

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AOS ESTRESSES OSMÓTICO E IÔNICO EM *Gluconacetobacter* *diazotrophicus* PAI 5.

José Paulo Mota Filho

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Mestrado em Biotecnologia e Biotecnologia

Campos dos Goytacazes, RJ

Janeiro, 2013

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AOS ESTRESSES OSMÓTICO E IÔNICO EM *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5.

José Paulo Mota Filho

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

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Mestrado em Biociências e Biotecnologia

Campos dos Goytacazes, RJ

Janeiro, 2013

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MECANISMOS DE TOLERÂNCIA
AOS ESTRESSES OSMÓTICO E IÔNICO EM *Gluconacetobacter
diazotrophicus* PAI 5.**

José Paulo Mota Filho

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

Aprovada em 22 de janeiro de 2013.

COMISSÃO EXAMINADORA:

José Roberto da Silva (*D. Sc.* Biociências e Biotecnologia) – UFRJ/NUPEM

Álvaro Fabrício Lopes Rios (*D. Sc.* Ciências Biológicas - Genética) - UENF/LBT

André de Oliveira Carvalho (*D. Sc.* Biociências e Biotecnologia) - UENF/LFBM

Gonçalo Apolinário de Souza Filho (*D. Sc.* Biociências e Biotecnologia) - UENF/LBT
(Orientador)

*Dedico esta dissertação à minha mãe,
Marilda, por todo amor e suporte que me
permitiram chegar até aqui, a minha irmã
Pâmela por torcer pelo meu sucesso e
especialmente, ao meu amado e saudoso
pai Paulo, que desde muito cedo me
dispertou o amor à ciência e sempre
acreditou em mim.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir chegar até aqui e não me deixar desistir nos momentos mais difíceis;

À minha querida mãe Marilda, por me amar incondicionalmente, compreender minhas ausências, aceitar minhas limitações e acreditar sempre no meu potencial;

Ao meu saudoso Pai, que foi meu maior incentivador e melhor amigo e me ensinou o valor na honestidade e do respeito;

À toda minha querida família por torcerem diariamente pelo meu sucesso;

À minha namorada Camille, por todo seu amor e paciência e por me incentivar constantemente. Obrigado por me ensinar a ser uma pessoa melhor;

Aos meus companheiros de laboratório, que tornaram essa jornada mais divertida. Obrigado pelos conselhos, pelos momentos agradáveis e pelo convívio harmonioso;

Aos professores da pós-graduação que contribuíram para meu aprendizado e meu crescimento profissional;

À Nathália, que além de companheira de bancada tornou-se minha amiga. Obrigado por toda sua ajuda indispensável e amizade;

À doutora Aline, pela revisão desta dissertação. Obrigado pelo altruísmo e por todo incentivo no momento mais necessário;

Ao professor Gonçalo, pela oportunidade e pelos desafios

Aos professores, técnicos e colegas do Laboratório de Biotecnologia;

À CAPES pelo apoio financeiro;

À UENF e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia pela oportunidade de realização do Mestrado.

SUMÁRIO

1- Introdução.....	1
2- Revisão Bibliográfica	3
2.1- Estresse osmótico em procariotos	3
2.2- Mecanismos de tolerância a estresse osmótico em procariotos.....	4
2.3- Transporte e acúmulo de K ⁺	5
2.4- Transporte e síntese de osmoprotetores.....	7
2.5- Papel da salinidade na indução do estresse osmótico e seus efeitos.....	8
2.6- Dano oxidativo induzido por estresses e os mecanismos celulares de defesa.....	9
2.7- Pirroquinolina-quinona e suas funções nos sistemas biológicos.....	13
2.8- <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	15
2.9- Estresse osmótico em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	17
3- Objetivo	20
3.1- Objetivos específicos	20
4- Material e métodos.....	21
4.1- Microorganismo.....	21
4.2- Coleção de microrganismos utilizados.....	21
4.3- Meios de cultivo e solutos	21
4.4- Seleção dos mutantes por ensaios de estresse osmótico e iônico	22
4.5- Análise do número de inserções do transposon tn5 no genoma dos mutantes selecionados por “Southern blot”.....	23
4.5.1 - Extração de DNA genômico.....	23
4.5.2- Hibridização DNA/DNA para verificação do número de inserções do transposon.....	24
4.6- Identificação das sequências interrompidas nos mutantes de única inserção.....	24
4.6.1- Caracterização funcional dos genes identificados através de análise <i>in silico</i>	25
4.7- Microscopia de fluorescência para detecção de ERO.....	26
4.8- Avaliação comparativa da fixação biológica do nitrogênio nos mutantes selecionados.....	26
5- Resultados	27
5.1- Seleção de mutantes com elevada sensibilidade ao estresse osmótico e iônico.....	27
5.2- Os mutantes selecionados possuem uma única inserção do transposon .	28

5.3- Identificação dos genes mutados <i>pqq</i> e <i>acr</i>	29
5.4- As proteínas mutadas são conservadas em bactérias Gram-negativas ...	31
5.4.1- PqqB	31
5.4.2- PqqC	34
5.4.3- PqqE	35
5.4.4- AcrA	37
5.5- A sensibilidade dos mutantes <i>pqq</i> e <i>acr</i> aos agentes estressantes em meio sólido.....	39
5.6- Na ₂ SO ₄ induz a produção de ERO em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5.....	41
5.7- PEG-400 induz produção de ERO em Δ <i>acrA</i>	44
5.8- Mutações nos genes <i>pqq</i> inibem a fixação biológica de nitrogênio.....	45
6- Discussão.....	47
6.1- O papel da molécula PQQ	48
6.2- Papel de AcrA na resistência ao estresse oxidativo.....	50
7- Conclusões	53
8- Referências Bibliográficas.....	54
9- Anexo	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de danos gerados por espécies reativas de oxigênio.....	12
Figura 2: Estrutura química da pirroloquinolina-quinona (PQQ).....	14
Figura 3: Representação gráfica do agrupamento dos 80 mutantes selecionados cuja inibição do crescimento na presença de agentes estressantes foi acima de 80%.....	27
Figura 4: Taxa de inibição de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5 selvagem (WT) e mutantes (GDP12F06, GDP01F02, GDP13G12, GDP04A11, GDP12E03 e GDP28B08 respectivamente) cultivados na presença de NaCl (100mM), sacarose (600mM), Na ₂ SO ₄ (250mM) e PEG-400 (300mM).	28
Figura 5: “Southern Blotting” dos mutantes selecionados.....	29
Figura 6: Extração e digestão do DNA genômico dos mutantes.....	30
Figura 7: Organização genômica dos genes interrompidos em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5.....	31
Figura 8: Alinhamento da proteína PqqB em diferentes bactérias Gram-negativas.....	32
Figura 9: Sequências de aminoácidos de PqqB em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5.....	33
Figura 10: Representação esquemática de PqqB em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5.....	33
Figura 11: Alinhamento da proteína PqqC em diferentes bactérias Gram-negativas.....	34
Figura 12: Representação esquemática de PqqC em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5.....	35
Figura 13: Alinhamento da proteína PqqE em diferentes bactérias Gram-negativas.....	36
Figura 14: Sequências de aminoácidos da proteína PqqE de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5.....	37
Figura 15: Esquema indicando a posição do domínio Radical SAM na proteína PqqE de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5.....	37
Figura 16: Alinhamento da proteína AcrA em diferentes bactérias Gram-negativas.....	38
Figura 17: Sequências de aminoácidos da proteína AcrA de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5.....	39
Figura 18: Teste de sensibilidade em meio LGIm sólido com diferentes concentrações de agentes estressantes.....	40

Figura 19: Microscopia do ensaio de estresse osmótico e salino em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5 selvagem.. ..	43
Figura 20: Microscopia do ensaio de estresse oxidativo em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5 selvagem e $\Delta acrA$	44
Figura 21: Teste de fixação biológica do nitrogênio.. ..	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies reativas de oxigênio de envolvidas em estresse oxidativo	10
Tabela 2: Composição do meio LGl.	22
Tabela 3: Composição do meio LB Miller.	22
Tabela 3: Mutantes selecionados quanto à sensibilidade a estresse osmótico.	30

LISTA DE ABREVIATURAS

ERO	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
GPx	Glutathione peroxidase
PEG	Polietileno glicol
EPS	Exopolissarídeos
LPS	Lipolissacarídeos
PQQ	Pirroloquinolina quinona
UV	Ultravioleta
NCBI	National Center for Biotechnology Information
FBN	Fixação Biológica do Nitrogênio

RESUMO

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria endofítica fixadora de nitrogênio, encontrada em plantas de cana-de-açúcar, café, arroz, batata-doce, dentre outras espécies vegetais. Tal bactéria possui uma destacável capacidade de sobrevivência em elevadas concentrações de sacarose, que podem chegar a 30% em meio líquido, o que indica indiretamente uma alta tolerância ao estresse osmótico. Neste sentido, o presente trabalho teve o objetivo de caracterizar novos mecanismos moleculares envolvidos na tolerância aos estresses osmótico e iônico em *G. diazotrophicus* PAL 5. Análises de crescimento em um conjunto de 138 mutantes na presença de altas concentrações dos agentes estressantes: NaCl (100 mM), Na₂SO₄ (250 mM) PEG-400 (300 mM) e sacarose (600 mM), permitiram selecionar 4 mutantes defectivos para o crescimento na presença de PEG e Na₂SO₄. O gene interrompido nestes mutantes foi identificado, revelando que todos pertencem à via de biossíntese e transporte de pirroloquinolina quinona (*pqqB*, *pqqC*, *pqqE*). Adicionalmente, dois mutantes que se mostraram sensíveis apenas a PEG foram selecionados para análise. A caracterização molecular de cada mutante revelou que ambos foram afetados no gene *acrA*, componente do transportador de membrana AcrAB. Juntos, estes dados revelaram que vias específicas de resistência são ativadas pelos diferentes estresses testados. Em seguida, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em *G. diazotrophicus* exposta aos quatro estresses foi analisada. Os ensaios revelaram forte produção de ERO na presença de Na₂SO₄. Interessantemente, na presença de 100mM de PEG, ocorre indução de ERO no mutante *acrA*⁻, enquanto a cepa selvagem não é afetada. Adicionalmente, análises *in silico* revelaram a presença de prováveis sítios de fosforilação nas proteínas Pqq e AcrA, indicando que estas proteínas também podem participar da sinalização celular ativada pelos estressores. Este é o primeiro estudo que revela o papel do transportador AcrAB na resistência a PEG-400 em bactérias e caracteriza o envolvimento dos genes *pqq* na resistência a estresses em *G. diazotrophicus*.

Palavras-chave: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; osmotolerância; estresse oxidativo; mutagênese insercional, PQQ, AcrAB.

ABSTRACT

Gluconacetobacter diazotrophicus is an endophytic nitrogen-fixing bacterium, found in plants of sugar cane, coffee, rice, sweet potato, among other plant species. This bacterium has a highlightable survival capability at high concentrations of sucrose, which can reach 30% in liquid medium, which indirectly indicates a high tolerance to osmotic stress. In this sense, the present study aimed to characterize new molecular mechanisms involved in tolerance to osmotic and ionic stress in *G. diazotrophicus* PAL 5. Analysis of growth in a range of 138 mutants in the presence of high concentrations of stressors: NaCl (100 mM), Na₂SO₄ (250 mM) PEG-400 (300 mM) and sucrose (600 mM), allowed to select four mutants defective for growth in the presence of PEG and Na₂SO₄. The disrupted genes were identified in these mutants, showing that they all belong to the biosynthesis and transport pathways of pyrroloquinoline quinone (*pqqB*, *pqqC*, *pqqE*). In addition, two mutants sensitive only to PEG were selected for analysis. Molecular characterization of each mutant revealed that both were affected in *acrA* gene, a component of membrane transporter *acrAB*. Together, these data revealed that specific resistance pathways are activated by different stresses tested. Thereafter, the production of reactive oxygen species (ROS) in *G. diazotrophicus* exposed to the four stresses was analyzed. The tests revealed a strong production of ROS in the presence of Na₂SO₄. Interestingly, in the presence of 100 mM PEG, induction of ROS occurs in the mutant *acrA*⁻ while the wild type is unaffected. Additionally, *in silico* analysis revealed the presence of probable sites of protein phosphorylation in the Pqq and AcrA, indicating that these proteins may also participate in cell signaling activated by stressors. This is the first study revealing the role of the transporter *AcrAB* in PEG-400 resistance in bacteria and characterizes the involvement of the *pqq* genes in the resistance to stresses by *G. diazotrophicus*.

Keywords: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; osmotolerance; oxidative stress; Insertional mutagenesis, PQQ, *AcrAB*.

1- Introdução

Os estresses salino e osmótico estão constantemente no ambiente atuando como fatores limitantes ao crescimento de diversos organismos vivos, inclusive bactérias. Diversos mecanismos moleculares têm sido desenvolvidos ao longo do processo evolutivo para contrapor os efeitos negativos do desbalanceamento iônico e das pressões osmóticas entre os ambientes intra e extracelulares. A salinidade gera simultaneamente os estresses iônico e osmótico, alterando o balanço iônico, o pH citoplasmático, e a atividade de diversas enzimas por indisponibilizar a água livre do ambiente.

Além disto, a salinidade e o estresse osmótico geram alterações nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), que se acumulam no interior das células podendo causar toxicidade e provocar morte celular. As ERO são formas reduzidas de oxigênio molecular altamente reativas, que incluem o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\bullet OH$) e oxigênio singlete (1O_2). Elas estão presente no interior das células como subprodutos normais do metabolismo aeróbico.

As bactérias controlam as ERO produzidas pelo metabolismo basal através de sistemas antioxidantes, compostos por substâncias hidrofílicas como carotenóides e glutathiona, e enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx).

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria promotora do crescimento vegetal, que possui como principal característica a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. Durante este processo ocorre à indução da expressão de genes envolvidos com a produção de enzimas antioxidantes para prevenir a inibição da atividade da enzima nitrogenase causada por ERO.

Dada a importância da fixação biológica do nitrogênio em *G. diazotrophicus*, diante de um acúmulo excessivo de ERO gerado por estresses ambientais, camadas adicionais de proteção, compostas por moléculas antioxidantes mais potentes e sistemas de efluxo eficientes podem ser necessárias. Deste modo, este estudo teve como objetivo caracterizar novos mecanismos envolvidos com a tolerância ao estresse osmótico e iônico em *G. diazotrophicus* PAI 5.

Um conjunto de 138 mutantes defectivos para os estresses iônico e osmótico previamente isolados pela seleção de uma biblioteca composta por 2227 mutantes foi analisado na presença de altas concentrações dos agentes estressantes: NaCl, Na₂SO₄, PEG-400 e sacarose. Tais mutantes foram testados quanto aos níveis de sensibilidade a estes agentes estressantes através da análise do crescimento em meio líquido e sólido. Visando a caracterização das vias afetadas nos mutantes mais relevantes, os genes interrompidos foram clonados e seqüenciados. Foram realizados testes de fixação biológica do nitrogênio nos mutantes selecionados. A produção de ERO em *G. diazotrophicus* PAI 5 provocada pelos agentes estressantes foi analisada através de microscopia de fluorescência. Adicionalmente, as características de tais vias envolvidas na tolerância aos estresses foram estudadas através de análises de seqüências por bioinformática.

2- Revisão Bibliográfica

2.1- Estresse osmótico em procariotos

Membranas bacterianas possuem alta permeabilidade a água e permitem esta passagem por meio de diversas rotas, como o transporte via lipídio, onde a água escapa do efeito hidrofóbico da bicamada lipídica, o transporte via aquaporinas que possibilita a passagem de água mesmo contra um gradiente osmótico, e ainda há o transporte de água via co-transportadores e uniporteres, os quais geralmente são estão associados com outras funções. Ainda que sejam prontamente permeáveis a água, as membranas representam uma barreira efetiva para a maioria dos solutos. Portanto, quando a atividade de água (A_w) do ambiente extracelular sofre mudança por aumento ou diminuição nas concentrações de solutos impermeáveis a membrana, a água se move para dentro ou para fora das células, respectivamente (CSONKA e HANSON, 1991; ZEUTHEN, 2010).

O movimento da água pela célula resulta em alterações no volume celular e pressão de turgor. Uma diminuição na atividade de água no meio extracelular (condições hiperosmóticas) leva a um rápido efluxo de água da célula e perda do turgor. Em casos extremos, pode ocorrer plasmólise, que corresponde à retração da membrana plasmática, de modo que esta se separe da parede celular. No caso de um choque hipo-osmótico, ocorre forte influxo de água, causando aumento do volume do citosol e da pressão de turgor, que é exercida contra a membrana citoplasmática gerando aumento do envelope celular, necessário para o crescimento e divisão da célula. No entanto, em casos extremos, a situação hipo-osmótica do meio pode levar ao rompimento da membrana plasmática (POOLMAN E GLAASKER, 1998; MORBACH e KRÄMER, 2003; PITTELKOW, 2011). Estudos demonstram que os estresses hídrico e osmótico em bactérias aeróbicas também resultam na formação de ERO e subsequente dano a proteínas, membranas e DNA (SHIRKEY et al., 2000; FRANÇA et al., 2007).

2.2- Mecanismos de tolerância a estresse osmótico em procariontos.

Quando ocorre aumento ou decréscimo da pressão osmótica extracelular, o fluxo de água resulta na concentração ou diluição os solutos no citosol, alterando a função e estrutura celular. As células respondem ajustando ativamente o transporte seletivo de solutos através da membrana celular, a biossíntese de novos compostos, bem como o controle do fluxo de água. Em bactérias, estes solutos incluem K^+ e um grande espectro de osmólitos orgânicos que também são estabilizadores de proteínas (geralmente açúcares e polióis, tais como: trealose, glicerol, di-mio-inositol-1-1'-fosfato, manitol e sorbitol), aminoácidos como prolina, glutamato e glutamina e derivados de aminoácidos como glicina-betaína, ectoína e carnitina (WOOD, 2006; SAUM e MÜLLER, 2008; BURG e FERRARIS, 2008; ITURRIAGA et al., 2009; PASTOR et al., 2010).

O acúmulo de solutos em resposta a uma mudança na osmolaridade obedece a uma hierarquia. Tanto as bactérias Gram-negativas quanto as Gram-positivas preferem solutos orgânicos zwitteriônicos como ectoína e glicina-betaína em relação a solutos inorgânicos como o K^+ . Provavelmente, isto se deve ao desbalanceamento que este íon pode causar no equilíbrio iônico da célula (WOOD, 1999; POOLMAN et al., 2002; WOOD, 2011). Acredita-se que os compostos orgânicos são mais compatíveis com as funções celulares. Deste modo, estas respostas osmorregulatórias contrapõem o fluxo de água, mitigando suas consequências (WOOD, 2006).

Compostos orgânicos que atuam como osmoprotetores são definidos como solutos compatíveis, porque podem ser acumulados em altos níveis, através de síntese *de novo*, sem interferir em processos celulares vitais. Muitos compostos compatíveis se mostraram estabilizadores efetivos de enzimas, dando proteção não somente em resposta a alta salinidade, mas também a altas temperaturas, congelamento ou seca (POOLMAN E GLAAKER, 1998; WEI et al., 2011). Contrapondo os efeitos benéficos, Singh e colaboradores (2011) destacam que estes osmólitos também possuem características de desestabilização de proteínas, dependendo da concentração e do solvente. Por exemplo, o bem caracterizado soluto compatível trealose desestabiliza algumas proteínas, quando em alta concentração ou elevado pH. Tais aspectos podem

modular muitos processos celulares, incluindo a regulação da homeostase protéica (proteostase), interações proteína-proteína e interações proteína-DNA.

Outro mecanismo utilizado por células osmoticamente estressadas é a modificação das membranas celulares. Isto se dá por alterações em suas estruturas de macromoléculas, incluindo a produção de longas cadeias de exopolissacarídeos (EPS) e lipopolissacarídeos (LPS) (VRIEZEN et al., 2007).

2.3- Transporte e acúmulo de K⁺

O K⁺ é o cátion em maior concentração no citosol de procariotos e eucariotos, onde desempenha diversas funções fisiológicas ajustando o potencial de membrana, atuando como molécula sinalizadora através da ativação ou indução de enzimas, regulando a pressão de turgor e o pH intracelular e sendo a molécula-chave de alguns sistemas de transporte que participam de mecanismos de osmoadação. Por K⁺ ser virtualmente impermeável a membrana celular, transportadores especializados estão envolvidos na assimilação deste íon. Bactérias podem acumular K⁺ através de diferentes sistemas de transporte, que diferem entre si no tipo de regulação, fonte de energia e cinética. O sinal para os transportadores pode ser íon-específico ou dependente de concentração (EPSTEIN, 2003; CAO et al., 2011).

Embora a maioria dos ambientes apresentem baixas concentrações de K⁺ (0,1-10mM), as bactérias podem manter uma alta concentração intracelular de K⁺, e para isso os sistemas de transporte são regulados de forma a não ocorrer um ciclo fútil de K⁺ através da membrana (MCLAGGAN et al., 1994; STUMPE et al., 1996; BALLAL et al., 2007). Os transportadores para efluxo de K⁺ em *E. coli* mais bem caracterizados são KefB e KefC (EPSTEIN, 2003). Enquanto os três principais transportadores para influxo de potássio são TrK, Kup e Kdp-ATPase (EPSTEIN, 2003; KITKO et al., 2010).

Os transportadores TrK e Kup são expressos constitutivamente e a atividade desses transportadores aparenta envolver simporte de H⁺, requerendo força próton-motriz para energizar o transporte sob condições anaeróbicas. Ambos são necessários para a manutenção dos níveis de K⁺ em condições fisiológicas. Em condições de pH baixo durante o estresse hiperosmótico, o transporte de K⁺ por Kup corresponde a redução na fração de

1:1 no efluxo de H^+ , sugerindo que para que ocorra influxo de K^+ seja necessária uma redução no efluxo de H^+ (ZAKHARYAN e TRCHOUNIAN, 2001; BALLAL et al., 2007; KITKO et al., 2010).

Sob condições aeróbicas o transporte de K^+ pelo sistema Trk é dependente de força próton-motriz e da ligação de ATP que tem uma função regulatória. Contudo, sob condições anaeróbicas, Trk pode formar um complexo com F_0F_1 ATP-síntase, o qual se propõe atuar como um K^+/H^+ antiporter dependente de ATP. (TRCHOUNIAN e KOBAYASHI, 1999; KITKO et al., 2010).

Cao e colaboradores (2011) revelaram a estrutura cristalina de TrkH de *Vibrio parahaemolyticus*. TrkH é um homodímero e cada monômero representa um canal de permeação de íons. Foi observado que TrkH é seletivo para K^+ e Rb^+ sobre íons menores como Na^+ ou Li^+ . Neste mesmo estudo foi revelado através de mutação sítio-dirigida que um resíduo de arginina (Arg 468) é responsável pelo controle do influxo de K^+ , foi observado que no mutante onde o resíduo Arg 468 foi substituído por um resíduo alanina ocorreu maior taxa de influxo de íons.

Quando ocorre uma forte limitação de íons K^+ ou choque osmótico, ocorre expressão do transportador de alta afinidade Kdp-ATPase. O transportador Kdp-ATPase de *E. coli* é o sistema Kdp mais amplamente caracterizado. Este sistema é composto por 4 sub-unidades protéicas: KdpF, KdpA, KdpB e KdpC. KdpF é importante para a estabilidade, KdpA liga e transporta K^+ , KdpB é similar a outras ATPases tipo P, contendo um sítio de fosforilação altamente conservado, e KdpC participa da montagem do complexo Kdp-ATPase (GASSEL et al., 1999; BALLAL et al., 2007).

Em 1992, Polarek e colaboradores mostraram que a regulação do operon *kdpFABC* que codifica o complexo KdpFABC é feita por duas proteínas regulatórias da família de sensores cinase: KdpD e KdpE. Zimmann e colaboradores (1995) realizaram um estudo sobre a topologia de membrana da proteína KdpD de *E. coli* e foi visto que sua estrutura consiste de um domínio citosólico N-terminal e um domínio citosólico C-terminal (domínio cinase) interconectado por quatro segmentos transmembranares. Nakashima e

colaboradores (1992) demonstraram que a proteína reguladora de resposta KdpE atua se ligando ao DNA, para regular a transcrição do operon *kdpFABC* (BALLAL et al., 2007).

2.4- Transporte e síntese de osmoprotetores

As células, quando se encontram em situação de desidratação, acumulam solutos, através de síntese ou de transporte de tais compostos para seu interior. O influxo de água atua restaurando a hidratação e o volume celular. As proteínas que respondem a desidratação, sintetizando ou transportando solutos, são bioquimicamente e geneticamente controladas (WOOD, 2006). Tais solutos atuam diretamente como osmoprotetores, como a glicina-betaína, ou podem servir como precursores, como ocorre com a colina, que é convertida em glicina-betaína logo após sua internalização. O acúmulo de compostos absorvidos do ambiente é geralmente favorecido, pois esse processo é muito mais econômico do ponto de vista energético que a síntese *de novo* (CHEN e BEATTIE, 2008).

A síntese *de novo* de transportadores adicionais e enzimas biossintéticas pode não ser suficientemente rápida para ser efetiva contra uma mudança repentina de osmolaridade no ambiente externo à célula. Deste modo, é comum encontrar sistemas de transporte de alta afinidade para solutos compatíveis que são controlados diretamente pelas condições osmóticas que permitem que esses microorganismos regulem rapidamente o nível intracelular destes compostos. Para acumular solutos compatíveis após o choque osmótico, as bactérias utilizam transportadores dependentes de ATP (transportadores ABC) ou de força íon-motriz (POOLMAN et al., 2002; EMPADINHAS e DA COSTA, 2008).

Outro importante composto osmoprotetor utilizado por microrganismos é a trealose. Tal açúcar é um dissacarídeo não-redutor formado por duas moléculas de glicose que é sintetizado por uma ampla variedade de organismos, de *Eubacteria* e *Archea* a fungos, plantas e invertebrados. Esta molécula protege numerosas estruturas biológicas contra variados tipos de estresses, incluindo dissecação, oxidação, calor, frio, desidratação e condições hiperosmóticas. Em organismos como *E. coli* e *Salmonella typhimurium*, a

trealose é acumulada via síntese *de novo* para sua utilização como soluto compatível. Tal síntese é ativada na ausência de solutos compatíveis no meio externo tais como glicina betaína e prolina (KEMPF E BREMER, 1998; ELBEIN et al., 2003; PEREIRA e HUNENBERGER, 2008; EMPADINHAS e DA COSTA, 2008).

Duas enzimas codificadas pelo operon *otsBA* determinam a síntese osmorregulatória de trealose. OtsA, a enzima trealose-6- fosfato sintase, catalisa a condensação enzimática dos precursores glicose-6-fosfato e UDP-glicose. Então trealose-6-fosfato é convertida em trealose livre pela ação da trealose-6-fosfato fostatase (OtsB) . Com o acúmulo de trealose, *E. coli* é capaz de suportar o estresse osmótico gerado por concentrações de até 0,5M de NaCl em um meio basal (STROM e KAASEN, 1993; KEMPF e BREMER, 1998; ITURRIAGA et al., 2009).

Em células de *E. coli*, quando não existem solutos compatíveis exógenos como, por exemplo, glicina-betaína e prolina, ocorre síntese de trealose em resposta ao estresse osmótico que leva ao acúmulo excessivo deste açúcar no citoplasma. O excedente produzido é excretado e convertido em glicose pela ação da trealase periplasmática (TreA), e a glicose formada pode ser consumida pela célula. A síntese de TreA é induzida por estresse osmótico mas não por trealose (STYRVOLD e STORM, 1991; BURG e FERRARIS; 2008).

2.5- Papel da salinidade na indução do estresse osmótico e seus efeitos

A salinidade é um tipo de estresse que está envolvido diretamente com a disponibilidade de água no ambiente. Os solutos iônicos contribuem simultaneamente para ambos os estresses iônico e osmótico, causando efeitos íon-específicos na fisiologia das células e, em casos de salinidade alta, afeta os processos biológicos por indisponibilizar a água livre do ambiente, gerando estresse osmótico, principal responsável pelo efeito tóxico sobre o crescimento microbiano (TRIPATHI et al., 1998; MORADI et al., 2011).

Duas estratégias são mais utilizadas para permitir aos microrganismos sobreviverem na presença de estresse osmótico inerente às elevadas concentrações salinas. A primeira é manter altas concentrações de sais no seu

interior, no mínimo equivalentes às concentrações exteriores. Para tanto, todos os sistemas intracelulares devem ser adaptados à presença de altas concentrações de sais no citoplasma. A segunda estratégia é a utilização de solutos-compatíveis orgânicos, que permitam que as células mantenham baixas concentrações de sais em seu citoplasma e, deste modo, não sejam necessárias adaptações nos sistemas intracelulares (OREN, 1999; MUSTAKHIMOV, 2010).

Diferentes cepas de *A. brasilense* apresentam níveis de tolerância a NaCl variados. Observa-se que em algumas linhagens a produção de EPS e agregados celulares é uma resposta fisiológica ao estresse salino mais consistente que a internalização e osmoproteção do soluto compatível glicina-betaína (CHOWDHURY et al. 2007).

A resposta ao estresse gerado por NaCl pode ser mais complexa. Estudos em *Sinorhizobium* apontam que alguns mutantes são incapazes de crescer em concentrações elevadas de NaCl. Há indícios que estas mutações ocorreram em genes potencialmente envolvidos no metabolismo central, como fatores de alongação, DNA ligases, chaperonas e proteínas de divisão celular. Estes achados demonstram que existe um nível adicional de complexidade na resposta ao estresse salino e osmótico ainda por ser caracterizada (VRIEZEN et al., 2007). Também tem sido demonstrado que o estresse salino causa estresse oxidativo nas células através da indução do acúmulo de ERO e que a proteção contra o dano oxidativo é um aspecto crucial na tolerância ao estresse salino e osmótico (PAN et al., 2009).

2.6- Dano oxidativo induzido por estresses e os mecanismos celulares de defesa.

O O₂ é utilizado tanto na produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria dos eucariotos, como na membrana celular de muitas bactérias, e outras diversas vias metabólicas. Em contrapartida, sua utilização gera substâncias tóxicas intra- e extracelulares, fato conhecido como “paradoxo do oxigênio”. Essas substâncias tóxicas são geradas durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, reações de auto-oxidação e pelo grupo heme de proteínas, e são chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são: o oxigênio singlete (¹O₂), o radical ânion

superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil ($\bullet OH$), o radical peridroxil ($O_2H\bullet$) e o ozônio (O_3) (SCANDALIOS, 2005; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Dentre as ERO, algumas são conhecidas como radicais livres, como por exemplo, o ânion superóxido e o radical hidroxil, enquanto outras são agentes oxidantes não radicalares, como o peróxido de hidrogênio e o ozônio. Em procariotos, essas ERO são formadas através da redução sequencial do oxigênio molecular catalisada por enzimas da cadeia respiratória associadas a membrana citoplasmática (CASH et al. 2007). Algumas destas moléculas reagem rapidamente apenas com algumas substâncias, como ocorre com o H_2O_2 , enquanto o radical $\bullet OH$, reage rapidamente com inúmeras moléculas. Na Tabela 1, são apresentadas algumas ERO e suas fontes conhecidas.

É importante ressaltar que ocorrem produção e ação das ERO mesmo em níveis fisiológicos no interior das células, como produtos do metabolismo basal. Por muito tempo, foi assumido que a produção de ERO gerava somente efeitos negativos no organismo. No presente, é sabido que estas moléculas assumem funções celulares essenciais. Por exemplo, algumas ERO participam de atividades biomoduladoras e regulatórias em processos de sinalização celular, através da modificação covalente de resíduos de cisteína específicos encontrados em proteínas alvo redox-sensitivas (ĎURAČKOVÁ, 2010; FINKEL, 2011).

Tabela 1: Espécies reativas de oxigênio envolvidas em estresse oxidativo e suas fontes

Nome	Fórmula	Fontes básicas
Oxigênio singleto	1O_2	Fotoinibição, Radiação ultra violeta (UV), Fotossistema II, reações de transferência de elétrons (cloroplastos)
Ânion superóxido	$O_2^{\bullet-}$	Reações de foto-oxidação, reação de Mehler nos cloroplastos, reações de transferência de elétrons em mitocôndrias, fotorrespiração glioxissomal, atividade peroxissomal, fixação biológica do nitrogênio, reações de O_3 e $OH\cdot$ no espaço apoplástico, defesa contra patógenos, oxidação de xenobióticos

Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Formado a partir de dismutação do $O_2^{\cdot -}$ pela enzima superóxido dismutase (SOD), fotorrespiração, beta-oxidação, decomposição próton-induzida de superóxido, defesa contra patógenos
Radical hidroxil	OH^{\cdot}	Decomposição de O_3 no espaço apoplástico, defesa contra patógenos, reações de H_2O_2 com $O_2^{\cdot -}$ (Haber-Weiss), reações de H_2O_2 com Fe^{2+} (Fenton)
Radical peridroxil	O_2H^{\cdot}	Formado pela protonação do $O_2^{\cdot -}$ através da reação de O_3 e OH^{\cdot} no espaço apoplástico
Ozônio	O_3	Radiação UV e descargas elétricas na estratosfera, reações envolvendo produtos de queima de combustíveis fósseis, radiação UV na troposfera

Fonte: SCANDALIOS, 2005

O estresse oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre a produção e a remoção de ERO em favor do balanço pró-oxidante. Este desequilíbrio pode ser desencadeado por estresses ambientais, que levam a produção excessiva de ERO, causando dano oxidativo progressivo, que pode ocasionar morte celular (POLJSAK e MILISAV, 2012; SHARMA et al., 2012). Os danos gerados por ERO a biomoléculas podem ser separados em três tipos principais: oxidação de proteínas, oxidação de DNA e peroxidação de lipídeos de membranas (Figura 1).

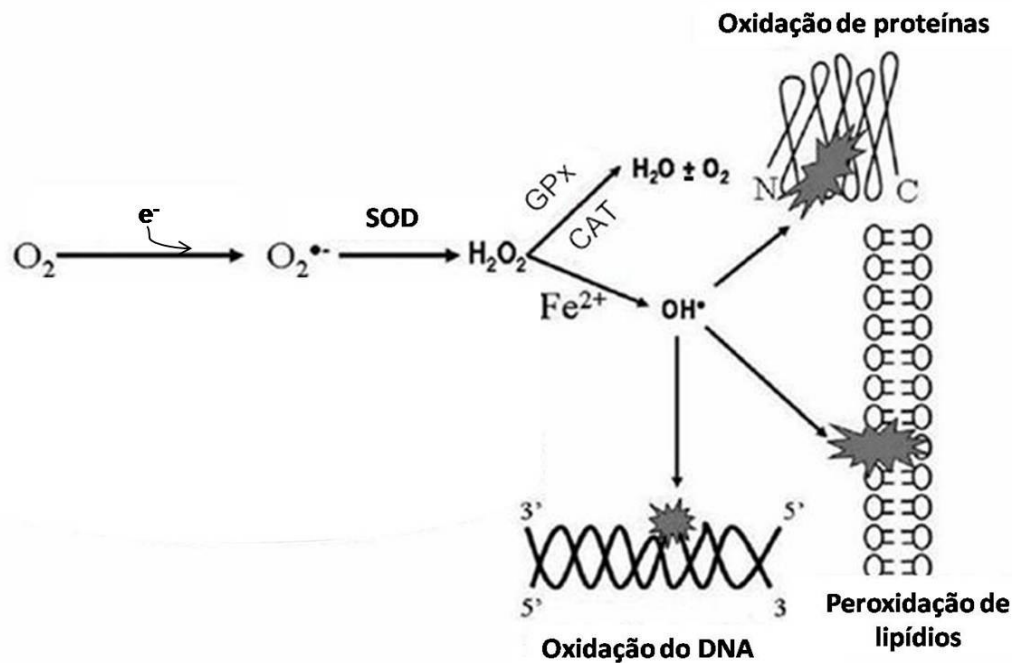


Figura 1: Representação esquemática de danos gerados por ERO à proteínas, DNA e lipídios. Quando estresses ambientais induzem a formação exacerbada de ERO, podem ocorrer danos a proteínas, lipídios e DNA se as defesas antioxidantes celulares não forem capazes de neutralizá-las. $\text{O}_2^{\bullet -}$ - Radical ânion superóxido; H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio; OH^{\bullet} – Radical hidroxil; Fe^{2+} – Íon ferroso; SOD – Enzima superóxido dismutase; GPx –enzima glutaciona peroxidase; CAT – catalase (Adaptado de RAMAKRISHNAN et al., 2007).

Devido ao “paradoxo do oxigênio”, a célula está munida de uma série de defesas mitigadoras dos efeitos prejudiciais das ERO. Tais defesas são conhecidas como defesas antioxidantes, e podem ser produzidas endogenamente ou adquiridas do ambiente. Estas defesas são resumidas em três formas principais de atuação: prevenção da formação de ERO, neutralização de ERO e mecanismos de reparo dos danos causados por ERO. Deste modo, o termo antioxidante define qualquer substância que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo (HALLIWELL et al., 2007).

As defesas antioxidantes possuem componentes enzimáticos e não-enzimáticos, que contribuem para a manutenção da homeostase redox intracelular. Dentre esses, alguns possuem alto peso molecular como as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutaciona peroxidase. Outros antioxidantes de alto peso molecular, porém não-enzimáticos são as proteínas albumina, transferrina e metalotioneínas. Antioxidantes não-enzimáticos de

baixo peso molecular compreendem compostos hidrofílicos e lipofílicos, como ácido úrico, ácido lipóico, glutatona e ubiquinol, que podem ser sintetizados por humanos. Algumas plantas e bactérias também podem sintetizar antioxidantes não-enzimáticos como vitamina C, vitamina E, carotenóides, flavonóides e pirroloquinolina-quinona (PQQ) (RAJPUROHIT e MISRA, 2010; ĎURAČKOVÁ, 2010; ROEHRS et al., 2011).

Em *G. diazotrophicus*, um exemplo destas defesas contra os efeitos das ERO geradas pelo metabolismo aeróbico é a indução da expressão de genes envolvidos com a produção de enzimas antioxidantes durante a fixação biológica do nitrogênio. Acredita-se que estas vias antioxidantes são induzidas para prevenir a inibição da atividade da enzima nitrogenase causada por ERO (ALQUÉRES et al., 2010).

2.7- Pirroloquinolina-quinona e suas funções nos sistemas biológicos

A pirroloquinolina-quinona (PQQ) foi descoberta a cerca de três décadas em bactérias metilotróficas atuando como cofator da enzima metanol desidrogenase (SALISBURY et al., 1979; WESTERLING et al., 1979), mas sua origem pode ser tão antiga quanto o próprio universo, pois surpreendentemente, esta molécula foi encontrada em grãos de poeira interestelar (KRUEGER et al. 2004). A estrutura química de PQQ é apresentada na Figura 2.

Em bactérias, PQQ interage com diferentes enzimas, incluindo, metanol desidrogenases, glicose desidrogenases, álcool desidrogenases e aldeído desidrogenases, e estas proteínas que interagem com PQQ são classificadas como quinoproteínas (XIONG et al., 2011; MISRA et al., 2012).

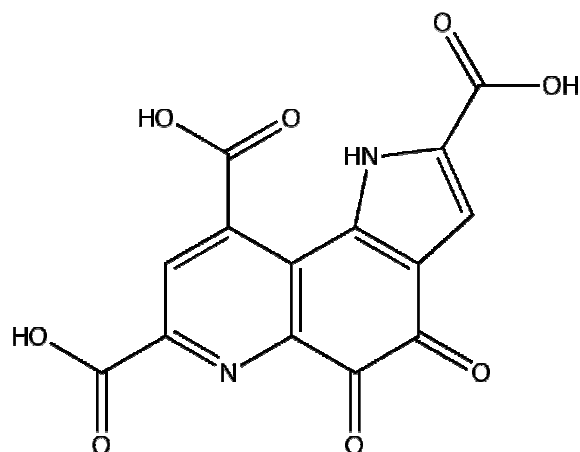


Figura 2: Estrutura química da pirroloquinolina-quinona (PQQ).

Ainda que a maioria das quinoproteínas sejam desidrogenases bacterianas, um grande número de outras enzimas tem sido relatado como dependentes de PQQ como cofator. Dentre as mais importantes estão as amina oxidases e desidrogenases (MCINTIRE, 1994), serina/treonina quinases de *E. coli* (KHAIRNAR et al., 2007) e *Deinococcus radiodurans* (RAJPUROHIT e MISRA, 2010) e 2-aminoadipico,6-semialdéido desidrogenase, uma proteína envolvida em adenocarcinoma em humanos que contém seis sítios de ligação para PQQ (WANG et al. 2005).

Diversas pesquisas tem mostrado que PQQ desempenha importantes papéis no crescimento e desenvolvimento de todos os organismos testados, porém a síntese de PQQ em organismos superiores ainda não foi relatada (MISRA et al., 2012). Kasahara e Karo (2003) propuseram que PQQ seja um membro do grupo de vitaminas do complexo B, porém esta classificação tem sido questionada (RUCKER et al, 2005).

Além da atuação como cofator, a participação de PQQ na resistência a estresses ambientais tem sido relatada. Foi demonstrado que PQQ estimula a tolerância ao estresse oxidativo em *E. coli* (KHAIRNAR et al., 2003) e mamíferos (HE et al., 2003). Condizantemente, foi observado que PQQ produz adutos quimicamente inertes com ERO *in vitro* (MISRA et al, 2004).

Adicionalmente, pesquisas realizadas com a bactéria gram-positiva *Deinococcus radiodurans* demonstraram que PQQ é um fator crucial na resistência aos efeitos da radiação UV e γ , e que esta resistência é dada pela

proteção contra ERO gerada diretamente pela molécula PQQ e pela ação de enzimas de reparo de quebra de DNA reguladas por PQQ (KHAIRNAR et al., 2007; RAJPUROHIT et al., 2008; RAJPUROHIT e MISRA, 2010) .

Estudos com mutantes defectivos de *Pseudomonas fluorescens* não produtores de PQQ, revelaram que esta molécula é um potente promotor do crescimento vegetal, e que esta característica não é dada pela solubilização de fosfato, mas provavelmente, pela atuação de PQQ como um antioxidante, sequestrando ERO (CHOI et al. 2008). Outro estudo mostrou que PQQ tem papel fundamental na indução da resistência sistêmica em plantas de tabaco estimulada pela bactéria *Enterobacter intermedium* contra a bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora*. Neste mesmo estudo, foi observado que mutantes de *E. intermedium* defectivos para a produção de PQQ perderam a capacidade de inibir o crescimento do fungo patogênico de arroz *Magnaporthe grisea* (HAN et al. 2008). Xiong e colaboradores (2011) observaram que a administração oral de PQQ em camundongos protege estes animais dos efeitos nocivos da radiação γ e prolonga a vida dos animais irradiados.

A função de PQQ como molécula moduladora da sinalização celular tem sido relatada. Em *Deinococcus radiodurans*, mutantes defectivos para o gene *pqqE* altamente sensível a radiação γ , radiação UV e estresse oxidativo, apresentam níveis reduzidos de fosforilação em relação a cepa selvagem de uma proteína quinase envolvida com mecanismo de reparo de DNA (RAJPUROHIT e MISRA, 2010).

Tem sido mostrado que PQQ inibe processos neurodegenerativos. PQQ bloqueia a formação de fibrilas amilóides e diminui a citotoxicidade de variantes da proteína alfa-sinucleína truncados na posição C-terminal. Esses variantes formam os amilóides que provocam danos em neurônios dopaminérgicos e levam ao estabelecimento da doença de Parkinson (KIM et al., 2010).

2.8- *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria Gram-negativa, endofítica e diazotrófica, que foi primeiramente isolada de raízes e colmos de variedades brasileiras de cana-de-açúcar (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988). Sua ocorrência na rizosfera é pouco detectada, devido a dificuldades de isolamento no solo e/ou a baixa sobrevivência da bactéria nesta condição

(SARAVANAN et al., 2007). *G. diazotrophicus* bactéria também foi isolada de várias outras espécies vegetais inclusive arroz e café, que possuem grande importância econômica (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997; ANITHA e THANGARAJU, 2010).

Devido ao comportamento endofítico, sugere-se que *G. diazotrophicus* possa fixar nitrogênio mais eficientemente que outros organismos diazotróficos, que permanecem somente na rizosfera (DÖBEREINER et al., 1993). Acredita-se que, nessa condição, a planta forneça fotossintetizados para a nutrição da bactéria. Somado a isso, a planta também oferece um microambiente pobre em oxigênio, que é uma condição necessária para a atividade da enzima nitrogenase bacteriana. Deste modo, a bactéria endofítica não compete com outros microrganismos por nutrientes como ocorre com bactérias rizosféricas (REINHOLD-HUREK e HUREK, 1998). Em contrapartida, a bactéria fixa nitrogênio atmosférico e produz compostos promotores do crescimento vegetal (FUENTES-RAMIREZ et al., 1993; ANITHA e THANGARAJU, 2010).

Estudos sobre os benefícios gerados por *G. diazotrophicus* sobre a produtividade de cana-de-açúcar revelaram que a inoculação em plantas micropropagadas com a cepa PAI 5 gerou um aumento do peso fresco da parte aérea de 28% (BALDANI e BALDANI, 2005). *G. diazotrophicus* também promove o crescimento de outras espécies economicamente como arroz (ANITHA e THANGARAJU, 2010) e tomate (LUNA et al., 2011). O aumento da biomassa de plantas ocasionado pela inoculação com *G. diazotrophicus* pode ser atribuído a diferentes aspectos apresentado pela bactéria, tais como: a fixação de nitrogênio, produção de fitormônios, solubilização de nutrientes minerais e supressão de patógenos pela produção de bacteriocinas (BLANCO et al. 2005; SARAVANAN et al., 2007). Este conjunto de características permite que *G. diazotrophicus* seja classificada como uma bactéria promotora do crescimento vegetal (SARAVANAN et al., 2008).

O crescimento ótimo de *G. diazotrophicus* é obtido em condições nutricionais semelhantes à composição do caldo de cana-de-açúcar, com concentrações de sacarose em torno de 10% e pH próximo a 5,5. Entretanto, glicose, frutose, galactose também podem ser usados como fontes de carbono (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988; STEPHAN et al., 1991). Outras fontes de carbono consumidas por *G. diazotrophicus* são gliconato, manitol,

arabinose, meso-inositol, i-inositol, sorbitol e glicerol. Além destes, os aminoácidos glutamato, serina, alanina e histidina podem ser utilizados como fonte de carbono e nitrogênio. Com exceção do ácido 2-cetoglicônico que é comumente presente em plantas de cana-de-açúcar, nenhum dos ácidos orgânicos mais comuns favorece o crescimento de *G. diazotrophicus* (MUTHUKUMARASAMY et al., 2002).

Análises fisiológicas e bioquímicas revelaram que *G. diazotrophicus* é capaz de crescer em altas concentrações de sacarose e baixos índices de pH, fixando nitrogênio em meios de cultura com até 30% de sacarose e pH em torno de 2,5 (STEPHAN et al., 1991). Esta capacidade de sobrevivência sob grandes concentrações de sacarose sugere uma alta tolerância ao estresse osmótico. Até o presente não é conhecido um sistema de internalização de sacarose em *G. diazotrophicus*, e o mecanismo proposto é o uso da enzima levansucrase (LsdA), que é secretada para o espaço periplasmático e catalisa a hidrólise da sacarose presente no ambiente (ARRIETA et al., 2004; VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2011). Os produtos gerados da hidrólise da sacarose, glicose e frutose, são consumidos como fonte de energia ou utilizados como fonte de carbono para produção de outros compostos (MUTHUKUMARASAMY et al., 2002; VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2011).

2.9- Estresse osmótico em *Gluconacetobacter diazotrophicus*

No interior dos tecidos de cana-de-açúcar, *G. diazotrophicus* tem como principal sítio de colonização o apoplasto, onde a concentração de sacarose varia em torno de 10%. Apesar de proporcionar o crescimento ótimo desta bactéria, tal condição gera uma elevada pressão osmótica, que é suficiente para inibir o crescimento de vários outros microrganismos (REIS e DOBEREINER, 1998).

G. diazotrophicus tem a capacidade de colonizar diversos tecidos de cana-de-açúcar, se estabelecendo nos espaços intercelulares, podendo entrar em contato direto com os osmoprotetores produzidos pela planta. Tal característica de ampla distribuição nos tecidos da planta sugere grande capacidade de osmo adaptação pela bactéria. Por exemplo, *G. diazotrophicus* se multiplica tanto no xilema, onde a concentração de sacarose é muito baixa,

quanto no apoplasto, onde a concentração deste açúcar é elevada (JAMES et al., 2001).

Em 2003, Tejera e colaboradores demonstraram que a atividade da nitrogenase de *G. diazotrophicus* é severamente afetada por concentrações de 150 e 200 mM de NaCl. Foi observado que as enzimas envolvidas no metabolismo do carbono, como glicose desidrogenase e enzimas do ciclo dos ácidos tricarbóxicos também foram inibidas nessas condições, limitando o crescimento bacteriano. Neste mesmo trabalho, foi observado ainda que a população bacteriana decaiu em 95% no primeiro dia de ensaio de desidratação por razão do choque osmótico. Porém, as bactérias que resistem se mantêm viáveis durante os 28 dias de ensaio subsequentes. Este resultado corrobora a ideia de que é necessário um tempo entre a percepção e as respostas de adaptação aos estresses ambientais (MITCHELL et al., 2009).

Muñoz-Rojas e Caballero-Melado (2001) apontam uma diminuição drástica na população de *G. diazotrophicus* nos tecidos internos com o aumento da idade da planta de cana-de-açúcar. Estes pesquisadores sugerem que o efeito no balanço osmótico gerado pelo aumento da concentração de sacarose e consequente diminuição da atividade de água no interior dos tecidos vegetais seja a causa de redução da população bacteriana.

Boniolo e colaboradores (2009) testaram o efeito de glicina betaína como osmoprotetor em *G. diazotrophicus*. Neste estudo foi visto que glicina betaína atenua os efeitos do estresse salino pela adição de NaCl. Os efeitos de concentrações de até 100 mM de NaCl sobre o crescimento da bactéria são revertidos pela adição de 20 mM de glicina betaína. No entanto, efeitos de concentrações maiores de NaCl causam mudanças drásticas no crescimento e morfologia das células bacterianas, que não puderam ser revertidas por glicina betaína.

Em estudo recente, utilizando mutantes defectivos em condições de estresse osmótico, Velázquez-Hernández e colaboradores (2011) demonstraram o papel da levansucrase (LsdA) na osmo adaptação de *G. diazotrophicus*. Foi revelado que o levan formado pela ação desta enzima atua como osmoprotetor e também é substrato para a formação de biofilme, que protege a bactéria do agente estressor.

Muitos aspectos da resistência de *G. diazotrophicus* aos estresses osmótico e iônico ainda não foram esclarecidos. Sabe-se que a levansucrase não protege esta bactéria contra os efeitos nocivos de PEG-400 (VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2011), porém ainda não foram relatados mecanismos moleculares envolvidos diretamente com a resistência contra este agente estressor.

3- Objetivo

Identificar novos mecanismos moleculares envolvidos na tolerância a estresse osmótico e iônico em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI5, através do estudo de um conjunto de mutantes de inserção previamente identificados.

3.1- Objetivos específicos

- Caracterizar os níveis de sensibilidade de 138 mutantes de *G. diazotrophicus* PAI 5 pela análise do padrão de crescimento em meio de cultivo líquido na presença dos agentes estressantes: PEG-400, sacarose, NaCl e Na₂SO₄;
- Selecionar aqueles mutantes que apresentem padrões específicos de sensibilidade aos agentes estressantes testados;
- Avaliar o número de inserções do transposon Tn5 no genoma dos mutantes selecionados por “Southern Blotting”;
- Identificar os genes mutados através do seqüenciamento das bordas do transposon;
- Caracterizar a função dos genes identificados pela análise “in silico” das seqüências protéicas codificadas;
- Avaliar a sensibilidade dos mutantes selecionados em meio sólido sob estresse com PEG-400, sacarose, NaCl e Na₂SO₄;
- Avaliar a produção de ERO em *G. diazotrophicus* PAI5 selvagem induzida pelos agentes estressantes.
- Avaliar a capacidade de fixação biológica de nitrogênio nos mutantes selecionados, utilizando ensaio de formação de película aerotóxica;

4- Material e métodos

4.1- Microorganismo

Foi utilizada a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* cepa PAI 5 cedida pelo professor Dr. Fábio Lopes Olivares do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual LBCT/CBB/UENF.

4.2- Coleção de microrganismos utilizados

Os mutantes de inserção utilizados neste trabalho foram provenientes da biblioteca de mutantes armazenada na UENF sob responsabilidade do professor Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho. Estes mutantes de *G. diazotrophicus* PAI 5 foram gerados utilizando o kit EZ-Tn5 <R6Kyori/KAN-2>Tnp Transposome (Epicentre, Madison, WI, USA), conforme descrito por Intorne e colaboradores (2009). A biblioteca de mutantes contendo 2227 bactérias foi submetida a triagem para seleção de mutantes sensíveis a estresse osmótico e iônico. Para realização da triagem voltada para estresse osmótico e iônico, os mutantes foram submetidos a cinco tratamentos: meio sólido LGlM sem adição de agentes estressantes e meio sólido LGlM contendo 600 mM de sacarose, 100 mM de NaCl ou 200 mM de Na₂SO₄. Após 6 dias de cultivo, o crescimento das colônias foi avaliado em comparação com a bactéria selvagem e foram selecionados 138 mutantes defectivos (de OLIVEIRA, 2012). No presente trabalho, estes 138 mutantes previamente selecionados foram avaliados quanto a tolerância aos estresses salino e osmótico como descrito a seguir.

4.3- Meios de cultivo e solutos

Foi utilizado o meio LGI (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988) modificado com 10mM (NH₄)₂SO₄ e 1% glicose, para todas as análises realizadas neste trabalho. O pH inicial dos meio foi ajustado para 5,5 com KOH. O meio modificado será mencionado como LGlM (Tabela 2). Para os ensaios de estresse osmótico e iônico, o meio foi preparado duas vezes concentrado para permitir a adição de diferentes solutos. As soluções estoques dos solutos utilizados também foram preparadas duas vezes concentradas. Os solutos utilizados foram NaCl (100mM), Na₂SO₄ (250mM), sacarose (600mM) e PEG

400 (300mM). O meio e os solutos foram esterilizados por meio de autoclavação.

Para o cultivo da bactéria *Escherichia coli*, foi utilizado o meio LB Miller (Tabela 2) (MILLER, 1972) e este cultivo foi realizado em estufa e/ou agitador orbital a 37°C. Nos cultivos em meio sólido foram adicionados 15 g/L de ágar bacteriológico. Canamicina 50 µg.mL⁻¹ foi utilizado quando necessário.

Tabela 2: Composição do meio LGIm.

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,002
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,001
K ₂ HPO ₄	0,02
KH ₂ PO ₄	0,06
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,02
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,0002
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,132
Glicose	10
Para meio sólido foi acrescentado	
Agar	15
Azul de bromotimol	5 mL

Modificado de Cavalcante e Döbereiner, 1988

Tabela 3: Composição do meio LB Miller.

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
Extrato de levedura	5
Triptona	10
NaCl	5
Para meio sólido foi acrescentado	
Ágar	1,5

Miller, 1972

4.4- Seleção dos mutantes por ensaios de estresse osmótico e iônico

Cinco por cento de células a partir de um estoque em glicerol de *G. diazotrophicus* PAI 5 selvagem e 138 mutantes foram inoculados em 400 µL de meio LGIm em placas de 96 poços. As culturas foram incubadas a 30°C sob

condições controladas, em agitador orbital com agitação de 200 rpm. Os inóculos foram cultivados até atingir DO 600 de 0,5 para utilização em ensaios posteriores.

Para os ensaios em meio líquido, 5% da cultura foi inoculada em meio LGM duas vezes concentrado e misturada com igual volume de solução estoque do soluto requerido. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços com 2 mL de volume/poço (“MEGA titer plate”). seladas com adesivo (“Adhesive Sealing Films for Microplates”- Simport, Beloeil QC, Canada) sob agitação constante (200 rpm, 30 °C). Foi utilizado 400 µL de volume de cultura por poço. Os resultados foram avaliados após 48 h de cultivo. 200 µL da cultura foram transferidos para placas transparentes de 96 poços de fundo reto e a absorbância foi mensurada em de microplacas (Synergy HT, BioTek Instruments, Winooski, VT) a 600 nm. Uma equação de regressão linear ($r^2=0,997$) foi aplicada para converter os valores obtidos em valores de espectrofotômetro de cubeta. Os dados obtidos para os mutantes foram comparados com o padrão de crescimento da bactéria selvagem nas mesmas condições para a visualização daqueles mutantes mais afetados pelos agentes estressantes. Seis mutantes que confirmaram o fenótipo afetado foram selecionados para análises de verificação do número de inserções do transposon, sequenciamento da região interrompida pelo inserto e ensaios de estresse em meio sólido e análises microscópicas.

Para a realização dos ensaios em meio sólido, a cultura foi transferida para placas de 96 poços com fundo em “U” e as células foram plaqueadas com o auxílio de um replicador de 96 pinos (Boeke, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) no meio sólido contendo diferentes concentrações de agentes estressantes. As placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 30 °C. Após 72h, os resultados foram registrados. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

4.5- Análise do número de inserções do transposon tn5 no genoma dos mutantes selecionados por “Southern blot”

4.5.1 - Extração de DNA genômico

Para extração de DNA genômico foi utilizado o reagente para extração *Plant DNAzol* (Invitrogen®). As bactérias foram cultivadas em meio líquido até

o final da fase exponencial e então submetidas a centrifugação. Aos sedimentos bacterianos obtidos foi acrescentado o reagente de extração e o protocolo seguiu de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a extração, as amostras obtidas foram quantificadas utilizando NanoDrop e avaliadas por eletroforese em gel de agarose (1 %) e TAE 1X (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

4.5.2- Hibridização DNA/DNA para verificação do número de inserções do transposon

O número de inserções do transposon em cada mutante selecionado foi verificado através de ensaio de “Southern Blotting”. Um micrograma do DNA extraído foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* (New England Biolabs) e submetido a eletroforese em gel de agarose e posterior transferência para membrana de nylon (HYBOND® N+, Pharmacia Biotech) para realização da hibridização (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). A sonda utilizada foi o fragmento de 2.001 pb relativo ao transposon “EZ-Tn5™ <R6K γ ori/KAN-2>”. O fragmento foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) e marcado utilizando o kit AlkPhos Direct Labelling Reagents (GE Healthcare, UK).

4.6- Identificação das sequências interrompidas nos mutantes de única inserção

Para identificação das sequências flanqueadoras ao sítio de inserção do transposon foi realizada digestão enzimática do DNA genômico de cada mutante com a enzima *EcoRI* e posterior auto-ligação dos fragmentos obtidos. O produto de tal ligação foi utilizado para a eletroporação em células competentes de *E. coli* TransforMax EC100D (*pir*) (Clontech, USA) seguindo as instruções do kit EZ-Tn5<R6K γ ori/KAN-2>Tnp Transposome. Em seguida, as células eletroporadas foram plaqueadas em meio LB sólido suplementado com canamicina (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A extração dos plasmídeos das colônias selecionadas foi feita por lise alcalina (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

A obtenção das sequências de nucleotídeos das regiões interrompidas pelo transposon foi realizada no sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems Inc., CA, USA) utilizando o kit Big Dye Terminator (Applied

Biosystems Inc., CA,USA) seguindo as instruções do fabricante. Para a reação de sequenciamento foram utilizados os iniciadores específicos KAN-2-FP-1 (5' - ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC - 3') e KAN-2-RP-1 (5' - CTACCCTGTGGAACACCTACATCT - 3') do kit EZ-Tn5<R6Kγori/KAN-2>Tnp Transposome.

4.6.1- Caracterização funcional dos genes identificados através de análise *in silico*

Posteriormente, foram feitas análises por alinhamento de sequências para identificação de homólogos e predição funcional através do programa BLAST do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). As sequências de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes estudados no presente trabalho foram utilizadas para a busca de sequências similares em outras espécies bacterianas através do uso da ferramenta ‘blastp’ nos bancos de dados GenBank-NCBI. Tais sequências foram alinhadas pela utilização da ferramenta “Create Alignment” do programa CLC Main Workbench 6.7 e para a detecção de motivos foi utilizada a ferramenta “motif search” do programa CLC Main Workbench 6.7.

Para os alinhamentos referentes às proteínas PqqB, PqqC e PqqE foram utilizadas sequências de proteínas homólogas das seguintes espécies: *Gluconacetobacter xylinus* NBRC 3288, *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769, *Acetobacter aceti* NBRC 14818, *Gluconobacter oxydans* 621H, *Chromohalobacter salexigens* DSM3043, *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC33913, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6, *Pelagibacterium halotolerans* B2, *Azospirillum lipoferum* 4B e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

Para o alinhamento referente à proteína AcrA foram utilizadas sequências homólogas encontradas nas bactérias *Escherichia coli* K12, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* pv. *typhimurium* LT2, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286, *Pantoea vagans* C9-1, *Pseudomonas stutzeri* ATCC 14405, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 642, *Gluconacetobacter xylinus* NBRC 3288, *Gluconacetobacter oboediens* 174Bp2, *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769, *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ZM4.

4.7- Microscopia de fluorescência para detecção de ERO

Para os ensaios de detecção da produção endógena de ERO, *G. diazotrophicus* PAI 5 selvagem foi cultivada em meio LGIm como controle e meio LGIm acrescido de Na₂SO₄ (250 mM), NaCl (100 mM), sacarose (600 mM), e Polietilenoglicol-400 (PEG-400) (300 mM). Para os ensaios com o mutante GDP12E03 (*acrA*), foi utilizado meio LGIm como controle e meio LGIm acrescido de PEG-400 (100 mM). Nestes ensaios, o cultivo destas bactérias foi realizado em placas de cultura de tecidos de fundo chato com 6 poços (TPP, Switzerland) e as culturas (2 mL) foram incubadas a 30°C durante 48h (selvagem) ou 24h (*acrA*), em agitador orbital (New Brunswick, USA) com agitação de 200 rpm. Após o tempo de cultivo as células foram tratadas com diclorofluoresceína diacetato (5mM), e permaneceram sob agitação durante 15 minutos no escuro. Após este período, estas células foram transferidas para lâminas e cobertas com lamínulas, e analisadas em um microscópio de fluorescência (Olympus BX60) utilizando filtros para detecção de fluoresceína (excitação, 450-490 nm; emissão, 500 nm). Os resultados obtidos representam um experimento em triplicata.

4.8- Avaliação comparativa da fixação biológica do nitrogênio nos mutantes selecionados

Para verificar possíveis alterações na fixação biológica de nitrogênio nos mutantes selecionados neste trabalho, *G. diazotrophicus* e os mutantes GDP12F06, GDP01F02, GDP13G12, GDP04A11, GDP12E03 e GDP28B08 foram cultivados em erlenmeyers de 250 mL contendo meio LGIm (30°C / 200 rpm) até atingir DO600 1. Em seguida, 100 µL desse cultivo foram adicionados no centro de frascos contendo cinco mililitros de meio LGIm sem nitrogênio semi-sólido (1,6 g/L ágar bacteriológico). Após 6 dias de cultivo em estufa microbiológica (30°C) a formação de película aerotóxica foi avaliada.

5- Resultados

5.1- Seleção de mutantes com elevada sensibilidade ao estresse osmótico e iônico

Para determinar quantitativamente os níveis de sensibilidade aos diferentes agentes indutores de estresse osmótico e iônico, foi realizado o cultivo em meio LGl_m líquido dos 138 mutantes de *G. diazotrophicus* PAI 5 na presença de NaCl, sacarose, Na₂SO₄ e PEG-400. Foram tomados os valores das densidades óticas, observando-se que os mutantes apresentavam diferentes padrões de crescimento e níveis de sensibilidade quando expostos aos agentes estressantes (Anexo 1). Oitenta mutantes apresentaram sensibilidade acima de 80% à no mínimo um dos agentes utilizados. Dentre estes 80 mutantes, 45 tiveram o crescimento prejudicado quando cultivados na presença de sacarose e somente seis por NaCl (Figura 3).

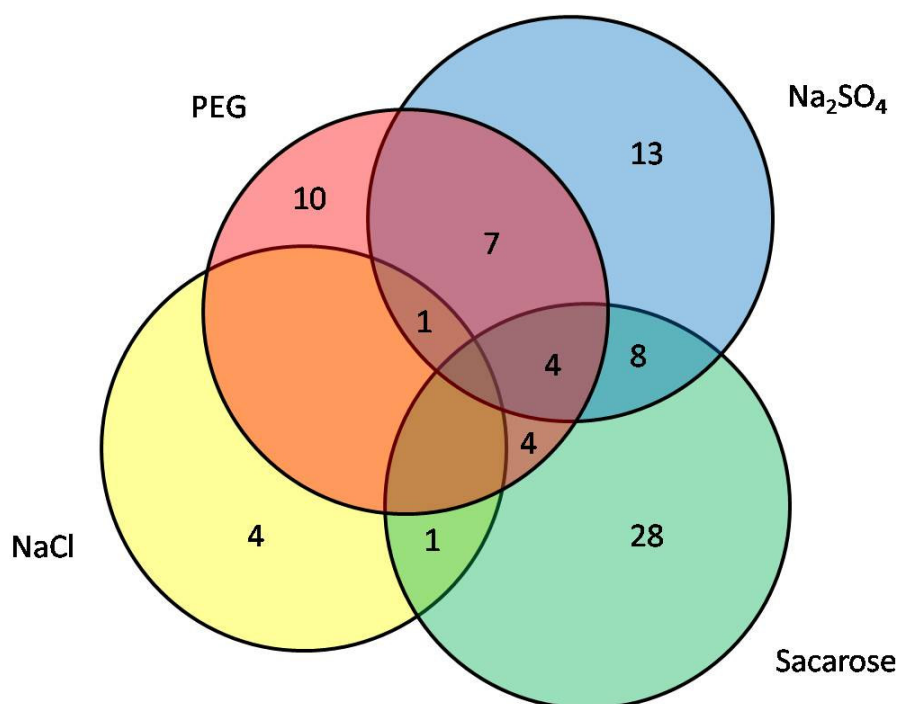


Figura 3: Representação gráfica do agrupamento dos 80 mutantes selecionados cuja inibição do crescimento na presença de agentes estressantes foi acima de 80%. O cultivo dos 138 mutantes de *G. diazotrophicus* PAI 5 foi realizado em meio LGl_m líquido na presença de NaCl (100 mM), sacarose (600 mM), Na₂SO₄ (250 mM) e PEG-400 (300 mM) durante 48h.

Em seguida, foram selecionados seis mutantes para análise. Dentre estes, quatro apresentaram padrão peculiar de resposta aos estresses, demonstrando forte inibição do crescimento (superior a 80%) na presença de PEG-400 e/ou Na₂SO₄, porém não sendo afetados por sacarose e NaCl (GDP12F06, GDP01F02, GDP13G12 e GDP04A11). Já GDP12E03 e GDP28B08 foram selecionados por apresentarem forte sensibilidade a PEG-400 (99% de inibição).

Um outro aspecto interessante a ser observado na figura 4, é o fato de que Na₂SO₄ favoreceu o crescimento da bactéria selvagem, resultando em maior concentração celular que aquela observada na ausência de estresse.

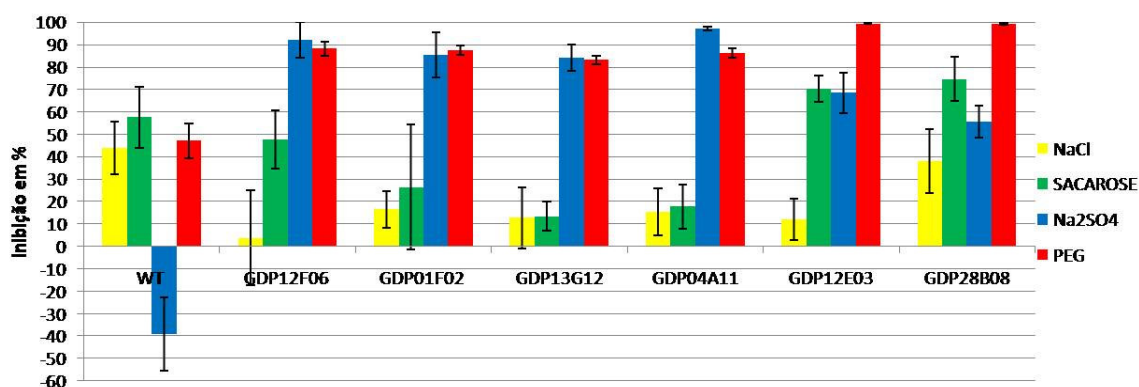


Figura 4: Taxa de inibição de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 selvagem (WT) e mutantes (GDP12F06, GDP01F02, GDP13G12, GDP04A11, GDP12E03 e GDP28B08 respectivamente) cultivados na presença de NaCl (100mM), sacarose (600mM), Na₂SO₄ (250mM) e PEG-400 (300mM).

5.2- Os mutantes selecionados possuem uma única inserção do transposon

A verificação do número de inserções do transposon no cromossomo dos seis mutantes selecionados foi realizada através de “Southern Blotting”, utilizando a seqüência do transposon como sonda (Figura 5). Os ensaios de hibridação permitiram verificar a presença de uma banda única para todos os seis mutantes. Quanto à bactéria selvagem não foi observada a presença de nenhuma banda após a hibridação como esperado (Figura 5).

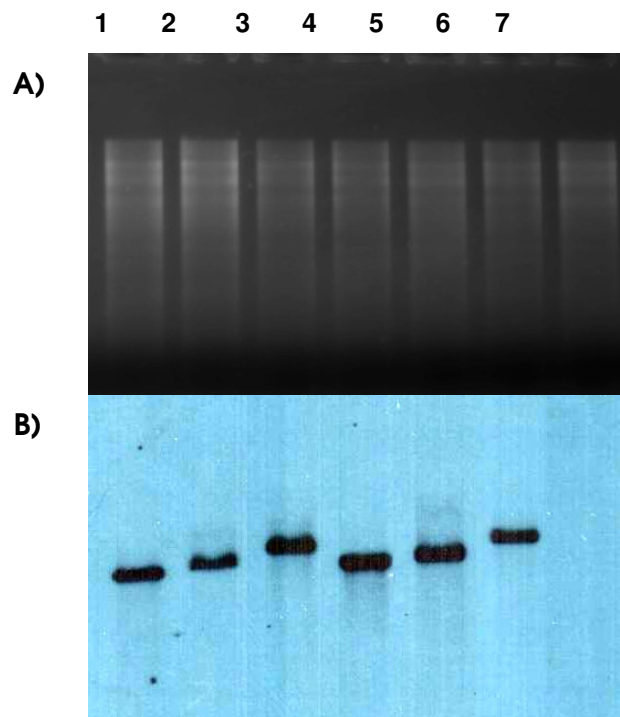


Figura 5: “Southern Blotting” dos mutantes selecionados. A) Gel de agarose 1% das digestões transferidas para a membrana usada na hibridação. B) O DNA genômico de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 selvagem e dos 6 mutantes selecionados foi isolado e digerido por EcoRI. O fragmento do transposon (2001 pb) marcado com fosfatase alcalina foi utilizado como sonda na hibridação 1 a 6: mutantes GDP01F02, GDP04A11, GDP12E03, GDP12F06, GDP13G12 e GDP28B08, respectivamente; 7: cepa selvagem.

5.3- Identificação dos genes mutados *pqq* e *acr*

Os DNAs genômicos dos mutantes selecionados foram extraídos e digeridos para subsequente identificação das regiões genômicas que flanqueam a inserção do transposon (Figura 6). O DNA digerido foi recuperado por auto-ligação e clonado em *E. coli* (pir-). Após a extração de DNA plasmidial foi feito o sequenciamento das regiões flanqueadoras e a identidade do gene interrompido em cada mutante foi revelada através de análise “in silico” (Tabela 4).

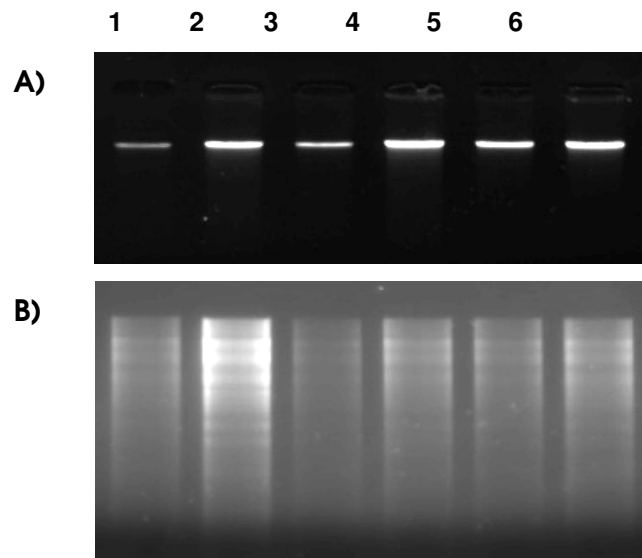


Figura 6: Extração e digestão do DNA genômico dos mutantes. A) Confirmação da extração do DNA genômico por eletroforese em gel de agarose 1% para os 6 mutantes selecionados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 com o reagente Plant DNAzol. B) Padrão eletroforético da digestão enzimática por EcoRI em gel de agarose 1%. 1 a 6: mutantes GDP01F02, GDP04A11, GDP12E03, GDP12F06, GDP13G12 e GDP28B08, respectivamente.

Tabela 4: Mutantes selecionados quanto à sensibilidade a estresse osmótico.

Mutantes	Sítios Alvos	A+T (%)	GeneID ^a	Gene	Proteína ^b
GDP12F06	CCCGGCGGG	0	5792150	<i>pqqB</i>	Pirroloquinolina-quinona sintase (putativa)
GDP01F02	CGCCCACCA	22,2	5792149	<i>pqqC</i>	Pirroloquinolina-quinona sintase (putativa)
GDP13G12	ACGCCACCC	22,2	5792149	<i>pqqC</i>	Pirroloquinolina-quinona sintase (putativa)
GDP04A11	GCGGACAGC	22,2	5792147	<i>pqqE</i>	Pirroloquinolina-quinona sintase (putativa)
GDP12E03	TTCTGGAAC	22,2	5792164	<i>acrA</i>	Proteína de resistência à acriflavina
GDP28B08	AACATGGAC	44,4	5792164	<i>acrA</i>	Proteína de resistência à acriflavina

^a: GeneID de acordo com a base de dados do NCBI. ^b: Anotação de acordo com a base de dados do NCBI

Pode-se observar que os sítios alvos do transposon foram diferentes entre os seis mutantes sequenciados, indicando um padrão aleatório de inserção no genoma de *G. diazotrophicus* PAI 5 (Tabela 4). Isto é confirmado pelo conteúdo A+T, que também variou entre os mutantes selecionados. Os quatro mutantes que apresentaram resultados de sensibilidade semelhantes para todos agentes estressantes foram identificados na mesma região genômica organizados lado-a-lado (*pqqB*, *pqqC* e *pqqE*) (Figura 7). Dentre

estes, dois mutantes (GDP01F02 e GDP13G12) possuem inserções em diferentes pontos do mesmo gene (*pqqC*). Os outros dois mutantes (GDP12E03 e GDP28B08) que apresentaram fenótipo similar durante os ensaios de estresse também foram interrompidos no mesmo gene (*acrA*) em pontos distintos (Tabela 4 e Figura 7). Este gene *acrA* encontra-se ao lado de outro gene *acr*, *acrB*. No entanto, este gene não foi encontrado entre os mutantes selecionados que foram sequenciados.

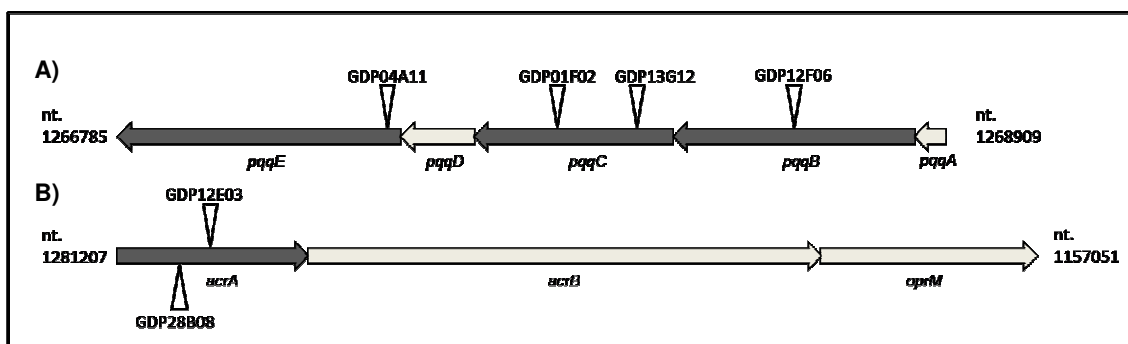


Figura 7: Organização genômica dos genes interrompidos em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. A) “Cluster” gênico flanqueando *pqqB*, *pqqC* e *pqqE*; B) “Cluster” gênico flanqueando *acrA*. As setas indicam o sentido da transcrição destes genes. nt: nucleotídeo; setas pretas: genes interrompidos neste estudo; setas cinzas claro: genes não interrompidos; triângulos de borda preta: posição relativa da inserção tn5. Adaptado da base de dados NCBI.

5.4- As proteínas mutadas são conservadas em bactérias Gram-negativas

5.4.1- PqqB

No alinhamento das sequências protéicas homólogas de PqqB fica evidenciada a maior conservação de aminoácidos nas regiões N-terminal e C-terminal, com exceção a PqqB de *M. magnetotaticum* MS-1, onde é inserido um “gap” na região N-terminal. O não pareamento na região central também é devido à inserção de “gaps”. Outra característica evidente ao longo de toda a proteína é a conservação de carga e principalmente hidrofobicidade dos aminoácidos. Quando não ocorre pareamento, aminoácidos carregados positivamente (R, K, H) são trocados entre eles nas diferentes espécies. O mesmo ocorre para os aminoácidos carregados negativamente (D, E), os de

cadeia lateral hidrofóbica alifática (L,I,V) e de cadeia lateral hidrofóbica aromática (F,W,Y) (Figura 8).

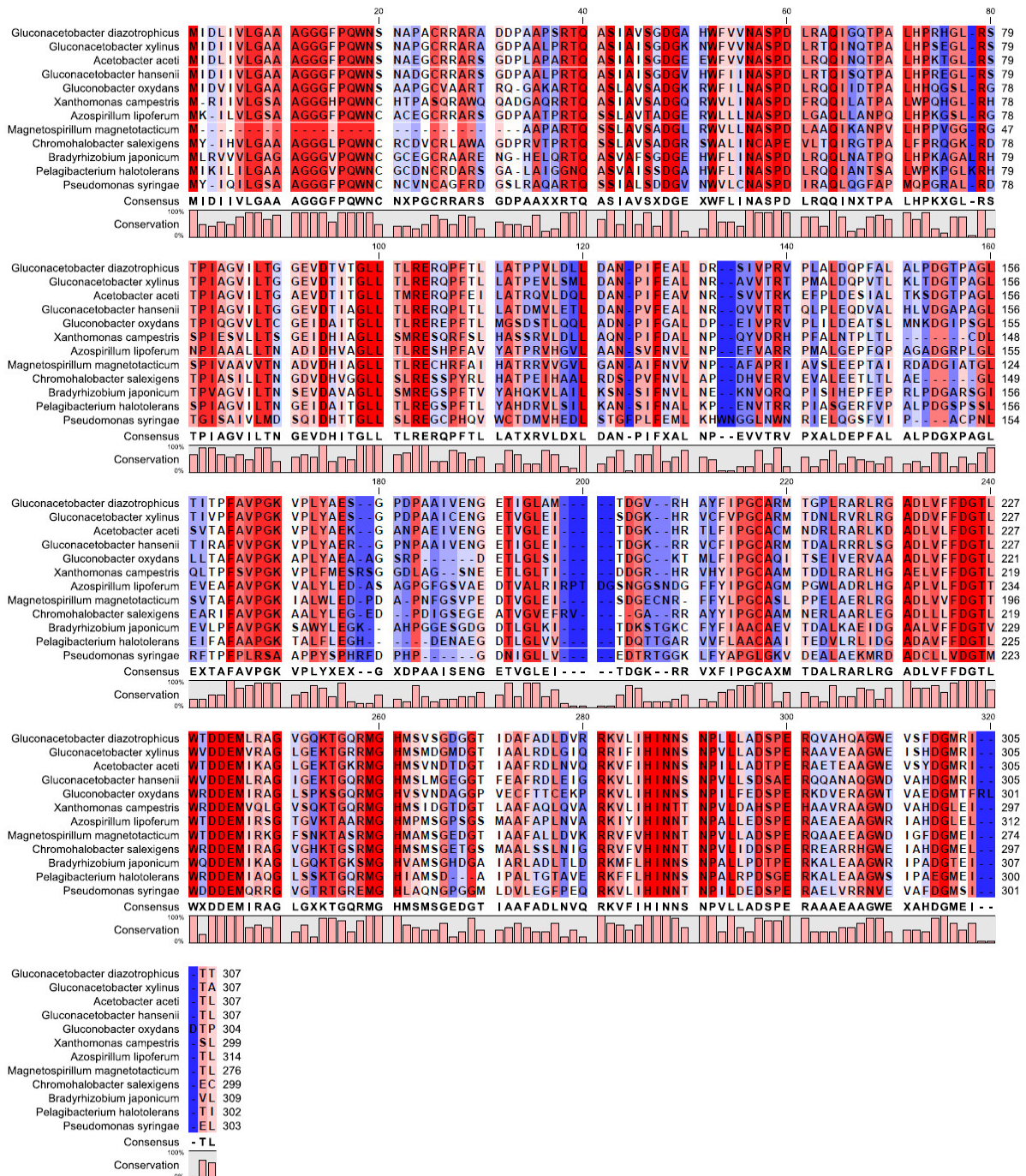


Figura 8: Alinhamento da proteína PqqB em diferentes bactérias Gram-negativas. Foi utilizada a ferramenta “Create Alignment” do programa CLC Main Workbench 6.7 com parâmetros padrões pré-determinados. A sequência em negrito, indicada nas linhas inferiores às comparações, representa uma sequência consenso das espécies. As barras mostram o nível de conservação de cada resíduo de aminoácido. Resíduos em fundo vermelho representam regiões mais conservadas da proteína e em azul, regiões menos conservadas. (-) Espaços foram introduzidos para melhorar o alinhamento.

Também foi realizada a predição de “motivos” na proteína PqqB. Foram encontrados dois “motivos” conservados em todas as sequências de proteínas utilizadas no alinhamento (Figura 9). Um “motivo” refere-se ao sítio alvo de fosforilação da proteína quinase C e o outro a um possível sítio de N-glicosilação. Adicionalmente, foi feita predição de domínios de PqqB apresentadas no banco de dados Pfam do “Wellcome Trust Sanger Institute”. Foi encontrado que o domínio metalo-beta-lactamase (PF00753) é comum a todos as proteínas analisadas. Este domínio se encontra na posição central de PqqB em *G. diazotrophicus* PAI 5 (Figura 10) e demais homólogos estudados (dados não mostrados).

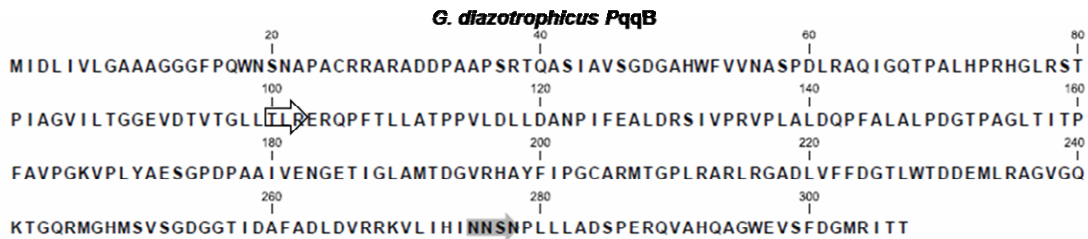


Figura 9: Sequências de aminoácidos de PqqB em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. Foi utilizado o programa CLC Main Workbench 6.7 com parâmetros padrões pré-determinados. Em destaque são mostrados os “motivos” referentes ao sítio alvo de fosforilação da proteína quinase C (seta não-preenchida) e ao sítio de N-glicosilação (seta cinza-claro).

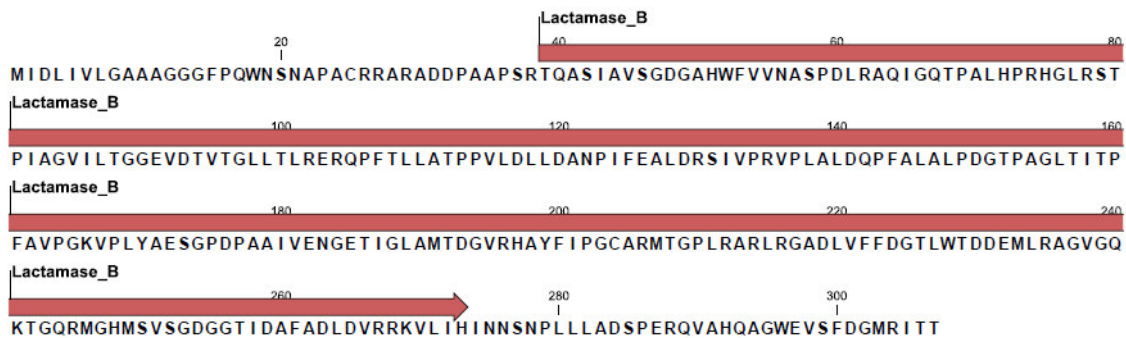


Figura 10: Representação esquemática de PqqB em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5, destacando a posição do domínio metalo-beta-lactamase.

5.4.2- PqqC

O alinhamento dos homólogos de PqqC demonstraram alta porcentagem de conservação, principalmente na região central da proteína. Porém, não foram observados “motivos” conservados (Figura 11). Interessantemente, dentre as proteínas analisadas, foi encontrado somente em integrantes da família Acetobacteraceae um domínio aminotransferase I e II na região N-terminal de PqqC. Em *G. diazotrophicus* PAI 5 e *A. acetii* NBRC14818, além deste domínio, foi predito outro domínio também localizado na região N-terminal, que é o domínio receptor regulador de resposta (PF00072), anotado como envolvido na sinalização de resposta a estresses gerais (Figura 12).

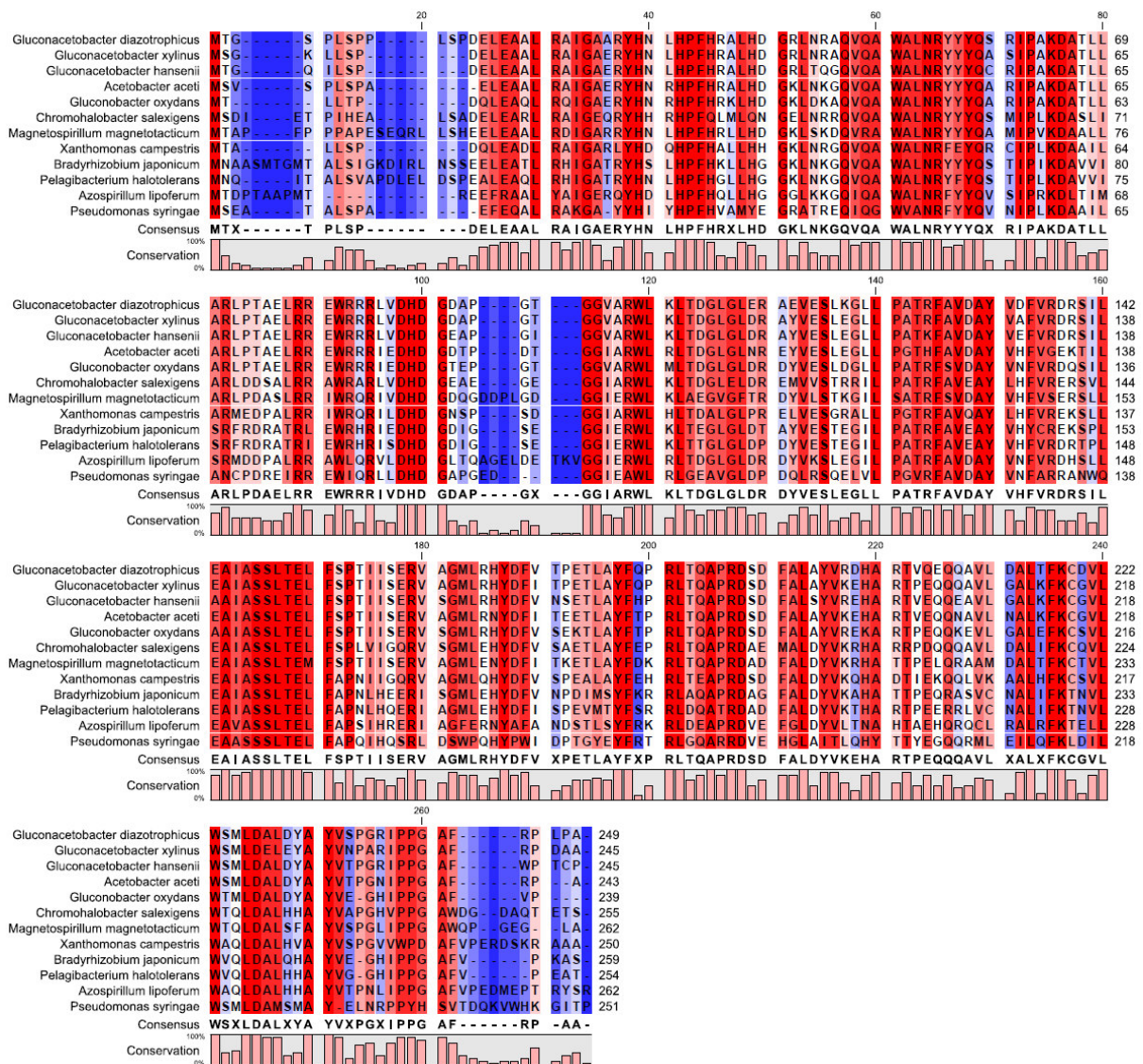


Figura 11: Alinhamento da proteína PqqC em diferentes bactérias Gram-negativas. Foi utilizada a ferramenta “Create Alignment” do programa CLC Main Workbench 6.7 com

Continuação: parâmetros padrões pré-determinados. A sequência em negrito, indicada nas linhas inferiores às comparações, representa uma sequência consenso das espécies. As barras mostram o nível de conservação de cada resíduo de aminoácido. Resíduos em fundo vermelho representam regiões mais conservadas da proteína e em azul, regiões menos conservadas. (-) Espaços foram introduzidos para melhorar o alinhamento.

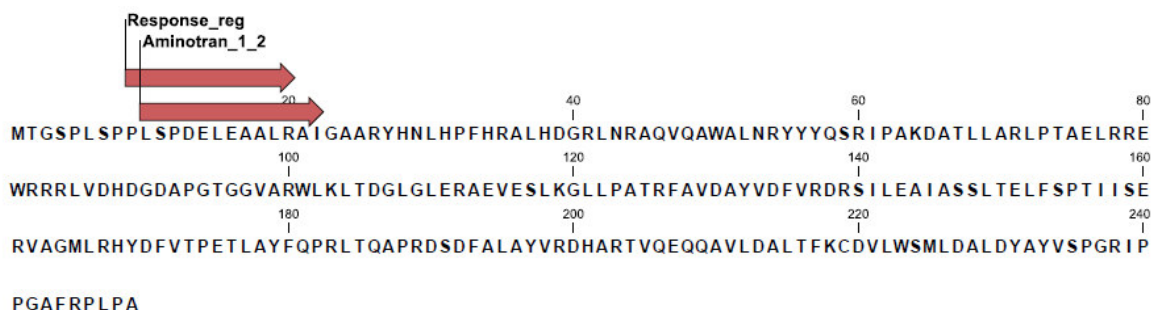


Figura 12: Representação esquemática de PqqC em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5, destacando a posição do domínio aminotransferase I e II (Aminotran_1_2) e do domínio receptor regulador de resposta (Response_reg).

5.4.3- PqqE

Assim como observado para PqqC, o alinhamento de sequências dos homólogos PqqE obteve maior porcentagem de conservação na região central da proteína (Figura 13). Foram encontrados diversos “motivos” relativos a sítios de fosforilação da proteína quinase C em todos homólogos estudados. Todavia, apenas um destes “motivos” se mostrou altamente conservado entre as espécies, estando localizado próximo a região N-terminal de PqqE (Figura 14). Foi possível observar que nesta posição o “motivo” [S|T-x-R|K] referente ao sítio de fosforilação da proteína quinase C está acompanhado à montante por um resíduo de ácido glutâmico (E) seguido de um resíduo de leucina (L), isoleucina (I) ou valina (V) (aminoácidos de cadeia lateral ramificada) e à jusante pela sequência [C-P-L] (Figura 14). Também foi encontrado em todos os homólogos de PqqE um domínio conservado Radical SAM (PF04055) (Figura 15).

Continuação: nível de conservação de cada resíduo de aminoácido. Resíduos em fundo vermelho representam regiões mais conservadas da proteína e em azul regiões menos conservadas.

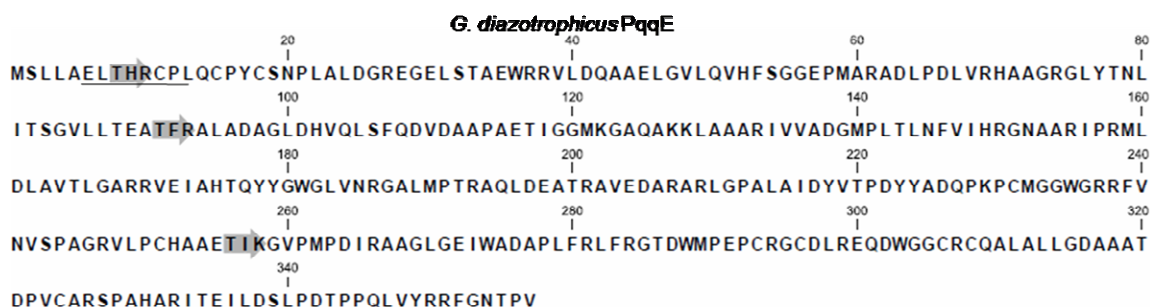


Figura 14: Sequências de aminoácidos da proteína PqqE de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. Foi utilizado o programa CLC Main Workbench 6.7 com parâmetros padrões pré-determinados. Em destaque são mostrados os “motivos” referentes ao sítio alvo de fosforilação da proteína quinase C (setas cinza-claro). Entre estes está destacado o “motivo” altamente conservado na proximidade da região N-terminal (sublinhado).

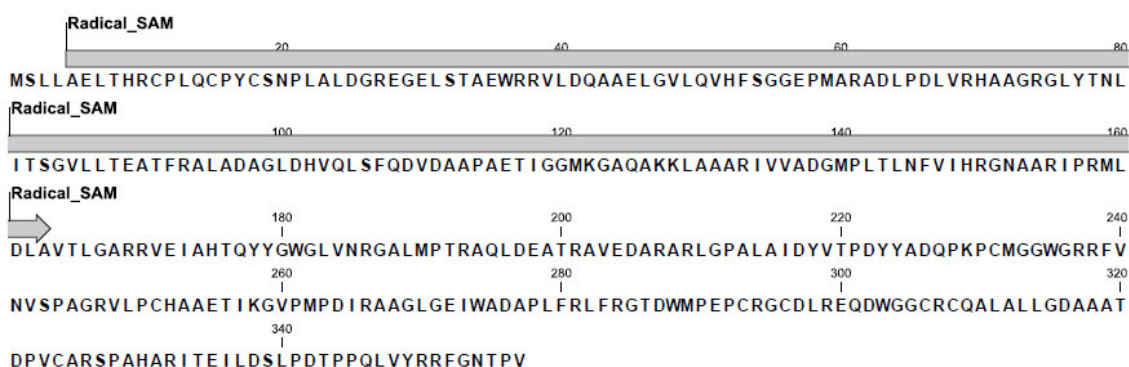


Figura 15: Esquema indicando a posição do domínio Radical SAM na proteína PqqE de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. O domínio Radical SAM tem a maior parte concentrada próximo a região N-terminal da proteína PqqE de *G. diazotrophicus*.

5.4.4- AcrA

O alinhamento das sequências de AcrA revelou maior similaridade na região central da proteína, porém é notável a presença de duas regiões de baixa similaridade na porção central bastante evidente entre as espécies da família Acetobacteraceae e do gênero *Pseudomonas* (Figura 16). Diversos sítios de fosforilação da proteína quinase C foram encontrados, mas apenas um se mostrou altamente conservado, estando localizado na região central de AcrA. Nesta posição, o motivo [S|T-x-R|K] está acompanhado à montante pelos resíduos [P-I] e a jusante pelos resíduos [I-G] em todos os homólogos de AcrA

estudados (Figura 17). Não foi possível encontrar nenhum domínio comum a todos os homólogos de AcrA.

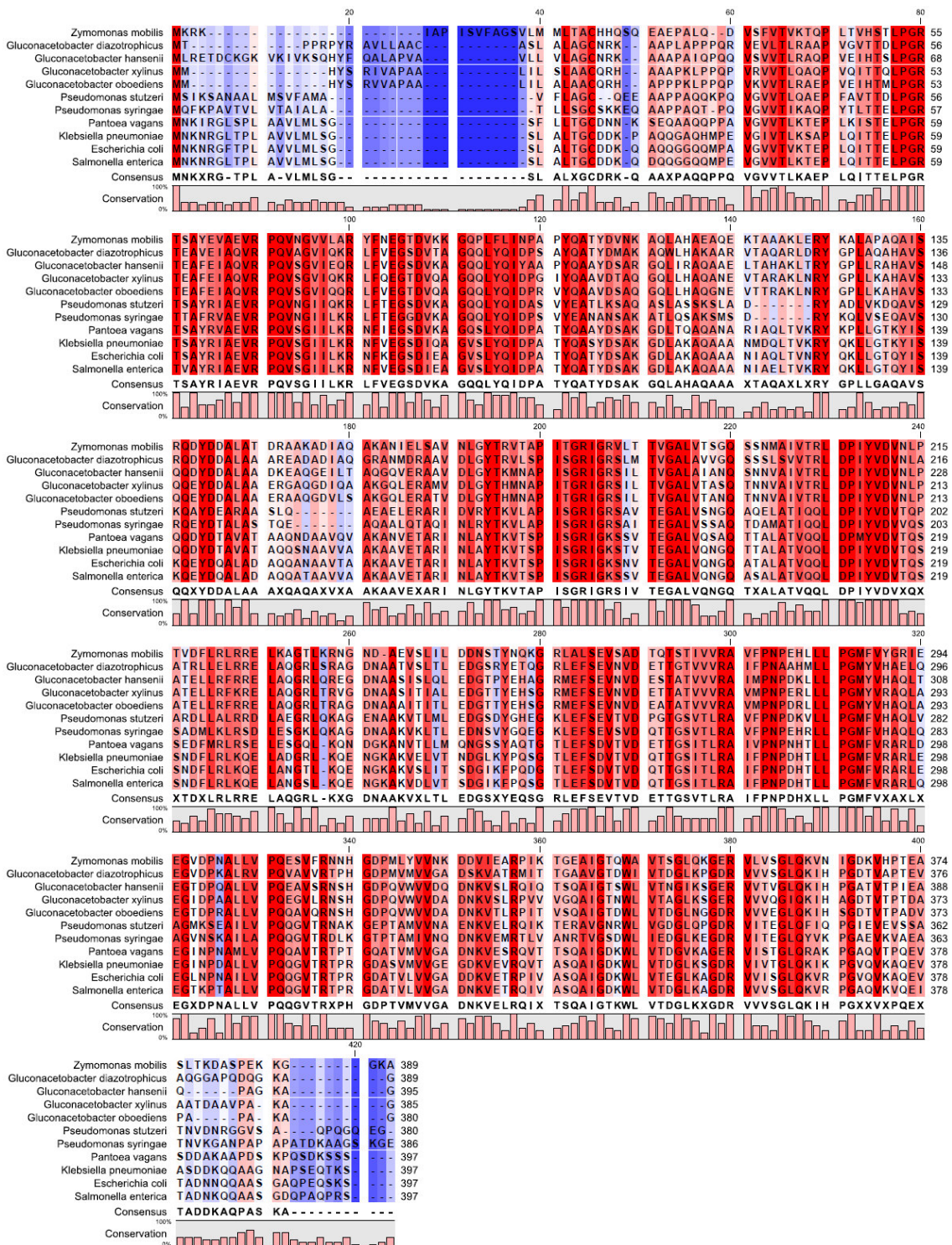


Figura 16: Alinhamento da proteína AcrA em diferentes bactérias Gram-negativas. Foi utilizada a ferramenta “Create Alignment” do programa CLC Main Workbench 6.7 com parâmetros padrões pré-determinados. A sequência em negrito, indicada nas linhas inferiores às comparações, representa uma sequência consenso das espécies. As barras mostram o nível de conservação de cada resíduo de aminoácido. Resíduos em fundo vermelho representam regiões mais conservadas da proteína e em azul, regiões menos conservadas.

***G. diazotrophicus* AcrA**

```

      20          40          60          80
      |          |          |          |
MTPPRPYRAVLLAACASLALAGCNRKAAPLAPPQORVEVLTLRAAPVGVTTDLPGRTEAVEIAQVRPQVAGVIQKRLFVE
      |          |          |          |
      100       120       140       160
      |          |          |          |
GSDVTAGQQLYQIDPSAYQATYDMAKAQWLHAKAARVTAQARLDYRGLAQAHAVSRQDYDDALAAAREADADIAQGRAN
      |          |          |          |
      180       200       220       240
      |          |          |          |
MDRAAVDLGYTRVLSPISGRIGRSLMTVGALAVVGSSLSLVVTRLDPYVDVNLAATRLELRRELAQGRLSRAGDNAA
      |          |          |          |
      260       280       300       320
      |          |          |          |
TVSLTLEDGSRYETQGRLEFSEVNVDETTGTVVVRAIFPNAAHMLLPGMVVAELQEGVDPKALRVPQVAVVRTPHGDPM
      |          |          |          |
      340       360       380
      |          |          |
VMVVGADSKVATRMITTGAAVGTDWIVTDGLKPGDRVVVSGLQKIHPGDTVAPTEVAQGGAPQDQGGKAG

```

Figura 17: Sequências de aminoácidos da proteína AcrA de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. Setas cinzas: “motivos” referentes ao sítio alvo de fosforilação da proteína quinase C (setas cinza-claro). Sublinhado: “motivo” altamente conservado na região central da sequência.

5.5- A sensibilidade dos mutantes *pqq* e *acr* aos agentes estressantes em meio sólido

Depois de analisar as sequências interrompidas em cada mutante selecionado, realizou-se testes de sensibilidade em meio LGM sólido com as diferentes cepas, utilizando-se os agentes estressantes NaCl, sacarose, Na₂SO₄ e PEG-400. Para representar $\Delta pqqC$ e $\Delta acrA$, foram escolhidos os mutantes GDP13G12 e GDP12E03 respectivamente, pois nestas cepas obteve-se os menores valores de desvio padrão nos testes realizados em meio líquido, quando comparados a GDP01F02 e GDP28B08, respectivamente.

Foi observado que $\Delta pqqB$, $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ não apresentaram aumento de sensibilidade na presença de NaCl, em comparação com a cepa selvagem. Pelo contrário, níveis discretos de crescimento foram observados para tais mutantes na presença de 150 mM de NaCl, onde não foi observado crescimento para a cepa selvagem e para $\Delta acrA$, corroborando os dados obtidos em meio líquido. Também foi possível notar que $\Delta pqqB$, ainda que fortemente inibido, é capaz de crescer na concentração de 200 mM de NaCl (Figura 18A).

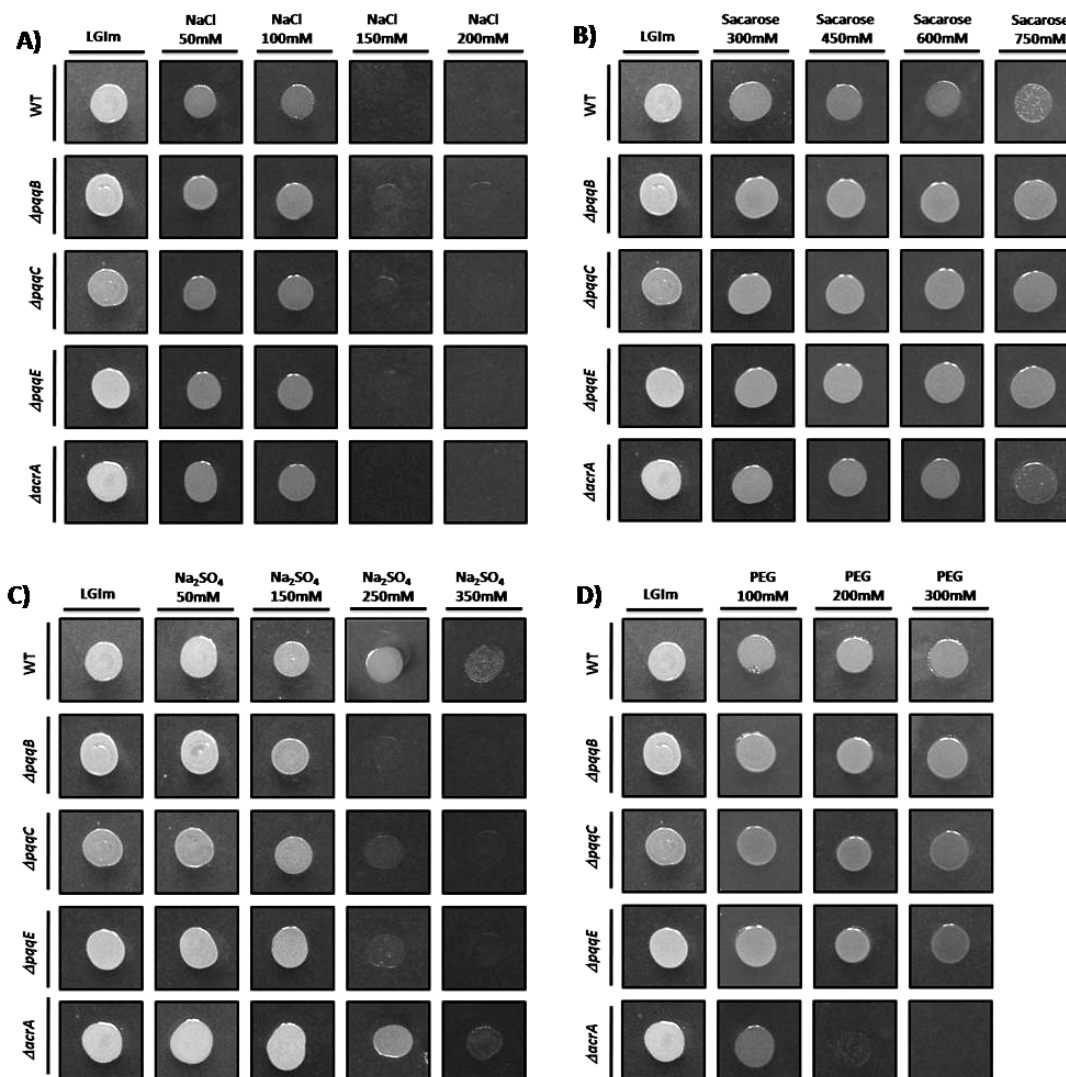


Figura 18: Teste de sensibilidade em meio LGIm sólido com diferentes concentrações de agentes estressantes. A) NaCl, B) sacarose, C) Na_2SO_4 e D) PEG-400. As fotos foram registradas após 72h de cultivo.

Quando cultivados na presença de sacarose, $\Delta pqqB$, $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ tiveram maior crescimento de colônia em comparação a bactéria selvagem (WT) e $\Delta acrA$. Esta vantagem dos mutantes *pqq* se tornou evidente quando as bactérias foram cultivadas em 750 mM de sacarose (Figura 18B). Novamente, os dados em meio sólido corroboraram os resultados obtidos em meio líquido (Figura 4).

Ao investigar a influência de Na_2SO_4 no crescimento celular das cepas, notou-se que as concentrações de 50 mM e 150 mM não afetaram o crescimento das colônias (Figura 18C). Porém, a presença de 250 mM de Na_2SO_4 inibiu fortemente o crescimento dos mutantes *pqq*, enquanto WT e

$\Delta acrA$ só tiveram o crescimento prejudicado em 350 mM (Figura 18C). Deste modo, não foi verificado maior sensibilidade de $\Delta acrA$ em comparação a WT como obtido em meio líquido (Figura 4).

O efeito da adição de PEG-400 ao meio de cultivo apresentou diferenças entre o meio sólido e o líquido quanto aos mutantes *pqq*. Conforme mostrado previamente, nos ensaios em meio líquido, PEG-400 causou inibição no crescimento de $\Delta pqqB$, $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ tão severa quanto a causada por Na_2SO_4 . Porém, em meio sólido esta inibição não foi observada para o mutante $\Delta pqqB$, e é muito mais branda para os mutantes $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ (Figura 18D). Quanto ao mutante *acrA*, não foi notado crescimento celular na presença de 300 mM de PEG-400, corroborando os dados obtidos em meio líquido (Figura 3 e 18D). É possível verificar que já ocorre forte inibição do crescimento deste mutante na presença de 200 mM de PEG-400, enquanto em WT o efeito negativo de PEG-400 é pouco aparente (Figura 18D). Deste modo, os dados indicam um papel crucial da proteína AcrA na resistência a PEG-400.

5.6- Na_2SO_4 induz a produção de ERO em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5

Para investigar a ocorrência de alterações fenotípicas em *G. diazotrophicus* PAI 5 selvagem pela adição dos agentes estressantes e a indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), foram realizados cultivos da cepa selvagem sob estresse e microscopia ótica de campo claro e fluorescência. Foi observado que células cultivadas em meio LGIm (controle) apresentaram bastante mobilidade, aspecto de bacilos curtos isolados, ou em menor número, diplobacilos (Figura 19A). Bactérias cultivadas na presença de 250 mM de Na_2SO_4 organizaram-se em diplobacilos com mobilidade bastante reduzida (Figura 19C). Em 100 mM de NaCl, observaram-se grandes mudanças no aspecto das bactérias. As células se apresentaram bastante alongadas e sem mobilidade. Muitas bactérias aparentavam estar rompidas (Figura 19E). Também foram notadas diferenças visuais nas células cultivadas na presença de 600 mM de sacarose. Em geral, as células se apresentavam como diplobacilos e formavam alguns pequenos grumos (Figura 19G). As células que não estavam em grumos tinham mobilidade semelhante à observada nas

células não estressadas. Foram detectadas deformações nas bactérias cultivadas na presença de PEG-400 (300 mM), aparentemente algumas células foram rompidas, e alguns grumos também foram formados (Figura 19I). Quanto a produção de ERO, foi possível visualizar emissão de fluorescência somente nas células tratadas com Na_2SO_4 (Figura 19D), nas demais condições não foi observado nenhuma resposta (Figuras 19B, 19F, 19H e 19J).

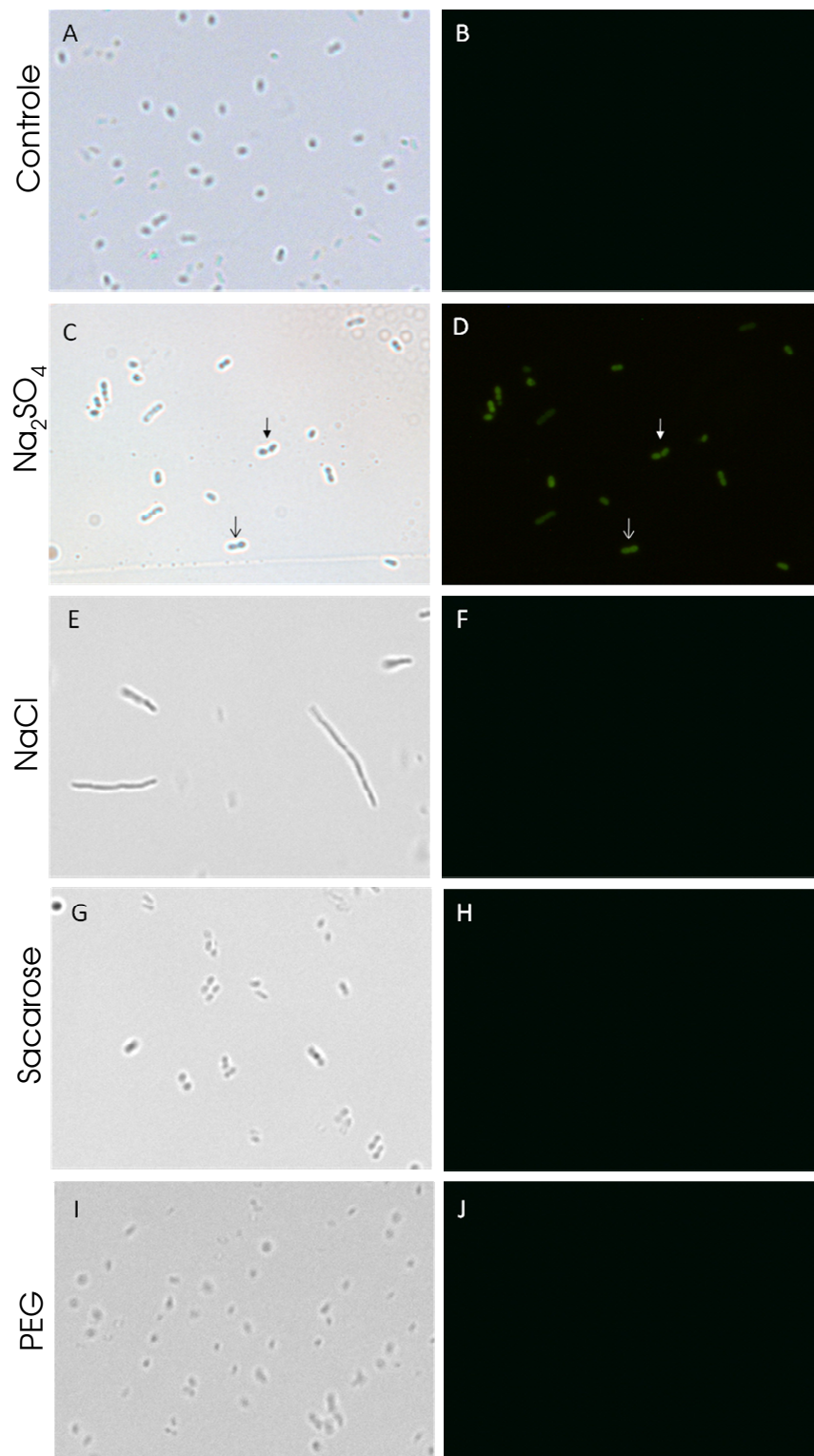


Figura 19: Microscopia do ensaio de estresse osmótico e salino em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 selvagem. Bactéria incubada em meio LGIm (controle) (A, B) e adicionado de 250mM de Na₂SO₄ (C, D) e 100mM de NaCl (E, F), 600 mM de sacarose (G,H) e 300 mM de PEG-400 (I,J) por 48 h. As células foram tratadas com diclorofluoresceína diacetato (5mM) para detecção de ERO. A, C, E, G e I representam imagens de campo claro. B, D, F, H e J são as imagens de fluorescência. Foi utilizado tempo de exposição de 1 s e aumento de 600x.

5.7- PEG-400 induz produção de ERO em $\Delta acrA$

Para analisar a importância do gene *acrA* na resistência a PEG-400 e o mecanismo de ação deste composto sobre as células de *G. diazotrophicus*, foram realizados cultivos da cepa selvagem e $\Delta acrA$ na presença de 100 mM de PEG-400 e $\Delta acrA$ na ausência de PEG-400, seguido de microscopia ótica DIC e fluorescência. A cepa selvagem apresentou diplobacilos com discreta diminuição da mobilidade em relação ao cultivo no meio LGIm sem adição de PEG-400, não sendo observada nenhuma fluorescência (Figura 20A e B). Em $\Delta acrA$ houve diminuição da mobilidade em relação a cepa selvagem cultivada nas mesmas condições e as bactérias também se organizaram em diplobacilos tanto nas células cultivadas com PEG-400 ou sem este polímero (Figura 20C e E). Foi observada ainda, intensa produção de ERO através da emissão de fluorescência em $\Delta acrA$ cultivada na presença de PEG-400 (Figura 20D) e nenhuma fluorescência é vista na ausência de PEG-400 (Figura 20F)

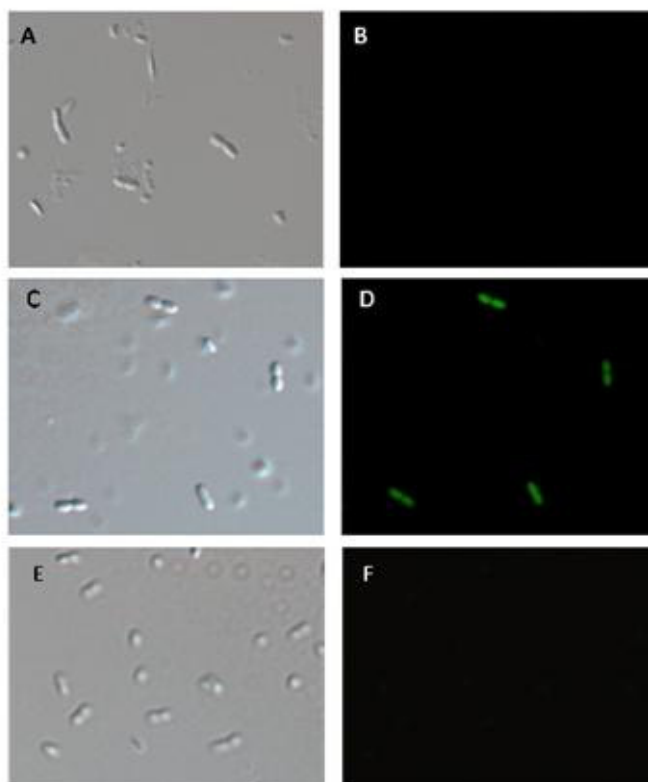


Figura 20: Microscopia do ensaio de estresse oxidativo em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 selvagem (A, B) e $\Delta acrA$ (C, D) incubadas em meio LGIm adicionado de 100mM de PEG-400 por 24h e $\Delta acrA$ em meio LGI não adicionado de PEG-400 (E,F). As células foram tratadas com diclorofluoresceína diacetato (5mM) para detecção de ERO. A, C e E representam imagens de DIC. B, D e F são as imagens de fluorescência. Foi utilizado tempo de exposição de 1 s e aumento de 600x.

5.8- Mutações nos genes *pqq* inibem a fixação biológica de nitrogênio

Devido à relevância do caráter diazotrófico e a sensibilidade da nitrogenase a ERO, foi testada a influência das mutações no metabolismo de nitrogênio de *G. diazotrophicus* PAI 5. As cepas mutantes foram testadas qualitativamente quanto à capacidade de fixar nitrogênio atmosférico em meio de cultivo LGI semi-sólido sem adição de nitrogênio. No ensaio foi observada a formação de película aerotóxica típica e alteração da coloração do meio de cultivo devido a acidificação em WT (Figura 21A) e $\Delta acrA$ (Figura 21E). Em $\Delta pqqB$, verificou-se um fenótipo intermediário (Figura 21B) com uma formação prejudicada da película e coloração entre o verde e o amarelo. Já $\Delta pqqC$ (Figura 21C) e $\Delta pqqE$ (Figura 21D) não formaram película aerotóxica, o que indica que esses mutantes não fixam nitrogênio do ar. Deste modo, pode-se concluir que os genes *pqq* são essenciais para o funcionamento da nitrogenase em *G. diazotrophicus* PAI 5.

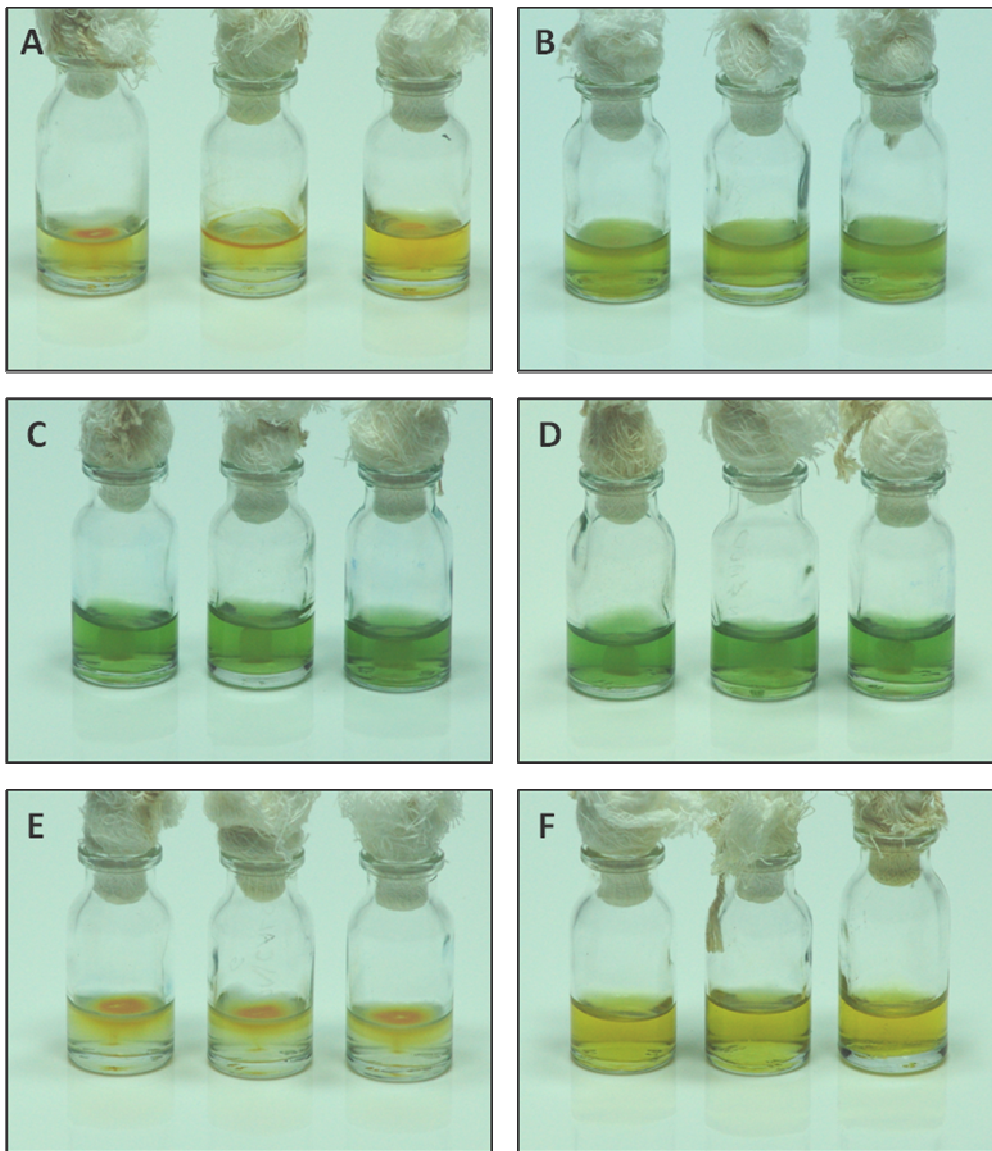


Figura 21: Teste de fixação biológica do nitrogênio. O ensaio foi realizado avaliando a formação de película aerotáxica típica em meio de cultivo LGI semi-sólido sem adição de nitrogênio. A) Cepa selvagem, B) $\Delta\rho qqB$, C) $\Delta\rho qqC$, D) $\Delta\rho qqE$, E) $\Delta acrA$ e F) solução salina.

6- Discussão

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria endofítica capaz de sobreviver em concentrações elevadas de até 30% de sacarose (STEPHAN et al., 1991), 200mM de NaCl e 300mM de PEG-400 (VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2011). Recentemente, foi revelado que a enzima levansucrase desempenha um importante papel na tolerância a altas concentrações de NaCl e sacarose, através da produção do polímero de frutose levan, que atua como um osmoprotetor não acumulativo. Neste mesmo trabalho também foi esclarecido que a levansucrase não está envolvida na resistência a PEG-400 (VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2011). Estes dados sugerem uma forte tolerância aos efeitos do estresse osmótico e iônico por esta bactéria. Porém, os mecanismos envolvidos na resistência a estes estresses ainda não foram totalmente elucidados. Para identificar novos mecanismos de resposta e tolerância de *G. diazotrophicus* aos estresses osmótico e iônico, foram utilizados neste trabalho NaCl, Na₂SO₄, sacarose e PEG como agentes estressantes.

Nossos resultados mostram que 80 dos 138 mutantes analisados tem a multiplicação celular fortemente inibida (superior a 80% de inibição) quando submetidos aos agentes estressantes testados, sendo que o estresse provocado por sacarose afetou o maior número de mutantes, seguido por Na₂SO₄, PEG e NaCl. Possivelmente, isto reflete a adaptação de *G. diazotrophicus* ao seu nicho ecológico mais comum, o interior de plantas ricas em sacarose (MUTHUKUMARASAMY et al., 2002). Além disso, quando submetida a altas concentrações de sacarose (20%) ocorre aumento da fixação de nitrogênio em relação a baixas concentrações (1%), o que reforça sua adaptação a altas concentrações deste açúcar (HARTMANN, 1991). Portanto, é compreensível que esta bactéria possua vias diversificadas envolvidas na resposta aos estresses iônico e osmótico, e que a maioria dos genes medeie a resistência a sacarose.

Após a análise em larga escala, foram realizados estudos mais aprofundados com seis mutantes. Foram selecionados quatro mutantes sensíveis a Na₂SO₄ e PEG-400 e que possuem resistência a NaCl e sacarose, e outros dois mutantes sensíveis a PEG-400. A identificação dos genes mutados através de sequenciamento dos sítios de inserção do transposon

revelou que os quatro primeiros mutantes pertencem a via de síntese do cofator PQQ e os outros dois foram interrompidos no mesmo gene *acrA*.

6.1- O papel da molécula PQQ

Os alinhamentos de sequências de aminoácidos revelaram que as proteínas envolvidas na síntese de PQQ em *G. diazotrophicus* são altamente conservadas em bactérias Gram-negativas. É evidente a conservação de aminoácidos de mesma carga, hidrofobicidade e tamanho de cadeia lateral em muitas posições das proteínas analisadas. Este resultado indica que a síntese da molécula PQQ utiliza vias semelhantes entre as diferentes bactérias analisadas. Isto chama atenção para a importância desta molécula, que precisa de sua estrutura mantida para realização do seu papel fisiológico.

A ação de PQQ na resistência a estresses ambientais tem sido relatada. PQQ estimula a tolerância ao estresse oxidativo em *E. coli* (KHAIRNAR et al., 2003) e produz adutos quimicamente inertes com ERO *in vitro* (MISRA et al, 2004). Adicionalmente, pesquisas realizadas com a bactéria Gram-positiva *D. radiodurans* revelaram um papel crucial de PQQ na resistência aos efeitos da radiação UV e γ . Em tais trabalhos, foi demonstrado que esta resistência é dada pela característica de proteção contra ROS gerada diretamente pela molécula PQQ e pela ação de enzimas de reparo de quebra de DNA, reguladas por PQQ (KHAIRNAR et al.2007; RAJPUROHIT et al., 2008; RAJPUROHIT e MISRA, 2010) .

Além das propriedades antioxidantes da molécula PQQ, as proteínas envolvidas em sua síntese podem desempenhar outros papéis importantes para o desenvolvimento da resistência a estresses abióticos. Em *D. radiodurans*, mutantes defectivos para o gene *pqqE*, que apresentam maior sensibilidade a radiação γ , radiação UV e estresse oxidativo também têm alterações negativas na sinalização celular envolvida em mecanismos de reparo de DNA (RAJPUROHIT e MISRA, 2010). Nossos resultados corroboram estes dados, pois as análises *in silico* apontaram diversos sítios de fosforilação altamente conservados em sequência e posição nas proteínas que sintetizam PQQ. Esta sinalização celular pode ser essencial para a ativação dos mecanismos de resistência a estresses abióticos em *G. diazotrophicus*.

Através de análises *in silico* também foi encontrado um possível sítio de N-glicosilação na proteína PqqB de *G. diazotrophicus*. Em procariotos, a ocorrência de N-glicosilação é descrita em proteínas da membrana periplasmática envolvidas no transporte de produtos do metabolismo celular (WEERAPANA e IMPERIALI, 2006). Além disso, tem sido descrito que mutantes defectivos para PqqB produzem PQQ no citosol, porém não secretam para o periplasma (PUEHRINGER et al., 2008). Tomados juntos, estes resultados indicam que PqqB não participa diretamente da síntese de PQQ, mas pode atuar como um carreador de PQQ, responsável pelo transporte desta molécula para o periplasma, através da membrana plasmática.

As análises realizadas por microscopia ótica de fluorescência indicaram que Na₂SO₄, na concentração de 250 mM, induz o acúmulo de ERO em *G. diazotrophicus*, o que não ocorreu com NaCl, PEG-400 e sacarose. Esse resultado evidencia a geração de estresse oxidativo por Na₂SO₄ na condição testada. Quanto aos demais agentes estressantes novos experimentos são necessários para avaliar concentrações diferentes das já testadas. Também seria interessante utilizar um marcador de viabilidade celular, já que eventuais danos nas membranas, que aumentam a permeabilidade, podem gerar extravasamento de ERO, impedindo sua detecção. Está bem caracterizado que o acúmulo de ERO é uma consequência comum ocorrida em organismos submetidos a estresse salino (PAN et al., 2009) e hídrico-osmótico (FRANÇA et al., 2007; GULEZ et al., 2012). Portanto, a proteção contra o dano oxidativo é um dos fatores determinantes para a tolerância e sobrevivência de organismos diante desses estresses. Aparentemente, a proteção contra Na₂SO₄ em *G. diazotrophicus* é dado pela molécula de PQQ através de sua ação antioxidante.

Testes realizados para verificar possíveis alterações na fixação biológica do nitrogênio nos mutantes selecionados demonstraram que $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ são bastante prejudicados na sua característica diazotrófica. Isto ocorre pela ausência de PQQ, que atua como cofator da enzima PQQ-glicose desidrogenase (PQQ-GDH). Tal enzima é necessária para a conversão de glicose em ácido glucônico, que ocorre no periplasma da bactéria. A enzima PQQ-GDH é responsável por prover a grande quantidade de energia que é utilizada por *G. diazotrophicus* durante a FBN (GALAR e BOIARDI, 1995). Na ausência do cofator PQQ, a oxidação da glicose em gluconato pode estar

sendo realizada pela enzima GDH citoplasmática (INTORNE et al., 2009). Esta intensa atividade respiratória pode produzir ERO, o que inibe a atividade da nitrogenase e impede a FBN (ALQUÉRES et al., 2010). Neste sentido, podemos inferir que as mutações nos genes *pqqC* e *pqqE*, impossibilitam a produção de PQQ durante a respiração citoplasmática, impedindo que esta molécula atue como antioxidante durante a FBN em *G. diazotrophicus*.

Interessantemente, $\Delta pqqB$ foi pouco afetado quanto à FBN em relação aos outros mutantes *pqq* analisados. Além disso, tal mutante promoveu acidificação parcial do meio de cultivo, quando comparado com a bactéria selvagem. Considerando as evidências fornecidas pelas análises *in silico* de que *pqqB* codifica um transportador de PQQ para o periplasma, podemos concluir que tal mutante acumula PQQ no citosol, porém não o transporta para o periplasma. Assim, tal composto não está acessível para a enzima GDH periplasmática, inviabilizando a produção de ácido glucônico. Neste caso, a degradação da glicose passaria a ocorrer no citosol, implicando em acúmulo de ERO. Podemos especular que, neste caso, o PQQ sintetizado no citosol é suficiente para sequestrar grande parte destas EROs, evitando danos à atividade da nitrogenase.

Tanto em nossos ensaios de crescimento em meio sólido quanto em meio líquido, foi perceptível uma maior tolerância à sacarose dos mutantes *pqq* em relação à cepa selvagem. Esta é a primeira demonstração de que mutações nas vias de produção de pqq contribuem para a resistência a sacarose em bactérias. Torna-se interessante a realização de futuros ensaios que permitam analisar os mecanismos envolvidos em tal processo.

6.2- Papel de AcrA na resistência ao estresse oxidativo

O sistema de efluxo AcrAB é composto por um transportador da família RND (Resistance-Nodulation-Division), e uma proteína periplasmática acessória AcrA. Os genes *acrA* e *acrB* formam um operon. Além destes componentes é necessário o recrutamento de uma proteína ligada a membrana externa, TolC. Em *E. Coli*, TolC é codificada por um gene que não está localizado próximo ao operon *acrAB* (NIKAIDO e ZGURSKAYA, 2001). Em *G. diazotrophicus*, a jusante do operon *acrAB* existe um gene ortólogo de *tolC*, chamado *oprM*, que pode fazer parte de um operon junto *acrA* e *acrB*. De

maneira semelhante, em *Pseudomonas aeruginosa* os genes *mexA* e *mexB*, ortólogos de *acrA* e *acrB* nesta bactéria, estão contidos em um operon junto com o gene *oprM* (STARR et al, 2012).

O transportador AcrAB utiliza força próton-motriz para externalizar diversos compostos tóxicos para a célula, como por exemplo: antibióticos, detergentes, brometo de etídio e solventes orgânicos (KRISHNAMOORTHY et al, 2008; POS, 2009; STARR et al, 2012). No presente trabalho, verificou-se que mutações no gene *acrA* impedem o crescimento celular de *G. diazotrophicus* PAI 5 em concentrações de 200 mM de PEG, enquanto a cepa selvagem pode se multiplicar em concentrações de até 300 mM deste composto. As propriedades antibacterianas de PEG tem sido relatadas há quase três décadas (CHIRIFE et al, 1983) e acredita-se que seu efeito antimicrobiano seja dado por diminuição da atividade de água no ambiente (AMBROSE et al, 1991). Este efeito pode ocorrer diretamente no interior das células bacterianas. Um estudo com a bactéria fermentadora de PEG, *Pelobacter venetianus*, afirma que moléculas de PEG de massa molecular de até 20 kDa podem atravessar as membranas biológicas e serem degradadas no citoplasma (SCHMID et al., 1991).

Atualmente, PEG é bastante utilizado em conjunto com agentes antimicrobianos. No entanto, Siedenbiedel e Tiller (2012) descrevem que o uso de PEG nem sempre é vantajoso, pois alguns antibióticos polimerizados com PEG têm diminuição da atividade antimicrobiana. Isto sugere que, em bactérias, exista algum mecanismo de defesa contra PEG ainda não descrito.

Nossos resultados mostram acúmulo de ERO em Δ *acrA* na presença de 100 mM de PEG, o que não foi observado na cepa selvagem. Sugere-se que este estresse oxidativo ocorra devido à intoxicação da bactéria com PEG-400. Na ausência deste transportador, a bactéria seria incapaz de bombear PEG-400 para o ambiente exterior, considerando assim que AcrAB atue como um transportador de efluxo ativo desta molécula em *G. diazotrophicus* PAI 5. Deste modo, o resultado obtido para bactéria selvagem na mesma concentração justifica-se pela eficiente detoxificação da célula mediada por AcrAB, o que evita a formação exacerbada de ERO proveniente do estresse hídrico provocado por PEG-400. Em concentrações acima de 100mM não ocorre crescimento de Δ *acrA* e não é observada produção de ERO na cepa

selvagem. O uso de um marcador de viabilidade celular pode ser necessário para a confirmação dos dados nestas condições.

Fernández e colaboradores (2012), demonstraram a participação conjunta do transportador *ttgABC*, ortólogo de *acrAB-oprM*, e genes da via de produção de PQQ na resistência de *Pseudomonas putida* KT2440 ao antibiótico gerador de estresse oxidativo cloranfenicol. Deste modo, na ausência de um mecanismo de defesa o outro atua na proteção contra o dano oxidativo. O transportador evita um acúmulo excessivo do antibiótico no interior das células, enquanto PQQ sequestra as ERO formadas, mitigando seus efeitos tóxicos. Esses dados mostram que existem diferentes linhas de defesa na resistência ao estresse oxidativo, e que estes mecanismos podem atuar concomitantemente a fim de proteger a viabilidade celular.

7- Conclusões

- 1- *G. diazotrophicus* PAI 5 possui mecanismos moleculares de defesa específicos para os estresses provocados por NaCl, Sacarose, PEG-400, Na₂SO₄.
- 2- As vias de biossíntese e transporte de PQQ são componentes essenciais da tolerância a PEG-400 e Na₂SO₄ em *G. diazotrophicus*.
- 3- Os genes *pqqC* e *pqqE* são essenciais para a fixação biológica de nitrogênio, enquanto *pqqB* não. Portanto, a disponibilidade de PQQ no citosol é essencial para a atividade da nitrogenase.
- 4- A exposição da cepa selvagem *G. diazotrophicus* PAI 5 a Na₂SO₄ resulta em indução do acúmulo de ERO.
- 5- Nossos resultados sugerem que a molécula PQQ atue como antioxidante em *G. diazotrophicus* PAI 5. PQQ pode ainda ter ação indireta como cofator de enzimas envolvidas na detoxificação e reparo dos efeitos do dano oxidativo provocado pelos estresses osmótico e salino em *G. diazotrophicus* PAI 5.
- 6- O transportador AcrAB é essencial para a tolerância a PEG-400. Na ausência do gene *acrA*, *G. diazotrophicus* PAI 5 acumula elevadas concentrações de ERO em resposta a exposição a baixas concentrações deste estressor. O transportador pode atuar na detoxificação celular, evitando o dano oxidativo provocado pelos estresses osmótico e salino em *G. diazotrophicus* PAI 5.

8- Referências Bibliográficas

Alquéres, S .M. C., Oliveira, J. H. M., Nogueira, E. M., Guedes, H. V., Oliveira, P. L., Câmara, F., Baldani, J. I. e O. B. Martins. Antioxidant pathways are up-regulated during biological nitrogen fixation to prevent ROS-induced nitrogenase inhibition in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Archives of Microbiology*. v.192, p. 835-841, 2010.

Ambrose, U., Middleton, K. e D. Seal. In vitro studies of water activity and bacterial growth inhibition of sucrose-polyethylene glycol 400-hydrogen peroxide and xylose-polyethylene glycol 400-hydrogen peroxide pastes used to treat infected wounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 35. n. 9, p. 1799-1803, 1991.

Anitha, K.G. e M. Thangaraju. Growth promotion of rice seedling by *Gluconacetobacter diazotrophicus* under *in vitro* conditions. *Journal of Cell and Plant Sciences*, v.1, n.1, p.6-12. 2010.

Arrieta, J. G., M. Sotolongo, C. Menendez, D. Alfonso, L. E. Trujillo, M. Soto, R. Ramirez e L. Hernandez. A Type 11 Protein Secretory Pathway Required for Levansucrase Secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Journal of Bacteriology*., v.186, n.15, p.5031-5039. 2004.

Baldani J.I. e V.L.D. Baldani. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceas plants: special emphasis on the brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. v.77, n.3, p.549-579, 2005.

Ballal, A., B. Basu e S. K. Apte. The Kdp-ATPase system and its regulation. *Journal of Biosciences*, v.32, n.3, p.559-568. 2007.

Blanco, Y., Blanch, M., Piñón, D., Legaz, M. E. e C. Vicente. Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v.99. p.366-371, 2005.

Boniolo, F., R. Rodrigues, E. Delatorre, M. Da Silveira, V. Flores e M. Berbert-Molina. Glycine-betaine enhances growth of nitrogen-fixing bacteria

Gluconacetobacter diazotrophicus PAL5 under saline stress conditions. *Current Microbiology*, v.59, n.6, p.593-599. 2009.

Burg, M. B. e J. D. Ferraris. Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, v.283, n.12, p.7309-7313. 2008..

Cabiscol, E., Tamarit, J. e J. Ros. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, v.3, p. 3-8, 2000.

Cao, Y., X. Jin, H. Huang, M. G. Derebe, E. J. Levin, V. Kabaleeswaran, Y. Pan, M. Punta, J. Love, J. Weng, M. Quick, S. Ye, B. Kloss, R. Bruni, E. Martinez-Hackert, W. A. Hendrickson, B. Rost, J. A. Javitch, K. R. Rajashankar, Y. Jiang e M. Zhou. Crystal structure of a potassium ion transporter, TrkH. *Nature*, v.471, p.336-341. 2011.

Cash, T.P, Pan, Yi e M. C. Simon. Reactive Oxygen Species and Cellular Oxygen Sensing. *Free Radic Biol Med.*; p.1219–1225, 2007.

Cavalcante, V. e J. Dobereiner. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, v. 108, n. 1, p.23-31. 1988.

Chen, C. e G. A. Beattie. *Pseudomonas syringae* BetT is a low-affinity cholíne transporter that is responsible for superior osmoprotection by choline over glycine betaine. *Journal of bacteriology* , v.190, n.8, p.2717. 2008.

Chirife, J., Herszage, L., Joseph, A., Bozzini, J.P., Leardini, N. e E.S. Kohn. In vitro antibacterial activity of concentrated Polyethylene glycol 400 solutions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 24. n. 3, p. 409-412, 1983.

Choi, O., Kim, J., Kim, J.G., Jeong, Y., Moon, J.S., Park, C.S. e Hwang, I. Pyrroloquinoline quinone is plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16. *Plant Physiology*. v.146, p. 657-668, 2008.

Chowdhury, S. P., Nagarajan, T., Tripathi, R., Mishra, M. N., Le Rudulier, D. E Tripathi, A. K. Strain specific salt tolerance and osmoregulatory mechanisms in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, v.267, 72-79. 2007.

Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. e J. Lunec. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *The FASEB journal*. v.17, p 1195-1214, 2003.

Csonka, L.N. e A. D. Hanson. Prokaryotic osmoregulation: Genetics and Physiology. *Annual Reviews. Microbiology*. v.45, p.569-606. 1991.

Davies, M. J. The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1703, n. 2, p. 93-109, 2005.

de Oliveira, M. V. V. Análise da resposta de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 aos estresses iônico e osmótico: Aspectos fisiológicos e moleculares. 2012. 98f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes. 2012.

Döbereiner, J.; Reis, V.M.; Paula, M.A. e Olivares, F.L. Endophytic diazotrophs in sugarcane cereals and tuber plants. In: Palacios R, Mora J e Newton WE (eds). *New horizons in nitrogen fixation. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. v.17 p 671-676. 1993.

Ďuračková, Z. Some current insights in oxidative stress. *Physiological Research*., n. 59, p.459-469, 2010.

Elbein, A. D., Y. T. Pan, I. Pastuszak, D. Carroll. New insight on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, v.13, p. 17-27. 2003.

Empadinhas, N. e M. S. da Costa. Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *International Microbiology*, v. 11, p. 151-161. 2008.

Epstein, W. The roles and regulation of potassium in bacteria. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, v.75, p.293-320. 2003.

Fernandéz, M., Conde, S., de la Torre, J., Molina-Santiago, C., Ramos, J.L., e E. Duque. Mechanisms of resistance to chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 56, n. 2, p. 1001-1009, 2012.

Finkel, T. Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology*, v.194, n. 1, p.7-15, 2011.

França, M. B., A. D. Panek e E. C. Eleutherio. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp. Biochem. Physiol. A* 146:621–631. 2007.

Fuentes-Ramirez, L.E.; Jimenez-Salgado, T.; Abarca-Ocampo, I.R. e Caballero-Mellado, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivar of México. *Plant and Soil*. v.154 p.145-150, 1993.

Galar, M.I. e J.I. Boiardi. Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 43 , p. 713-716, 1995.

Gassel, M., T. Möllenkamp, W. Puppe e K. Altendorf. The KdpF subunit is part of the K⁺ translocating Kdp complex of *Escherichia coli* and is responsible for stabilization of the complex in vitro. *Journal Of Biological Chemistry*, v.274, n.53, p.37901. 1999.

Gulez, G., Dechesne, A., Workman, C.T. e B.T. Smets. Transcriptome dynamics of *Pseudomonas putida* KT2440 under water stress. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 78, n. 3, p. 676-683, 2012.

Halliwell, B e J. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. 4. ed. Oxford University Press, 2007.

Halliwell, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, v.141, p.312-322, 2006.

Han, S.H., Kim, C.H., Lee, J.H., Park, J.Y., Cho, S.M., Park, S.K., Kim, K.Y., Krishnan, H.B. e Y. C. Kim. Inactivation of *pqq* genes of *Enterobacter intermedium* 60-2G reduces antifungal activity and induction of systemic resistance. *FEMS Microbiology Letters*. v. 282, p. 140-146, 2008.

He, K., Nukada, H., Urakami, T e M.P. Murphy. Antioxidant and prooxidant properties of pyrroloquinoline quinone (PQQ) implications for its function in biological systems. *Biochemical Pharmacology*. v.65, p.67-74, 2003.

Hong, R., Kang, T. Y., Michels, C.A. e N. Gadura. Membrane lipid peroxidation in cooper alloy-mediated contact killing of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. v.78, n. 6, p. 1776-1784, 2012.

Imlay, J.A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual Review of Biochemistry*, v.77, p. 755-776, 2008.

Intorne, A.C., de Oliveira, M.V.V., Lima, M.L., Silva, J.F., Olivares, F.L. e G.A. de Souza Filho. Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Archives of Microbiology*. v.191, p. 477-483, 2009.

Iturriaga G., R. Suárez e B. Nova-Franco. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, v.10, p.3795-3810. 2009.

James, E. K, F. L. Olivares, A. L. M. De Oliveira, F. B. Dos Reis Jr, L. G. Da Silva e V. M. Reis. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *Journal of Experimental Botany*, v.52, n.357, p.747. 2001.

Jimenez-Salgado, T., L. E. Fuentes-Ramirez, A. Tapia-Hernandez, M. A. Mascarua-Esparza, E. Martinez-Romero e J. Caballero-Mellado. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Applied Environmental Microbiology*. v.63, n.9, p.3676-3683. 1997.

Joshi, S.G., Cooper, M., Yost, A., Paff, M., Ercan, U. K., Fridman, G., Friedman, G., Fridman, A. e A. D. Brooks. Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.53, n. 3, p. 1053-1062, 2011.

Kasahara T, Kato T. Nutritional biochemistry: a new redox-cofactor vitamin for mammals. *Nature*. v.422, p.832, 2003.

Kempf, B. e E. Bremer. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology*, v. 170, n.5, p.319-330. 1998.

Khairnar, N.P., Kamble, V.A., Mangoli, S.H., Apte, S.K. e H.S. Misra. Involvement of a periplasmatic protein kinase in DNA strand break repair and homologous recombination in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. v.65, n.2, p.294-304, 2007.

Khairnar, N.P., Misra, H.S. e S.K. Apte. Pyrroloquinoline-quinone synthesized in *Escherichia coli* by pyrroloquinoline-quinone synthase of *Deinococcus radiodurans* plays a role beyond mineral phosphate solubilization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.312, p. 303–308, 2003.

Kim, J., Harada, R., Kobayashi, M., Kobayashi, N. e K. Sode. The inhibitory effect of pyrroloquinoline quinone on the amyloid formation and cytotoxicity of truncated alpha synuclein. *Molecular Neurodegeneration*. v.5, n.20, p. 1-11, 2010.

Kitko, R. D., J. C. Wilks, G. M. Garduque e J. L. Slonczewski. Osmolytes contribute to pH homeostasis of *Escherichia coli*. *Plos One*, v. 5.4. 2010.

Krishnamoorthy, G., Tikhonova, E.B. e H.I. Zgurskaya. Fitting periplasmic membrane fusion proteins to inner membrane transporters: mutations that enable *Escherichia coli* AcrA to function with *Pseudomonas aeruginosa* MexB. *Journal of Bacteriology*. v.190, n. 2, p. 691-698, 2008.

Krueger, F.R., Werther, W., Kissel, J. e E.R. Schmid. Assignment of quinone derivatives as the main compound class composing 'interstellar' grains based on both polarity ions detected by the 'Cometary and Interstellar Dust Analyser' (CIDA) onboard the spacecraft STARDUST. *Rapid Commun Mass Spectrom*. v.18, n.1, p.103-111, 2004.

Luna, M. F., Aprea, J., Crespo, J. M. e J. L. Boiardi. Colonization and yield promotion of tomato by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Applied Soil Ecology*. v.61, p. 225-229, 2011.

McIntire, W.S. Quinoproteins. *The FASEB Journal*. v.8, p. 513-521, 1994.

Mclaggan, D., J. Naprstek, E. T. Thurman e W. Epstein. Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. Journal Of Biological Chemist , v.269, n.3, p.1911. 1994.

Miller, J.H. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y. 1972.

Misra, H.S., Khairnar, N.P., Barik, A., Priyadarsini, K.I., Mohan, H. e S.K. Apte. Pyrroloquinoline quinone: a reactive oxygen species scavenger in bacteria. FEBS letters. v. 578. p. 26-30, 2004.

Misra, H.S., Rajpurohit, Y.S. e N.P. Khairnar. Pyrroloquinoline quinone and its versatile roles in biological processes. Journal of Biosciences. v.37, p. 313-325, 2012.

Mitchell, A; Romano, G. H.; Groisman, B.; Yona, A.; Dekel, E.; Kupiec, M.; Dahan, O. e Y. Pilpel. Adaptative prediction of environmental changes by microorganisms. Nature. v. 460, p. 220-225. 2009.

Moradi, A., A. Tahmourespour, M. Hoodaji e F. Khorsandi. Effect of salinity on free living - diazotroph and total bacterial populations of two saline soils. African Journal of Microbiology Research. v. 5, n. 2, p. 144-148, 2011.

Morbach, S. e R. Krämer. Impact of transport processes in the osmotic response of *Corynebacterium glutamicum*. Journal of Biotechnology, v. 104, p. 69-75. 2003.

Muñoz Rojas, J. e J. Caballero Mellado. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito. E. Martínez-Romero e J. Martínez-Romero. Microbios en línea. Universidade Nacional Autónoma de México, p.157-176. 2001.

Mustakhimov, I. I., A. S. Reshetnikov, V. N. Khmelenina, e Y. A. Trotsenko. Regulatory aspects of ectoine biosynthesis in halophilic bacteria. Microbiology, v. 79, n. 5, p. 583-592. 2010.

Muthukumarasamy, R., G. Revathi, S. Seshadri e C. Lakshminarasimhan. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a

promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science*, v.83, n.2, p.9. 2002.

Nakashima, K, A. Sugiura, H. Momoi e T. Mizuno. Phosphotransfer signal transduction between Mo regulatory factors involved in the osmoregulated kdp operon in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, v.6, n. 13, p. 1777-1784. 1992.

Nikaido, H. e H.I. Zgurskaya. AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. v.3, n.2, p. 215-218, 2001.

Oren, A. Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.63, n.2, p.334-348. 1999.

Pan, J., Wang, J., Zhou, Z., Yan, Y., Zhang, W., Lu, W., Ping, S., Dai, Q., Yuan, M., Feng, B., Hou, X., Zhang, Y., Ma, R., Lui, T., Wang, L., Chen, M. e M. Lin. IrrE, a global regulator of extreme radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*, enhances salt tolerance in *Escherichia coli* and *Brassica napus*. *PLoS One* v.4:e4422, 2009.

Pastor, J. M., M. Salvador, M. Argandoña , V. Bernal , M. Reina-Bueno , L. N. Csonka , J. L. Iborra , C. Vargas, J. J. Nieto , M. Cánovas. Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. *Biotechnology Advances*, v.28, p. 782-801, 2010.

Pereira, C. S. e P. H. Hunenberger. Effect of trehalose on a phospholipid membrane under mechanical stress. *Biophysical Journal*, v. 95, p. 3525-3534. 2008.

Pittelkow, M., B. Tschapek, S. H. J. Smits, L. Schmitt e E. Bremer. The crystal structure of the substrate-binding protein OpuBC from *Bacillus subtilis* in complex with choline. *Journal of Molecular Biology*. v.1, p. 53-67. 2011.

Polarek, J. W., G. Williams e W. Epstein. The products of the kdpDE operon are required for expression of the Kdp ATPase of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, v.1 74, n.7, p.2145. 1992.

- Poljsak, B. e I. Milisav. The neglected significance of “antioxidative stress”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. p. 1-12, 2012.
- Poolman, B. e E. Glaasker. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Molecular Microbiology*, v.29, n.2, p.397-407. 1998.
- Poolman, B., P. Blount, J. H. A. Folgering, R. H. E. Friesen, P. C. Moe e T. Heide. How do membrane proteins sense water stress? *Molecular Microbiology*, v.44, nA, p.889-902. 2002.
- Pos, K. M. Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochimica et Biophysica Acta*.v.1794, p.782–793, 2009.
- Puehringer, S., Metlitzky, M. e R. Schwarzenbacher. The pyrroloquinoline quinone biosynthesis pathway revisited: a structural approach. *BMC Biochemistry*. v. 9, n. 8, 2008.
- Rajpurohit, Y. S. e H. S. Misra. Characterization of a DNA damage-inducible membrane protein kinase and its role in bacterial radioresistance and DNA strand break repair. *Molecular Microbiology*. v.77, n.6, p. 1470-1482, 2010.
- Rajpurohit, Y. S., Gopalakrishnan, R. e H. S. Misra. Involvement of a protein kinase activity inducer in DNA double strand break repair and radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Journal of Bacteriology*. v.190, n.11, p. 3948-3954, 2008.
- Ramakrishnan, S; Rajesh, M e K. N. Sulochana. Eales’ disease: Oxidant stress and weak antioxidant defence. *Indian Journal of Ophtalmology*, v.55, p.95-102. 2007.
- Reinhold-Hurek B. e T. Hurek . Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in Microbiology*. v.139 p.44. 1998.
- Reis, V. M. e J. Döbereiner. Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Archives of Microbiology* , v.171, n.1, p.13-18. 1998.

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

Roehrs, M., Valentini, J., Paniz, C., Moro, A., Charão, M., Bulcão, R., Freitas, F., Brucker, N., Duarte, M., Leal, M., Burg, G., Grune, T. e S.C. Garcia. The relationships between exogenous and endogenous antioxidants with the lipid profile and oxidative damage in hemodialysis patients. BMC Nephrology. v.12, 2011.

Rucker, R., Storms, D., Sheets, A., Tchapanian, E. e A. Fascetti "Biochemistry: is pyrroloquinoline quinone a vitamin?". Nature. v. 433, p.10–11, 2005.

Salisbury, S.A., Forrest, H.S., Cruse, W.B. e O. Kennard . A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenases. Nature. v.280 p.843–844. 1979.

Sambrook, J e D.W. Russel. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 3^a ed. 2001.

Saravanan V. S., M. Madhaiyan e M. Thangaraju. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. v.66, n.9, p.1794-1798. 2007.

Saravanan, V. S., M. Madhaiyan, J. Osborne, M. Thangaraju e T. M. Sa. Ecological Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Nitrogen-fixing Acetobacteraceae Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. Microbial Ecology, v.55, n.1, p. 130-140. 2008.

Saum, S. H .e V. Müller. Regulation of osmoadaptation in the moderate halophile *Halobacillus halophilus*: chloride, glutamate and switching osmolyte strategies. Saline Systems, v.4.4. 2008.

Scandalios J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, n.38, p.995-1014, 2005.

Schmid, A., Benz, R. e B. Schink. Identification of two porins in *Pelobacter venetianus* fermenting high-molecular-mass polyethylene glycols. *Journal of Bacteriology*. v. 173., n. 16, p. 4909-4913, 1991.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. e M. Pessarakli. Reactive oxygen species, oxidative damage, e antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*. p. 1-26, 2012.

Shirkey, B., D. P. Kovarcik, D. J. Wright, G. Wilmoth, T. F. Prickett, R. F. Helm, E. M. Gregory, and M. Potts. Active Fe-containing superoxide dismutase and abundant sodF mRNA in *Nostoc commune* (cyanobacteria) after years of desiccation. *Journal of Bacteriology*. v.182 p.189–197. 2000.

Siedenbiedel, F. e J.C. Tiller. Antimicrobial polymers in solution and on surfaces: overview and functional principles. *Polymers*. v. 4, p. 46-71, 2012.

Singh, L. R., N. K. Poddar, T. A. Dar, R. Kumar e F. Ahmad. Protein and DNA destabilization by osmolytes: The other side of the coin. *Life Sciences*, v.88, p.117-125. 2011.

Starr, L.M., Fruci, M. e K. Poole. Pentachlorophenol induction of the *Pseudomonas aeruginosa* mexAB-oprM efflux operon: Involvement of repressors NalC and MexR and the antirepressor ArmR. *Plos One*. v.7, n.2, p. e32684, 2012.

Stephan, M.P.; Oliveira, M.; Texeira, K.R.S.; Martinez-Drets, G. , Döbereiner, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiology Letters*. v..77 p.67–72, 1991.

Strom, A. R. e I. Kaasen. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Molecular Microbiology* , v.8, n.2, p.205-210. 1993.

Stumpe, S., A. Schlösser, M. Schleyer e E. P. Bakker. K⁺ circulation across the prokaryotic cell membrane: K⁺ uptake systems. *Handbook of biological physics*, v.2, p.473-499. 1996.

Styvold, O. B. e A. R. Strom. Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli* K-12 strains: influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalase. *Journal of Bacteriology*, v.173, n.3, p.1187. 1991.

Tejera, N. A., E. Ortega, J. González López e C. Liuch. Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Journal of Applied Microbiology*, v.95, n.3, p.528-535. 2003.

Trchounian, A. e H. Kobayashi. Kup is the major K⁺ uptake system in *Escherichia coli* upon hyper-osmotic stress at a low pH. *FEBS Letters*, v.447, n.2-3, p.144-148. 1999.

Tripathi, A. K., B. M. Mishra e P. Tripathi. Salinity stress responses in the plant growth promoting rhizobacteria, *Azospirillum* spp. *Journal of Biosciences*, v. 23, n.4, p.463-471. 1998.

Velázquez-Hernández, M., V. Baizabal-Aguirre, F. Cruz-Vázquez, M. Trejo-Contreras, L. Fuentes-Ramírez, A. Bravo-Patifio, M. Cajero-Juárez, M. Chávez-Moctezuma e J. Valdez-Alarcón. *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. *Archives of Microbiology*, v.193, n.2, p. 137-149. 2011.

Vriezen, J. A. C., F. J. De Bruijn, e K. Nusslein. Responses of Rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, p.3451–3459. 2007.

Wang, L., Ji, C., Xu, J., Dai, J., Wu, D., Wu, M., Zou, X., Sun, L., Gu, S., Xie, Y. e Y. Mao. Cloning and characterization of a novel human homolog of mouse U26, a putative PQQ-dependent AAS dehydrogenase. *Molecular Biology Reports*. v.32, p47-53, 2005.

Weerapana, E. e B. Imperiali. Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology*. v. 16, n. 6, p. 91-101, 2006.

Wei, Y. H., F. W. Yuan, W. C. Chen e S. Y. Chen. Production and characterization of ectoine by *Marinococcus* sp. ECT1 isolated from a high-

salinity environment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 111, n. 3, p. 336-342. 2011.

Westerling, J., Frank, J. e J.A. Duine. The prosthetic group of methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium X* electron spin resonance evidence for a quinone structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.87 p.719–24. 1979.

Wondrak, G. T. Redox-directed cancer therapeutics: Molecular mechanisms and opportunities. *Antioxidants & Redox signaling.* v.11, n.12, 2009.

Wood, J. M. Osmosensing by bacteria. *Science STKE*, n.357. 2006.

Wood, J. M. Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.63, n.1, p.230. 1999.

Wood, J. M. Bacterial osmoregulation: A paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annual Reviews. Microbiology*, v.65 p. 215-238. 2011.

Xiong, X., Zhao, Y., Xin, G., Yuan, S., Wang, J., Zhi, J., Yang, Y., Du, B., Guo, W., Wang, S., Yang, D. e W. Zhang. Production and radioprotective effects of pyrroloquinoline quinone. *International Journal of Molecular Sciences.* v. 12, p. 8913-8923, 2011.

Zakharyan, E., Trchounian, A. K^+ influx by Kup in *Escherichia coli* is accompanied by a decrease in H^+ efflux. *FEMS Microbiology Letters*, v.204, p. 61–64. 2001.

Zeuthen T. Water-Transporting Proteins. *Journal of Membrane Biology*, v.234. p. 57-73. 2010.

Zimmann, P., W. Puppe e K. Altendorf. Membrane topology analysis of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *Journal Of Biological Chemistry*, v.270, n.47, p.28282. 1995.

9- Anexo

Tabela 5: Taxa de inibição de *G. diazotrophicus* PAL5 selvagem (WT) e mutantes cultivados em meio líquido suplementado com NaCl (100mM), sacarose (600mM), Na₂SO₄ (250mM) e PEG-400 (300mM). Valores expressos em porcentagem.

	NaCl	SACAROSE	Na ₂ SO ₄	PEG
WT	43.9	57.6	-39	47.1
GDP12F06	3.8	47.7	92.1	88.3
GDP01F02	16.5	26.4	85.4	87.6
GDP13G12	12.7	13.4	84	83.2
GDP04A11	15.3	17.8	97	86.3
GDP12E03	11.9	70.3	68.5	99.4
GDP28B08	38.1	74.6	55.6	99.3
GDP02D03	33.8	78,0	45,8	73,2
GDP02E03	37,7	78,1	55,2	68,4
GDP03B11	3,6	78,7	70,3	74,8
GDP03D10	17,0	92,3	65,4	73,9
GDP03E09	96,3	71,7	95,1	81,9
GDP03F10	30,7	74,2	90,8	81,3
GDP04A09	3,7	80,0	69,4	73,9
GDP04B02	17,7	66,1	52,5	74,1
GDPO4F11	23,2	68,4	-70,9	62,1
GDP06C07	27,6	67,7	86,0	67,4
GDP06GO3	17,0	72,1	85,1	68,1
GDP07A04	-18,9	77,1	59,6	73,3
GDP07B01	-3,8	66,2	51,9	76,0
GDP07B11	19,6	66,8	32,2	74,4
GDP07E03	60,7	81,6	99,0	94,5
GDP07E09	27,1	70,1	96,7	70,4
GDP09A11	-24,6	56,5	92,8	65,4
GDP09D04	46,4	76,1	36,5	73,3
GDP09E02	13,2	73,2	48,8	77,5
GDP09E08	30,1	71,2	44,5	76,0
GDP09G02	29,8	74,0	63,1	69,5
GDP10C04	35,4	68,5	54,6	64,4
GDP10G02	41,8	74,1	48,0	60,6
GDP14A01	54,7	73,0	79,8	70,6
GDP14A02	43,3	78,6	48,5	71,5
GDP14A09	19,9	73,2	71,1	70,9
GDP14B02	40,8	76,4	64,7	71,9
GDP14B07	12,9	70,6	43,9	48,2
GDP14E07	31,3	75,1	98,8	78,1
GDP14E08	-17,3	58,5	37,8	65,5
GDP14F09	26,6	71,7	99,2	68,4

GDP14G01	33,6	72,0	-56,2	60,5
GDP14G09	38,9	75,9	98,7	68,7
GDP14H08	48,0	76,9	63,9	66,8
GDP15B08	37,2	79,2	77,7	73,2
GDP15D06	23,8	75,2	61,7	71,7
GDP15D07	21,2	69,8	12,1	62,1
GDP15E05	1,7	61,3	1,7	70,8
GDP15E08	0,2	60,7	35,2	62,3
GDP15E11	31,7	71,9	51,7	83,2
GDP15F11	26,2	69,9	60,6	67,1
GDP15G05	55,3	81,9	97,9	79,5
GDP15G11	41,7	79,8	52,1	70,1
GDP15H03	23,9	77,4	48,9	99,7
GDP17A07	48,6	80,8	96,5	66,0
GDP17C04	27,2	73,3	29,1	68,0
GDP19B01	26,4	95,8	99,3	73,4
GDP21A03	10,2	57,1	-4,4	12,1
GDP21B05	31,7	77,9	70,5	67,0
GDP21D11	31,9	77,2	49,1	66,5
GDP21F03	48,8	89,6	46,5	66,3
GDP21H07	29,7	72,0	48,3	67,6
GDP22A06	8,3	62,2	21,0	64,5
GDP22C06	24,2	66,6	53,7	70,6
GDP22H09	17,3	66,9	34,4	70,0
GDP23A12	21,5	87,1	77,0	84,7
GDP23C05	30,4	75,0	58,5	47,8
GDP23E10	27,5	74,1	38,0	65,3
GDP25C03	31,5	69,8	38,1	76,4
GDP25D02	33,5	75,2	37,9	59,1
GDP25D10	26,9	81,8	93,9	68,6
GDP25F03	21,6	63,2	38,8	98,9
GDP25F06	4,9	60,5	42,7	65,4
GDP25F10	18,4	72,8	89,1	77,5
GDP25G07	0,5	57,2	69,1	64,9
GDP25G09	34,3	77,7	60,0	69,4
GDP25H10	37,9	75,9	47,0	78,2
GDP26A04	35,2	80,7	26,5	64,1
GDP26B01	18,1	72,5	34,2	75,0
GDP27F06	20,6	71,1	49,4	77,8
GDP28A07	14,2	69,2	47,8	77,1
GDP28C07	91,2	80,3	51,9	70,5
GDP28D03	48,8	78,1	55,8	72,0
GDP28D07	99,8	71,9	45,6	68,5
GDP28E03	40,8	76,8	55,1	100,0
GDP28E07	95,9	73,2	59,3	68,5
GDP28G03	67,1	91,7	98,7	86,2

GDP28H11	98,1	72,0	29,7	65,1
GDP29D03	43,5	87,2	92,7	74,4
GDP01B03	28,0	69,2	71,5	76,8
GDP01B09	4,0	79,2	50,6	76,7
GDP01C05	27,4	75,4	57,9	67,8
GDP01C12	9,6	68,3	73,7	73,7
GDP01F07	17,1	72,9	65,2	79,4
GDP03D09	20,4	86,4	76,5	77,1
GDP03H07	22,0	76,0		59,6
GDP04D08	18,5	73,6	87,9	100,0
GDP04H07	38,1	82,1	65,5	76,1
GDP06F04	36,5	76,9	51,9	70,0
GDP07D04	-28,4	87,6	91,0	50,2
GDP07G09	41,2	81,8	58,7	74,4
GDP08A09	46,0	76,3	53,3	75,6
GDP08C07	44,3	81,2	74,3	75,8
GDP08D08	27,2	77,6	54,1	86,5
GDP08D11	27,4	73,5	49,6	61,1
GDP08F06	34,7	74,0	64,3	63,3
GDP08H10	70,8	76,4	93,9	71,9
GDP09C02	28,8	77,3	47,6	75,1
GDP10C08	32,0	74,4	52,8	77,2
GDP10C04	36,3	74,5	74,5	68,3
GDP11A09	36,1	68,6	44,8	76,0
GDP11G06	50,9	81,7	30,7	72,4
GDP12B05	53,2	84,4	59,0	79,5
GDP12C03	25,9	78,6	58,6	78,4
GDP12F10	7,1	68,1	-1,4	75,7
GDP12G09	12,8	77,2	84,0	51,6
GDP12H02	27,8	72,6	42,1	99,8
GDP13D05	37,0	85,2	50,2	69,1
GDP13H01	7,7	69,0	54,3	49,5
GDP14B08	19,3	65,3	60,6	78,1
GDP16B03	-9,1	59,3	28,7	57,0
GDP16B08	-44,1	63,6	90,5	65,1
GDP16E02	5,7	70,6	81,0	67,7
GDP18D03	32,1	96,4	50,2	77,3
GDP21E01	56,4	96,3	91,3	91,9
GDP21G06	26,2	79,9	94,5	94,0
GDP23A05	12,1	75,2	85,1	67,7
GDP23G07	25,6	76,3	60,1	78,1
GDP24D01	23,7	87,2	80,1	67,7
GDP24E04	19,5	81,4	46,2	84,0
GDP24G06	23,0	69,1	29,0	76,4
GDP25B03	2,0	81,9	65,9	73,7
GDP25C08	14,5	75,9	13,8	75,0

GDP25C10	7,7	78,8	20,5	78,1
GDP25D04	24,2	85,3	76,3	79,1
GDP25G06	28,7	77,7	71,6	78,5
GDP27A09	41,2	83,6	68,1	77,0
GDP27C01	26,8	83,1	54,0	76,5
GDP28B09	33,0	81,2	57,7	56,5
GDP28D11	17,8	88,7	0,0	24,2
GDP28H05	19,4	80,7	61,8	77,8
GDP29G06	29,2	79,8	18,0	70,3