p (quantidade suficiente para) 3 mL. Esses frascos foram cobertos com mantas de algodão envoltas com gaze e incubados. As células foram cultivadas até atingir $\text{DO}_{600} = 1,0$.

Para o preparo do inóculo, foram adicionados 300 μL do pré-inóculo de cada estirpe e DYGS q.s.p 3 mL em frascos Erlenmeyers de 50 mL. Esses frascos foram cobertos com mantas de algodão envoltas com gaze e incubados. Da mesma forma, as células foram cultivadas até $\text{DO}_{600} = 1,0$. Gotas (10 μL) de cada estirpe, nas diluições 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , foram inoculadas em placas de Petri contendo meio LGIm controle e LGIm suplementado com três diferentes concentrações de ampicilina, estreptomicina e espectinomicina (50, 100 e 150

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e gentamicina (25, 50 e 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). As placas de Petri foram incubadas em estufa durante cinco dias e, em função do crescimento bacteriano, foi avaliada a sensibilidade e/ou resistência das estirpes às diferentes concentrações dos antibióticos testados.

4.6. Avaliação da tolerância das estirpes selvagem e mutantes a metais pesados

Para este ensaio, o preparo do pré-inóculo e do inóculo foi realizado como no item 4.4. Após as culturas atingirem a $\text{DO}_{600(\text{fe})}$, elas foram ajustadas para DO_{600} 1,0 com meio LGM. Volumes de 500 μL dessa solução bacteriana foram adicionados a frascos Erlenmeyers de 50 mL contendo 4,5 mL de meio LGM controle ou suplementado com cádmio ($\text{CdCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$; 0,09 mM), zinco (ZnCl_2 ; 0,9 mM) ou cobalto ($\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1,2 mM) Os erlenmeyers foram cobertos com mantas de algodão envoltas com gaze e incubados por 24 h. Os ensaios foram repetidos três vezes com cinco repetições internas em cada.

Os valores descritos para cada metal correspondem à concentração final de cada tratamento. Essas concentrações foram definidas previamente (Souza, 2015) e são capazes de inibir 20-30% do crescimento da estirpe selvagem. As soluções de metais foram esterilizadas por filtração.

4.7. Caracterização da tolerância à variações de temperatura e à H_2O_2 nas bactérias

Neste ensaio, o inóculo foi cultivado como descrito no item 4.4. Em seguida, após atingir a $\text{DO}_{600(\text{fe})}$, esta cultura foi ajustada para 1,0. Gotas (10 μL) de cada estirpe, nas diluições 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , foram inoculadas em placas de Petri contendo meio LGM para avaliar a resistência a diferentes temperaturas. As placas foram incubadas em estufa a 25 °C, 30 °C e 35 °C durante 5 dias e, em função do crescimento bacteriano, foi avaliada a sensibilidade e/ou resistência das estirpes às variadas temperaturas.

Com o objetivo de avaliar o efeito de H_2O_2 sobre o crescimento das bactérias, foi realizado o procedimento de disco de difusão em ágar. Após o

cultivo, já descrito, 100 μL de inóculo ($\text{DO} = 1,0$) de cada estirpe foram plaqueados em meio DYGS com o auxílio de uma alça de Drigalski. Um disco de papel estéril embebido com 5 μL de solução de H_2O_2 10 mM foi disposto no centro de cada placa de Petri. Passados três dias em estufa, o diâmetro do halo de inibição foi registrado. Em ambos os ensaios, cada tratamento conteve três repetições. Os ensaios foram realizados três vezes de modo independente.

4.8. Ensaio de solubilização de zinco e fósforo

O inóculo foi cultivado como descrito no item 4.4. Após atingir a $\text{DO}_{600(\text{fe})}$, esta cultura foi ajustada para $\text{DO}_{600} = 1,0$. Gotas (10 μL) de cada estirpe foram inoculadas em placas de Petri contendo meio DYGS suplementado com 0,54% de $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (concentração final de fósforo 0,1%) ou 0,12% de ZnO e 5 mL azul de bromotimol 0.5% em KOH 0,2 M (concentração final de zinco 0,1%) (Mowade e Bhattacharyya, 2000; Saravanan *et al.*, 2007b). As placas foram incubadas por três dias. Após esse período, foi registrada formação do halo de solubilização em ambas as condições. Nas duas análises, cada tratamento conteve três repetições, tendo sido realizados três ensaios independentes.

4.9. Ensaio de fixação biológica de nitrogênio

No intuito de verificar possíveis alterações na capacidade dos mutantes em fixar nitrogênio, foi realizado o cultivo das estirpes selvagem e mutantes conforme descrito no item 4.4. Após atingirem as respectivas $\text{DO}_{600(\text{fe})}$, as culturas foram centrifugadas (3500 rpm, 25 °C, 3 min) para a retirada do meio. As células foram lavadas por três vezes utilizando solução salina 0,85%. Após a última lavagem a DO_{600} foi ajustada para 1,0. Em seguida, 10 μL de solução de cada estirpe foram adicionados no centro de frascos de penicilina (10 mL), contendo 5 mL do meio LGI-P semissólido (Day e Döbereiner, 1976). Após 10 dias de cultivo em estufa, foi avaliada a formação da película aerotóxica. Cada estirpe foi representada por três repetições. Esse ensaio foi realizado três vezes de modo independente.

4.10. Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de *A. thaliana* (Columbia-0, tipo selvagem) gentilmente cedidas pela Dra. Jen Sheen (Departamento de genética - *Harvard Medical School* - USA) foram utilizadas neste trabalho. Para o plantio, as sementes foram submetidas à desinfestação superficial em etanol 95% durante 1 min, seguida de solução de hipoclorito de sódio 1,25%, sob agitação, por 10 min. O excesso desses reagentes foi removido mediante lavagem abundante com água destilada. As sementes permaneceram imersas em água durante 48 h sob temperatura de 4 °C, antes da semeadura.

A semeadura foi realizada em copos plásticos de 50 mL contendo substrato *West Garden* (*West Garden* Indústria e comércio LTDA), autoclavado (120 °C, 1 atm, 40 min) e irrigado com água destilada. Este material foi acondicionado em bandejas cobertas com filme de PVC transparente, a fim de manter a umidade em nível elevado nos primeiros 10 dias, o que favorece a germinação. Após este período, o filme de PVC foi removido e as plantas inoculadas conforme descrito no item 4.11. Após 20 dias da semeadura as plantas foram irrigadas em intervalo de dois dias, com solução de Hoagland modificada 25% (Composição em mM - solução 100%: KNO₃ 6, Ca(NO₃)₂.4H₂O 4, NH₄H₂PO₄ 2, MgSO₄.7H₂O 1, KCl 0,05, H₃BO₃ 0,025, MnSO₄.H₂O 0,002, ZnSO₄.7H₂O 0,002, CuSO₄.5H₂O 0,0005, H₂MoO₄ 0,0005, NaFeDTPA 0,053) (Hoagland e Arnon, 1950). O pH da solução foi ajustado para 6,5. A sala de cultivo utilizada foi mantida sob temperatura de 22 °C, 60% de umidade e irradiância de 120 μmol.fótons.m⁻².s⁻¹, durante 12 h diárias. As plantas foram mantidas nessas condições até 40 dias após a inoculação.

4.11. Inoculação de plantas de *A. thaliana* com estirpes selvagem e mutantes

Uma colônia isolada das estirpes selvagem e mutantes foi transferida para frascos Erlenmeyers de 50 mL contendo 3 mL de meio DYGS. Após cada cultura ter atingido DO₆₀₀ 1,0, estas foram centrifugadas (3500 rpm, 25 °C, 3 min) para a retirada do meio. As células foram lavadas por três vezes utilizando água ultra-pura previamente esterilizada. Após a última lavagem a DO₆₀₀ foi ajustada

para 0,0001 (equivalente a 10^4 células mL⁻¹), utilizando água ultra-pura esterilizada, e 10 mL de cada solução bacteriana foram dispostas em uma placa de Petri. O tratamento controle foi representado por uma placa de Petri contendo água ultra-pura esterilizada.

Plantas de *A. thaliana* (Columbia-0) com 10 dias de idade provenientes do substrato foram utilizadas para a realização do processo de inoculação. Neste intuito, para cada tratamento (controle, selvagem, $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$), nove plantas foram retiradas do substrato e apenas suas raízes foram colocadas em contato direto com as soluções bacterianas ou água (controle). Após três horas, as plantas foram transferidas para potes de jardinagem de 200 mL contendo substrato *West Garden*, autoclavado (120 °C, 1 atm, 40 min), previamente irrigados com água destilada. O substrato foi previamente esterilizado por autoclavagem (120 °C, 1 atm, 40 min). Este material foi acondicionado em bandejas cobertas com filme de PVC transparente por 10 dias. As condições de cultivo foram conduzidas como descrito no item 4.10.

4.12. Análise da promoção do crescimento vegetal

Após 40 dias de cultivo, as amostras foram avaliadas quanto ao número de folhas, à área foliar, à massa fresca de parte aérea e radicular. Os valores da área foliar foram obtidos utilizando um medidor digital de área foliar (*Li-Cor 3100 area meter*), disponibilizado para uso pelo Laboratório de Fisiologia Vegetal/UENF. Já os valores de massa fresca foram determinados por pesagem em balança analítica. Todas as análises foram realizadas imediatamente após a coleta. Neste ensaio foram avaliadas nove plantas em cada tratamento. Para esse ensaio, foi realizada apenas apenas uma repetição independente.

4.13. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram testados pela análise de variância (ANOVA). O teste Tukey foi utilizado para mensurar a significância entre os tratamentos ao nível de 1% de significância, utilizando o software Genes (versão 2013.5.1) (Cruz, 2013).

5. RESULTADOS

5.1. Organização genômica dos genes *acrA* e *acrB* em *G. diazotrophicus* PAL5

Os mutantes GDP28B08 e GDP12H02 foram previamente identificados com inserção do transposon Tn5 nos genes *acrA* (*Locus tag*: GDI_RS06095) e *acrB* (*Locus tag*: GDI_RS06100), respectivamente. O gene *acrA* codifica uma proteína de fusão de membrana (AcrA), enquanto *acrB* codifica uma proteína de membrana interna pertencente à família RND (AcrB). A análise *in silico*, utilizando o banco de dados BioCyc e MicrobesOnline, sugere que os genes *acrA*, *acrB* e um terceiro gene, *oprM* (*Logus tag*: GDI_RS06105), subsequente à *acrB*, estejam organizados em operon. O gene *oprM* é responsável por codificar uma proteína de membrana externa pertencente à superfamília NodT, completando a bomba de efluxo multidrogas triparte AcrAB-OprM (Figura 4).

A análise do contexto genômico permitiu identificar um outro gene, *tetR* (*Locus tag*: GDI_RS06090), próximo ao operon *acrAB-oprM*. Esse gene é responsável por codificar uma proteína de regulação transcricional pertencente à família TetR (Figura 4).

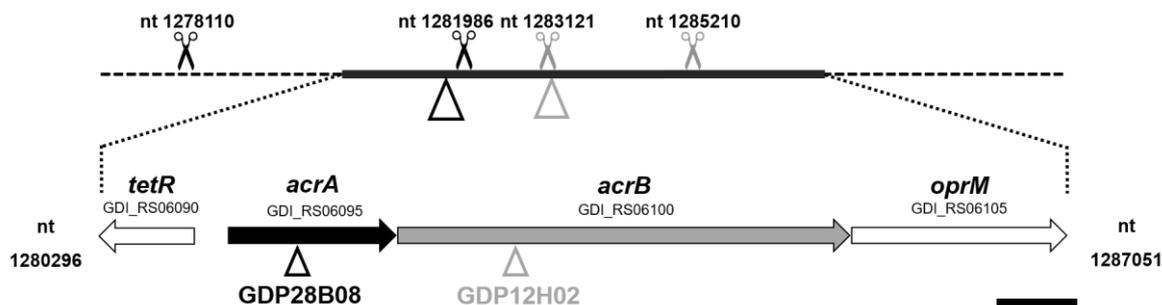


Figura 4. Organização genômica dos genes flanqueando as inserções do transposon Tn5 em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. Grupo gênico flanqueando *acrA* e *acrB* de acordo com a base de dados do NCBI. As setas indicam a orientação da fase de leitura aberta. *Seta preta*: gene *acrA* interrompido neste estudo; *seta cinza*: gene *acrB* interrompido neste estudo; *setas brancas*: genes não interrompidos; *nt*: nucleotídeo; *tesouras pretas*: sítios de restrição de *EcoRI* imediatamente antes e após o local de inserção de Tn5 no gene *acrA*; *tesouras cinzas*: sítios de restrição de *EcoRI* imediatamente antes e após o local de inserção de Tn5 no gene *acrB*; *triângulo preto*: sítio de inserção de Tn5 no gene *acrA*; e *triângulo cinza*: sítio de inserção do Tn5 no gene *acrB*. *Barra de escala*: 500 pb

5.2. Organização genômica do operon *acrAB-oprM* e seus homólogos em outras espécies de bactérias

A organização genômica dos genes *acrA*, *acrB* e *oprM* de *G. diazotrophicus* PAL5 foi comparada com seus homólogos em outras espécies, utilizando os bancos de dados BioCyc e MicrobesOnline. Foi possível observar alta similaridade de organização e que tais genes também estão organizados em operon (Figura 5). No entanto, para as espécies *E. amylovora*, um fitopatógeno, e *E. coli*, organismo cujo transportador AcrAB-TolC é bem caracterizado, é possível observar que o gene *tolC*, homólogo a *oprM*, que codifica a proteína de efluxo de membrana externa, não está organizado em operon, junto a *acrA* e *acrB* (Figura 5). Vale ressaltar que, em determinadas espécies, como *P. syringae* DC3000 e *P. aeruginosa* PAO1, os genes componentes do operon recebem nomenclatura distintas.

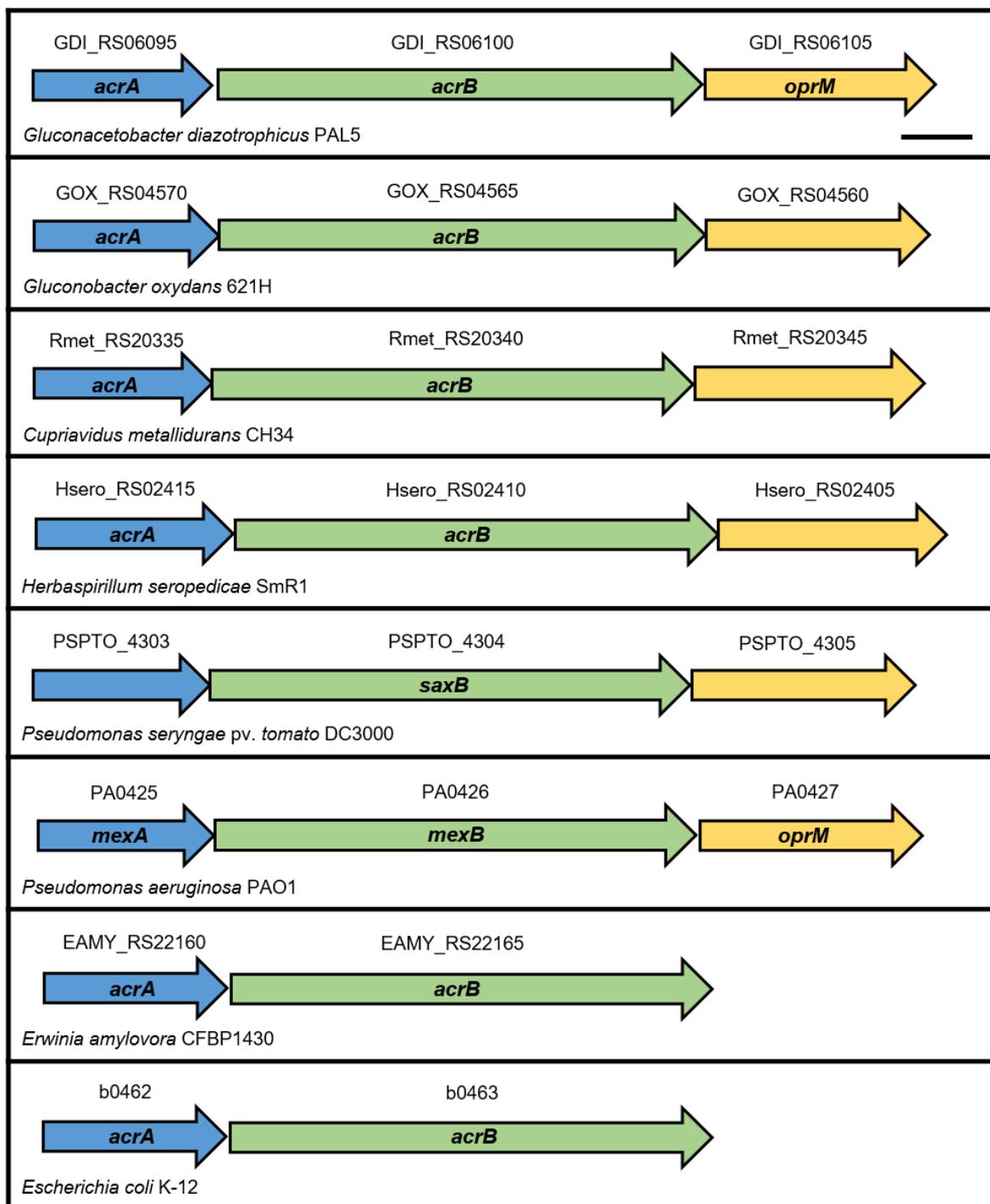


Figura 5. Comparação da organização genômica dos genes *acrA*, *acrB* e *oprM* em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 e outras espécies de bactérias. As cores das setas indicam o tipo de proteína a ser codificada por cada gene. *Seta azul*: proteína de fusão de membrana; *seta verde*: proteína de membrana interna pertencente à família RND; e *seta amarela*: proteína de membrana externa. *Barra de escala*: 500 pb.

5.3. Presença de outros operons de transportadores RND no genoma de *G. diazotrophicus* PAL5

Visando a averiguar a existência de outras cópias de *acrAB-oprM* no genoma de *G. diazotrophicus* PAL5, foi realizada uma busca por genes relacionados com sistemas de transporte de membrana em *G. diazotrophicus* PAL5, que estão inseridos em um mesmo operon. Foi considerada nessa busca a presença de domínios conservados presentes nos produtos dos genes *acrA* (*Locus tag*: GDI_RS06095), domínio HlyD_3 e *acrB* (*Locus tag*: GDI_RS060100). Após essa análise, foi possível identificar, além da região 1, já caracterizada na Figura 4, outras três regiões do genoma contendo genes com as características supracitadas. A região 2 contém um operon formado pelos genes *Locus tag* GDI_RS00700, *mdtB* e *lysR*, que codificam, respectivamente, uma proteína de secreção da família HlyD, uma proteína de resistência à multidroga e um regulador transcricional (Figura 6). Nessa região, além do operon, estão presentes genes codificantes para transposases (*Locus tag*: GDI_RS00685 e GDI_RS00690)

Na região 3, está localizado um operon com os genes *Locus tag* GDI_RS02640, *mdta* e *ttgC*, que codificam, respectivamente, uma proteína de resistência à acriflavina, uma proteína de resistência a multidrogas e uma proteína de membrana externa, descrita como transportador de tolueno. A região 4 compreende um operon com os genes *Locus tag* GDI_RS16220, *Locus tag* GDI_RS16215 e *Locus tag* GDI_RS16210, que codificam, respectivamente, uma proteína de resistência à acriflavina, uma proteína de transporte e uma proteína de membrana externa. De acordo com o banco de dados do NCBI, o *Locus tag* GDI_RS16220, dessa região, está anotado como *acrA*, no entanto, a presença do domínio conservado ACR_tran (característico de proteínas de membrana interna) na proteína codificada sugere um equívoco de anotação (Figura 6).

Os dados apresentados mostraram presença de outros genes no genoma de *G. diazotrophicus* PAL5, que apresentam organização em operon e possuem os mesmos domínios conservados observados nos produtos dos genes de estudo *acrA* (GDI_RS06095) e *acrB* (GDI_RS060100). Adicionalmente, esses genes também codificam proteínas de transporte multidrogas, podendo ser mais bem estudadas no futuro.

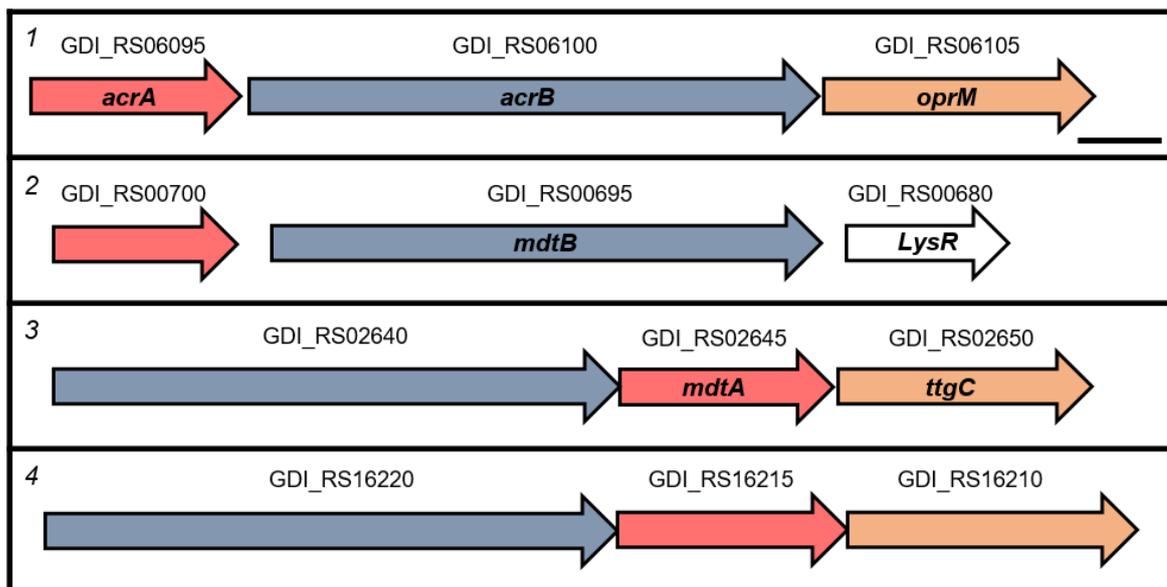


Figura 6. Comparação de operons localizados em diferentes regiões do genoma de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 contendo genes relacionados a sistemas de transportadores de membrana. As regiões do genoma identificadas foram: (1) De 1.281.201 a 1.287.051 pb; (2) 148.647 a 154.853 pb; (3) 568.139 a 573.848 pb; e (4) 3.514.413 a 3.520.461 pb. As cores das setas indicam o tipo de proteína a ser codificada por cada gene. *Seta vermelha*: proteína de fusão de membrana; *seta cinza*: proteína de membrana interna pertencente à família RND; *seta laranja*: proteína de membrana externa; e *seta branca*: proteína de regulação transcricional. *Barra de escala*: 500 pb.

5.4. Similariade das proteínas do transportador multidrogas AcrAB-OprM com seus homólogos em espécies relacionadas e com outras proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5

No intuito de avaliar a similaridade de cada membro do transportador AcrAB-OprM de *G. diazotrophicus* PAL5 com outras espécies de bactérias (item 5.2) e com outros transportadores multidrogas identificados no genoma da bactéria (item 5.3), foram realizados o alinhamento e a análise de filogenia dessas proteínas. As proteínas AcrA e AcrB de *G. diazotrophicus* PAL5 mostraram maior similaridade com as proteínas AcrA e AcrB de *G. oxydans* 621H. E ainda apresentaram elevada similaridade de sequência com proteínas homólogas das demais espécies avaliadas (Figuras 7 e 8).

A proteína AcrA (A9HEF9) mostrou baixa similaridade com outras proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5, que apresentam o mesmo domínio HlyD_3 (Figura 7). O mesmo comportamento foi observado para a proteína AcrB (A9HEG1) quando comparada às outras proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5, que possuem o

domínio conservado ACR_tran (Figura 8). Tais resultados indicam que não existem cópias das proteínas em estudo, no genoma de *G. diazotrophicus* PAL5

A análise filogenética indicou que, entre as proteínas com domínios HlyD_3 e ACR_tran em *G. diazotrophicus* PAL5 identificadas no item 5.3, as proteínas AcrA (A9HEF9) e AcrB (A9HEG1) mostraram maior similaridade com proteínas homólogas já caracterizadas em outras espécies, como *E. coli* e *P. aeruginosa* (Figuras 7 e 8), do que com outras proteínas presentes em *G. diazotrophicus* PAL5

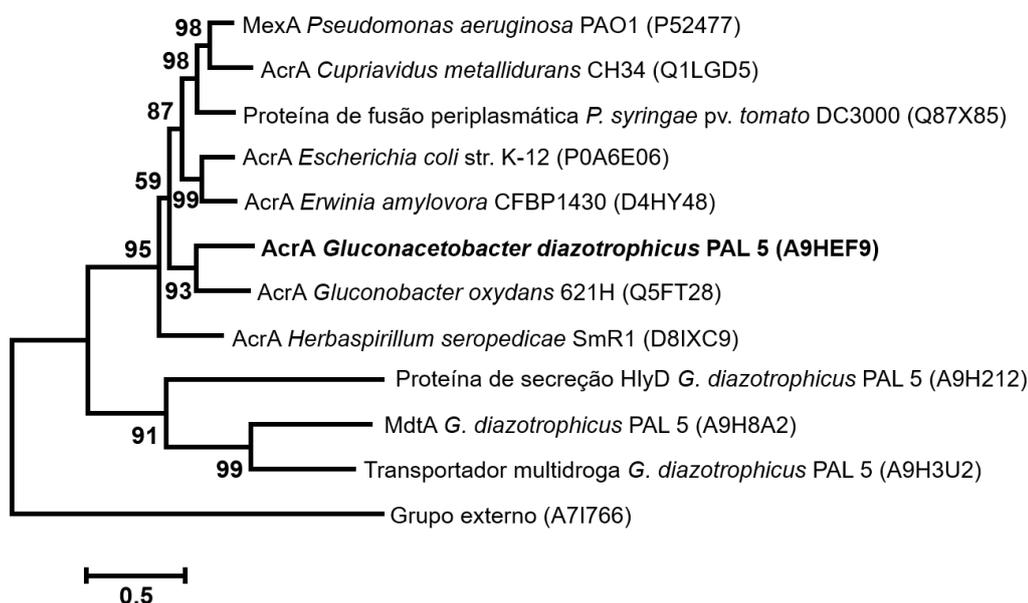


Figura 7. Alinhamento múltiplo e relação filogenética das sequências de aminoácidos de proteínas homólogas à AcrA em outras espécies ou que apresentem domínio HlyD_3 em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. A proteína AcrA de *G. diazotrophicus* PAL5 está com letras em negrito. A árvore filogenética foi gerada pelo método *Neighbor-Joining* (NJ), modelo Dayhoff, com deleção parcial de 95%. Os números próximos aos nós indicam a porcentagem de *bootstrap* referente a 1.000 repetições. O comprimento dos ramos é proporcional à distância evolucionária (barra de escala). Os códigos entre parênteses são os números de acesso destas proteínas no banco de dados Uniprot. A proteína HAE3 de *Methanorgula boonei* 6A8 (A7I766) foi utilizada como grupo externo.

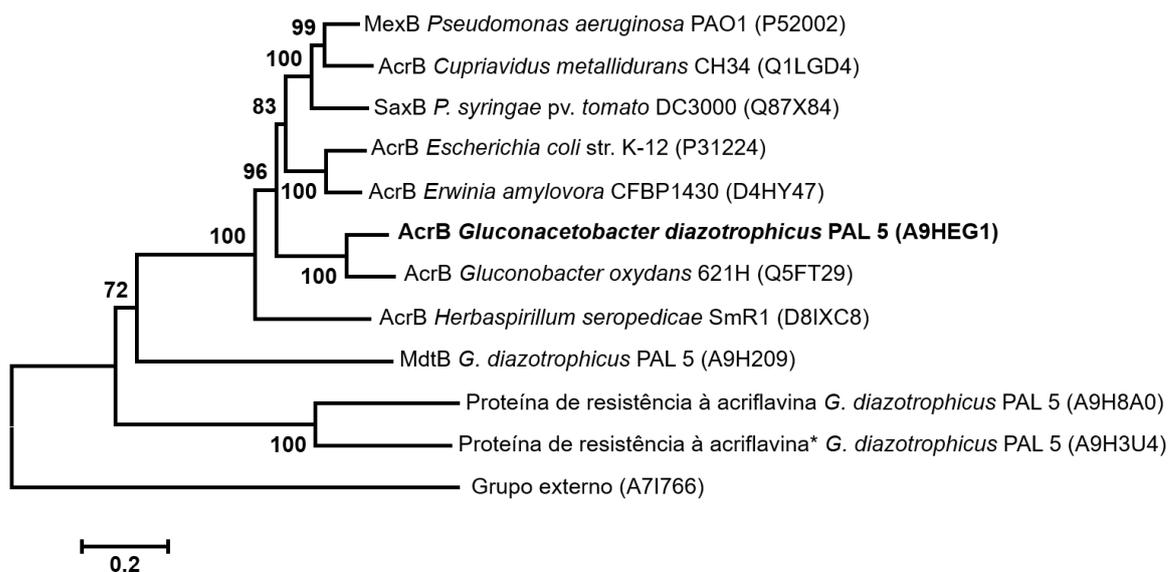


Figura 8. Alinhamento múltiplo e relação filogenética das sequências de aminoácidos de proteínas homólogas à AcrB em outras espécies ou que apresentem domínio ACR_tran em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. A proteína AcrB de *G. diazotrophicus* PAL5 está com letras em negrito. A árvore filogenética foi gerada pelo método *Neighbor-Joining* (NJ), modelo Poisson, com deleção parcial de 95%. Os números próximos aos nós indicam a porcentagem de *bootstrap* referente a 1.000 repetições. O comprimento dos ramos é proporcional à distância evolucionária (barra de escala). Os códigos entre parênteses são os números de acesso destas proteínas no banco de dados Uniprot. O asterisco refere-se à proteína codificada pelo gene anotado como *acrA*, em *G. diazotrophicus* PAL 5, de acordo com banco de dados do NCBI. A proteína HAE3 de *Methanorgula boonei* 6A8 (A71766) foi utilizada como grupo externo.

A similaridade da proteína de membrana externa OprM, de *G. diazotrophicus* PAL5, também foi comparada com outras proteínas de membrana externa que participam de transportadores AcrAB, homólogos em outras espécies bacterianas. A proteína OprM (A9HEG4) apresentou maior similaridade com a lipoproteína de membrana externa de *G. oxydans*. Diferentemente do que foi observado para as proteínas AcrA e AcrB, OprM (A9HEG4) mostrou baixa similaridade com as proteínas TolC, de *E. coli*, e TolC, de *E. amylovora* (Figura 9).

A proteína OprM (A9HEG4) apresentou baixa similaridade com outras proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5, que possuem os mesmos domínios OEP. Nessa análise, além dos produtos dos genes identificados nos itens 5.2 e 5.3, foi incluída a proteína anotada como TolC em *G. diazotrophicus* PAL5 (GDI_RS08365), que também apresenta domínio conservado OEP. Essa proteína apresentou baixa similaridade com OprM (A9HEG4) (Figura 9).

A análise filogenética indicou que a proteína OprM (A9HEG4) apresenta maior similaridade com proteínas de membrana externa de *G. oxydans* (Q5FT30),

Pseudomonas sp. (Q51487 e Q87x83), *C. metallidurans* (Q1LGD3) e *H. seropedicae* (D8XC7). Interessantemente, em um outro agrupamento filogenético aparecem as proteínas de membrana externa de *E. coli* (P02930), de *E. amylovora* (D4HVA2), e outras duas proteínas de membrana externa de *G. diazotrophicus* PAL 5, incluindo a proteína anotada como TolC (A9HI09) (Figura 9).

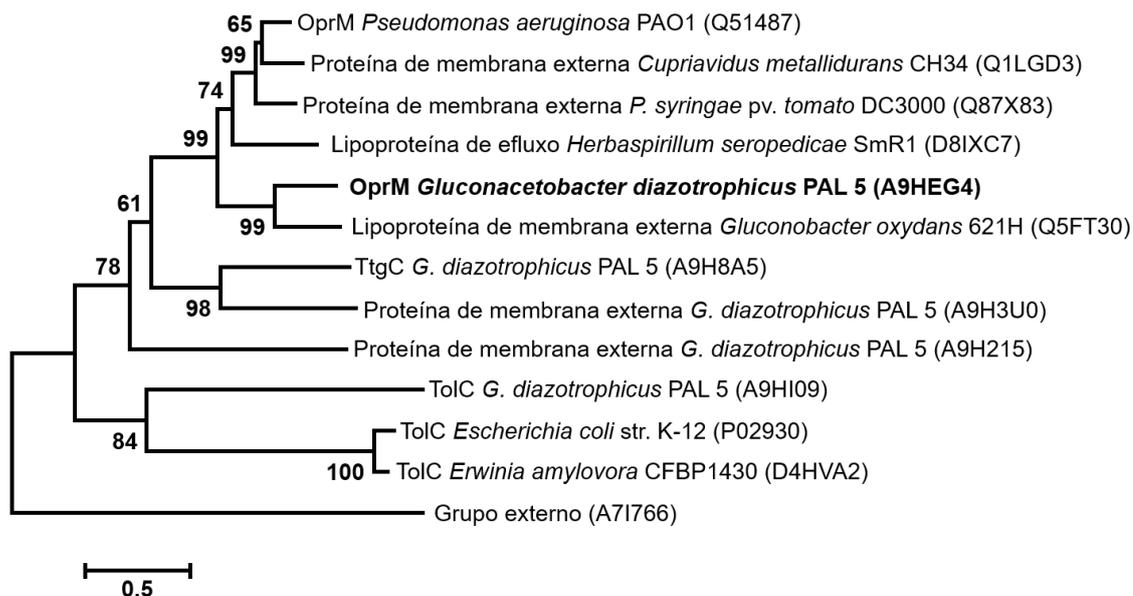


Figura 9. Alinhamento múltiplo e relação filogenética das sequências de aminoácidos de proteínas homólogas à OprM em outras espécies ou que apresentem domínios OEP em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. A proteína OprM de *G. diazotrophicus* PAL5 está com letras em negrito. A árvore filogenética foi gerada pelo método *Neighbor-Joining* (NJ), modelo Dayhoff, com deleção parcial de 95%. Os números próximos aos nós indicam a porcentagem de *bootstrap* referente a 1.000 repetições. O comprimento dos ramos é proporcional à distância evolucionária (barra de escala). Os códigos entre parênteses são os números de acesso destas proteínas no banco de dados Uniprot. A proteína HAE3 de *Methanorgula boonei* 6A8 (A7I766) foi utilizada como grupo externo.

5.5. Efeito das mutações Δ acrA e Δ acrB na multiplicação celular em meio líquido

Visando a avaliar o efeito das mutações na multiplicação celular, o crescimento de cada estirpe, em meio LGM, foi monitorado durante 36 horas (h). O mutante Δ acrA apresentou pequenas diferenças na curva de crescimento em relação à bactéria selvagem, cuja fase lag de crescimento teve duração de 6 h

(Figura 10). Após 33 h de cultivo, foi possível observar maior intensidade de crescimento do mutante $\Delta acrA$ em relação à bactéria selvagem.

A curva de crescimento do mutante $\Delta acrB$ apresentou diferenças em relação à curva das estirpes selvagem e $\Delta acrA$ (Figura 10). O mutante $\Delta acrB$ possui fase lag de 10 h. Ao final das 36 h de cultivo, esse mutante apresentou DO bastante inferior à $\Delta acrA$ e selvagem.

A análise comparativa das curvas de cultivo indica que as mutações afetam de forma diferente a fisiologia de crescimento de *G. diazotrophicus* PAL5. A mutação $\Delta acrB$ promoveu atraso na entrada em fase exponencial, bem como menor concentração celular ao final do cultivo, quando comparada às demais estirpes.

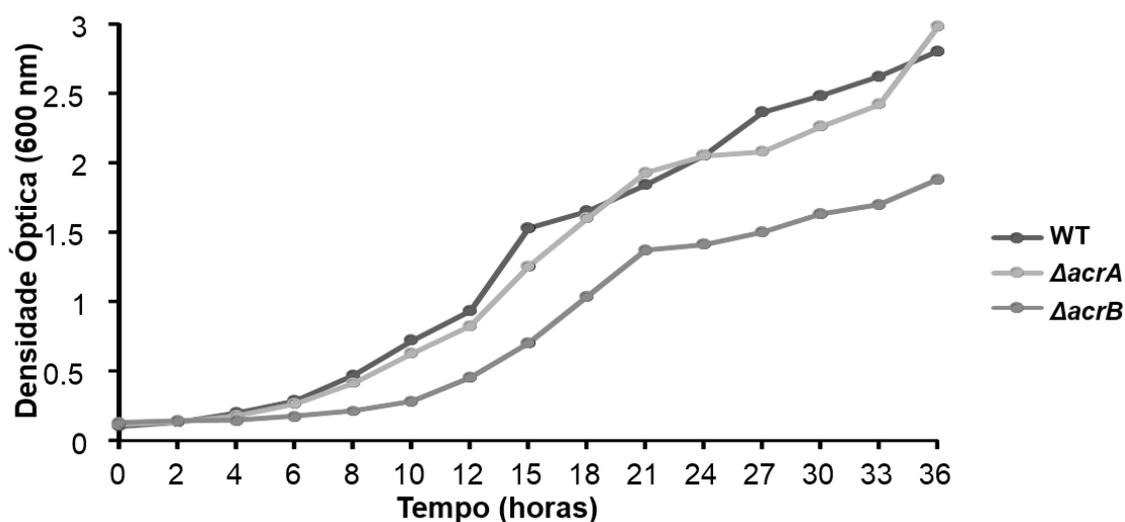


Figura 10. Comparação das curvas de crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 e mutantes. Selvagem e mutantes foram crescidos em meio líquido LGI modificado a 30 °C, 250 rpm. As leituras de DO foram realizadas durante 36 horas de cultivo, com leituras a cada 2 h até 12 h de crescimento e a cada 3 h até 36 h de crescimento.

Para a realização das análises comparativas com maior sensibilidade, entre a estirpe selvagem e mutantes, nos ensaios de resposta a estresses abióticos e avaliação das características de promoção do crescimento vegetal, é importante que as bactérias estejam em uma mesma fase de crescimento. Por isso, após a obtenção das curvas de crescimento de cada estirpe, foi escolhida a $DO_{600(fe)}$, correspondente ao ponto intermediário da fase exponencial de crescimento, para que fosse utilizada nos ensaios posteriores, exceto para a

avaliação de resistência a antibióticos. Então, as $DO_{600(fe)}$ de 1,6, 1,2 e 1,0 foram escolhidas para as estirpes selvagem, $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$, respectivamente.

5.6. A importância da bomba de efluxo multidroga AcrAB-OprM na resistência à ampicilina em *G. diazotrophicus* PAL5

No intuito de avaliar a importância do sistema de efluxo AcrAB-OprM na resistência a diferentes agentes antimicrobianos, a bactéria selvagem *G. diazotrophicus* PAL5 e os mutantes $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$ foram cultivados em meio sólido LGM, suplementado com três concentrações de ampicilina, estreptomicina, espectinomicina e gentamicina. No entanto, apenas os dados obtidos para ampicilina serão apresentados, uma vez que não foi observada participação da bomba de efluxo AcrAB-OprM na resistência aos demais antibióticos nas concentrações testadas.

Na ausência de ampicilina, os mutantes $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$ apresentaram crescimento similar ao da bactéria selvagem em todas as diluições. No entanto, apresentaram redução na resistência ao antibiótico na concentração de $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$, como pode ser observado na Figura 11. O mutante $\Delta acrA$ teve seu crescimento afetado negativamente já na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do antibiótico nas diluições de 10^{-2} e 10^{-3} (Figura 11). Estes dados indicam o importante papel do sistema de efluxo multidroga AcrAB-OprM na resistência de *G. diazotrophicus* PAL5 ao antibiótico ampicilina

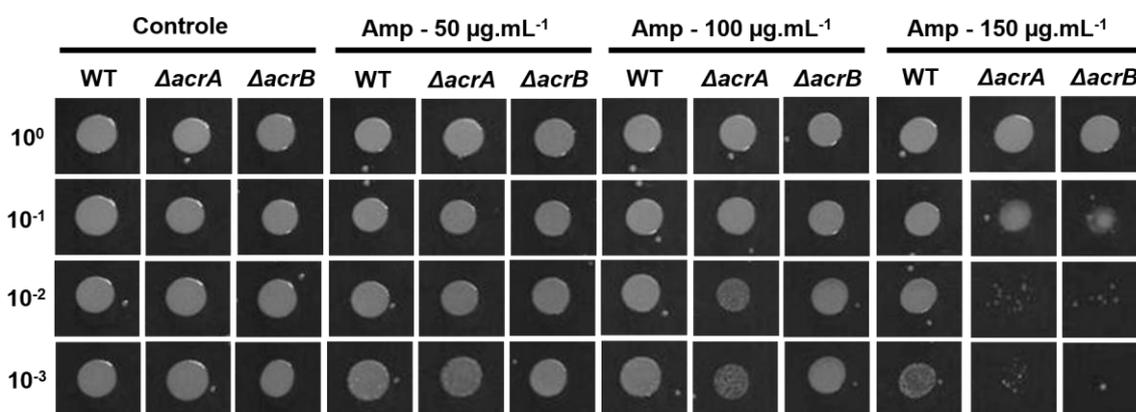


Figura 11. Avaliação do crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 selvagem e mutantes $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$ em resposta à ampicilina. Selvagem (WT) e mutantes foram inoculados, em diferentes diluições, em placas de Petri contendo meio sólido LGM modificadas suplementadas com três diferentes concentrações de ampicilina. O registro do ensaio foi realizado após cinco dias de crescimento (n=3). Amp: ampicilina.

5.7. O sistema de efluxo multidrogas AcrAB-OprM é importante para a tolerância a zinco, cobalto e cádmio, em *G. diazotrophicus* PAL5

Com o objetivo de avaliar a importância do sistema de efluxo AcrAB-OprM na tolerância a estresses abióticos em *G. diazotrophicus* PAL5, os mutantes $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$ e a estirpe selvagem foram crescidos em meio suplementado com os metais cádmio 0,09 mM, zinco 0,9 mM ou cobalto 1,2 mM.

O mutante $\Delta acrA$ mostrou elevada sensibilidade aos estressores zinco e cádmio, com taxa de inibição de aproximadamente 80% e 90%, respectivamente (Figuras 12A e 12C). Ao analisar a taxa de inibição de $\Delta acrA$, quando submetido a estresse por cobalto, é possível observar aumento significativo, próximo de 15%, em relação à estirpe selvagem, atingindo aproximadamente 40% de inibição.

O mutante $\Delta acrB$ apresentou uma pequena sensibilidade, comparado ao $\Delta acrA$, quando submetido aos estressores zinco e cádmio, com taxa de inibição em torno de 35% e 30%, respectivamente (Figuras 12A e 12C). Quanto ao estresse provocado por cobalto, não houve diferença significativa entre $\Delta acrB$ e a bactéria selvagem, visto que, $\Delta acrB$ apresentou taxa de inibição de 27% (Figura 12B).

Estes resultados indicam participação da bomba de efluxo multidrogas AcrAB-OprM na tolerância aos metais pesados cádmio, cobalto e zinco. É interessante ainda a realização de ensaios futuros utilizando concentrações maiores de cobalto, uma vez que esse metal é um micronutriente e a taxa de inibição provocada por cobalto foi menor em relação aos outros metais testados, considerando o mutante $\Delta acrA$. Tais ensaios permitirão avaliar o nível de importância do transportador AcrAB-OprM na tolerância a esse metal.

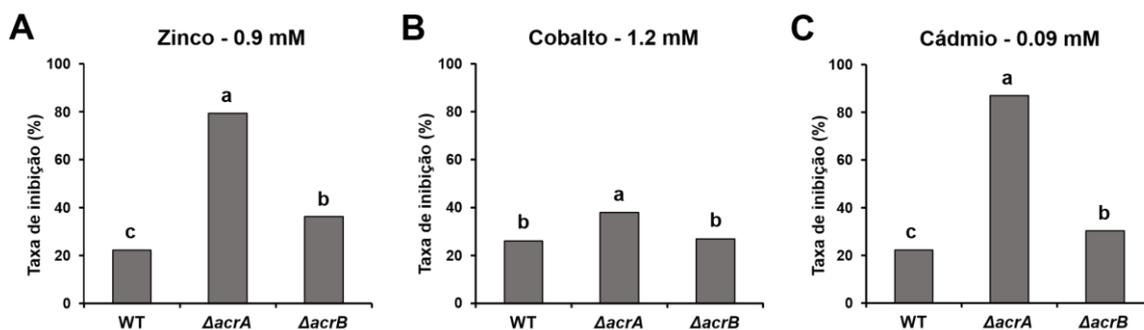


Figura 12. Efeito de metais pesados no crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 selvagem e mutantes $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$. Selvagem (WT) e mutantes foram crescidos em meio líquido LGI modificado, a 30°C, suplementado com: $ZnCl_2$; 0,9 mM (A), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 1,2 mM (B), $CdCl_2 \cdot H_2O$ e 0,09 mM (C). Os resultados foram coletados após 24 horas de crescimento. A figura representa o resultado de, no mínimo, três experimentos independentes. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

5.8. Participação do sistema de efluxo multidrogas AcrAB-OprM na resposta à variações de temperatura em *G diazotrophicus* PAL5

Com o objetivo de verificar a importância do sistema de efluxo AcrAB-OprM na tolerância à variações de temperatura, a bactéria selvagem e os mutantes $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$ foram cultivados a 25 °C, 30 °C e 35 °C. Verificou-se que na diluição de 10^{-3} , em 25 °C, $\Delta acrA$ apresentou melhor crescimento que as estirpes selvagem e $\Delta acrB$ (Figura 13). Na temperatura de 35 °C, na diluição de 10^0 , o mutante $\Delta acrB$ foi mais afetado que as demais estirpes. Além disso, é possível observar, nessa mesma temperatura, que na diluição de 10^{-1} , a estirpe selvagem apresentou leve crescimento, fato não observado para ambos os mutantes. Estes dados sugerem participação da bomba de efluxo AcrAB na tolerância à pequenas variações de temperatura.

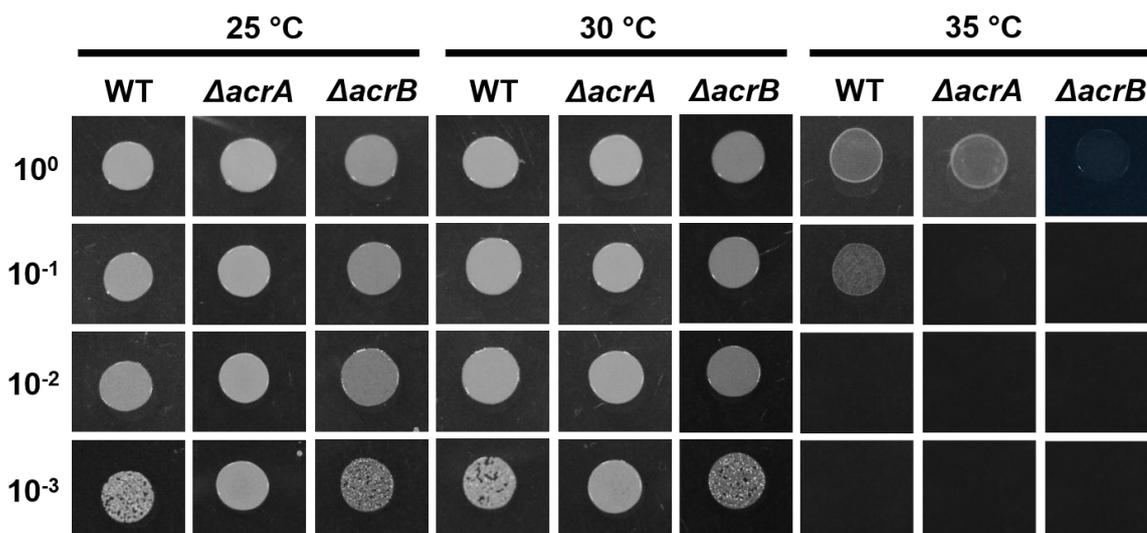


Figura 13. Efeito de diferentes temperaturas no crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 selvagem e mutantes $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$. Selvagem (WT) e mutantes foram inoculados, em diferentes diluições, em placas de Petri contendo meio sólido LGI modificado, incubadas a 25 °C, 30 °C e 35 °C. O registro do ensaio foi realizado após cinco dias de crescimento (n=3). A figura representa o resultado de no mínimo três experimentos independentes com três repetições por tratamento.

5.9. As mutações $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$ conferem tolerância à H₂O₂ em *G. diazotrophicus* PAL5

No intuito de avaliar o envolvimento do sistema de efluxo AcrAB-OprM na resposta ao estresse oxidativo causado por H₂O₂, foi realizado um ensaio de halo de inibição. Ambos os mutantes, $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$, apresentaram maior tolerância à presença de H₂O₂ quando comparados à estirpe selvagem (Figura 14). O mutante $\Delta acrA$ apresentou maior redução no halo de inibição, revelando forte incremento na tolerância, quando comparado às demais estirpes. Estes dados sugerem que a falta da bomba AcrAB-OprM torna a bactéria mais resistente ao estresse oxidativo causado por H₂O₂.

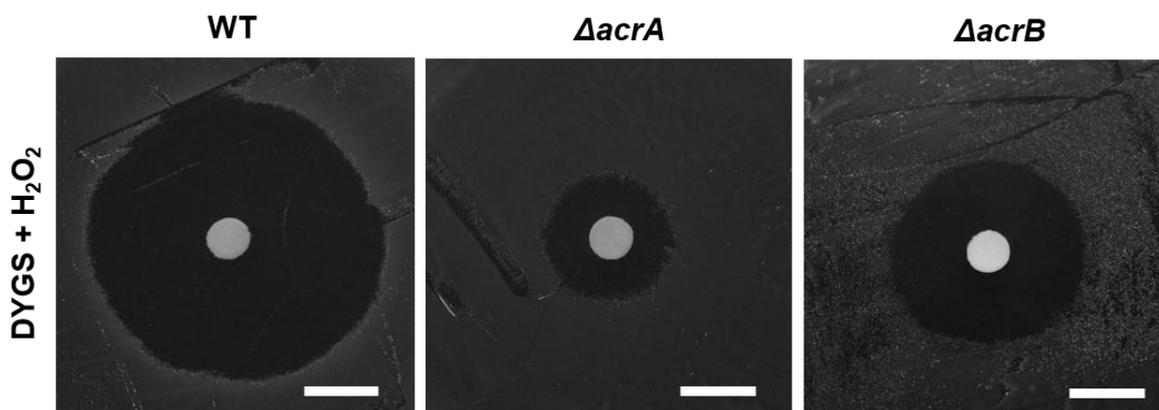


Figura 14. Comparação da inibição do crescimento, por H_2O_2 , de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 selvagem e mutantes $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$. Selvagem (WT) e mutantes foram plaqueados (100 μ L) em meio DYGS contendo papel de filtro embebido com 5 μ L de H_2O_2 (10 mM). O resultado foi registrado após três dias de crescimento a 30 °C em estufa. A figura representa o resultado de, no mínimo, três experimentos independentes com três repetições por tratamento. *Barra de escala:* 1 cm

5.10. AcrAB-OprM não participa dos processos de solubilização de nutrientes e da FBN em *G. diazotrophicus* PAL5.

Para verificar a participação do sistema de efluxo multidrogas AcrAB-OprM no processo de solubilização de nutrientes, foi realizado um ensaio *in vitro* com fósforo e zinco insolúveis. Com isso, observou-se que as mutações nos genes *acrA* e *acrB* não afetaram a capacidade de solubilização de zinco e fósforo de *G. diazotrophicus* PAL5 (Figura 15). Este resultado indica que o sistema de efluxo AcrAB-OprM não participa do processo de solubilização desses nutrientes nessa bactéria.

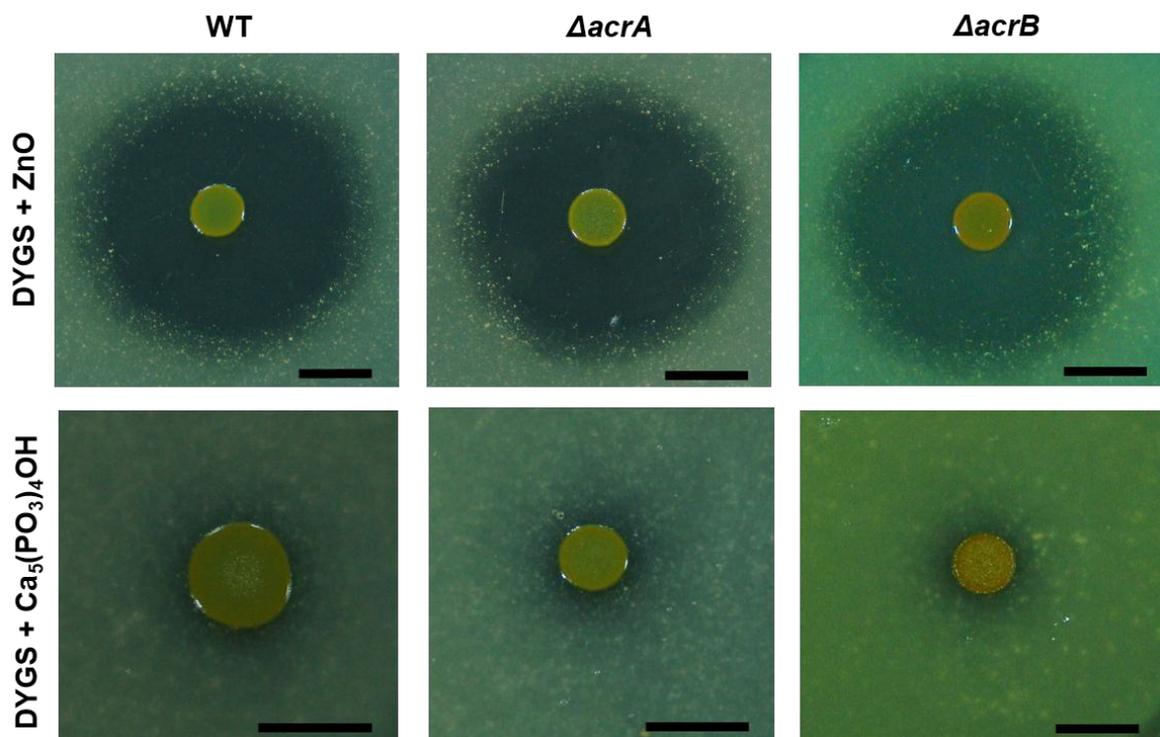


Figura 15. Comparação da capacidade de solubilização de zinco e fósforo entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 selvagem e mutantes $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$. Selvagem (WT) e mutantes foram inoculados em placas de Petri contendo meio sólido DYGS suplementado com $Ca_5(PO_4)_3$ e ZnO. O resultado foi registrado após três dias de crescimento a 30 °C em estufa. A figura representa o resultado de, no mínimo, três experimentos independentes com três repetições por tratamento. *Barra de escala:* 1 cm

Com o objetivo de avaliar a importância do sistema de efluxo AcrAB-OprM no processo de FBN, foi realizado um ensaio para verificar a formação de película aerotóxica por *G. diazotrophicus* PAL5 selvagem e pelos mutantes $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$. Observou-se que a estirpe selvagem e os mutantes foram capazes de formar a película aerotóxica de maneira similar (Figura 16). Sendo assim, este resultado indica que o sistema de efluxo multidrogas não está envolvido com a FBN.

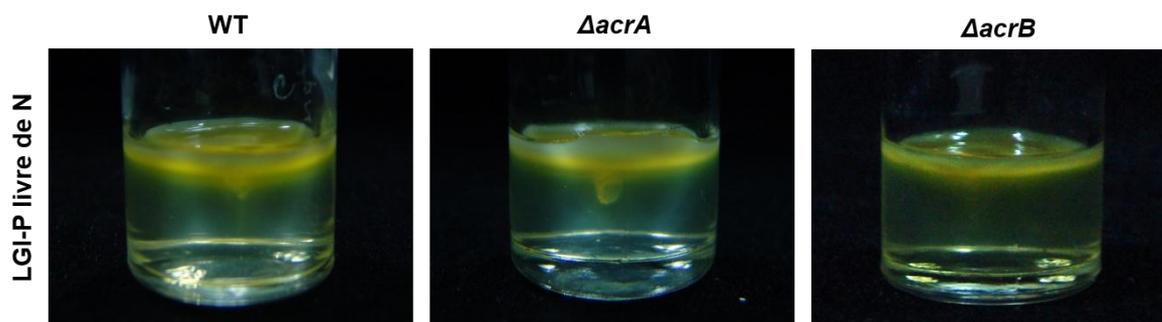


Figura 16. Comparação da capacidade de fixação biológica de nitrogênio em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 selvagem e mutantes \DeltaacrA e \DeltaacrB . Selvagem (WT) e mutantes foram inoculados (10 uL) em meio LGI-P semissólido para avaliar a formação da película aerotóxica. O resultado foi registrado após 10 dias de crescimento a 30 °C em estufa. A figura representa o resultado de, no mínimo, três experimentos independentes com três repetições por tratamento.

5.11. O sistema de efluxo multidrogas AcrAB-OprM é essencial para a promoção do crescimento vegetal de *A. thaliana*

Para verificar a importância da bomba de efluxo multidrogas AcrAB-OprM na promoção do crescimento vegetal por *G. diazotrophicus* PAL5, plantas de *A. thaliana* do ecótipo Col-0 foram inoculadas com a estirpe *wild type* e mutantes \DeltaacrA e \DeltaacrB . Ao avaliar o fenótipo das plantas, é possível observar uma pequena diferença entre os tratamentos. As plantas inoculadas com *wild type* apresentaram crescimento de roseta um pouco maior em relação às plantas controle e inoculadas com os mutantes \DeltaacrA e \DeltaacrB (Figura 17A).

Entre as características avaliadas, observou-se diferença estatística para área foliar e massa fresca de parte aérea (Figuras 17B e 17C). Plantas inoculadas com o mutante \DeltaacrB apresentaram menor área foliar em relação às plantas controle e inoculadas com *wild type* e \DeltaacrA (Figura 17B). Além disso, plantas inoculadas com \DeltaacrB apresentaram menor massa fresca de parte aérea em relação às plantas inoculadas com *wild type* (Figura 17C).

As plantas inoculadas com \DeltaacrA apresentaram área foliar e massa fresca de parte aérea iguais às plantas controle e inoculadas com *wild type*, estatisticamente (Figuras 17B e 17C). Para as outras características avaliadas, massa fresca de raiz e número de folha, não houve diferença estatística entre os tratamentos (Figuras 17D e 17E). No entanto, para essas duas características,

plantas inoculadas com *wild type* apresentaram maiores valores em relação aos demais tratamentos.

Neste sentido, os resultados obtidos sugerem a importância da bomba AcrAB-OprM para a capacidade de *G. diazotrophicus* PAL5 em promover o crescimento de *A. thaliana*.

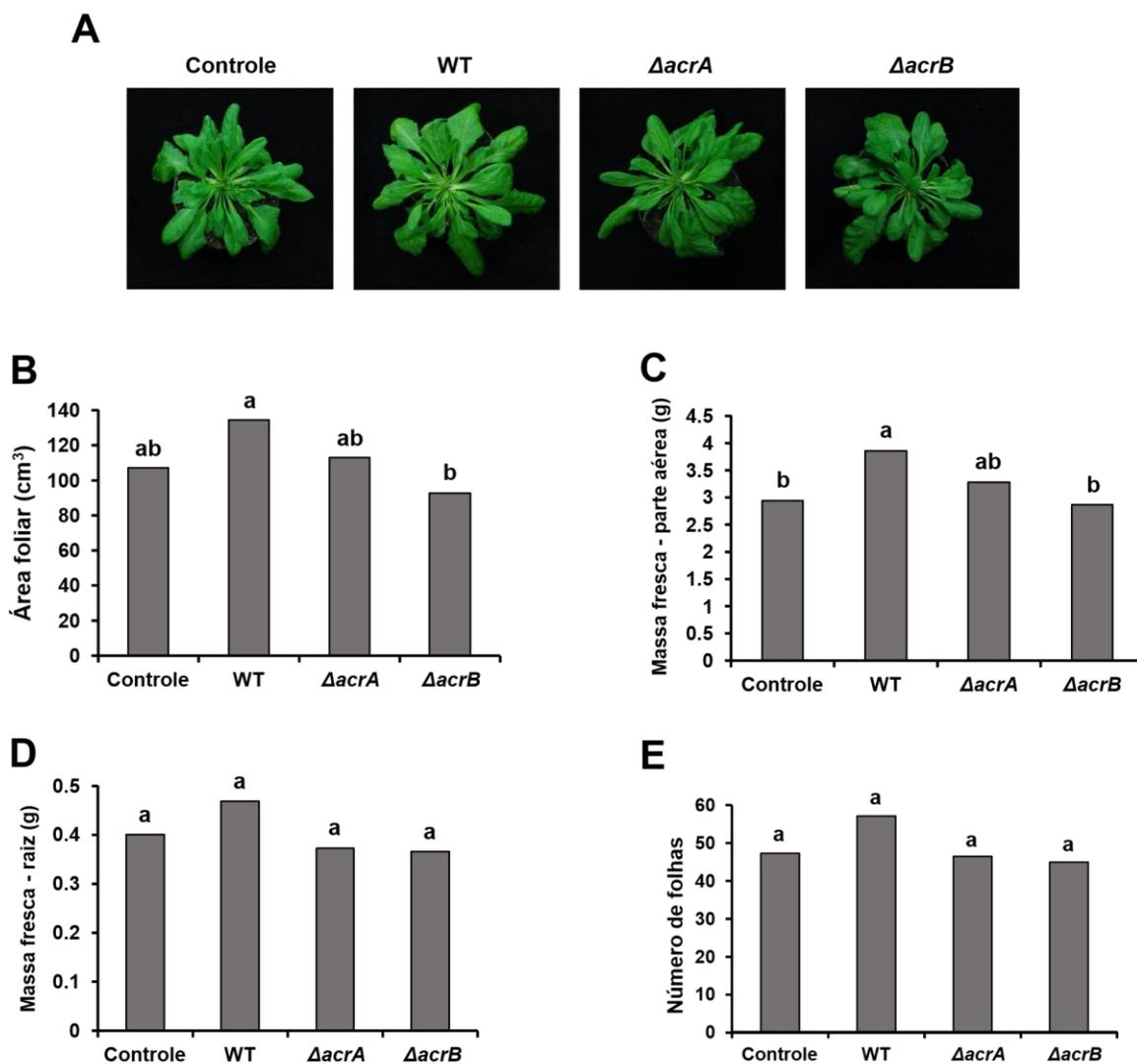


Figura 17. Análise da promoção do crescimento em *Arabidopsis thaliana* inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 selvagem e mutantes Δ acrA e Δ acrB. Plantas do ecótipo Col-0 foram inoculadas aos 10 dias com as bactérias selvagem (WT) e mutantes. Após 40 dias, as florescências foram retiradas e o fenótipo de plantas representativas do ensaio foi registrado e comparado (A). Foram ainda analisadas as características área foliar (B), massa fresca da parte aérea (C), massa fresca da raiz (D) e número de folhas (E). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

6. DISCUSSÃO

G. diazotrophicus é uma bactéria que apresenta características interessantes para promoção do crescimento vegetal. Além disso, esse micro-organismo apresenta alta tolerância a estresses ambientais (Tejera *et al.*, 2003; Intorne *et al.*, 2012; de Oliveira *et al.*, 2016b). Os mecanismos moleculares dessa bactéria que participam da resposta a estresses abióticos e que podem também ser importantes para o estabelecimento da interação bactéria-planta ainda são pouco conhecidos. Neste estudo, mutantes defectivos nos genes *acrA* e *acrB*, que codificam proteínas componentes da bomba de efluxo multidroga AcrAB-OprM, foram analisados, com ênfase em seu papel na tolerância a estresses abióticos e na capacidade de promover crescimento vegetal.

A análise de contexto genômico sugere que os genes mutados *acrA* e *acrB* estão organizados em um operon *acrAB-oprM*. Dessa forma, possivelmente, no mutante GDP28B08 (Δ *acrA*) a transcrição do primeiro gene do operon, *acrA*, é interrompida, não havendo produção das proteínas AcrA, AcrB e OprM. O mutante GDP12H02 (Δ *acrB*), por sua vez, não é capaz de produzir o membro da família RND (AcrB) e o componente OMP (OprM). Em ambas as situações, sugere-se que o sistema de efluxo multidrogas AcrAB-OprM não seja formado.

Além do operon *acrAB-oprM*, foi possível observar presença de um gene (*tetR*), antes do gene *acrA*, que é responsável por codificar um regulador transcricional da família TetR. Um gene da mesma família, *acrR*, já foi identificado em *E. coli*, estando localizado anteriormente ao operon *acrAB*. O gene *acrR* de *E.*

coli é responsável por codificar uma pequena proteína, AcrR, que atua como um repressor transcricional do operon *acrAB* (Ma *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2007) (Figura 18). A função principal desse regulador transcricional é modular a expressão desse operon (Ramos *et al.*, 2005).



Figura 18. Regulação da expressão do operon *acrAB* em *Escherichia coli* pela proteína AcrR. A proteína AcrR, codificada pelo gene *acrR* se liga ao promotor do operon *acrAB*, regulando negativamente a expressão das proteínas componentes, AcrA e AcrB, da bomba de efluxo multidrogas AcrAB-TolC. Adaptado de Blanco *et al.* (2016)

Em *P. aeruginosa*, o gene *mexR*, localizado anteriormente ao operon *mexAB-oprM*, é responsável por codificar a proteína MexR, pertencente à família MarR, que atua como um regulador transcricional desse operon (Poole *et al.*, 1996b; Sánchez *et al.*, 2002). Sendo assim, ao analisar o contexto genômico do operon *acrAB-oprM* em *G. diazotrophicus* PAL5, sugere-se que o produto do gene *tetR*, possivelmente uma proteína AcrR, deva atuar como um regulador transcricional desse operon.

Ao comparar o operon *acrAB-oprM* de *G. diazotrophicus* PAL5 com operons relacionados em outras espécies de bactérias, foi possível observar que estes se organizam de forma similar. Na maioria das espécies analisadas, como por exemplo, em *G. oxydans* 621H (uma bactéria próxima filogeneticamente de *G. diazotrophicus* PAL5), *H. seropicae* SmR1 (bactéria endofítica de cana-de-açúcar) e em *C. metallidurans* CH34 (bactéria altamente resistente a metal), os operons são formados por três genes, sendo cada um deles responsável por codificar um componente do sistema de efluxo triparte.

Em *P. aeruginosa*, um dos micro-organismos em que esse sistema de efluxo já é caracterizado, os homólogos dos genes *acrA* e *acrB* são *mexA* e *mexB*, respectivamente (Poole e Srikumar, 2001). Em *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, um dos modelos para estudos de interação bactéria-planta, o gene homólogo ao *acrB* está anotado no banco de dados NCBI como *saxB*. No entanto, alguns trabalhos o consideram como *mexB*, em decorrência da significativa

homologia com *mexB* de *P. aeruginosa*. O mesmo ocorre para os outros componentes do sistema de efluxo desse micro-organismo (Stoitsova *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2011). Nessas bactérias, os operons também são formados por três genes.

Em *E. coli*, micro-organismo em que o transportador AcrAB é amplamente estudado, é possível observar que o operon é composto por dois genes, *acrA* e *acrB*. O mesmo é observado para *E. amylovora*, um fitopatógeno. O gene *tolC*, responsável por codificar a OMP nesses organismos, fica localizado em região genômica distinta do operon *acrAB*. Esse fato suporta a versatilidade observada em TolC, que pode interagir com outras proteínas relacionadas a transporte. (Sharff *et al.*, 2001).

Em *P. aeruginosa*, o gene responsável por codificar a proteína OprM faz parte do operon *mexAB-oprM*. Contudo, é importante destacar que, além de MexAB, essa proteína pode se associar com MexXY, outro transportador multidrogas (Mine *et al.*, 1999). Além das bombas MexAB e MexXY, já foram caracterizadas outras bombas de efluxo em *P. aeruginosa*, como MexCD e MexEF. Esses complexos proteicos se associam com as proteínas de membrana externa, OprJ e OprN, respectivamente (Poole *et al.*, 1996a; Michéa-Hamzhepour *et al.*, 1997). Essas observações sugerem maior especificidade de interação entre esses tipos de proteínas de membrana externa, do tipo Opr, e os outros componentes dos sistemas de efluxo triparte.

Ao comparar as sequências de aminoácidos das proteínas AcrA, AcrB e OprM, de *G. diazotrophicus* PAL5 com as respectivas proteínas homólogas em outras espécies, foi possível observar alta similaridade entre AcrA e AcrB em todas as espécies avaliadas. É importante ressaltar que, apesar da alta similaridade das sequências de aminoácidos das proteínas AcrB homólogas, é possível que haja diferenças de especificidade de transporte e grau de resistência a certas substâncias tóxicas como já observado para *E. coli* (AcrB) e *P. aeruginosa* (MexB) (Ma *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995; Masuda *et al.*, 2000; Tikhonova *et al.*, 2002).

A proteína OprM de *G. diazotrophicus* PAL5 apresentou maior similaridade com a proteína de membrana externa de *P. aeruginosa* (OprM) em comparação à proteína TolC de *E. coli*. Baixa similaridade foi observada entre

OprM e TolC, ambas de *G. diazotrophicus* PAL5. Nesta espécie, o gene *tolC* é encontrado em uma região distante do operon *acrAB-oprM*.

Interessantemente, Tikhonova e colaboradores (2002) observaram que OprM de *P. aeruginosa* é incapaz de complementar a função de TolC, assim como TolC é incapaz de complementar a função de OprM no complexo MexAB, em *E. coli*. Esses resultados indicam alta especificidade de AcrAB e MexAB, nesses micro-organismos, por seus respectivos componentes de membrana externa.

Juntas, análise de contexto genômico e de similaridade entre as sequências de aminoácidos, sugerem que, em *G. diazotrophicus* PAL5, OprM é a proteína que participa do sistema triparte de efluxo multidrogas, se associando com os componentes AcrA e AcrB. O complexo AcrAB-OprM já foi descrito em *Moroxella catarrhalis*, uma bactéria patogênica humana (Spaniol *et al.*, 2015). No entanto, é necessário avançar no estudo da bomba AcrAB-OprM, em *G. diazotrophicus* PAL5, no intuito de confirmar a interação entre os componentes AcrAB e OprM, ou se é apenas uma questão de nomenclatura.

Ao analisar os sistemas de transportadores de membrana em *G. diazotrophicus* PAL5, foi possível identificar outros transportadores que possuem os mesmos domínios proteicos conservados em AcrA, AcrB e OprM e que seus genes codificadores possivelmente também estejam organizados em operon. No entanto, ao comparar a sequência de aminoácidos de cada uma dessas proteínas com seus respectivos homólogos em outras espécies, observou-se baixa similaridade com proteínas que compõem transportadores já bem caracterizados, como AcrAB-TolC (*E. coli*) e MexAB-OprM (*P. aeruginosa*) (Hobbs *et al.*, 2012; Ruiz e Levy, 2013; Uwate *et al.*, 2013; Weeks *et al.*, 2014). Os componentes MdtA, MdtC e TtgC, codificados por alguns genes localizados nesses operons, já foram descritos em outras espécies e participam do efluxo de solventes e de um amplo espectro de antimicrobianos (Nagakubo *et al.*, 2002; Poole, 2007). Esses resultados sugerem presença de apenas um operon, em *G. diazotrophicus* PAL5, responsável por codificar o transportador AcrAB-OprM. Os outros operons identificados podem estar envolvidos na formação de outras bombas de efluxo multidrogas.

O perfil de crescimento dos mutantes Δ *acrA* e Δ *acrB* foi avaliado, tendo sido observado que Δ *acrB* é diferente da estirpe selvagem e de Δ *acrA*, mostrando

menor multiplicação celular e antecipada entrada na fase estacionária. Como já proposto, o mutante $\Delta acrB$ não seria capaz de produzir as proteínas AcrB e OprM, não havendo montagem do sistema de efluxo triparte AcrAB-OprM. No entanto, essa mutação não deve impossibilitar a produção da proteína AcrA. Dessa forma, podemos especular que o acúmulo de AcrA na célula pode acarretar alterações metabólicas, que prejudiquem o seu crescimento.

A mutação nos genes *acrA* e *acrB* afetou a resistência de *G. diazotrophicus* PAL5 à ampicilina. O papel de transportadores multidrogas na resistência a antibióticos já foi demonstrado em outras espécies. Mutantes *acrAB* em *E. coli* (Sulavik *et al.*, 2001) e em *Raustonia solenaceum* (Brown *et al.*, 2007) apresentaram maior sensibilidade à ampicilina e a outros compostos como brometo de etídio e dodecil sulfato de sódio (SDS). Em *P. aeruginosa*, já foi observado que a bomba MexAB-OprM é responsável por transportar antibióticos β -lactâmicos, cloranfenicol e tetraciclina (Masuda *et al.*, 2000; Poole, 2007).

Em *G. diazotrophicus* PAL5, a bomba de efluxo multidrogas AcrAB-OrpM tem papel fundamental na resistência dessa bactéria à ampicilina. Contudo, outros trabalhos devem ser desenvolvidos com o objetivo de avaliar o papel dessa bomba na resistência a outros antibióticos e compostos tóxicos como brometo de etídio, acriflavina e SDS, entre outros já descritos como substratos para essa bomba.

O mutante $\Delta acrA$ apresentou alta sensibilidade aos metais cádmio e zinco. Tal fato não foi observado para $\Delta acrB$, que apresentou pequena diferença de resposta a esses metais em relação à estirpe selvagem. Em alguns microorganismos, as bombas de efluxo multidrogas podem, além de conferir resistência a antibióticos, corantes e solventes orgânicos, participar da detoxificação de metais pesados (Martinez *et al.*, 2009). Em *P. aeruginosa*, foi identificado que a bomba de efluxo MexGHI-OpmD tem papel fundamental na resistência dessa bactéria ao metal vanádio (Aendekerk *et al.*, 2005). As bombas de efluxo AcrD (homólogo de AcrB) e MdtABC, em *S. enterica* atuam tanto na resistência aos metais zinco e cobre como na resistência a antibióticos β -lactâmicos e outros compostos tóxicos (Nishino *et al.*, 2007).

A bactéria *Cupriavidus metallidurans* é amplamente encontrada em ambientes contaminados por metais pesados, sendo o organismo modelo mais reconhecido para o estudo de mecanismos moleculares envolvidos na resistência

a metais (Mergeay *et al.*, 2003; von Rozycki e Nies, 2009; Janssen *et al.*, 2010). O determinante Czc encontrado nessa bactéria desempenha papel fundamental na resistência a cádmio e zinco, assim como observado em *G. diazotrophicus* PAL5 (Nies *et al.*, 2006; Intorne *et al.*, 2012). Essa bactéria também possui um operon *acrAB-omp* cujos produtos apresentam alta similaridade com o transportador AcrAB-OprM. A presença dessa bomba também pode auxiliar a bactéria *C. metallidurans* na alta tolerância a metais pesados.

Em *G. diazotrophicus* PAL5, o envolvimento das bombas CzcCBA e AcrAB-OprM na tolerância a cádmio, cobalto e zinco, sugere que essa bactéria tenha maior espectro de tolerância a metais em relação ao que já foi descrito (Intorne *et al.*, 2012). Dessa forma, são necessários estudos futuros com o objetivo de avaliar a tolerância dessa bactéria a outros metais pesados.

Como observado, em *G. diazotrophicus* PAL5, a bomba de efluxo multidrogas AcrAB-OprM tem papel importante na resistência à ampicilina e também na detoxificação dos metais pesados. Um modelo esquemático para a estrutura e funcionamento deste transportador é apresentado na Figura 19. O formato como a bomba foi proposta é baseada em trabalhos de estruturas cristalográficas das proteínas AcrA, AcrB, TolC e OprM de *E. coli* e de *P. aeruginosa* (Murakami *et al.*, 2002; Phan *et al.*, 2010)

Segundo tal modelo, na estirpe selvagem, o antibiótico ampicilina e os metais pesados cádmio, cobalto e zinco são transportados para o meio externo com o auxílio da bomba AcrAB-OprM (Figura 19A). É descrito que os substratos podem ser transportados por essa bomba a partir do periplasma e citoplasma (Sun *et al.*, 2014). O mutante $\Delta acrA$, que não produz nenhum dos componentes da bomba de efluxo, acumula esses compostos no interior da célula, prejudicando seu metabolismo/multiplicação (Figura 19B). Já o mutante $\Delta acrB$, que é capaz de produzir a proteína AcrA, perde a resistência à ampicilina, que é transportada pela bomba AcrAB-OprM. No entanto, para a detoxificação dos metais pesados cádmio, zinco, cobalto, podemos especular que a proteína AcrA possa se associar com outras proteínas RND e OMP, possibilitando o transporte desses metais de forma quase tão eficiente quanto a bomba AcrAB-OprM (Figura 19C).

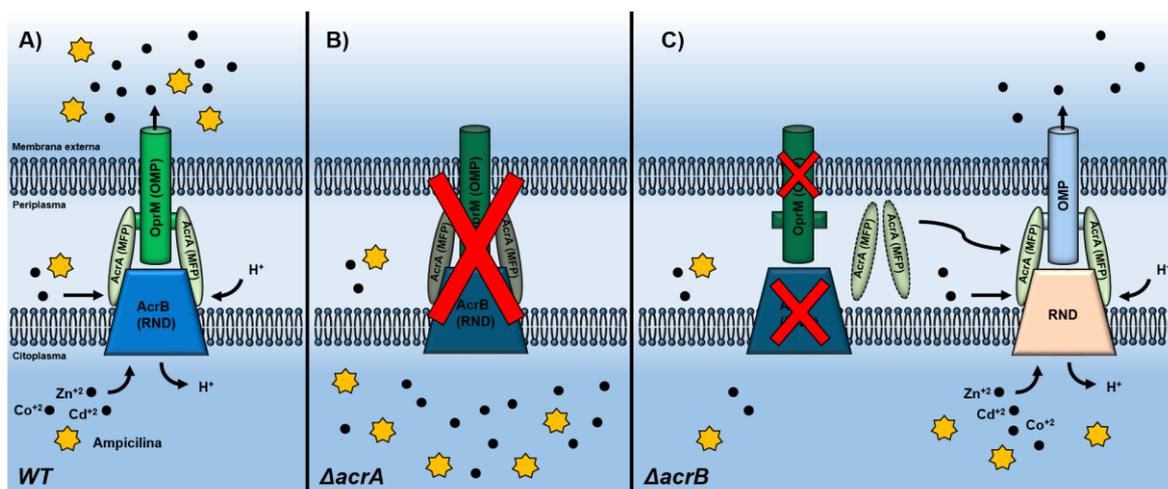


Figura 19. Modelo para o transporte de ampicilina e metais pesados cádmio e zinco por meio da bomba AcrAB-OprM em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 selvagem e mutantes $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$. Bomba de efluxo multidrogas AcrAB-OprM atua no transporte de ampicilina, cádmio e zinco. O X vermelho indica ausência dos componentes nos mutantes $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$. WT: selvagem; círculos pretos preenchidos: Co^{+2} , Cd^{+2} e Zn^{+2} ; figura amarela: ampicilina; RND: proteína da família RND; MFP: proteína de fusão de membrana; OMP: proteína de membrana externa. Adaptado de Avarez-Ortega *et al.* (2013) e Intorne *et al.* (2012).

Ao avaliar a participação da bomba de efluxo AcrAB-OprM na resposta à H_2O_2 , foi possível observar que os mutantes $\Delta acrA$ e $\Delta acrB$, interessantemente, apresentaram maior resistência a esse composto, em comparação à estirpe selvagem. Em *E. coli*, diversos genes de resposta ao estresse oxidativo são regulados por SoxRS. A proteína SoxR é ativada por agentes que geram superóxido e outros agentes como óxido nítrico e também H_2O_2 . A proteína SoxR, quando ativada, regula positivamente a expressão de *soxS*, cujo produto modula a expressão de diversos genes, incluindo aqueles com papel chave na resposta ao estresse oxidativo, como *sodA* (superóxido dismutase), e também genes responsáveis por codificar bombas de efluxo multidrogas (Chiang e Schellhorn, 2012).

Ruiz e Levy (2013) observaram que, em *E. coli*, a expressão de *soxR* é aumentada em mutantes $\Delta acrB$ e que a inativação ou inibição da bomba de efluxo AcrAB-TolC ativa o promotor do gene *acrAB*. Os autores sugerem que metabólitos celulares transportados pela bomba de efluxo AcrAB-TolC se acumulam no interior da célula (devido à mutação em $\Delta acrB$) e ativam a expressão de gene *soxRS*, que regula positivamente o promotor do gene *acrAB*.

Com isso, diante dos resultados obtidos para *G. diazotrophicus* PAL5, sugere-se que a falta da bomba de AcrAB-OprM, em ambos os mutantes, pode

ativar a expressão de homólogo de *soxRS*, aumentando a produção de enzimas de detoxificação de ERO, acarretando aumento da resistência observada. Adicionalmente, o mutante Δ *acrB* apresentou menor tolerância à H₂O₂ em relação ao Δ *acrA*. Nesse caso, presume-se que a proteína AcrA, que continua a ser produzida mesmo com a mutação no gene *acrB*, se associe com outras proteínas de membrana interna, permitindo o transporte de metabólitos que ativam a expressão de homólogo de *soxR*. No entanto, esse transporte pode não ser tão eficiente quanto aquele realizado pela bomba AcrAB-OprM, resultando em uma resposta intermediária de Δ *acrB* à H₂O₂ em relação às estirpes selvagem e Δ *acrA*. É importante ressaltar que outros estudos devem ser conduzidos no intuito de detalhar os mecanismos moleculares envolvidos na participação da bomba de efluxo AcrAB-OprM na resposta ao estresse oxidativo.

Ao avaliar a participação da bomba de efluxo multidrogas na promoção do crescimento de *A. thaliana*, foi possível observar que a ausência dos componentes AcrA, AcrB e OprM afetou a promoção do crescimento vegetal. A literatura relata que bombas de efluxo multidrogas também estão envolvidas no processo de interação entre bactéria e planta (Burse *et al.*, 2004; Eda *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2011; Pletzer e Weingart, 2014). Em *E. amylovora*, foi demonstrado que as bombas de efluxo MdtABC e MdtUVW estão envolvidas no estabelecimento desse fitopatógeno em macieiras, provavelmente devido à sua participação na resistência a compostos antimicrobianos produzidos pela planta, como os flavonoides (Pletzer e Weingart, 2014). Além disso, nesse mesmo micro-organismo, foi demonstrado que o mutante Δ *acrB* teve sua virulência diminuída em relação à estirpe selvagem quando inoculado em macieiras (Burse *et al.*, 2004).

Vargas e colaboradores (2011) reportaram a importância da bomba de efluxo multidrogas MexAB-OprM no processo de colonização e estabelecimento da doença em plantas de tomate por *P. syringae*. Além disso, foi identificado que flavonoides são os principais substratos para essa bomba.

Eda e colaboradores (2011) demonstraram que, em *S. meliloti*, um rizóbio, a bomba SmeAB, da família RND, está envolvida com o processo de nodulação em plantas de *M. sativa*, além de conferir resistência a antibióticos, corantes e outros compostos tóxicos. A deleção de genes codificadores para uma bomba de efluxo multidrogas em *B. japonicum* prejudicou o processo de

nodulação e a capacidade de fixação biológica de nitrogênio por essa bactéria (Takeshima *et al.*, 2013).

Diante disso, sugere-se que a bomba AcrAB-OprM participe da promoção do crescimento vegetal, principalmente no processo de colonização dos tecidos vegetais, por participar da resistência a compostos produzidos pelas plantas. No entanto, são necessários novos estudos com o objetivo de melhor caracterizar essa participação, além de elucidar quais compostos são transportados por essa bomba, propiciando uma interação eficiente entre *G. diazotrophicus* PAL5 e *A. thaliana*.

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram a caracterização de uma bomba de efluxo multidrogas em *G. diazotrophicus* PAL5, principalmente quanto à tolerância aos metais pesados cádmio, zinco, cobalto e ao antibiótico ampicilina. Além dessa bomba, foi possível identificar, por análises *in silico*, presença de outras bombas de efluxo multidrogas que apresentam características de domínio proteico e organização genômica similares a AcrAB-OprM, sendo necessária a caracterização quanto aos substratos transportados por elas. Um modelo dessas bombas, juntamente com a bomba CzcCBA já identificada e caracterizada em *G. diazotrophicus* (Intorne *et al.*, 2012), é proposto (Figura 20). Assim, o presente trabalho abre novas perspectivas para futuros estudos que visem a melhor caracterizar a bomba AcrAB-OprM, em *G. diazotrophicus* PAL5, bem como seu papel, e das demais bombas identificadas *in silico*, no transporte de outros compostos como corantes, detergentes, compostos antimicrobianos produzidos por plantas e outros antibióticos e metabólitos secundários produzidos pela própria bactéria.

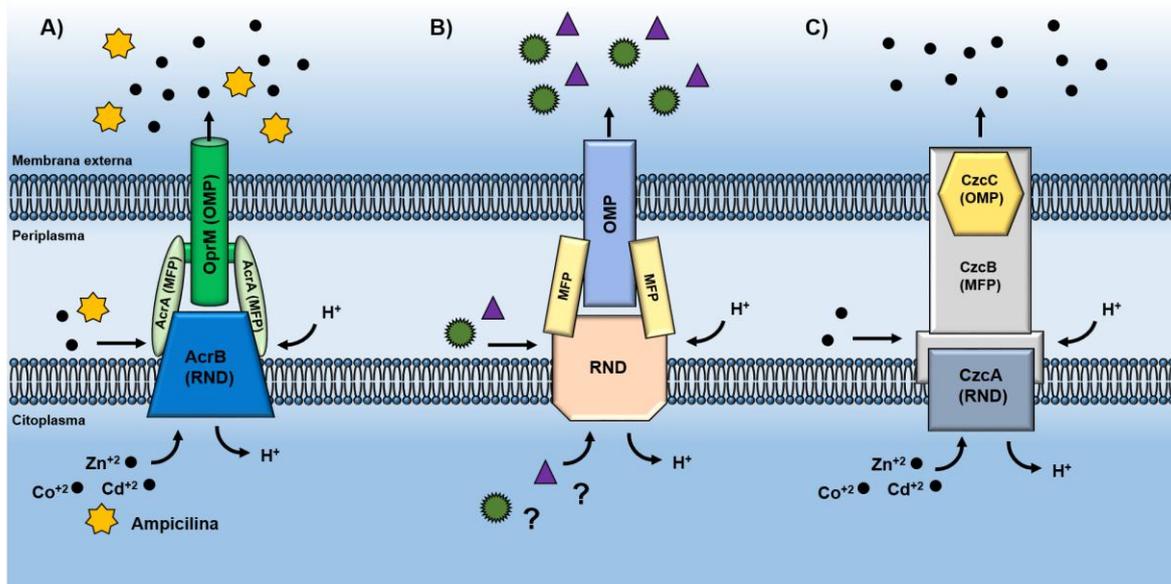


Figura 20. Modelo do transporte de compostos tóxicos por bombas de efluxo RND em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. (A) Bomba de efluxo multidrogas AcrAB-OprM; (B) Bomba de efluxo multidrogas, cujos componentes ainda não foram identificados; (C) Bomba de efluxo CzcCBA. Círculos pretos preenchidos: Co⁺², Cd⁺² e Zn⁺²; figura amarela: ampicilina; figura verde e triângulo roxo: compostos desconhecidos. RND: proteína da família RND; MFP: proteína de fusão de membrana; OMP: proteína de membrana externa. Adaptado de Avarez-Ortega *et al.* (2013) e Intorne *et al.* (2012).

7. CONCLUSÕES

- ✓ Os genes mutados *acrA* e *acrB*, juntamente com o gene *oprM*, possivelmente, compõem o operon *acrAB-oprM* e são responsáveis por codificar a bomba AcrAB-OprM em *G. diazotrophicus* PAL5;
- ✓ As proteínas codificadas pelos genes mutados *acrA* e *acrB* de *G. diazotrophicus* PAL5 apresentaram alta similaridade com proteínas homólogas já caracterizadas em outras espécies;
- ✓ A proteína de membrana externa de *G. diazotrophicus* PAL5 que se associa com AcrAB é a proteína OprM;
- ✓ Os mutantes Δ *acrA* e Δ *acrB* e a estirpe selvagem possuem perfis de crescimento diferentes, sugerindo participação desta bomba de efluxo multidrogas no metabolismo bacteriano;
- ✓ A bomba de efluxo AcrAB-OprM participa do processo de detoxificação dos metais pesados cádmio, cobalto e zinco e também da resistência à ampicilina em *G. diazotrophicus* PAL5;
- ✓ Mutações nos genes *acrA* e *acrB* conferem maior resistência à *G. diazotrophicus* PAL5 quanto ao estresse oxidativo causado por H₂O₂;

- ✓ Mutações nos genes *acrA* e *acrB* prejudicam a capacidade de *G. diazotrophicus* PAL5 em promover o crescimento vegetal de *A. thaliana*, indicando participação da bomba de efluxo multidrogas AcrAB-OprM na interação bactéria-planta, com ênfase na promoção do crescimento vegetal por *G. diazotrophicus* PAL5.

8. PERSPECTIVAS

- ✓ Confirmar a organização em operon dos genes *acrA*, *acrB* e *oprM* por meio de análises de RT-PCR;
- ✓ Verificar o papel da bomba de efluxo multidrogas AcrAB-OprM na resposta a outras agentes estressores como sacarose, Na₂SO₄, PEG-400, Paraquat e outros metais pesados;
- ✓ Detalhar a promoção do crescimento vegetal, avaliando a eficiência de colonização dos mutantes Δ *acrA* e Δ *acrB*, por meio de ensaios de CFU e microscopia de fluorescência;
- ✓ Avaliar a participação da bomba de efluxo multidrogas AcrAB-OprM no transporte de brometo de etídeo, SDS, acriflavina e outros compostos;
- ✓ Realizar a complementação funcional dos mutantes Δ *acrA* e Δ *acrB*, por meio da clonagem desses genes sob orientação de promotor nativo;
- ✓ Avaliar a resposta da estirpe selvagem superexpressando os genes *acrA* e *acrB* sob orientação de um promotor 35S, quando exposta a diferentes estresses abióticos e também a diferentes compostos tóxicos e antimicrobianos;

- ✓ Verificar quais proteínas interagem com as proteínas AcrA e AcrB, por meio da superexpressão dos genes codificadores fundidos à calda HA, seguido de imunoprecipitação e proteômica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aendekerk, S., Diggle, S.P., Song, Z., Høiby, N., Cornelis, P., Williams, P. , Camara, M. (2005) The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiology* 151(4):1113-1125.
- Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P. , Baysse, C. (2002) Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* 148(8):2371-2381.
- Aires, J.R. , Nikaido, H. (2005) Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187(6):1923-1929.
- Ali, B., Sabri, A.N., Ljung, K. , Hasnain, S. (2009) Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World journal of Microbiology and Biotechnology* 25(3):519-526.
- Ali, S., Charles, T.C. , Glick, B.R. (2014) Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry* 80:160-167.

- Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M. , Murata, N. (2000) Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant physiology* 123(3):1047-1056.
- Alquéres, S., Meneses, C., Rouws, L., Rothballer, M., Baldani, I., Schmid, M. , Hartmann, A. (2013) The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26(8):937-945.
- Alquéres, S.M.C. (2010) *Estudos de genômica funcional em Gluconacetobacter diazotrophicus*. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. (Doutorado), Universidade Federal do Rio de Janeiro,
- Álvarez-Ordóñez, A., Begley, M., Clifford, T., Deasy, T., Collins, B. , Hill, C. (2014) Transposon mutagenesis reveals genes involved in osmotic stress and drying in *Cronobacter sakazakii*. *Food Res. Int.* 55:45-54.
- Alvarez-Ortega, C., Olivares, J. , Martínez, J.L. (2013) RND multidrug efflux pumps: what are they good for?
- Arencibia, A., Estevez, Y., Vinagre, F., Bernal, A., Perez, J., Carmona, E., Hemerly, A. , Santana, I. (2006) Induced-resistance in sugarcane against pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans* mediated by an endophytic interaction. *Sugar Tech* 8(4):272-280.
- Arshad, M., Shaharoon, B. , Mahmood, T. (2008) Inoculation with *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of drought stress on growth, yield, and ripening of pea (*Pisum sativum* L.). *Pedosphere* 18(5):611-620.
- Babalola, O.O. (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol. Lett.* 32(11):1559-1570.
- Bal, H.B., Nayak, L., Das, S. , Adhya, T.K. (2013) Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant Soil* 366(1-2):93-105.

- Bashan, Y., Holguin, G. , De-Bashan, L.E. (2004) *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 50(8):521-577.
- Bastian, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R. , Bottini, R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A(1) and A(3) by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul.* 24(1):7-11.
- Bertalan, M., Albano, R., de Pádua, V., Rouws, L., Rojas, C., Hemerly, A., Teixeira, K., Schwab, S., Araujo, J., Oliveira, A., França, L., Magalhães, V., Alquéres, S., Cardoso, A., Almeida, W., Loureiro, M.M., Nogueira, E., Cidade, D., Oliveira, D., Simão, T., Macedo, J., Valadão, A., Dreschsel, M., Freitas, F., Vidal, M., Guedes, H., Rodrigues, E., Meneses, C., Brioso, P., Pozzer, L., Figueiredo, D., Montano, H., Junior, J., de Souza Filho, G., Martin Quintana Flores, V., Ferreira, B., Branco, A., Gonzalez, P., Guillobel, H., Lemos, M., Seibel, L., Macedo, J., Alves-Ferreira, M., Sachetto-Martins, G., Coelho, A., Santos, E., Amaral, G., Neves, A., Pacheco, A.B., Carvalho, D., Lery, L., Bisch, P., Rössle, S.C., Ürményi, T., Rael Pereira, A., Silva, R., Rondinelli, E., von Krüger, W., Martins, O., Baldani, J.I. , Ferreira, P.C. (2009) Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics* 10(1):1-17.
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J.A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M.B. , Martinez, J.L. (2016) Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms* 4(1):14.
- Blanco, Y., Blanch, M., Pinon, D., Legaz, M.E. , Vicente, C. (2005) Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. *J. Biosci. Bioeng.* 99(4):366-371.
- Blanco, Y., Legaz, M.E. , Vicente, C. (2010) *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane endophyte, inhibits xanthan production by sugarcane-invading *Xanthomonas albilineans*. *Journal of Plant Interactions* 5(4):241-248.

- Boddey, R., Urquiaga, S., Reis, V. , Döbereiner, J. (1991) Biological nitrogen fixation associated with sugar cane Nitrogen Fixation. Springer, p. 105-111.
- Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, C., Cassan, F. , Luna, V. (2007) Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(4):874-880.
- Boniolo, F.S., Rodrigues, R.C., Delatorre, E.O., da Silveira, M.M., Quintana Flores, V.M. , Berbert-Molina, M.A. (2009) Glycine betaine enhances growth of nitrogen-fixing bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 under saline stress conditions. *Curr. Microbiol.* 59(6):593-599.
- Boyer, M. , Wisniewski-Dyé, F. (2009) Cell–cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70(1):1-19.
- Brown, D.G., Swanson, J.K. , Allen, C. (2007) Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(9):2777-2786.
- Bruins, M.R., Kapil, S. , Oehme, F.W. (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45(3):198-207.
- Burse, A., Weingart, H. , Ullrich, M.S. (2004) The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17(1):43-54.
- Busset, N., De Felice, A., Chaintreuil, C., Gully, D., Fardoux, J., Romdhane, S., Molinaro, A., Silipo, A. , Giraud, E. (2016) The LPS O-antigen in photosynthetic *Bradyrhizobium* strains is dispensable for the establishment of a successful symbiosis with *Aeschynomene* legumes. *PLoS one* 11(2):e0148884.
- Cabiscol, E., Tamarit, J. , Ros, J. (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* 3(1):3-8.

- Caspi, R., Altman, T., Billington, R., Dreher, K., Foerster, H., Fulcher, C.A., Holland, T.A., Keseler, I.M., Kothari, A. , Kubo, A. (2014) The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Res.* 42(D1):D459-D471.
- Cassan, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C. , Luna, V. (2009) *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Soil Biol.* 45(1):28-35.
- Cavalcante, V.A. , Döbereiner, J. (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108(1):23-31.
- Cheng, Z., Woody, O.Z., McConkey, B.J. , Glick, B.R. (2012) Combined effects of the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and salinity stress on the *Brassica napus* proteome. *Appl. Soil Ecol.* 61:255-263.
- Chiang, S.M. , Schellhorn, H.E. (2012) Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 525(2):161-169.
- Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T.T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R.R. , Schweizer, H.P. (2001) Cross-Resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(2):428-432.
- Chung, E.J., Hossain, M.T., Khan, A., Kim, K.H., Jeon, C.O. , Chung, Y.R. (2015) *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing activities in rice. *The plant pathology journal* 31(2):152.
- Coates, A., Hu, Y., Bax, R. , Page, C. (2002) The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 1(11):895-910.

- Cocking, E.C., Stone, P.J. , Davey, M.R. (2006) Intracellular colonization of roots of Arabidopsis and crop plants by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 42(1):74-82.
- Cohen, A.C., Bottini, R. , Piccoli, P.N. (2008) *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant Growth Regul.* 54(2):97-103.
- Cohen, A.C., Bottini, R., Pontin, M., Berli, F.J., Moreno, D., Boccanlandro, H., Travaglia, C.N. , Piccoli, P.N. (2015) *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiol. Plant* 153(1):79-90.
- Cruz, C.D. (2013) Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy* 35(3):271-276.
- Da Costa, P.B., Beneduzi, A., de Souza, R., Schoenfeld, R., Vargas, L.K. , Passaglia, L.M. (2013) The effects of different fertilization conditions on bacterial plant growth promoting traits: guidelines for directed bacterial prospection and testing. *Plant Soil* 368(1-2):267-280.
- Das, P., Behera, B.K., Meena, D.K., Azmi, S.A., Chatterjee, S., Meena, K. , Sharma, A.P. (2015) Salt stress tolerant genes in halophilic and halotolerant bacteria: Paradigm for salt stress adaptation and osmoprotection. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 4(1):642-658.
- Das, S., Jean, J.-S., Kar, S., Chou, M.-L. , Chen, C.-Y. (2014) Screening of plant growth-promoting traits in arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soil and their potential implication for arsenic bioremediation. *J. Hazard. Mater.* 272:112-120.
- Day, J. , Döbereiner, J. (1976) Physiological aspects of N₂-fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil Biology and Biochemistry* 8(1):45-50.
- de Oliveira, M.V., Xu, G., Li, B., de Souza Vespoli, L., Meng, X., Chen, X., Yu, X., de Souza, S.A., Intorne, A.C. , Manhães, A.M.E.d.A. (2016a) Specific control

- of *Arabidopsis* BAK1/SERK4-regulated cell death by protein glycosylation. *Nature Plants*:15218.
- de Oliveira, M.V.V. (2012) *Análise da resposta de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 ao estresses osmótico e iônico: aspectos fisiológico e moleculares*. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. (Doutorado), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
- de Oliveira, M.V.V., Intorne, A.C., Vespoli, L.d.S., Madureira, H.C., Leandro, M.R., Pereira, T.N., Olivares, F.L., Berbert-Molina, M.A. , De Souza Filho, G.A. (2016b) Differential effects of salinity and osmotic stress on the plant growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Arch. Microbiol.*:1-8.
- de Paula Soares, C., Rodrigues, E.P., de Paula Ferreira, J., Araújo, J.L.S., Rouws, L.F.M., Baldani, J.I. , Vidal, M.S. (2015) Tn5 insertion in the *tonB* gene promoter affects iron-related phenotypes and increases extracellular siderophore levels in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.* 197(2):223-233.
- de Souza, A.R., De Souza, S., De Oliveira, M., Ferraz, T., Figueiredo, F., Da Silva, N., Rangel, P., Panisset, C., Olivares, F. , Campostrini, E. (2015a) Endophytic colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its effect on plant growth promotion, plant physiology, and activation of plant defense. *Plant Soil*:1-14.
- de Souza, R., Beneduzi, A., Ambrosini, A., Da Costa, P.B., Meyer, J., Vargas, L.K., Schoenfeld, R. , Passaglia, L.M. (2013) The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant Soil* 366(1-2):585-603.
- de Souza, R., Meyer, J., Schoenfeld, R., da Costa, P.B. , Passaglia, L.M. (2015b) Characterization of plant growth-promoting bacteria associated with rice cropped in iron-stressed soils. *Ann. Microbiol.* 65(2):951-964.

- Dehal, P.S., Joachimiak, M.P., Price, M.N., Bates, J.T., Baumohl, J.K., Chivian, D., Friedland, G.D., Huang, K.H., Keller, K., Novichkov, P.S. (2010) MicrobesOnline: an integrated portal for comparative and functional genomics. *Nucleic Acids Res.* 38(suppl 1):D396-D400.
- del Amor, F.M., Cuadra-Crespo, P. (2012) Plant growth-promoting bacteria as a tool to improve salinity tolerance in sweet pepper. *Funct. Plant Biol.* 39(1):82-90.
- Dimkpa, C., Merten, D., Svatoš, A., Büchel, G., Kothe, E. (2009a) Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *J. Appl. Microbiol.* 107(5):1687-1696.
- Dimkpa, C., Weinand, T., Asch, F. (2009b) Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, cell & environment* 32(12):1682-1694.
- Dixon, R., Kahn, D. (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(8):621-631.
- Döbereiner, J. (1992) Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. *Ciência e Cultura* 44(5):310-313.
- Döbereiner, J., Andrade, V.d.O., Baldani, V. (1999) Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia. *EMBRAPA-CNPAB. Documentos*
- Dourado, M.N., Souza, L.A., Martins, P.F., Peters, L.P., Piotto, F.A., Azevedo, R.A. (2014) *Burkholderia* sp. SCMS54 triggers a global stress defense in tomato enhancing cadmium tolerance. *Water, Air, & Soil Pollution* 225(10):1-16.
- Du, D., van Veen, H.W., Luisi, B.F. (2015) Assembly and operation of bacterial tripartite multidrug efflux pumps. *Trends Microbiol.* 23(5):311-319.
- Du, D., Wang, Z., James, N.R., Voss, J.E., Klimont, E., Ohene-Agyei, T., Venter, H., Chiu, W., Luisi, B.F. (2014) Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature* 509(7501):512-515.

- Dwivedi, S.L., Sahrawat, K.L., Upadhyaya, H.D., Mengoni, A., Galardini, M., Bazzicalupo, M., Biondi, E.G., Hungria, M., Kaschuk, G. , Blair, M.W. (2015) Chapter one-advances in host plant and rhizobium genomics to enhance symbiotic nitrogen fixation in grain legumes. *Adv. Agron.* 129:1-116.
- Eda, S., Mitsui, H. , Minamisawa, K. (2011) Involvement of the smeAB multidrug efflux pump in resistance to plant antimicrobials and contribution to nodulation competitiveness in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(9):2855-2862.
- Egamberdieva, D., Jabborova, D. , Hashem, A. (2015) *Pseudomonas* induces salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*) and resistance to *Fusarium* root rot through the modulation of indole-3-acetic acid. *Saudi J. Biol. Sci.* 22(6):773-779.
- Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J. , Poole, K. (1998) Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 180(20):5443-5447.
- FAO (2013) *Fao Statistical Yearbook 2013: World Food and Agriculture*. Rome: Food and Agriculture Organization,
- Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez, D. , Abdala, G. (2007) Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76(5):1145-1152.
- Franche, C., Lindström, K. , Elmerich, C. (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 321(1-2):35-59.
- Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G. , Bahl, H. (2001) Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Arch. Microbiol.* 176(6):421-426.
- Fuentes-Ramirez, L.E., Jimenez-Salgado, T., Abarca-Ocampo, I. , Caballero-Mellado, J. (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing

- bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil* 154(2):145-150.
- Gallon, J. (1981) The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and micro-organisms. *Trends Biochem. Sci.* 6:19-23.
- García-Fraile, P., Menéndez, E. , Rivas, R. (2015) Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry.
- Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R., Stephan, M., Teixeira, K.d.S., Dobereiner, J. , De Ley, J. (1989) *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 39(3):361-364.
- Glick, B.R. (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012
- González-Pasayo, R. , Martínez-Romero, E. (2000) Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13(5):572-577.
- Gotoh, N., Tsujimoto, H., Poole, K., Yamagishi, J.-i. , Nishino, T. (1995) The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *mexA-mexB-oprK* multidrug resistance operon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(11):2567-2569.
- Grover, M., Ali, S.Z., Sandhya, V., Rasul, A. , Venkateswarlu, B. (2011) Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(5):1231-1240.
- Güneş, A., Turan, M., Güllüce, M. , Şahin, F. (2014) Nutritional content analysis of plant growth-promoting rhizobacteria species. *Eur. J. Soil Biol.* 60:88-97.
- Haas, D. , Keel, C. (2003) Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41(1):117-153.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. , Kloepper, J. (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43(10):895-914.

- Hinchliffe, P., Symmons, M.F., Hughes, C. , Koronakis, V. (2013) Structure and operation of bacterial tripartite pumps. *Annu. Rev. Microbiol.* 67:221-242.
- Hoagland, D.R. , Arnon, D.I. (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station* 347(2nd edit)
- Hobbs, E.C., Yin, X., Paul, B.J., Astarita, J.L. , Storz, G. (2012) Conserved small protein associates with the multidrug efflux pump AcrB and differentially affects antibiotic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(41):16696-16701.
- Holdsworth, S.R. , Law, C.J. (2012) Functional and biochemical characterisation of the *Escherichia coli* major facilitator superfamily multidrug transporter MdtM. *Biochimie* 94(6):1334-1346.
- Hu, N. , Zhao, B. (2007) Key genes involved in heavy-metal resistance in *Pseudomonas putida* CD2. *FEMS Microbiol. Lett.* 267(1):17-22.
- Hu, P., Brodie, E.L., Suzuki, Y., McAdams, H.H. , Andersen, G.L. (2005) Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 187(24):8437-8449.
- Hussein, K.A. , Joo, J.H. (2015) Isolation and characterization of rhizomicrobial isolates for phosphate solubilization and indole acetic acid production. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 58(6):847-855.
- IFA (2013) International Fertilizer Industry Association. IFADATA, 2013. Disponível em: < <http://www.fertilizer.org/ifa/ifadata/search> >. Acesso em: Fevereiro.
- Ikedo, A.C., Bassani, L.L., Adamoski, D., Stringari, D., Cordeiro, V.K., Glienke, C., Steffens, M.B.R., Hungria, M. , Galli-Terasawa, L.V. (2013) Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. *Microb. Ecol.* 65(1):154-160.
- Intorne, A.C. (2012) *Mecanismos de resistência a cádmio, cobalto e zinco em Gluconacetobacter diazotrophicus, uma bactéria promotora do crescimento vegetal.* Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy

Ribeiro. (Doutorado), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,

Intorne, A.C., de Oliveira, M.V.V., Lima, M.L., da Silva, J.F., Olivares, F.L. , de Souza Filho, G.A. (2009) Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Arch. Microbiol.* 191(5):477-483.

Intorne, A.C., de Oliveira, M.V.V., Pereira, L.d.M. , de Souza Filho, G.A. (2012) Essential role of the *czc* determinant for cadmium, cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. *Int. Microbiol.* 15(2):69-78.

Islam, F., Yasmeen, T., Ali, Q., Mubin, M., Ali, S., Arif, M.S., Hussain, S., Riaz, M. , Abbas, F. (2016) Copper-resistant bacteria reduces oxidative stress and uptake of copper in lentil plants: potential for bacterial bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research* 23(1):220-233.

Jain, S., Vaishnav, A., Kasotia, A., Kumari, S., Gaur, R.K. , Choudhary, D.K. (2013) Bacteria-induced systemic resistance and growth promotion in *Glycine max* L. Merrill upon challenge inoculation with *Fusarium oxysporum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 83(4):561-567.

James, E.K. , Olivares, F.L. (1998) Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17(1):77-119.

James, E.K., Olivares, F.L., de Oliveira, A.L., dos Reis, F.B., da Silva, L.G. , Reis, V.M. (2001) Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J. Exp. Bot.* 52(357):747-760.

Janssen, P.J., Van Houdt, R., Moors, H., Monsieurs, P., Morin, N., Michaux, A., Benotmane, M.A., Leys, N., Vallaey, T. , Lapidus, A. (2010) The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS One* 5(5):e10433.

- Jayaraman, A. , Wood, T.K. (2008) Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 10:145-167.
- Jimenez-Salgado, T., Fuentes-Ramirez, L.E., Tapia-Hernandez, A., Mascarua-Esparza, M.A., Martinez-Romero, E. , Caballero-Mellado, J. (1997) *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(9):3676-3683.
- Kang, Y.-S., Lee, Y., Jung, H., Jeon, C.O., Madsen, E.L. , Park, W. (2007) Overexpressing antioxidant enzymes enhances naphthalene biodegradation in *Pseudomonas* sp. strain As1. *Microbiology* 153(10):3246-3254.
- Kasim, W.A., Osman, M.E., Omar, M.N., Abd El-Daim, I.A., Bejai, S. , Meijer, J. (2013) Control of drought stress in wheat using plant-growth-promoting bacteria. *J. Plant Growth Regul.* 32(1):122-130.
- Kaul, S., Koo, H.L., Jenkins, J., Rizzo, M., Rooney, T., Tallon, L.J., Feldblyum, T., Nierman, W., Benito, M.-I. , Lin, X. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *nature* 408(6814):796-815.
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K. , Swings, J. (2006) The family acetobacteraceae: the genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. *The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses*:163-200.
- Khan, M.S., Zaidi, A. , Wani, P.A. (2009) Role of Phosphate Solubilizing Microorganisms in Sustainable Agriculture - A Review. *In: Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Véronique, S. , Alberola, C. (eds) Sustainable Agriculture.* Dordrecht: Springer Netherlands, p. 551-570.
- Kim, Y.C., Jung, H., Kim, K.Y. , Park, S.K. (2008) An effective biocontrol bioformulation against Phytophthora blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* 120(4):373-382.
- Kobayashi, T. , Nishizawa, N.K. (2012) Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63:131-152.

- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A. , Collins, J.J. (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130(5):797-810.
- Köhler, T., van Delden, C., Curty, L.K., Hamzehpour, M.M. , Pechere, J.-C. (2001) Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183(18):5213-5222.
- Koronakis, V., Eswaran, J. , Hughes, C. (2004) Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu. Rev. Biochem.* 73(1):467-489.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. , Hughes, C. (2000) Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405(6789):914-919.
- Krämer, A., Herzer, J., Overhage, J. , Meyer-Almes, F.-J. (2016) Substrate specificity and function of acetylpolyamine amidohydrolases from *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Biochem.* 17(1):1.
- Krewulak, K.D. , Vogel, H.J. (2008) Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1778(9):1781-1804.
- Kumar, S., Stecher, G. , Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*:msw054.
- Kurepin, L.V., Park, J.M., Lazarovits, G. , Hüner, N.P. (2015) Involvement of plant stress hormones in *Burkholderia phytofirmans*-induced shoot and root growth promotion. *Plant Growth Regul.* 77(2):179-187.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A. , Lopez, R. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21):2947-2948.
- Lee, S., Flores-Encarnacion, M., Contreras-Zentella, M., Garcia-Flores, L., Escamilla, J. , Kennedy, C. (2004) Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *J. Bacteriol.* 186(16):5384-5391.

- León, M., Yaryura, P., Montecchia, M., Hernández, A., Correa, O., Pucheu, N., Kerber, N., García, A. (2009) Antifungal activity of selected indigenous *Pseudomonas* and *Bacillus* from the soybean rhizosphere. *International journal of microbiology* 2009
- Li, M., Gu, R., Su, C.-C., Routh, M.D., Harris, K.C., Jewell, E.S., McDermott, G., Edward, W.Y. (2007) Crystal structure of the transcriptional regulator AcrR from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 374(3):591-603.
- Li, X.-Z., Nikaido, H., Poole, K. (1995) Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(9):1948-1953.
- Lindemann, A., Koch, M., Pessi, G., Müller, A.J., Balsiger, S., Hennecke, H., Fischer, H.-M. (2010) Host-specific symbiotic requirement of BdeAB, a RegR-controlled RND-type efflux system in *Bradyrhizobium japonicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 312(2):184-191.
- Lister, P.D., Wolter, D.J., Hanson, N.D. (2009) Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 22(4):582-610.
- Loaces, I., Ferrando, L., Scavino, A.F. (2011) Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice. *Microb. Ecol.* 61(3):606-618.
- Loganathan, P., Sunita, R., Parida, A.K., Nair, S. (1999) Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine coracana* L. *J. Appl. Microbiol.* 87(1):167-172.
- Logeshwaran, P., Thangaraju, M., Rajasundari, K. (2009) Hydroxamate siderophores of endophytic bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolated from sugarcane roots. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(4):3564-3567.

- Lopes, R.B.M., de Oliveira Costa, L.E., Vanetti, M.C.D., de Araújo, E.F. , de Queiroz, M.V. (2015) Endophytic bacteria isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris*) exhibiting high variability showed antimicrobial activity and quorum sensing inhibition. *Curr. Microbiol.* 71(4):509-516.
- Luna, M.F., Aprea, J., Crespo, J.M. , Boiardi, J.L. (2012) Colonization and yield promotion of tomato by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Appl. Soil Ecol.* 61:225-229.
- Luna, M.F., Galar, M.L., Aprea, J., Molinari, M.L. , Boiardi, J.L. (2010) Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biotechnol. Lett.* 32(8):1071-1076.
- Ma, D., Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H. , Hearst, J.E. (1996) The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol. Microbiol.* 19(1):101-112.
- Ma, D., Cook, D., Alberti, M., Pon, N., Nikaido, H. , Hearst, J. (1993) Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175(19):6299-6313.
- Ma, D., Cook, D.N., Alberti, M., Pon, N.G., Nikaido, H. , Hearst, J.E. (1995) Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 16(1):45-55.
- Ma, D., Cook, D.N., Hearst, J.E. , Nikaido, H. (1994) Efflux pumps and drug resistance in gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* 2(12):489-493.
- Ma, J.F. (2005) Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24(4):267-281.
- Ma, Y., Rajkumar, M. , Freitas, H. (2009) Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *J. Environ. Manag.* 90(2):831-837.
- Madhaiyan, M., Saravanan, V.S., Jovi, D., Lee, H., Thenmozhi, R., Hari, K. , Sa, T. (2004) Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. *Microbiol. Res.* 159(3):233-243.

- Maldonado-González, M.M., Bakker, P.A., Prieto, P. , Mercado-Blanco, J. (2015) *Arabidopsis thaliana* as a tool to identify traits involved in *Verticillium dahliae* biocontrol by the olive root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Frontiers in microbiology* 6
- Mareque, C., Taulé, C., Beracochea, M. , Battistoni, F. (2015) Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Ann. Microbiol.* 65(2):1057-1067.
- Martinez, J.L., Sánchez, M.B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A. , Alvarez-Ortega, C. (2009) Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 33(2):430-449.
- Masciarelli, O., Urbani, L., Reinoso, H. , Luna, V. (2013) Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. *Journal of Microbiology* 51(5):590-597.
- Mastretta, C., Taghavi, S., van der Lelie, D., Mengoni, A., Galardi, F., Gonnelli, C., Barac, T., Boulet, J., Weyens, N. , Vangronsveld, J. (2009) Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. *Int. J. Phytoremediat.* 11(3):251-267.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H. , Nishino, T. (2000) Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(12):3322-3327.
- Matilla, M.A., Espinosa-Urgel, M., Rodríguez-Herva, J.J., Ramos, J.L. , Ramos-González, M.I. (2007) Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biol* 8(9):R179.
- Mazurier, S., Corberand, T., Lemanceau, P. , Raaijmakers, J.M. (2009) Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to Fusarium wilt. *The ISME journal* 3(8):977-991.

- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D. , Koornneef, M. (1998) *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* 282(5389):662.
- Meneses, C.H., Rouws, L.F., Simões-Araújo, J.L., Vidal, M.S. , Baldani, J.I. (2011) Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24(12):1448-1458.
- Meng, X., Chen, X., Mang, H., Liu, C., Yu, X., Gao, X., Torii, K.U., He, P. , Shan, L. (2015) Differential function of Arabidopsis SERK family receptor-like kinases in stomatal patterning. *Curr. Biol.* 25(18):2361-2372.
- Meng, X., Zhou, J., Tang, J., Li, B., de Oliveira, M.V., Chai, J., He, P. , Shan, L. (2016) Ligand-induced receptor-like kinase complex regulates floral organ abscission in Arabidopsis. *Cell reports* 14(6):1330-1338.
- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., van der Lelie, D. , Wattiez, R. (2003) *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27(2-3):385-410.
- Meyerowitz, E.M. , Pruitt, R.E. (1985) *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics. *Science* 229(4719):1214-1218.
- Meyerowitz, E.M. , Somerville, C.R. (1994) *Arabidopsis*. New York: Cold Spring Harbor,
- Michéa-Hamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Kocjancic Curty, L. , Pechère, J.C. (1997) Characterization of MexE–MexF–OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 23(2):345-354.
- Mine, T., Morita, Y., Kataoka, A., Mizushima, T. , Tsuchiya, T. (1999) Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43(2):415-417.

- Miranda, J.E.A., Sotomayor, C.E., Albesa, I. , Paraje, M.G. (2011) Oxidative and nitrosative stress in *Staphylococcus aureus* biofilm. *FEMS Microbiol. Lett.* 315(1):23-29.
- Molina, M.A., Godoy, P., Ramos-González, M.I., Muñoz, N., Ramos, J.L. , Espinosa-Urgel, M. (2005) Role of iron and the TonB system in colonization of corn seeds and roots by *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 7(3):443-449.
- Mowade, S. , Bhattacharyya, P. (2000) Resistance of P-solubilizing *Acetobacter diazotrophicus* to antibiotics. *Current Science* 79(11):1591-1594.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. , Yamaguchi, A. (2002) Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419(6907):587-593.
- Muthukumarasamy, R., Cleenwerck, I., Revathi, G., Vadivelu, M., Janssens, D., Hoste, B., Gum, K.U., Park, K.-D., Son, C.Y. , Sa, T. (2005) Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. *Syst. Appl. Microbiol.* 28(3):277-286.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G. , Lakshminarasimhan, C. (1999) Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. *Biol. Fertil. Soils* 29(2):157-164.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G. , Vadivelu, M. (2000) Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal organism of red-rot of sugarcane. *Current Science* 78(9):1063-1065.
- Nagakubo, S., Nishino, K., Hirata, T. , Yamaguchi, A. (2002) The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. *J. Bacteriol.* 184(15):4161-4167.
- NCBI (2016) National Center of Biotechnology Information. 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> >. Acesso em: Fevereiro.

- Neilands, J. (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270(45):26723-26726.
- Newton, W.E. (2000) Nitrogen fixation in perspective Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Springer, p. 3-8.
- Nies, D.H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51(6):730-750.
- Nies, D.H., Rehbein, G., Hoffmann, T., Baumann, C. , Grosse, C. (2006) Paralogs of genes encoding metal resistance proteins in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 11(1-2):82-93.
- Nieto-Penalver, C.G., Savino, M.J., Bertini, E.V., Sanchez, L.A. , de Figueroa, L.I.C. (2014) Gluconic acid produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 possesses antimicrobial properties. *Res. Microbiol.* 165(7):549-558.
- Nishino, K., Nikaido, E. , Yamaguchi, A. (2007) Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 189(24):9066-9075.
- Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H. , Greenberg, E. (1994) Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(1):197-201.
- Perez-Pantoja, D., Nickel, P.I., Chavarría, M. , de Lorenzo, V. (2013) Endogenous stress caused by faulty oxidation reactions fosters evolution of 2, 4-dinitrotoluene-degrading bacteria. *PLoS Genet* 9(8):e1003764.
- Perrig, D., Boiero, M., Masciarelli, O., Penna, C., Ruiz, O., Cassán, F. , Luna, M. (2007) Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75(5):1143-1150.
- Perron, K., Caille, O., Rossier, C., van Delden, C., Dumas, J.-L. , Köhler, T. (2004) CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and

carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 279(10):8761-8768.

Petrini, O. (1991) Fungal endophytes of tree leaves Microbial ecology of leaves. Springer, p. 179-197.

Phan, G., Benabdelhak, H., Lascombe, M.-B., Benas, P., Rety, S., Picard, M., Ducruix, A., Etchebest, C., Broutin, I. (2010) Structural and dynamical insights into the opening mechanism of *P. aeruginosa* OprM channel. *Structure* 18(4):507-517.

Piddock, L.J. (2006) Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4(8):629-636.

Piñón, D., Casas, M., Blanch, M.a., Fontaniella, B., Blanco, Y., Vicente, C., Solas, M.a.-T., Legaz, M.a.-E. (2002) *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. *Res. Microbiol.* 153(6):345-351.

Pletzer, D., Weingart, H. (2014) Characterization and regulation of the Resistance-Nodulation-Cell Division-type multidrug efflux pumps MdtABC and MdtUVW from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *BMC Microbiol.* 14(1):1.

Poole, K. (2007) Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann. Med.* 39(3):162-176.

Poole, K., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q., Wada, A., Yamasaki, T., Neshat, S., Yamagishi, J.i., Li, X.Z., Nishino, T. (1996a) Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 21(4):713-725.

Poole, K., Srikumar, R. (2001) Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa* components, mechanisms and clinical significance. *Curr. Top. Med. Chem.* 1(1):59-71.

Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D.E., Bianco, N. (1996b) Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in

- Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(9):2021-2028.
- Pumbwe, L., Skilbeck, C.A. , Wexler, H.M. (2008) Presence of quorum-sensing systems associated with multidrug resistance and biofilm formation in *Bacteroides fragilis*. *Microb. Ecol.* 56(3):412-419.
- Putman, M., van Veen, H.W. , Konings, W.N. (2000) Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4):672-693.
- Pyke, K. (1994) *Arabidopsis* - Its use in the genetic and molecular analysis of plant morphogenesis. *New Phytol.* 128(1):19-37.
- Rado, R., Andrianarisoa, B., Ravelomanantsoa, S., Rakotoarimanga, N., Rahetlah, V., Fienena, F. , Andriambelason, O. (2015) Biocontrol of potato wilt by selective rhizospheric and endophytic bacteria associated with potato plant. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development* 15(1):9762-9776.
- Ramadoss, D., Lakkineni, V.K., Bose, P., Ali, S. , Annapurna, K. (2013) Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *Springer Plus* 2(6):1-7.
- Ramakrishnan, S., Rajesh, M. , Sulochana, K. (2007) Eales' disease: oxidant stress and weak antioxidant defence. *Indian J. Ophthalmol.* 55(2):95.
- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.-T., Godoy, P., Ramos-González, M.I., Rojas, A., Terán, W. , Segura, A. (2002) Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annual Reviews in Microbiology* 56(1):743-768.
- Ramos, J.L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R. , Tobes, R. (2005) The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69(2):326-356.
- Reinhold-Hurek, B. , Hurek, T. (1998) Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17(1):29-54.

- Reis, V.M. , Dobereiner, J. (1998) Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.* 171(1):13-18.
- Richardson, A.E. , Simpson, R.J. (2011) Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant physiology* 156(3):989-996.
- Riggs, P.J., Chelius, M.K., Iniguez, A.L., Kaeppler, S.M. , Triplett, E.W. (2001) Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Funct. Plant Biol.* 28(9):829-836.
- Robinson, R.J., Fraaije, B.A., Clark, I.M., Jackson, R.W., Hirsch, P.R. , Mauchline, T.H. (2015) Endophytic bacterial community composition in wheat (*Triticum aestivum*) is determined by plant tissue type, developmental stage and soil nutrient availability. *Plant Soil*:1-16.
- Rodríguez-Salazar, J., Suárez, R., Caballero-Mellado, J. , Iturriaga, G. (2009) Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 296(1):52-59.
- Rodríguez, H. , Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17(4):319-339.
- Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D. , Bonilla, R. (2012a) Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Appl. Soil Ecol.* 61:264-272.
- Rojas-Tapias, D.F., Bonilla, R.R. , Dussán, J. (2012b) Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria on growth and copper uptake by sunflowers. *Water, Air, & Soil Pollution* 223(2):643-654.
- Rosenberg, E.Y., Ma, D. , Nikaido, H. (2000) AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *J. Bacteriol.* 182(6):1754-1756.
- Rossbach, S., Mai, D.J., Carter, E.L., Sauviac, L., Capela, D., Bruand, C. , de Bruijn, F.J. (2008) Response of *Sinorhizobium meliloti* to elevated

- concentrations of cadmium and zinc. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(13):4218-4221.
- Rouws, L.F., Simões-Araújo, J.L., Hemerly, A.S. , Baldani, J.I. (2008) Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of a flagellar mutant. *Arch. Microbiol.* 189(4):397-405.
- Rouws, L.F.M., Meneses, C.H.S.G., Guedes, H.V., Vidal, M.S., Baldani, J.I. , Schwab, S. (2010) Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes. *Lett. Appl. Microbiol.* 51(3):325-330.
- Ruiz, C. , Levy, S.B. (2013) Regulation of *acrAB* expression by cellular metabolites in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.*:dkt352.
- Saier, M.H., Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Pao, S.S., Skurray, R.A. , Nikaido, H. (1998) Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *The FASEB Journal* 12(3):265-274.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S. , Bhatti, A.S. (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34(10):635-648.
- Sánchez, P., Rojo, F. , Martínez, J.L. (2002) Transcriptional regulation of *mexR*, the repressor of *Pseudomonas aeruginosa mexAB-oprM* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiol. Lett.* 207(1):63-68.
- Sangthong, C., Setkit, K. , Prapagdee, B. (2016) Improvement of cadmium phytoremediation after soil inoculation with a cadmium-resistant *Micrococcus* sp. *Environmental Science and Pollution Research* 23(1):756-764.
- Santi, C., Bogusz, D. , Franche, C. (2013) Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of botany* 111(5):743-767.
- Saravanan, V., Madhaiyan, M., Osborne, J., Thangaraju, M. , Sa, T. (2008) Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* members: their possible role in plant growth promotion. *Microb. Ecol.* 55(1):130-140.

- Saravanan, V.S., Kalaiarasan, P., Madhaiyan, M. , Thangaraju, M. (2007a) Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion (Zn^{2+}) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Lett. Appl. Microbiol.* 44(3):235-241.
- Saravanan, V.S., Madhaiyan, M. , Thangaraju, M. (2007b) Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere* 66(9):1794-1798.
- Scandalios, J. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38(7):995-1014.
- Segura, A., Molina, L., Fillet, S., Krell, T., Bernal, P., Muñoz-Rojas, J. , Ramos, J.-L. (2012) Solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23(3):415-421.
- Sevilla, M., Burris, R.H., Gunapala, N. , Kennedy, C. (2001) Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $15N_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and nif mutant strains. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14(3):358-366.
- Sévin, D.C., Stählin, J.N., Pollak, G.R., Kuehne, A. , Sauer, U. (2016) Global metabolic responses to salt stress in fifteen species. *PloS one* 11(2):e0148888.
- Shaharoon, B., Arshad, M. , Zahir, Z. (2006) Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Lett. Appl. Microbiol.* 42(2):155-159.
- Sharff, A., Fanutti, C., Shi, J., Calladine, C. , Luisi, B. (2001) The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux. *Eur. J. Biochem.* 268(19):5011-5026.

- Sharma, A., Johri, B., Sharma, A. , Glick, B. (2003) Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP 3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biology and Biochemistry* 35(7):887-894.
- Sheng, X.-F. , Xia, J.-J. (2006) Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere* 64(6):1036-1042.
- Silhavy, T.J., Kahne, D. , Walker, S. (2010) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(5):a000414.
- Song, S., Kim, J.-S., Lee, K. , Ha, N.-C. (2015) Molecular architecture of the bacterial tripartite multidrug efflux pump focusing on the adaptor bridging model. *Journal of Microbiology* 53(6):355-364.
- Souza, R., Ambrosini, A. , Passaglia, L.M. (2015) Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet. Mol. Biol.* 38(4):401-419.
- Souza, S.A. (2015) *O papel das vias de PQQ em Gluconacetobacter diazotrophicus na tolerância a estresses ambientais e na promoção do crescimento vegetal.* Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. (Doutorado), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
- Spaepen, S. (2015) Plant hormones produced by microbes Principles of Plant-Microbe Interactions. Springer, p. 247-256.
- Spaepen, S., Bossuyt, S., Engelen, K., Marchal, K. , Vanderleyden, J. (2014) Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. *New Phytol.* 201(3):850-861.
- Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs, A. , Vanderleyden, J. (2008) Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil* 312(1-2):15-23.

- Spaepen, S., Vanderleyden, J. , Remans, R. (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31(4):425-448.
- Spaniol, V., Bernhard, S. , Aebi, C. (2015) *Moraxella catarrhalis* AcrAB-OprM efflux pump contributes to antimicrobial resistance and is enhanced during cold shock response. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(4):1886-1894.
- Stephan, M., Oliveira, M., Teixeira, K., Martinez-Drets, G. , Döbereiner, J. (1991) Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77(1):67-72.
- Stoitsova, S.O., Braun, Y., Ullrich, M.S. , Weingart, H. (2008) Characterization of the RND-type multidrug efflux pump MexAB-OprM of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(11):3387-3393.
- Strzelczyk, E., Kampert, M. , Li, C. (1994) Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.* 149(1):55-60.
- Suárez, R., Wong, A., Ramírez, M., Barraza, A., Orozco, M.d.C., Cevallos, M.A., Lara, M., Hernández, G. , Iturriaga, G. (2008) Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in rhizobia. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21(7):958-966.
- Sukweenadhi, J., Kim, Y.-J., Choi, E.-S., Koh, S.-C., Lee, S.-W., Kim, Y.-J. , Yang, D.C. (2015) *Paenibacillus yonginensis* DCY84 T induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression against aluminum, drought, and salt stress. *Microbiol. Res.* 172:7-15.
- Sulavik, M.C., Houseweart, C., Cramer, C., Jiwani, N., Murgolo, N., Greene, J., DiDomenico, B., Shaw, K.J., Miller, G.H. , Hare, R. (2001) Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(4):1126-1136.
- Sun, J., Deng, Z. , Yan, A. (2014) Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453(2):254-267.

- Takeshima, K., Hidaka, T., Wei, M., Yokoyama, T., Minamisawa, K., Mitsui, H., Itakura, M., Kaneko, T., Tabata, S., Saeki, K. (2013) Involvement of a novel genistein-inducible multidrug efflux pump of *Bradyrhizobium japonicum* early in the interaction with *Glycine max* (L.) merr. *Microbes and Environments* 28(4):414.
- Tapia-Hernandez, A., Bustillos-Cristales, M.R., Jimenez-Salgado, T., Caballero-Mellado, J., Fuentes-Ramirez, L.E. (2000) Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microb. Ecol.* 39(1):49-55.
- Tejera, N.A., Ortega, E., Gonzalez-Lopez, J., Lluch, C. (2003) Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *J. Appl. Microbiol.* 95(3):528-535.
- Tikhonova, E.B., Wang, Q., Zgurskaya, H.I. (2002) Chimeric analysis of the multicomponent multidrug efflux transporters from gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 184(23):6499-6507.
- Touceda-González, M., Brader, G., Antonielli, L., Ravindran, V.B., Waldner, G., Friesl-Hanl, W., Corretto, E., Campisano, A., Pancher, M., Sessitsch, A. (2015) Combined amendment of immobilizers and the plant growth-promoting strain *Burkholderia phytofirmans* PsJN favours plant growth and reduces heavy metal uptake. *Soil Biology and Biochemistry* 91:140-150.
- Touzé, T., Eswaran, J., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., Koronakis, V. (2004) Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB–TolC multidrug efflux system. *Mol. Microbiol.* 53(2):697-706.
- Trujillo-Lopez, A., Camargo-Zendejas, O., Salgado-Garciglia, R., Cano-Camacho, H., Baizabal-Aguirre, V.M., Ochoa-Zarzosa, A., Lopez-Meza, J.E., Valdez-Alarcon, J.J. (2006) Association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* with roots of common bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings is promoted in vitro by UV light. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 84(2):321-327.
- Ubalde, M.C., Braña, V., Sueiro, F., Morel, M.A., Martínez-Rosales, C., Marquez, C., Castro-Sowinski, S. (2012) The versatility of *Delftia* sp. isolates as tools

for bioremediation and biofertilization technologies. *Curr. Microbiol.* 64(6):597-603.

UniProt (2016) Universal Protein Resource. 2016. Disponível em: < <http://www.uniprot.org/> >. Acesso em: Fevereiro.

Uwate, M., Ichise, Y.k., Shirai, A., Omasa, T., Nakae, T. , Maseda, H. (2013) Two routes of MexS-MexT-mediated regulation of MexEF-OprN and MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* 57(4):263-272.

Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J.-F., Curie, C. , Lemanceau, P. (2007) Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20(4):441-447.

Vargas, P., Felipe, A., Michán, C. , Gallegos, M.-T. (2011) Induction of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 MexAB-OprM multidrug efflux pump by flavonoids is mediated by the repressor PmeR. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24(10):1207-1219.

Velazquez-Hernandez, M.L., Baizabal-Aguirre, V.M., Cruz-Vazquez, F., Trejo-Contreras, M.J., Fuentes-Ramirez, L.E., Bravo-Patino, A., Cajero-Juarez, M., Chavez-Moctezuma, M.P. , Valdez-Alarcon, J.J. (2011) *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. *Arch. Microbiol.* 193(2):137-149.

Verhagen, B.W., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.-S., Van Loon, L. , Pieterse, C.M. (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17(8):895-908.

Vinocur, B. , Altman, A. (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16(2):123-132.

Von Blottnitz, H., Rabl, A., Boiadjev, D., Taylor, T. , Arnold, S. (2006) Damage costs of nitrogen fertilizer in Europe and their internalization. *J. Environ. Plann. Man.* 49(3):413-433.

- von Rozycki, T. , Nies, D.H. (2009) *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie Leeuwenhoek* 96(2):115-139.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E. , Vivanco, J.M. (2003) Root exudation and rhizosphere biology. *Plant physiology* 132(1):44-51.
- Walsh, C. (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406(6797):775-781.
- Wang, C., Yang, L., Shah, A.A., Choi, E.-S. , Kim, S.-W. (2015a) Dynamic interplay of multidrug transporters with TolC for isoprenol tolerance in *Escherichia coli*. *Scientific reports* 5
- Wang, J., Zhang, Y., Li, Y., Wang, X., Nan, W., Hu, Y., Zhang, H., Zhao, C., Wang, F. , Li, P. (2015b) Endophytic microbes *Bacillus* sp. LZR216-regulated root development is dependent on polar auxin transport in Arabidopsis seedlings. *Plant Cell Rep.* 34(6):1075-1087.
- Weeks, J.W., Bavro, V.N. , Misra, R. (2014) Genetic assessment of the role of AcrB β -hairpins in the assembly of the TolC–AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 91(5):965-975.
- Wei, C.-Y., Lin, L., Luo, L.-J., Xing, Y.-X., Hu, C.-J., Yang, L.-T., Li, Y.-R. , An, Q. (2014) Endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E promotes sugarcane growth. *Biol. Fertil. Soils* 50(4):657-666.
- Wheaton, G., Counts, J., Mukherjee, A., Kruh, J. , Kelly, R. (2015) The confluence of heavy metal biooxidation and heavy metal resistance: implications for bioleaching by extreme thermoacidophiles. *Minerals* 5(3):397-451.
- Wilson, D.N. (2014) Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 12(1):35-48.
- Wood, J.M., Bremer, E., Csonka, L.N., Kraemer, R., Poolman, B., van der Heide, T. , Smith, L.T. (2001) Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 130(3):437-460.

- Xia, Y., DeBolt, S., Dreyer, J., Scott, D. , Williams, M.A. (2015) Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. *Frontiers in plant science* 6
- Yamada, Y., Hoshino, K. , Ishikawa, T. (1998) Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 64: *Gluconacetobacter* nom. corrig.(*Gluconoacetobacter* [sic]). *Int. J. Syst. Bacteriol* 48:327-328.
- Youssef, H.H., Fayez, M., Monib, M. , Hegazi, N. (2004) *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a natural endophytic diazotroph of *Nile Delta* sugarcane capable of establishing an endophytic association with wheat. *Biol. Fertil. Soils* 39(6):391-397.
- Zhao, S., Wei, H., Lin, C.-Y., Zeng, Y., Tucker, M.P., Himmel, M.E. , Ding, S.-Y. (2016) *Burkholderia phytofirmans* inoculation-induced changes on the shoot cell anatomy and iron accumulation reveal novel components of Arabidopsis-endophyte interaction that can benefit downstream biomass deconstruction. *Frontiers in Plant Science* 7
- Zhou, J., Wu, S., Chen, X., Liu, C., Sheen, J., Shan, L. , He, P. (2014) The *Pseudomonas syringae* effector HopF2 suppresses Arabidopsis immunity by targeting BAK1. *The Plant Journal* 77(2):235-245.