

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

DISSERTAÇÃO

**Envolvimento da Proteína EnvZ nos Processos de
Osmotolerância e Fixação Biológica de Nitrogênio
em *Gluconacetobacter diazotrophicus***

José Rodrigo da Silva

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA EnvZ NOS PROCESSOS DE
OSMOTOLERÂNCIA E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO
EM *GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS***

JOSÉ RODRIGO DA SILVA

Sob a Orientação da Professora
Vera Lúcia Divan Baldani

e Co-orientação da Pesquisadora

Marcia Soares Vidal

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em
Agronomia, Área de Concentração
em Ciência do Solo

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2013

633.61

Silva, José Rodrigo da Silva, 1988-

S586e

Envolvimento da proteína EnvZ nos processos de osmotolerância e fixação biológica de nitrogênio em *Gluconacetobacter Diazotrophicus* / José Rodrigo da Silva. – 2013.

T

35 f.: il.

Orientador: Vera Lúcia Divan Baldani.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo.

Bibliografia: f. 29-35.

1. Cana-de-açúcar – Cultivo – Teses. 2. Nitrogênio na agricultura – Teses. 3. Nitrogênio - Fixação – Teses. I. Baldani, Vera Lúcia Divan, 1954- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

JOSÉ RODRIGO DA SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/02/2013.

Vera Lúcia Divan Baldani. Dra. Embrapa Agrobiologia
(Orientadora)

Leandro Azevedo Santos Dr. UFRRJ

Marcia Reed Rodrigues Coelho. Dra. Embrapa Agrobiologia

*Aos meus queridos e incansáveis pais, José e Ana
por toda a ajuda, apoio, compreensão e carinho.
DEDICO*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade concedida e pela minha vida.

Aos meus pais, José e Ana Maria por todo apoio dedicado a mim e por compreenderem a minha ausência em momentos tão importantes.

A meus irmãos Ronaldo e Romildo, suas esposas e meus queridos sobrinhos pelos momentos de descontração.

Aos meus orientadores Dra. Marcia Sores Vidal, Dra. Vera Lúcia Divan Baldani e Dr. José Ivo Baldani pela orientação e por estarem sempre disponíveis a me ajudarem.

À Helma Guedes pela bactéria e todos os seus trabalhos anteriores que me possibilitaram desenvolver essa dissertação.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

À UFRRJ, os professores do CPGA-CS e todos os funcionários que me ajudaram durante esses dois anos.

Aos pesquisadores e funcionários do Laboratório de Genética e Bioquímica, Multi Usuário de Biologia Molecular, Genoma, Gramíneas, Meio de Cultura e Sala de Lavagem por todo apoio e competência: Dr. Jean Luiz Simões de Araújo, Dra. Kátia Teixeira, Dr. Stefan Schwab, Patrícia, Carol, Tatiana, Aline, Fernanda, Natália, Lúcio, Wilson, Claudinho e Marildo.

Aos meus grandes amigos da EMBRAPA pela troca de experiências, apoio e descontração: Cleiton, Ana Luiza, Vivi, Patty, Leona, Rafaela, Francine, Mauro, Fernando, Esdras, Anita, Paula, Jéssica, Gabriela Shchuller e Gabriella Oliveira, Helder, as duas Vanessa, Carlos, Dani, Juliana, Diego, Jakson e Samuel.

Aos meus grandes amigos Leandro, Cris, Renata, Ciro, Aninha, Deividson, Karlinha e Gustavo pelos momentos de descontração e apoio na minha vida pessoal.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Aos membros da banca, Dra. Márcia Reed, Dr. Leandro Azevedo e Dra. Vera Baldani, pelas contribuições ao trabalho.

BIOGRAFIA

José Rodrigo da Silva nasceu no município de Macaparana - PE, no dia 13 de agosto de 1988. Em 2005 conclui o Ensino Médio no Colégio Estadual Presidente Dutra. Em 2006 ingressou no curso de graduação em Engenharia Agrônômica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo-o em 2010. Durante o período de graduação foi bolsista de Iniciação Científica (CNPq) no período de março de 2007 a novembro de 2010 exercendo suas atividades referentes à pesquisa na EMBRAPA Agrobiologia. Em março de 2011 ingressou no curso de Pós-Graduação em Agronomia com ênfase em Ciência do Solo, pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO

SILVA, José Rodrigo. **Envolvimento da enzima *envZ* nos processos de osmotolerância e fixação biológica de nitrogênio.** 2013. 35f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria endofítica diazotrófica isolada originalmente de plantas de cana-de-açúcar e utilizada como biofertilizantes na cultura. A fim de prospectar novos genes envolvidos direta ou indiretamente na Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) em *G. diazotrophicus* (PAL5^T), foi realizada, em trabalhos anteriores, a seleção de mutantes afetados neste processo. A estirpe selecionada, Mut29, foi mutada em gene homólogo a *envZ*, que codifica uma proteína osmosensora. Em outras bactérias essas proteínas estão envolvidas na transdução de sinal a respostas fisiológicas, como: osmorregulação, motilidade, e na produção de polissacarídeo extracelular envolvido na patogênese de plantas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a função osmosensora da proteína codificada pelo homólogo à *envZ* de *G. diazotrophicus*. Para tal, as estirpes utilizadas Mut29 e PAL5^T foram crescidas em meio do cultivo LGI-P contendo concentrações crescentes dos osmólitos sacarose, polietilenoglicol (PEG400) ou cloreto de sódio (NaCl). Neste meio foi avaliada a formação de películas aerotáticas, atividade da redução de acetileno, motilidade, formação de biofilmes e análise da expressão de alguns genes por RT-qPCR. Como resultado observou-se que a estirpe PAL5^T foi capaz de formar película e reduzir acetileno em todas as concentrações dos osmólitos utilizados, com exceção para algumas concentrações de cloreto de sódio. O Mut29 não foi capaz de formar película, característica de microrganismo diazotrófico, nem de fixar nitrogênio em nenhum dos tratamentos e meios utilizados. Por outro lado, o crescimento desse mutante em altas concentrações de diferentes osmólitos não foi afetado em relação à PAL5^T, indicando que existem outros mecanismos relacionados à osmotolerância em *G. diazotrophicus*. Os testes de motilidade e formação de biofilmes indicam que em PAL5^T, *envZ* está relacionada a produção ou movimentação de flagelos. Como conclusão, *envZ* tem importantes funções no metabolismo de *G. diazotrophicus*, que necessitam ser elucidadas, sugerindo que outros estudos sejam realizados.

Palavras-chave: FBN. Osmossensor. Diazotrófica. Cana-de-açúcar.

ABSTRACT

SILVA, José Rodrigo. **Involvement of EnvZ enzyme in osmotolerance and biological nitrogen fixation processes.** 2013. 35p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Gluconacetobacter diazotrophicus is an endophytic diazotrophic bacterium originally isolated from plants of sugarcane and used as biofertilizers in culture. In order to prospect new genes involved directly or indirectly in Biological Nitrogen Fixation (BNF) in *G. diazotrophicus* (PAL5^T) in previous studies was performed to select mutants affected in this process. The strain selected Mut29 was mutated in *envZ* gene homologous to that encoding an osmosensore protein. In other bacteria these proteins are involved in signal transduction to physiological responses such as: osmoregulation, motility, and production of extracellular polysaccharide involved in the pathogenesis of plants. This study aimed to evaluate the function of the osmosensore protein encoded by homologous to *envZ* of *G. diazotrophicus*. For this, the strains used PAL5^T and Mut29 were grown in the cultivation LGI-P containing osmolytes increasing concentrations of sucrose, polyethylene glycol (PEG400) or sodium chloride (NaCl). This medium was evaluated tactical air film formation, acetylene reduction activity, motility, biofilm formation and analysis of expression of some genes by RT-qPCR. As a result it was observed that the strain PAL5^T was capable of forming film and reduce acetylene at all concentrations of osmolytes used, except for some concentrations of sodium chloride. The Mut29 was not capable of forming film, characteristic of microorganism diazotrophic or to fix nitrogen in large concentrations of any of the treatments and medium. Moreover, the growth of this mutant at higher concentrations of different osmolytes was unaffected relative to PAL5^T, indicating that other mechanisms related to osmotolerance in *G. diazotrophicus*. Tests for motility and biofilm formation in PAL5^T indicate that *envZ* is related to production or handling of flagella. In conclusion, *envZ* has important functions in the metabolism of *G. diazotrophicus*, which need to be elucidated, suggesting that further studies should be conducted.

Keywords: BNF. Osmosensor. Diazotrophic. Sugarcane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Mecanismos de Osmotolerância em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	08
Figura 02. Cinética de crescimento das estirpes PAL5 ^T e Mut29 de <i>G. diazotrophicus</i> em meio LGI-P suplementado com concentrações crescentes de sacarose.....	16
Figura 03. Cinética de crescimento das estirpes PAL5 ^T e Mut 9 de <i>G. diazotrophicus</i> em meio LGI-P suplementado com concentrações crescentes de NaCl.....	17
Figura 04. Cinética de crescimento das estirpes PAL5 ^T e Mut 9 de <i>G. diazotrophicus</i> em meio LGI-P suplementado com concentrações crescentes de PEG400.....	18
Figura 05. Atividade de Redução de Acetileno de PAL5 ^T e Mut29 cultivadas em meio LGI-P líquido suplementado com concentrações crescentes de PEG400.....	21
Figura 06. Formação de película aerotática das estirpes PAL5 ^T e Mut29 de <i>G. diazotrophicus</i> crescidas em meio semi-sólido LGI-P.....	22
Figura 07. Testes de motilidade com PAL5 ^T e Mut29.....	23
Figura 08. Testes de formação de biofilme.....	24
Figura 09. Avaliação da expressão dos genes.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Composição do meio de Cultura Dygs.....	10
Tabela 02. Composição do meio de cultura LGI-P.....	10
Tabela 03. Oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificação de genes com função relacionada aos processos de osmotolerância e FBN em <i>G. diazotrophicus</i> por PCR em tempo real.....	14
Tabela 04. Crescimento e capacidade de formação de película de PAL5 ^T e Mut29 inoculadas em meio LGI-P semi-sólido com concentrações crescentes de Sacarose	19
Tabela 05. Crescimento e capacidade de formação de película de PAL5 ^T e Mut29 inoculadas em meio LGI-P semi-sólido com concentrações crescentes de NaCl	20
Tabela 06. Crescimento e capacidade de formação de película de PAL5 ^T e Mut29 inoculadas em meio LGI-P semi-sólido com concentrações crescentes de PEG400.....	20

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 - Fixação Biológica de Nitrogênio em Cana-de-açúcar.....	3
2.2 - Genes envolvidos no processo de FBN de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	4
2.3 - Transduções de Sinais e Osmoadaptação em Bactérias	5
2.4 - Osmotolerância em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	6
2.5 - Envolvimento do Sistema Protéico EnvZ/OmpR na Motilidade em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	8
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 - Estirpes de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Utilizadas.....	10
3.2 - Meios de Cultivo.	10
3.3 - Avaliação da Tolerância a Sacarose, NaCl e Polietileno Glicol 400 (PEG400).	11
3.4 - Avaliação da Viabilidade Celular, Potencial para FBN e Crescimento.....	11
3.5 - Avaliação da Atividade de Redução de Acetileno sob Condições de Estresse Osmótico	11
3.6 - Avaliação da Motilidade.	12
3.7 - Formação de Biofilme.....	12
3.8 - Análise do Padrão de Expressão Gênica por PCR em Tempo Real.	12
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 - Avaliação da Tolerância a Sacarose, NaCl e Polietileno Glicol (PEG400).....	15
4.2 - Avaliação da Viabilidade Celular, Potencial para FBN e Crescimento.....	18
4.3 - Medição da Atividade da Nitrogenase	20
4.4 - Motilidade e formação de Biofilme.	21
4.5 - Análise do Padrão de Expressão Gênica por PCR em Tempo Real.	24
5 - CONCLUSÕES	27
6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1 - INTRODUÇÃO

A cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) exerce um papel de grande importância na economia de diversos países, tendo maior destaque nas economias de países tropicais, em especial os da América Latina. O Brasil é atualmente o maior produtor mundial desta cultura com uma produção estimada de 596,63 milhões de toneladas para uma área plantada acima de 8,5 milhões de hectares, tendo um aumento de 670 mil hectares em relação à safra 2011/2012. Esses dados, além de mostrarem a importância incontestável dessa cultura para o país, mostram também, que mesmo sendo cultivada há muito tempo, ainda continua em expansão (CONAB, 2012).

É sabido que Poaceas como a cana-de-açúcar são beneficiadas pela associação com bactérias diazotróficas, que fixam o nitrogênio atmosférico que é uma alternativa importante para a substituição, mesmo que parcial, da adubação com nitrogênio. Assim, diversos estudos têm sido realizados na busca de diminuir a adubação nitrogenada, como por exemplo, o uso de genótipos com maior potencial para FBN, práticas no manejo da cultura (XAVIER, 2002), e a seleção de estirpes de bactérias eficientes (OLIVEIRA et al., 2002).

Desde os primeiros trabalhos de Johanna Döbereiner no fim da década de 1950, pesquisadores levantaram a hipótese de que microrganismos fixadores de N₂ poderiam desenvolver-se na rizosfera ou estar associados às plantas de cana-de-açúcar e serem responsáveis por significativas contribuições de N proveniente da atmosfera para a nutrição das plantas (XAVIER, 2002).

Depois do desenvolvimento do possível inoculante para cana-de-açúcar, OLIVEIRA et al. (2006) avaliaram o efeito da inoculação de misturas bacterianas em material micropropagado das variedades SP701143 e SP813250 e verificaram que aproximadamente 30% do nitrogênio acumulado foi proveniente da fixação biológica de nitrogênio atmosférico. Esses resultados indicam que a combinação das espécies *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Burkholderia tropica* no inoculante é uma estratégia viável para melhorar a FBN e a produtividade da cultura.

G. diazotrophicus é uma bactéria Gram-negativa e aeróbica que pertence à sub-classe das α -proteobactérias. Membro do gênero *Gluconacetobacter* da família *Acetobacteraceae*, essa espécie é capaz de oxidar etanol a ácido acético e apresenta-se em forma de bastonetes retos com extremidades arredondadas e dimensões aproximadas de 0,7 x 0,9 x 2,0 μ m (CAVALCANTE, 1988; MUTHUKUMARASAMY, 2002).

Além da promoção do crescimento vegetal via FBN, *G. diazotrophicus* também é responsável pela solubilização de P e Zn (LINU et al., 2009), síntese de fitohormônios como auxina (FUENTES-RAMIREZ et al., 1993) e giberelina (BASTIAN et al., 1998) e produz compostos antagônicos como bacteriocinas que tem a função de impedir o crescimento de possíveis microrganismos fitopatogênicos (BLANCO et al., 2004).

Um mutante de *G. diazotrophicus* foi desenvolvido por GUEDES (2010), interrompendo a ORF GDI_3079, que codifica uma proteína pertencente à classe de proteínas histidina quinases sensoras, com alto grau de similaridade com a proteína osmosensora EnvZ de *Escherichia coli*. Esta classe de proteínas está envolvida na transdução de sinal em bactérias, com função descrita para organismos como *E. coli*, *Salmonella* sp., *Erwinia amylovora* e outras, estando envolvida em processos como osmorregulação, metabolismo celular, motilidade, produção de polissacarídeo extracelular envolvido na patogênese de plantas e outros. Tendo em vista a importância das proteínas quinase nas vias de transdução de sinais que levam à expressão da nitrogenase, GUEDES avaliou a expressão dos genes *nifA*, *nifD*, *glnA* e *gltD*, tanto no mutante quanto na estirpe selvagem e, os resultados obtidos

sugerem que a proteína histidina quinase (GDI_3079) está envolvida na regulação da FBN em *G. diazotrophicus*.

Para os genes *nifA* e *nifD* que são um regulador transcricional da nitrogenase e uma subunidade da mesma, respectivamente, os resultados em LGI-P onde o conteúdo de sacarose é de 10% (relativamente alta) o Mut29 apresentou baixo nível de expressão para esses dois genes, diferindo de PAL 5^T. Quando cultivados em LGI (0,5% de sacarose) os resultados foram o oposto. Já a expressão relativa da glutamina (*glnA*) e glutamato sintase (*gltD*) foi maior no mutante do que na selvagem em resposta às baixas concentrações de íons amônio refletida pela ausência do nitrogênio fixado nessa condição.

Estes resultados abriram novas perspectivas para o papel dessa proteína na FBN, em especial para a compreensão das vias de transdução de sinal que possivelmente atuam na regulação da FBN e na osmotolerância de *G. diazotrophicus*.

Dessa forma, o objetivo dessa dissertação foi de avaliar o papel da enzima EnvZ e sua possível relação com a osmotolerância, fixação biológica de nitrogênio e sua possível participação na formação ou movimentação de flagelos em *G. diazotrophicus*.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Fixação Biológica de Nitrogênio em Cana-de-açúcar

Para um bom desenvolvimento de culturas como a cana-de-açúcar, além da disponibilidade de água, existe a necessidade de solos férteis, sendo o Nitrogênio um dos elementos mais requeridos. Constituindo a maior parte da atmosfera, esse elemento não está prontamente disponível para as plantas; entretanto, representa um dos mais importantes para o desenvolvimento vegetal, podendo ser fornecido por meio de descargas elétricas, da adubação com fertilizantes químicos, da mineralização da matéria orgânica presente no solo e pela Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) (FERNANDES, 1978; VAN LOON e DUFFY, 2001).

Uma das grandes vantagens da incorporação de nitrogênio via FBN aos diferentes ecossistemas de nosso planeta é a economia substancial de energia fóssil empregada na produção de fertilizantes nitrogenados necessários para atender a demanda da agricultura mundial (DIXON e KAHN, 2004).

A interação entre bactérias diazotróficas endofíticas e plantas da família das Poaceae é um tipo particular de associação, pois as bactérias colonizam os tecidos vegetais sem causar qualquer sintoma de doença, e promove o crescimento da planta. (DÖBEREINER, 1992).

Estudos realizados por URQUIAGA et al. (1992) mostraram que alguns genótipos de cana-de-açúcar podem obter até 60% das suas necessidades de nitrogênio via FBN. Outros estudos utilizando a técnica de Diluição do Isótopo ¹⁵N relatam que a contribuição da FBN para variedades de cana colhidas em áreas produtoras no Brasil é em média de 30% (BODDEY et al., 2001). Em variedades de cana-de-açúcar do Uruguai, a FBN levou uma incorporação de N entre 34,8 e 58,8% (TAULÉ et al., 2012). Plantas micropropagadas e inoculada com a estirpe selvagem PAL5^T de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, levaram a um aumento de 28% no peso fresco da parte aérea da planta em relação às plantas não inoculadas com esta bactéria (BALDANI et al., 1999).

Em plantas micropopagadas inoculadas com a mistura de diferentes espécies de bactérias diazotróficas levou a uma contribuição pela FBN de até 30% do Nitrogênio total acumulado, mostrando que há uma sinergia entre essas bactérias que agem melhor em conjunto do que quando inoculadas separadamente (OLIVEIRA et al., 2002); contudo, outros trabalhos de colonização detectaram que pode haver antagonismo entre algumas das estirpes componentes do inoculante (OLIVEIRA et al., 2009).

O primeiro inoculante para cana-de-açúcar, contendo as bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus* (REIS et al., 1994), *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* (OLIVARES et al., 1996), *Azospirillum amazonense* e a espécie *Burkholderia tropica* (REIS et al., 2004; PERIN et al., 2006) foi lançado em 2008 pela EMBRAPA Agrobiologia sendo que os estudos sobre a eficiência e impacto na nutrição nitrogenada da cultura ainda estão em andamento (REIS et al., 2009).

A inoculação proporcionou significativa contribuição da FBN para a variedade de cana-de-açúcar SP70-1143, em solos de baixa fertilidade, e promoveu produtividades similares às áreas que receberam fertilizante nitrogenado (OLIVEIRA et al., 2006). SCHULTZ et al. (2012), estudando a contribuição do inoculante para cana-de-açúcar em algumas variedades, observou que a variedade RB867515 apresentou uma quantidade de N total acumulado na parte aérea similar ao controle com adubação nitrogenada em condições de campo. PEREIRA et al. (2013) realizando experimentos também em campo observaram que essa mesma variedade respondeu positivamente à inoculação com as bactérias

diazotróficas. Sendo assim, a FBN em cana de açúcar é dependente das variedades utilizadas, níveis de fertilidade e manejo da cultura.

2.2 - Genes envolvidos no Processo de FBN de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Gluconacetobacter diazotrophicus foi originalmente isolada de raízes de cana-de-açúcar por CAVALCANTE e DÖBEREINER (1988). É caracterizada como gram-negativa pertencente ao grupo α -proteobactéria e fixa nitrogênio em condições microaeróbicas. Tem sido considerada uma das mais importantes na cultura da cana-de-açúcar, sendo encontrada em alto número, colonizando o interior de tecidos de raízes, colmos e folhas (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988), tanto em cultivares plantadas no Brasil, como na Argentina, Uruguai, México, Cuba, Estados Unidos, Índia, Canadá e Austrália (DONG et al., 1994, BALDANI et al., 1997, MUTHUKUMARASAMY et al., 1999). Além da cana-de-açúcar, também foi isolada de outras plantas, como: batata-doce, café (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997), capim-elefante (REIS et al., 1994), abacaxi (TAPIA-HERNANDEZ et al., 2000), *Eleusine coracana* (LOGANATHAN et al., 1999) e arroz (MUTHUKUMARASAMY et al., 2005; 2007). É encontrada até mesmo em insetos que infestam a cana-de-açúcar (ASHBOLT e INKERMAN, 1990).

Além da promoção do crescimento vegetal via FBN, *G. diazotrophicus* também pode contribuir na secreção de ácidos orgânicos, síntese de fitorreguladores sendo também produtora de bacteriocina (BERTALAN et al., 2009). Apresenta capacidade de se desenvolver em baixo pH (5,0 a 3,0), produz ácido acético a partir de etanol e tolera altas concentrações de sacarose (10% a 30%); TEIXEIRA et al., 1997). Essa capacidade de se desenvolver em altas concentrações de sacarose e baixo pH sugere a existência de mecanismos muito eficientes de proteção contra a acidez e de osmotolerância (STEPHAN et al., 1991; ALVAREZ e DRETS, 1995; REIS e DÖBEREINER, 1998). Uma vez que a sacarose não pode ser transportada ou metabolizada por *G. diazotrophicus*, esta secreta uma enzima, a levansucrase, que é capaz de hidrolisar sacarose em frutose e glicose (BATISTA et al., 1999; MARTINEZ-FLEITES et al., 2005).

Estudos sobre a genética e bioquímica da FBN em *G. diazotrophicus* revelaram que os genes estruturais para nitrogenase (*nifHDK*) são organizados em um agrupamento (GDI_0425-GDI_0454), que também contém outros genes relacionados a fixação de N₂, como: *fixABCX*, *modABC* e *nifAB*. Outros genes, *ntrX*, *ntrY* e *ntrC* (GDI_2263, GDI_2264 e GDI_2265) estão localizados em outras partes do cromossomo compondo um agrupamento de 5,2 kb (BERTALAN et al., 2009).

Acredita-se que em *G. diazotrophicus* a principal via para assimilação de amônia ocorre pela via glutamina sintetase / glutamato sintase (GS / GOGAT codificadas pelos genes *glnA* e *gltDB*, respectivamente) (ALVAREZ e DRETS, 1995); contudo, a análise do genoma sugere a existência de rotas alternativas, onde as possíveis enzimas NAD-sintase (GDI_0919), aminometiltransferase (GDI_2317), histidina amônia-liase (GDI_0550) e D-amino ácido desidrogenase (GDI_2422) que possam incorporar a amônia em diferentes compostos (BERTALAN et al., 2009).

Os genes *fix* desempenham um papel essencial para a FBN, principalmente no mecanismo de regulação da transcrição dos genes *nif*. O operon *fixLJ* em *Sinorhizobium meliloti*, codifica produtos que são essenciais para a fixação de nitrogênio simbiótica e respiração anaeróbica do nitrato e, além disso, diversos autores observaram que o produto desses genes constituem um sistema de dois componentes responsável pela regulação da expressão dos genes *nif/fix* em resposta a baixos níveis de oxigênio (DAVID et al., 1988; HERTNG et al., 1989).

Os genes *nifHDK* em *G. diazotrophicus* são responsáveis pela estrutura da nitrogenase, enquanto que os *nifE*, *nifN* e *nifX* codificam os cofatores para a enzima. Os genes

ntrB, *ntrC*, *ntrX* e *ntrY* codificam proteínas sensoras dos níveis de nitrogênio nesta bactéria (GUEDES, 2010).

Em diazotróficos simbióticos, a transcrição dos genes *nifA* e *fix* é predominantemente controlada pelo sistema de dois componentes FixL-FixJ que atuam em função da concentração de oxigênio, juntamente com FixK, ou por o sistema redox-sensor RegS-RegR (DIXON e KAHN, 2004). Em proteobactérias, o sistema de dois componentes NtrB/NtrC responde aos níveis de nitrogênio juntamente com proteínas sensoras do tipo PII regulando assim a expressão dos genes *nif* em *G. diazotrophicus*.

2.3 - Transduções de Sinais e Osmoadaptação em Bactérias

Os microrganismos podem, para sobreviver, alterar a sua morfologia, fisiologia, forma de crescimento e transcrição de genes em resposta às alterações no meio onde vivem, como a baixa ou excessiva disponibilidade de nutrientes, aceptores de elétrons para a respiração, mudanças na temperatura, pH e osmotolerância (WHITE, 2000). Tais adaptações são devidas a sistemas nos quais se transmitem sinais através da membrana celular para alvos intracelulares específicos, que podem levar à transcrição de genes, ativação de enzimas ou funcionalidade de componentes celulares, como por exemplo, a movimentação de um flagelo. Dentre esses sistemas, as histidinas quinase são enzimas que se destacam. Na maioria dos casos, o sinal causa a ativação ou inativação de fatores de transcrição citoplasmáticos, os quais são normalmente fosforilados podendo ser chamado de reguladores de resposta que junto com as histidinas formam um sistema de dois componentes (WHITE, 2000).

As histidinas quinases foram classificadas em três grandes grupos por MASCHER et al. (2006). O maior grupo contém uma região sensora periplasmática (ou extracelular), que é estruturada por pelo menos duas regiões transmembranares. O segundo é composto por histidinas quinases que se associam a membrana plasmática através de várias regiões transmembranares ligados por uma cadeia de aminoácidos curta. Geralmente, esse grupo é responsável pela percepção de sinais envolvidos com propriedades mecânicas do envelope celular, como: turgor e estresse mecânico. O terceiro grupo compreende as histidinas sensoras citoplasmáticas e inclui, tanto proteínas ancoradas na membrana como, proteínas solúveis, contendo domínios de entrada, ou seja, sensor de sinal citoplasmático, sendo que este último grupo é o responsável pela percepção dos níveis de O₂.

Para que células bacterianas possam sobreviver em ambientes com altas pressões osmóticas, é preciso manter uma pressão intracelular maior do que a do meio de crescimento, a fim de gerar turgor celular, geralmente considerada como a força motriz para extensão do crescimento celular e divisão (CSONKA, 1989). A capacidade de adaptar-se a mudanças na osmolaridade do ambiente externo é, portanto, de fundamental importância para o crescimento e sobrevivência, e, como tal, as células procarióticas têm evoluído no número de estratégias para lidar com flutuações na pressão osmótica onde vivem (SLEATOR e HILL, 2001).

De modo geral, existem duas estratégias de osmoadaptação que evoluíram para lidar com osmolaridade elevada: (i) acumulação de sal no citoplasma e (ii) acúmulo de osmólitos orgânicos ou solutos compatíveis (GALINSKI e TROPER, 1994). Típico das bactérias da família das Halobacteriaceae, o primeiro tipo acontece com a entrada de sal (KCl) dentro das células com o objetivo de equilibrar o conteúdo citoplasmático com o meio externo, em contra partida, para isso é requerido pela célula uma série de adaptações na sua estrutura para resistir essa pressão interna após a entrada dos íons (SLEATOR e HILL, 2001).

Mudanças nos fluxos de água no meio podem levar à lise celular (ambiente hipotônico) ou plasmólise e desidratação (ambiente hipertônico). Em resposta a esse estresse, inicialmente as células bacterianas aumentam seus níveis de K⁺ (EPSTEIN, 1986), seguido de um aumento drástico das concentrações de osmoprotetores no citoplasma, seja por síntese ou

absorção, sendo responsáveis pelas respostas secundárias ao estresse. Esses osmoprotetores são chamados de solutos compatíveis e são moléculas altamente solúveis que não interagem com proteínas, facilitando a sua acumulação em alta concentração intracelular e podem ser aminoácidos, glicina betaína, prolina, açúcares ou álcoois de açúcar (RECORD et al., 1998).

Para que as bactérias codifiquem enzimas que vão lhe ajudar durante a sobrevivência em condições de alta pressão osmótica, primeiro a célula percebe, por meio de sinais, mudanças no ambiente. Alguns desses transdutores de sinais já foram bem estudados e elucidados com detalhes, sendo os sistemas de dois componentes histidina quinase / regulador de resposta KdpD / KdpE e EnvZ / OmpR em *Escherichia coli* e MtrA / MtrB em *Corynebacterium glutamicum*, que serão discutidos em mais detalhe abaixo (REINHARD, 2010).

Estudos com *Escherichia coli*, um dos principais organismos modelos para a resposta de bactérias ao estresse osmótico, mostraram que diversos sistemas de osmoregulação têm sido encontrados. Nesta bactéria o acúmulo de K^+ em resposta a alta pressão osmótica é uma das primeiras respostas a perda de água e é intermediada pelos transportadores TrkA(G/H)SapD e KdpFABC (SCHLÖSSER et al., 1995). KdpD é um sensor tipo quinase integral de membrana, que junto com KdpE, um regulador da resposta citoplasmática, constitui um sistema que controla transcrição do *operon* KdpFABC, que são transportadores de potássio, em resposta ao estresse osmótico (SLEATOR e HILL, 2001). Esse sistema de dois componentes é ativado em condições de moderada a alta pressão osmótica para permitir o equilíbrio entre o meio inter e intracelular (CSONKA e HANSON, 1991)

Outro exemplo muito bem estudado de sistema de dois componentes osmosensitivos são o conjunto EnvZ / OmpR de *E. coli* (LEONARDO e FORST, 1996). Eles regulam a expressão dos genes que codificam as duas porinas de membrana externa ompC e ompF em dependência da osmolaridade externa (REINHARD, 2010). Em osmolaridade elevada, EnvZ se autofosforila e transfere o grupo fosfato para o regulador de resposta OmpR, levando à formação de OmpR fosforilado (OmpR-P). OmpR-P interage então com as regiões promotoras dos genes *ompF* e *ompC*, que codificam para as porinas OmpF e OmpC, respectivamente, que são transportadoras de solutos. A expressão diferencial destes genes é modulada de acordo com o nível OmpR-P celular (YUAN et al., 2011). EnvZ também atua como uma fosfatase, que desfosforila OmpR-P uma vez que o estresse osmótico desaparece (MATTISON e KENNEY, 2002). OSHIMA et al. (2002) constataram que mutações em *envZ/ompR* de *E. coli* alteraram, direta ou indiretamente, a expressão de mais de 100 genes, incluindo genes relacionados a biossíntese de aminoácidos com isoleucina e cisteína, transporte de ferro e maltose e síntese flagelar.

2.4 - Osmotolerância em *Gluconacetobacter diazotrophicus*

O principal sítio de localização de *G. diazotrophicus* é o apoplasto, onde a concentração natural de sacarose se aproxima dos 10% (DONG et al., 1994). Esta alta concentração de sacarose promove uma elevada pressão osmótica, que é responsável pela inibição do crescimento de muitos microrganismos; entretanto, tal concentração é considerada como ótima para o crescimento de *G. diazotrophicus*. Altas concentrações de sacarose influenciam na atividade da nitrogenase desta bactéria, diminuindo a inibição causada por altas pressões de O_2 e pelo aumento na concentração de amônio (REIS e DÖBEREINER, 1998). Mesmo assim a capacidade de *G. diazotrophicus* tolerar estresse osmótico tem sido pouco estudada.

A estirpe PAL5^T de *G. diazotrophicus* foi capaz de fixar nitrogênio crescendo em até 20% de sacarose (HARTMANN et al., 1991), porém com 30% no meio de cultura não apresenta atividade da nitrogenase, mesmo sendo osmotolerante (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988). Já na presença de NaCl, TEJERA (2003) observou que é capaz de

sobreviver em até 200 mM de sal, isso se houver uma maior concentração de sacarose no meio (10% ao invés de 1%), uma vez que ela só conseguiu crescer até 100 mM de NaCl quando havia apenas 1% de sacarose, indicando que a maior concentração de sacarose (10%) favorece o desenvolvimento dessa bactéria, que é normalmente adaptada a essa condição. Nessa mesma condição (10% de sacarose), REIS e DÖBEREINER (1998) detectaram atividade da nitrogenase em PAL5^T com até 180 mM de NaCl, já com 1% de sacarose no meio, apenas a uma concentração de 130 mM de NaCl foi detectado atividade da nitrogenase. Esses valores indicam ainda que *G. diazotrophicus* é pouco tolerante a pressões osmóticas provenientes de sal; contudo, altamente resistente a pressões por Sacarose, mostrando que existem mecanismos diferentes que detectam esses osmólitos no meio.

DELATORRE (2007) citado por OLIVEIRA (2008) relatou o efeito dos solutos compatíveis glicina betaína, prolina e colina sobre cultivos descontínuos de *G. diazotrophicus* PAL5^T sob estresse salino e verificou que tanto prolina quanto colina foram capazes de recuperar o crescimento de *G. diazotrophicus* em meio de cultura e acrescido de NaCl. Entretanto, glicina betaína não promoveu esta recuperação.

Gluconacetobacter diazotrophicus teve seu genoma totalmente sequenciado, sendo composto por um cromossomo com 3,9 Mb e dois plasmídeos com 16,6 kb e 38,8 kb, respectivamente (BERTALAN et al., 2009). Esses mesmos autores propuseram um modelo baseado nos genes homólogos relacionados à osmotolerância encontrados em *G. diazotrophicus* (Figura 1); todavia, esse modelo foi proposto tendo como base um organismo que vive em condições normais de açúcar. Dessa forma, outros mecanismos desconhecidos que protegem especificamente as bactérias contra as concentrações elevadas de açúcar podem atuar em *G. diazotrophicus*.

Nesse modelo estão presentes o sensor Kdp do sistema *kdpABCDE*, que regulam o fluxo de potássio. Um possível gene transportador dos solutos compatíveis betaína/prolina foi detectado. O genoma de *G. diazotrophicus* também abriga três transportadores de di e tripeptídeos (DppABC), duas ORFs que codificam um transportador Dtpt, também envolvidos na captação de di e tripeptídeos. O sensoriamento de altas pressões osmóticas em *G. diazotrophicus* pode ocorrer por meio do sistema de dois componentes envZ/OmpR; no entanto, as porinas OmpF e OmpC não foram encontradas, o que não descarta a possibilidade da existência dessas proteínas, uma vez que grande parte do genoma foi classificado com proteínas hipotéticas. Em bactérias, duas porinas (*aqpZ* e *glpF*) regulam a circulação de água e de alcoóis alifáticos através das membranas celulares, porém, homólogos a tais genes não foram encontrados no genoma de *G. diazotrophicus*; todavia, existem dois conjuntos de genes que codificam para gliceroporinas: um que contém *glpRDFK* e o outro composto de *glpDKF* (BERTALAN et al., 2009).

GUEDES (2010), obteve mutante de *G. diazotrophicus* interrompido na ORF GDI_3079, que codifica uma proteína pertencente à classe de proteínas sensoras do tipo histidina quinases, com alto grau de similaridade com a proteína osmosensora EnvZ de *E. coli*. Tendo em vista a importância das proteínas quinase nas vias de transdução de sinais que levam à expressão da nitrogenase, GUEDES avaliou a expressão dos genes *nifA*, *nifD*, *glnA* e *gltD*, tanto no mutante quanto na estirpe selvagem e, os resultados obtidos sugerem que a histidina quinase (GDI_3079) está envolvida na regulação da FBN em *G. diazotrophicus*. Os resultados encontrados abriram novas perspectivas para o papel dessa proteína na regulação da FBN em *G. diazotrophicus*, além de sua potencial participação na interação planta-microrganismo, muito por conta de seu possível envolvimento com tolerância osmótica, uma vez que o habitat desta bactéria apresenta elevada osmolalidade.

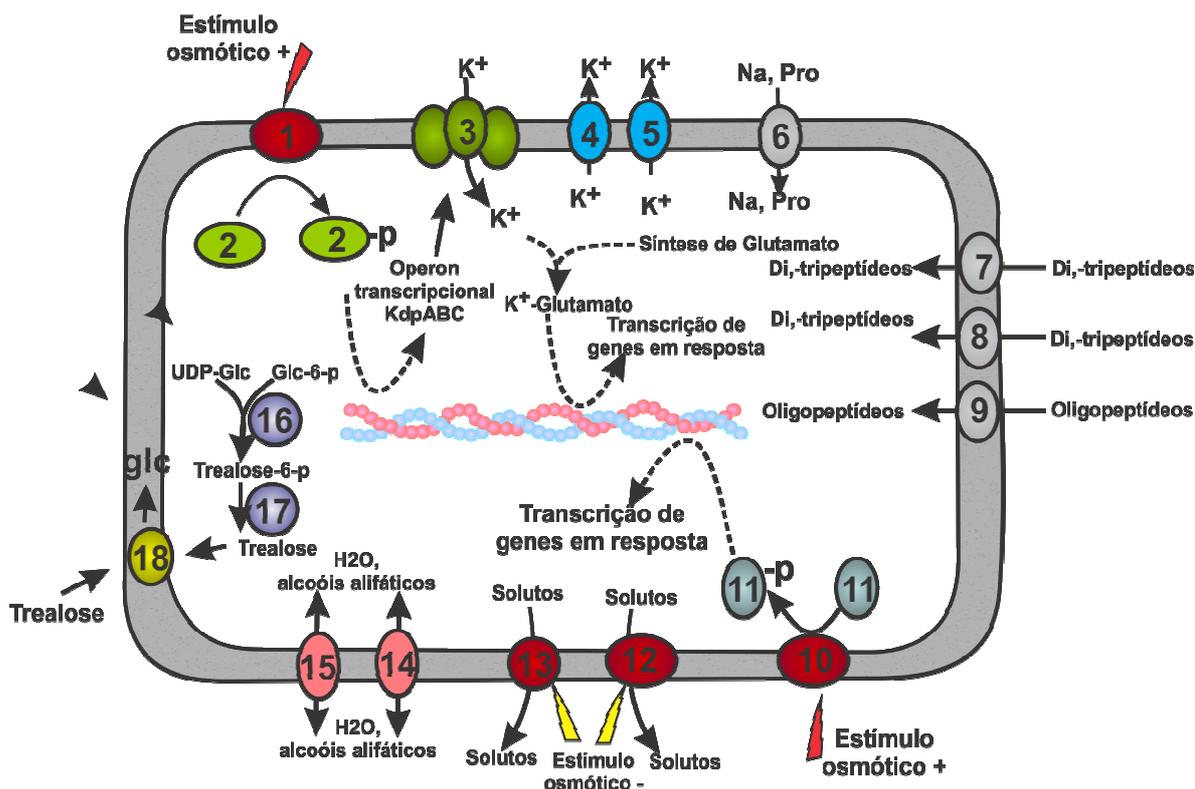


Figura 01. Mecanismos de Osmotolerância em *Gluconacetobacter diazotrophicus* – proposto por Bertalan *et al.* (2009). (1) Proteína Sensora kdpD; (2) Proteína Reguladora transcripcional kdpE; (3) Transportador de Potássio do tipo ABC (kdpABC); (4) Proteínas reguladoras do Sistema de glutathione kefB e (5) kefC; (6) Transportador de prolina/betaína; (7) Transportador Dpp ABC de dipeptídeos e tripeptídeos; (8) Transportador dtpT; (9) Transportador de Oligopeptídeo; (10) Sensor quinase EnvZ. (11) Regulador de resposta OmpR (GDI_3088); (12) Grande Canal Condutor MS (mscL). (13) Pequeno Canal Condutor MS (mscS); (14) glpRDFK; (15) glpDKF; (16) otsA; (17) otsB e, (18) Trealose Periplásmica (treA). A função das proteínas foi verificada pelo BLAST.

2.5 - Envolvimento do Sistema Protéico EnvZ/OmpR na Motilidade em *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Em bactérias, a motilidade mediada por flagelos possibilita a quimiotaxia, uma característica que possibilita que a bactéria realize um movimento em direção a uma concentração de uma substância benéfica, ou se afaste de substâncias tóxicas (WADHAMS *et al.*, 2004). MILLER *et al.* (2007) sugerem que a quimiotaxia tem um papel importante em ambientes com grandes variações em concentração de nutrientes, como é o caso da rizosfera. Uma questão interessante é, portanto, se a quimiotaxia teria um papel na colonização de raiz de plantas como a cana-de-açúcar por bactérias diazotróficas, sendo que os exudados das raízes poderiam atrair esta bactéria, como tem sido mostrado para várias outras bactérias (MILLER *et al.*, 2007).

Estudos de motilidade em placas de Petri mostraram que a estirpe selvagem PAL5^T de *Gluconacetobacter diazotrophicus* apresenta vários flagelos peritricos que provavelmente podem estar envolvidos no deslocamento e colonização de plantas. Nesse mesmo estudo foi demonstrado que o gene *flgA* tem relação direta na formação de flagelos nessa bactéria. (ROUWS *et al.*, 2008)

Além da movimentação e quimiotaxia, os flagelos também têm uma forte ligação com a formação de biofilmes que nada mais é do que a estreita associação que bactérias fazem com superfícies e interfaces em ambientes naturais, sob a forma de multicelular (PRATT e KOLTER, 1998; BRANDA et al., 2005).

Diversos papéis do sistema de dois componentes EnvZ/OmpR na resposta a estresses ambientais já foram mencionados acima, entretanto diversos autores relataram a ligação dessas proteínas transmembranas na síntese e regulação de flagelos em bactérias. YUAN et al. (2011) verificaram que EnvZ/OmpR está relacionado a motilidade em *Shewanella oneidensis*. Mutações em EnvZ/OmpR em *E. coli* também levaram a alterações na expressão de genes flagelares nessa bactéria (MATTISON e KENNEY, 2002). KIM et al. (2003) comprovaram que OmpR está ligado a motilidade e expressão de genes flagelares em *Xenorhabdus nematophila*, uma bactéria gram-negativa móvel. Esses resultados levam a hipótese de que talvez a mutação em *envZ* também possa influenciar a formação de flagelos em *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Utilizadas

- ✓ PAL5^T – Estirpe selvagem - Sensível ao antibiótico canamicina (Km^S) (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988);
- ✓ Mut29 – Estirpe derivada de PAL5^T mutada na ORF GDI_3079 pela inserção do transposon Tn5 (GDI_3079::Tn5) - Resistente ao antibiótico canamicina (Km^R), (GUEDES, 2010).

3.2 - Meios de Cultivo

As estirpes selvagem PAL5^T e mutante Mut29 de *G. diazotrophicus* foram cultivadas nos meios DYGS (RODRIGUES-NETO et al., 1986) ou LGI-P (CAVALCANTI e DOBEREINER, 1988). A composição dos meios encontra-se descrita nas Tabelas 01 e 02.

Tabela 01. Composição do meio de Cultura DYGS.

Meio DYGS	g.l ⁻¹
Glicose	2,0
Peptona bacteriológica	1,5
Extrato de Levedura	2,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Ácido Glutâmico	1,5

Todos os ingredientes foram adicionados à água destilada e o pH do meio foi ajustado para 6,0 com solução de KOH 10%. Para o preparo de meio sólido adicionou-se 15 g.l⁻¹ de ágar bacteriológico.

Tabela 02. Composição do meio de cultura LGI-P.

Meio LGI-P	g.l ⁻¹
Açúcar Cristal	100,0
K ₂ HPO ₄	0,2
KH ₂ PO ₄	0,6
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,001
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,32
	ml.l ⁻¹
Solução 0,5% de Azul de Bromotimol em 0,2 N de KOH	5
Solução de Vitaminas	1

Todos os ingredientes foram adicionados à água destilada e o pH do meio foi ajustado para 5,5 com solução de ácido acético 10%. Para o preparo de meio semi-sólido foram adicionados 1,6 g de ágar e para o meio sólido adicionou-se 25 g.l⁻¹. A fonte de nitrogênio foi 0,05 g.l⁻¹ de extrato de levedura. A solução de vitaminas utilizada consiste em 10 mg de Biotina e 20 mg de vitamina B6 em 100 ml de água destilada.

3.3 - Avaliação da Tolerância a Sacarose, NaCl e Polietileno Glicol 400 (PEG400)

A resposta das estirpes selvagem PAL5^T e mutante Mut29 de *G. diazotrophicus* quanto à tolerância osmótica foi determinada pela taxa de crescimento bacteriano durante o cultivo em meio LGI-P líquido modificado pela suplementação com diferentes concentrações dos osmólitos em questão: NaCl (0, 50 e 100 mM), Sacarose (0,5; 5,0; 10,0 e 20,0%) e PEG400 (0, 75 e 150 mM). Para tal foi preparado um pré inoculo com as estirpes crescidas em 5 ml de meio DYGS sob agitação de 120 rpm por 24 horas.

As taxas de crescimento das estirpes PAL5^T e Mut29 foram obtidas a partir da inoculação de 0,01 de D.O._{595nm}.ml⁻¹ das estirpes previamente crescidas em frascos erlenmeyers de 250 ml contendo 25 ml de meio líquido LGI-P suplementado com concentrações crescentes de sacarose empregada como fonte de carbono. Os frascos inoculados foram mantidos a 30°C por 120 horas sob agitação de 150 rpm. A densidade celular foi determinada a cada 12 h em cada um dos cultivos que foi medida em espectrofotômetro empregando o comprimento de onda (λ) de 595nm (D.O._{595nm}). Para a análise do crescimento em NaCl e PEG400 foram empregadas as mesmas condições acima citadas.

3.4 - Avaliação da Viabilidade Celular, Potencial para FBN e Crescimento

A viabilidade das estirpes PAL5^T e Mut29, assim como a sua possível capacidade para fixar nitrogênio atmosférico foram medidas em frascos com capacidade para 13 ml contendo 7 ml de meio LGI-P semi-sólido cultivadas na presença dos diferentes osmólitos. Em cada triplicata de frascos representando um tratamento foi realizada a inoculação de 20 μ l das estirpes com um crescimento de 10⁷ UFC.ml⁻¹. Os tratamentos foram: NaCl (0, 75 e 150 e 300 mM), Sacarose (0,5; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0%) e PEG400 (0, 100, 200 e 300 mM). A capacidade das estirpes formarem películas foi avaliada diariamente durante 15 dias. Cada frasco que apresentava a formação da película aerotática, era repicado para um segundo grupo de frascos com o objetivo de diminuir a fonte de nitrogênio no meio. Para cada tratamento, foram feitas duas repicagem, até se obter o terceiro grupo onde foram feitas as análises finais.

3.5 - Avaliação da Atividade de Redução de Acetileno sob Condições de Estresse Osmótico

A avaliação da redução de acetileno das estirpes PAL5^T e Mut29 foi realizada no meio LGI-P líquido contendo PEG400. Estas mesmas amostras foram utilizadas para estudos de expressão gênica por PCR em tempo real. Essa escolha se deu porque o PEG400 seria o reagente no qual não influenciaria o crescimento das bactérias por não causar estresse salino com o NaCl e não participar do metabolismo do carbono como a sacarose

Uma colônia de cada estirpe foi inoculada no meio líquido DYGS, sendo cultivados sob agitação a 200 rpm por 72 h a 30°C. As células foram suspensas com solução salina e a D.O._{595nm} ajustada para 0,4. Uma alíquota de 5 ml dessa suspensão foi transferida para frascos com capacidade de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura líquido LGI-P suplementado com 0, 75 e 150 mM de PEG400. As culturas foram incubadas a 30°C por 120 h, e cada 12 horas eram feitas análises da atividade da nitrogenase. Durante as análises, os frascos eram fechados com rolhas de borracha perfurável do tipo “sub-seal” estéreis e com o auxílio de uma seringa foi injetado 25 ml do gás acetileno (10% da fase gasosa do frasco) e o sistema ficou incubado por 1 h a 30°C. Posteriormente, 0,5 ml da fase gasosa do frasco foram injetadas, com o auxílio de uma seringa, em cromatógrafo de gás com ionização por chama, marca Perkin Elmer modelo F11 (Perkin Elmer, Japan, Yokohama, Japan), que permitiu a quantificação do etileno formado pela redução do acetileno.

3.6 - Avaliação da Motilidade.

Como o Mut29 apresentou má formação de película quando cultivado em meio semi-sólido, a motilidade dessa estirpe em comparação a PAL5^T foi avaliada em meio LGI-P modificado contendo 0,5% de sacarose, 10 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,25% de Agar como descrito por ROUWS et al. (2008) e três diferentes concentrações de PEG400 no meio (0, 75 e 150 mM) utilizando-se três (03) repetições. Para avaliação desse fenótipo, foram realizados dois experimentos.

O primeiro ensaio realizado foi o método designado como tubo de vidro em meio semi-sólido, que foi realizado da seguinte forma: tubos de vidro com diâmetro interno de aproximadamente 5 mm e comprimento de 3-4 cm vazados em ambas as extremidades foram colocados verticalmente em vidros contendo 7 ml de meio de cultura LGI-P semi-sólido. Cerca de 20 µl das estirpes selvagem e mutante, crescidas em meio de cultura DYGS líquido, foram colocados dentro dos tubos. Após cinco (05) dias de incubação a 30°C, a formação de película no meio de cultura semi-sólido fora do tubo foi avaliada.

Um segundo tipo de ensaio de motilidade foi realizado em placas de Petri. Uma alíquota de 10 µl de suspensão bacteriana das estirpes foi inoculada no centro das placas. Neste trabalho, o tipo de meio de cultura foi denominado de “agar de motilidade”. Como medida de motilidade foi usada o halo de crescimento da colônia bacteriana, a partir do ponto de inoculação no centro das placas de Petri. O tamanho dos halos foi medido diariamente.

3.7 - Formação de Biofilme

Foi avaliada a formação de biofilmes pelas estirpes PAL5^T e Mut29 de *G. diazotrophicus* em lâ de vidro, conforme descrito por OOSTHUIZEN et al. (2001). A lâ de vidro (Leco Ltd, USA) (0,1 g) foi colocada em frascos do tipo Erlenmeyer com volume de 125 ml contendo 25 ml de meio de cultura LGI-P [0,5% de glicose e 10 mM de (NH₄)₂SO₄].

Células de *G. diazotrophicus* cultivadas em meio DYGS crescendo durante 72 h tiveram sua D.O._{595nm} ajustadas pra o mesmo valor (0,2) e uma alíquota de 100 µl foi inoculada nos frascos contendo a lâ de vidro. As culturas foram incubadas durante 72 h, a 30°C, com agitação de 100 rpm. A D.O._{595nm} das culturas foi avaliada e, posteriormente, as mesmas foram descartadas. Foi adicionado 1 ml de cristal violeta, na concentração de 1%, a cada frasco, de forma que toda a lâ de vidro entrou em contato com o corante. Após aproximadamente 10 a 20 min, a lâ de vidro foi lavada rapidamente duas vezes com 50 ml de solução de Tampão Fosfato (0,5 M), seguido por duas (02) lavagens com 50 ml de solução salina, sob agitação de 150 rpm, durante 15 min. O corante cristal violeta que permaneceu aderido aos biofilmes (ou seja, às células aderidas à lâ de vidro) após as lavagens, foi extraído com 2 x 2 ml de EtOH absoluto. A D.O._{560nm} foi avaliada por meio de espectrofotometria e este valor foi usado como medida para quantificar a formação de biofilme. O experimento de formação de biofilme foi feito com três (03) repetições.

3.8 - Análise do Padrão de Expressão Gênica por PCR em Tempo Real

Após a definição das condições ideais para a identificação do fenótipo de tolerância as condições osmóticas em estudo, deu-se início a avaliação do perfil de expressão dos genes *envZ* e *ompR* nas estirpes selvagem PAL5^T e mutante Mut29 de *G. diazotrophicus*, bem como, de genes envolvidos na sinalização e fixação biológica de nitrogênio (*ntrX*, *ntrY*, *nifA*, *nifB*) por PCR em Tempo Real.

Passadas 64 horas de incubação, onde foi detectada a redução de acetileno, foi realizada a coleta de células, que imediatamente foram congeladas para análise do RT-qPCR.

As bactérias sedimentadas foram descongeladas em banho de gelo e o RNA total foi extraído através da adição de 1 ml do reagente Trizol (Invitrogen) previamente aquecido por 5

minutos a 65°C, seguido de agitação vigorosa com auxílio de um vórtex por 30 segundos e incubação em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente foram adicionados 200 µl de solução fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, e as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 2 a 3 minutos em temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 12000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida cuidadosamente com auxílio de pipeta para um novo microtubo, onde foi adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado e a mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 12000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspensionado em etanol 70% e posteriormente centrifugado a 12.000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente e dissolvido em 50 µl de água estéril do tipo Milli-Q (Millipore Corporation) tratada com DEPC. Foi separada uma alíquota deste material, onde 1 µl de enzima DNase (RNase-Free DNase I – Epicentre®) foi adicionada e a mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 75°C por 10 minutos para inativação da enzima.

Para sintetizar a primeira fita do DNA complementar 5 µg de RNA previamente tratado com DNase foram misturados 50 ng de iniciadores randômicos, 0,5 mM dNTP e água. Essa mistura foi aquecida a 65°C por 10 minutos e incubada no gelo por pelo menos 1 min. Em seguida, foi adicionado tampão 1X (First-Strand Buffer), 5 mM DTT e 40 U de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Cat. No. 10777-019) e 200 U de SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Cat. No. 18080-093). A mistura foi incubada primeiramente a 25°C por 5 minutos e, em seguida, a 50°C por 60 minutos.

As reações de Transcrição Reversa em Tempo Real (RT-qPCR) foram realizadas com amostras de cDNA diluídas 20 X e, utilizado o equipamento 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) em placas contendo 96 poços (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate - Applied Biosystems, Cat. No. N8010560 com selador *MicroAmp™ Optical Adhesive Film*® (Applied Biosystems, Cat. No. 4311971) com a utilização do kit Fast SYBR® Green PCR Master Mix, da empresa Applied Biosystems (Cat. No. 4385612), conforme as recomendações do fabricante, empregando oligonucleotídeos específicos para os genes: *rho* (Gene Normalizador), *envZ*, *ompR*, *ntrX*, *ntrY*, *nifA* e *nifB*.

A reação foi realizada partindo do seguinte programa: 95°C por dois minutos, seguidos por 40 ciclos envolvendo uma desnaturação a 95°C por 20 seg, anelamento e aquisição da fluorescência a 60°C por 30 seg. O equipamento 7500 Fast Applied Biosystems foi utilizado para a realização dos ensaios. Após a coleta dos dados brutos dos 40 ciclos de cada amostra, o programa Miner (ZHAO e FERNALD, 2005) foi utilizado para a obtenção do Ct (threshold cycle) e eficiência de cada amostra. A quantificação da expressão relativa foi realizada usando o método de $\Delta\Delta CT$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Todas as amostras foram analisadas em triplicata técnica e a média do Ct da amostra alvo foi subtraída da média do Ct do gene *rho*, empregado como gene de referência nos ensaios, que funciona como normalizador da concentração de cDNA de cada reação. Após a obtenção do ΔCT de cada amostra, este valor foi subtraído do ΔCT da amostra calibradora (Controle).

Tabela 03. Oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificação de genes com função relacionada aos processos de osmotolerância e FBN em *G. diazotrophicus* por PCR em tempo real.

Gene	Função	Oligo	Sequência
<i>envZ</i>	Possível histidina quinase osmosensora	envZ-F	5'-CATTTCGAAAGCGGACAGAAC-3'
		envZ-R	5'-GCAGTATGATCCTGACCTGAAG-3'
<i>ompR</i>	Regulador de Resposta de <i>envZ</i>	ompR-F	5'-TGCTGGACATGGAGCAAATC-3'
		ompR-R	5'-TTCAGCACATAGCCCTTGC-3'
<i>nifA</i>	Regulador Transcricional	nifA_F	5'-GGCGGTTCAACGAAACCA-3'
		nifA_R	5'-AACAGGTTGTCAGGACGTCCAT-3'
<i>nifB</i>	Síntese de cofator Fe-Mo	nifB-F	5'-TGCCTTCCTGCACAATATCATG-3'
		nifB-R	5'-GCCCCGTCAGTCCGAAATG-3'
<i>ntrX</i>	Proteína Reguladora de Nitrogênio	ntrX-F	5'-TTCCCACCATCATGATCTCC-3'
		ntrX-R	5'-ACTGGAAGGGCTTTTGGATG-3'
<i>ntrY</i>	Proteína Reguladora de Nitrogênio	ntrY-F	5'-GTGCCTTCAACCGCATGAC-3'
		ntrY-R	5'-GCACGGCTTCGGTAAAGC-3'
<i>RhO</i>	Gene normalizador	rhO-F	5'-GCAACTCGGAACTCATCCTC-3'
		rhO-R	5'-GGACCCACATCTTCGACAGT-3'

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Avaliação da Tolerância a Sacarose, NaCl e Polietileno Glicol (PEG400)

O crescimento da estirpe selvagem ou mutante apresentou diferenças quando submetidas às concentrações de sacarose em relação ao tempo de crescimento. Nas menores concentrações de sacarose no meio de cultivo (0,5 e 5%), tanto PAL5^T como o Mut29 mostraram um crescimento mais lento indicando que essas concentrações mínimas afetam o crescimento das duas estirpes. Estes resultados estão de acordo com CAVALCANTE e DÖBEREINER (1988) que mostraram ser 10% de sacarose o melhor crescimento para a estirpe selvagem PAL5^T.

Como esperado, 10 e 20% de sacarose apresentaram melhor crescimento; entretanto, não houve alterações nos crescimentos quando se comparam PAL5^T e Mut29. Esses resultados sugerem que Mut29 não sofre influência no seu crescimento por ter o gene *envZ* silenciado (Figura 01). Com 20% de sacarose houve um bom crescimento para as duas estirpes, entretanto há um decréscimo ao longo do tempo, o que não ocorre no tratamento com 10%, entretanto esse decréscimo acontece em ambas às estirpes. OLIVEIRA (2008), estudando mutantes sensíveis a estresse osmótico, observou que um mutante deficiente para a síntese de uma possível proteína *nifU* apresentou redução de até 50% de seu crescimento quando comparada a PAL5^T, ambas cultivadas em meio com 800 mM de sacarose (27,3%).

As porinas são proteínas transmembranares responsáveis pela difusão de pequenos metabólitos como açúcares, aminoácidos e íons. Dessa forma, controlam a pressão interna das células. Em *E. coli* essas proteínas são codificadas pelo sistema de dois componentes: a proteína sensora quinase EnvZ e o regulador de resposta OmpR (JIAN e INOUE, 2002). Como possivelmente o Mut29 teve seu homólogo a EnvZ interrompido, esperava-se que esse não apresentasse um crescimento similar a PAL5^T nas condições de alta osmolaridade, uma vez que a expressão dessas proteínas transmembranares seria deficiente. Contudo, de acordo com dados da anotação do genoma de *G. diazotrophicus*, as porinas OmpC e OmpF de *E. coli*, reguladas por EnvZ, ainda não foram identificadas neste microrganismo, muito embora tenha sido encontrado um grande número de isoformas de sistemas enzimáticos potencialmente envolvidos em osmotolerância como o KdpD que é um sensor tipo quinase integral de membrana que junto com KdpE, um regulador da resposta citoplasmática, constitui um sistema que controla transcrição do operon KdpFABC em resposta ao estresse osmótico (SLEATOR e HILL, 2001). Entretanto, outros mecanismos desconhecidos que protegem a bactéria especificamente contra altas concentrações de açúcar podem atuar em *G. diazotrophicus* (BERTALAN et al., 2009).

Quando as estirpes foram crescidas com concentrações crescentes de NaCl, foi visto que, apesar de pouca diferença no crescimento entre as duas, houve aumento na turbidez do Mut29 em relação a PAL5^T quando crescidas com 50 e 100 mM de NaCl. (Figura 03).

Através desse experimento foi possível observar o quanto as duas estirpes são sensíveis ao estresse salino, apresentando crescimento máximo, na menor concentração de sal (50 mM) de 0,2 de D.O., enquanto que o controle (sem sal) apresenta valores que chegam a 0,8 (Figura 03).

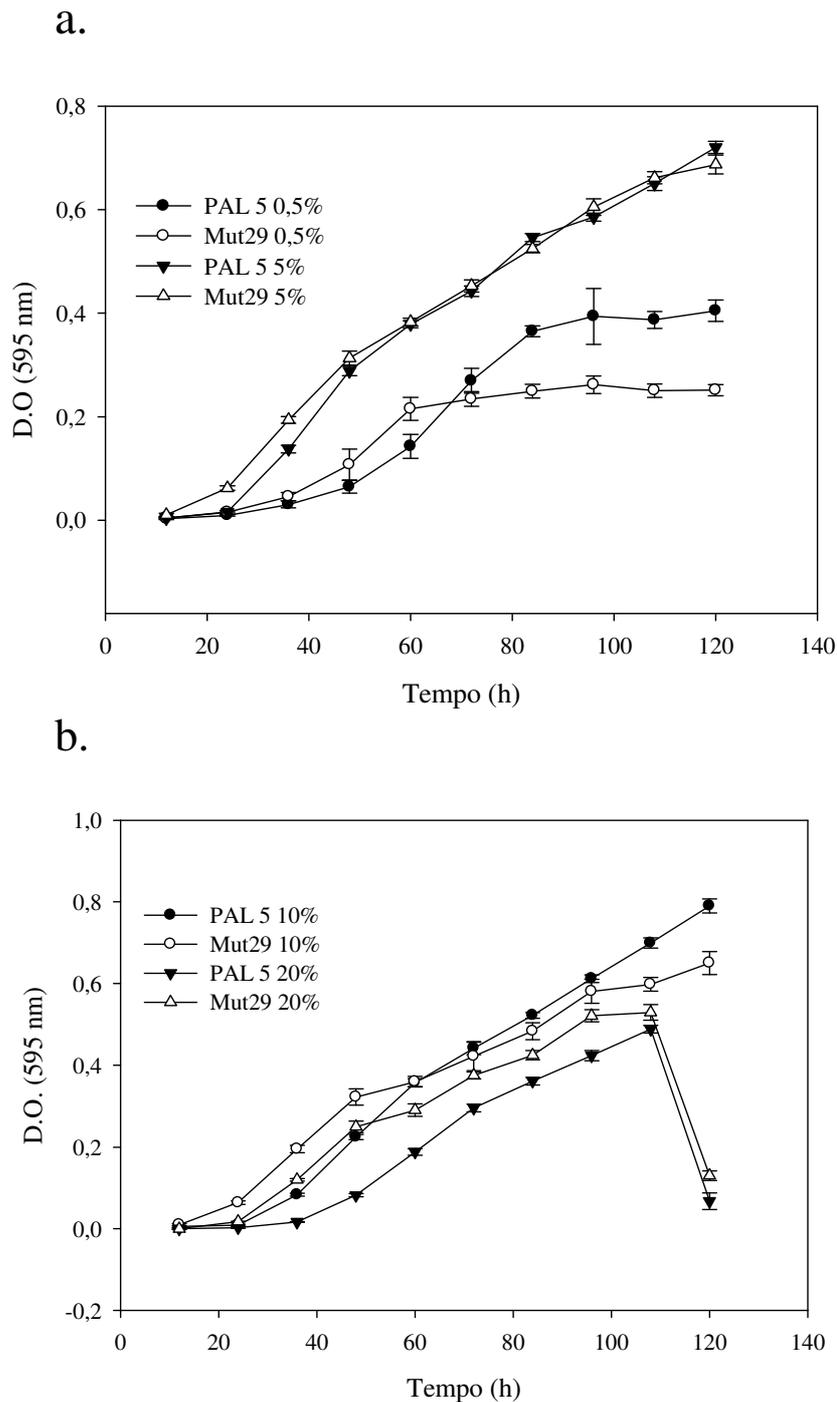


Figura 02. Cinética de crescimento das estirpes PAL5^T e Mut 29 de *G. diazotrophicus* em meio LGI-P suplementado com concentrações crescentes de sacarose durante 120 h, sendo: **a** - Menores concentrações de sacarose (0,5 e 5 %) e **b** - Maiores concentrações (10 e 20 %).

Visto essa sensibilidade das estirpes ao sal e resposta semelhante das duas estirpes ao estresse, também é descartada a possibilidade da mutação ter afetado a capacidade de Mut 29 resistir a essas condições de altas tensões osmóticas. Vale lembrar que apesar de *G. diazotrophicus* ser naturalmente adaptada a altas concentrações de sacarose, REIS e DÖBEREINER (1998) observaram que essa bactéria era pouco resistente a ambientes com alta salinidade, tendo a nitrogenase e outras enzimas relacionadas ao metabolismo do carbono

afetadas por esse estresse. Isso se justifica porque *G. diazotrophicus* é uma endofítica obrigatória, vivendo em plantas com grande quantidade de açúcar e não em solos salinos como é o caso de *Azospirillum halopraeferans* que foi isolada a partir de solo salino, o que é consistente devido a sua tolerância de até 0,5 M de NaCl (BALDANI et al.,1997; HARTMAN, 1987).

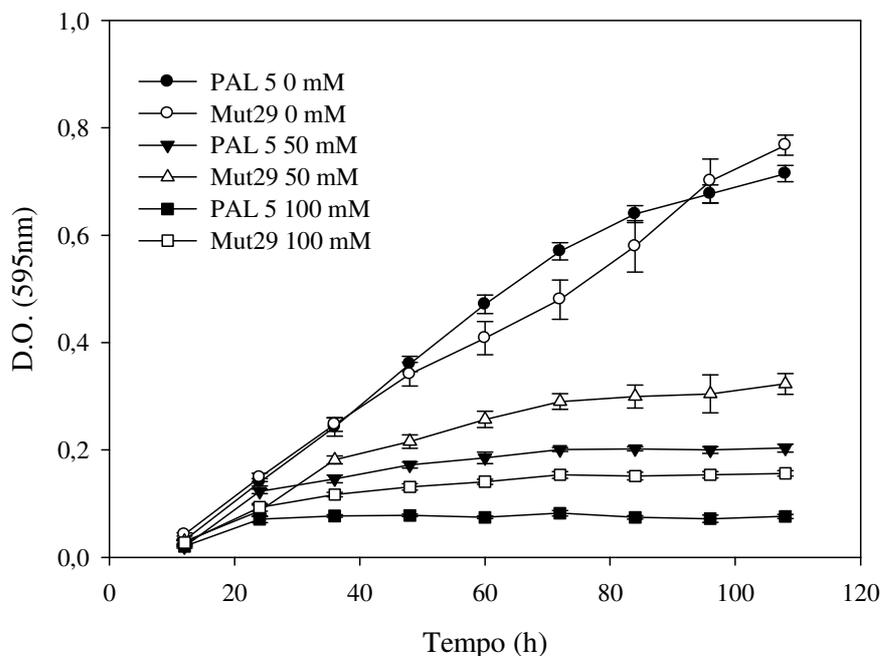


Figura 03. Cinética de crescimento das estirpes PAL5^T e Mut 29 de *G. diazotrophicus* em meio LGI-P suplementado com concentrações crescentes de NaCl durante 120 h.

O Polietilenoglicol (PEG400), por ser um reagente que não está relacionado ao metabolismo do carbono, como a sacarose e não conferir estresse salino além do osmótico, como o NaCl, seria o osmólito que conferiria menor resultado falso positivo, ou seja, se o Mut29 apresentasse menor resistência a altas concentrações desse reagente, provavelmente esse resultado se daria quase que exclusivamente à mutação, uma vez que PEG400 não é iônico, sendo assim não é metabolizado por *G. diazotrophicus* (HARTMANN et al., 1991).

Os resultados obtidos são similares aos de sacarose, ou seja, para aqueles tratamentos onde não houve PEG400 ou estava em baixa concentração (75 mM) o Mut29 apresentou uma menor densidade óptica do que PAL5^T. Por outro lado, com o tratamento de 150 mM, mesmo apresentando valores muito baixos de D.O., esses são similares aos atingidos por PAL5^T, demonstrando que o Mut29 não sofreu problemas quanto ao seu crescimento nos tratamentos com alta pressão osmótica quando comparado às menores concentrações (Figura 03).

Uma possível explicação para os resultados obtidos onde o controle sem PEG400, para Mut29, ter apresentado um baixo crescimento em relação a estirpe selvagem pode ser porque foi utilizado como fonte de carbono uma concentração de 0,5% de sacarose, sendo que essa concentração, como pode ser observada na Figura 2b, já afeta o crescimento da estirpe mutada. A escolha de 0,5% se deu para eliminar-se todos os outros osmólitos que pudessem provocar pressão osmótica nas bactérias.

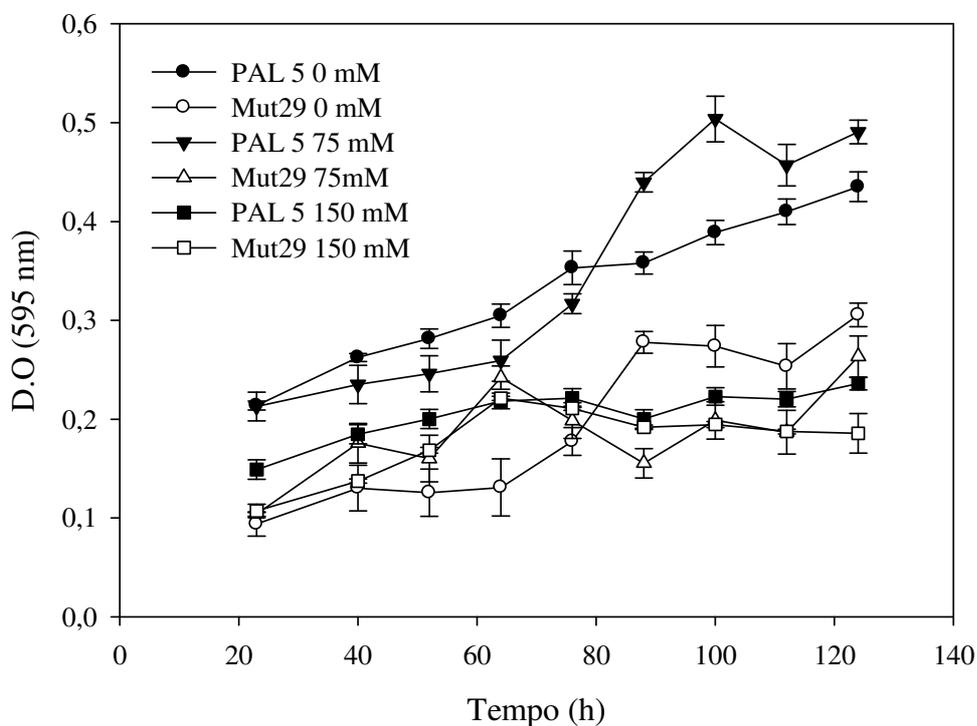


Figura 04. Cinética de crescimento das estirpes PAL5^T e Mut29 de *G. diazotrophicus* em meio LGI-P suplementado com concentrações crescentes de PEG400 durante 120 h.

4.2 - Avaliação da Viabilidade Celular, Potencial para FBN e Crescimento

As estirpes PAL5^T e Mut29 foram inoculadas em meio LGI-P semi-sólido sem fonte de nitrogênio contendo concentrações crescentes de sacarose, NaCl e PEG400 a fim de se verificar a formação de películas, que tem relação direta com a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. Os resultados encontram-se na Tabela 04.

A estirpe selvagem foi capaz de se manter viável em todas as concentrações de sacarose, mesmo com as sucessivas repicagens onde o nitrogênio, que foi introduzido junto com o pré-inóculo, já estava escasso. Essa capacidade de formar película aerotática era primeiramente observada nas maiores concentrações de sacarose (5, 10 e 20%). Esses resultados estão de acordo com REIS e DÖBEREINER (1988) que testaram a atividade da nitrogenase dessa estirpe com 1% de glicose e 10% sacarose e observaram a maior atividade quando havia 10 % de sacarose no meio. Isso se dá devido à adaptação natural dessas bactérias a essas condições de alta pressão osmótica.

O Mut29 não apresentou formação de película quando cultivado na menor (0,5%) nem na maior (20%) concentração de sacarose no meio de cultivo. Com 10% de sacarose, houve um retardo na formação da película. Um fato importante a se observar é que essa película formada não apresentava características similares à formada pela PAL5^T, sendo pouco superficial e com um agregado celular no centro do frasco. Esses resultados eram esperados, uma vez que GUEDES (2010) observou que o Mut29 não era capaz de fixar nitrogênio em meio LGI-P líquido (10% de sacarose).

Tabela 04. Crescimento e capacidade de formação de película de PAL5 e Mut 29 inoculadas em meio LGI-P semi-sólido com concentrações crescentes de Sacarose observadas durante 15 dias e submetidas a três repicagens. – (sem película), + (pequena formação), ++ (película característica).

PAL5 ^T (%)	Dias após inoculação												
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0,5	-	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
2,5	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
5	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
10	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
20	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Mut29 (%)													
0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quando as estirpes foram crescidas em meio LGI-P suplementadas com concentrações crescentes de NaCl, a estirpe selvagem mostrou formação de película até a concentração de 75 mM, entretanto, surpreendentemente, o Mut29 apresentou ainda um pequeno crescimento com 150 mM de NaCl (Tabela 05).

Esses resultados indicam que existem mecanismos diferentes de tolerância a sacarose e NaCl em *G. diazotrophicus*. REIS e DÖBEREINER (1998) também constataram isso quando compararam a resistência dessa bactéria a diferentes concentrações de sacarose e NaCl e observaram ainda que essa bactéria é mais tolerante a altas pressões causadas por sacarose e não por NaCl. Este fato pode ser justificado porque *G. diazotrophicus* é uma endofítica obrigatória, que vive e fixa em condições de alto teor de sacarose, como é a cana de açúcar (BALDANI et al., 1997). Por outro lado, *A. brasilense* SP7 teve o processo de FBN inativado sob estresse salino pela inibição da síntese de polipeptídeos da nitrogenase (TRIPATHI et al., 2002), mas pode ser parcialmente restaurado, na presença de glicina betaína que é um soluto orgânico que ajuda no controle do estresse osmótico em bactérias (CHOWDHURY et al., 2006).

No meio suplementado com diferentes concentrações de PEG400, PAL5^T formou película até 300 mM, demonstrando que essa bactéria consegue resistir a altas pressões osmóticas, mesmo empregando-se um osmólito diferente de sacarose no meio de cultura (Tabela 06); entretanto, a estirpe Mut29 cresceu tardiamente e só a uma concentração de 100 mM, indicando que possivelmente a ausência de nitrogênio no meio e a alta pressão osmótica impossibilitaram o seu crescimento e FBN, respectivamente. Estes resultados nos deram embasamento para utilizar o PEG 400 como osmólito nas demais análises realizadas.

Tabela 05. Crescimento e capacidade de formação de película de PAL 5 e Mut 29 inoculadas em meio LGI-P semi-sólido com concentrações crescentes de NaCl acompanhadas durante 15 dias. – (sem película), + (pequena formação), ++ (película característica).

Dias após inoculação													
PAL5^T (mM)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
75	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mut29 (mM)													
0	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
75	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
150	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 06. Crescimento e capacidade de formação de película de PAL5^T e Mut29 inoculadas em meio LGI-P semi-sólido com concentrações crescentes de PEG400 acompanhadas durante 15 dias. – (sem película), + (pequena formação), ++ (película característica).

Dias após inoculação													
PAL5^T (mM)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
100	-	+	+	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++
200	-	-	-	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++
300	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mut29 (mM)													
0	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.3 - Medição da Atividade da Nitrogenase

Além da observação da formação de películas que pode ser um indicativo da capacidade de fixar nitrogênio, a atividade da nitrogenase foi medida pela Atividade de

Redução de Acetileno (ARA) em meio LGI-P líquido modificado (0,5% de sacarose, 1 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Para esse experimento foram utilizados três tratamentos (0, 75 e 150 mM de PEG400). As avaliações da ARA foram feitas até 100 h onde não se observou mais atividade da nitrogenase para nenhum dos tratamentos.

Os resultados demonstraram que a estirpe selvagem foi capaz de fixar nitrogênio em todos os tratamentos, apresentando picos (0 e 75 mM de PEG400) por volta de quatro dias. Entretanto, para o tratamento de 150 mM, PAL5^T apresentou baixa atividade, demonstrando que a presença de uma pressão osmótica muito elevada pode afetar o processo de fixação de nitrogênio nessa bactéria (Figura 05).

A estirpe mutada não foi capaz de fixar nitrogênio para os tratamentos de 0 e 75 mM, entretanto, apresentou, mesmo que pouco expressiva, uma atividade da nitrogenase com 150 mM de PEG400. Isso pode ter se dado devido a contaminação com etileno ou erro de leitura já que apenas uma das repetições apresentou atividade.

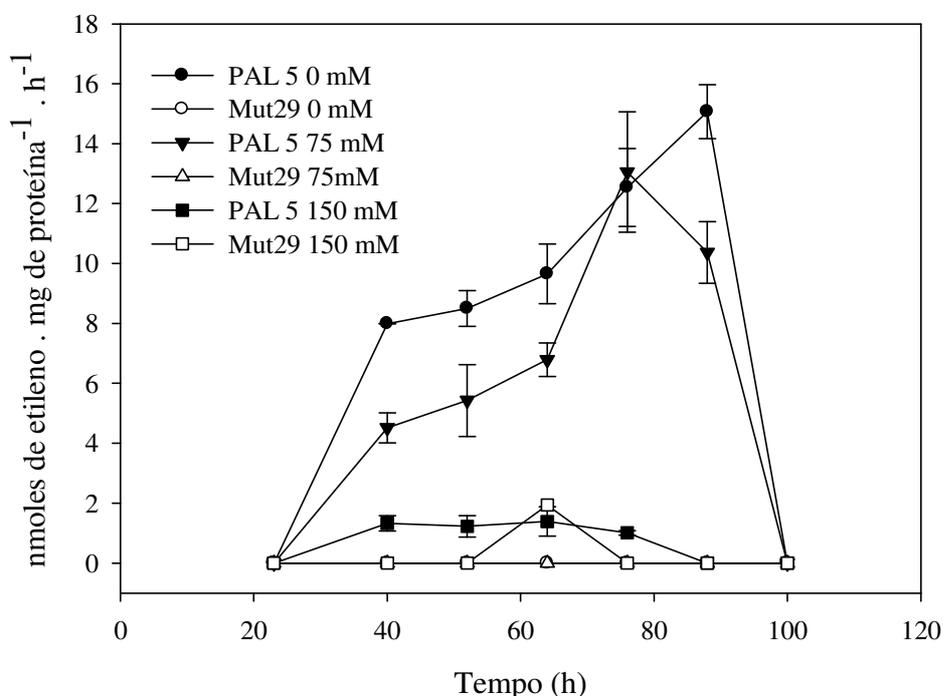


Figura 05. Atividade de Redução de Acetileno de PAL5 e Mut 29 cultivadas em meio LGI-P líquido suplementado com concentrações crescentes de PEG400 e analisadas a cada 12 h até 100 h. Dados médios de 3 repetições.

4.4 - Motilidade e Formação de Biofilme.

Ao se analisar a formação de películas em meio semi-sólido, para todos os tratamentos com os diferentes osmólitos, foi observado que o Mut29 apresenta uma característica de crescimento diferente da sua forma selvagem, havendo uma predominância das células e consequentemente, um crescimento mais significativo no local onde foi inoculado, não havendo formação de película característica na superfície do meio de cultura. Por outro lado, a estirpe selvagem PAL5^T rapidamente emergiu e formou uma película aerostática que lhe permite controlar o contato de oxigênio com o sítio ativo da nitrogenase, favorecendo a FBN. Essa observação levou a uma hipótese de que a mutação do gene *envZ* possa ter influenciado na formação de flagelos em Mut29, uma vez que se sabe que *G. diazotrophicus* apresenta flagelos (GILLIS et al., 1989).



Figura 06. Formação de película aerotática das estirpes PAL5^T (Esquerda “++”) e Mut29 (Direita “+”) de *G. diazotrophicus* crescidas em meio semi-sólido LGI-P.

Com base nestes resultados foram realizados dois tipos de ensaios de motilidade, um em placa, e outro com o sistema de tubo de vidro em meio semi-sólido (ver material e métodos).

Quando as bactérias foram colocadas em capilares de vidro, dispostos verticalmente em meio de cultura LGI-P semi-sólido, a estirpe PAL5^T foi capaz de formar uma película na superfície do meio de cultura fora do capilar após a incubação por três (03) dias (Figura 07). O Mut29 não foi capaz de formar a película; porém, apresentou crescimento dentro dos capilares, mostrando que o crescimento não foi prejudicado (Figura 07a). Foi observado que, em placas de Petri com agar de motilidade (0,25% de agar), a estirpe selvagem apresentou motilidade, com um aumento no diâmetro da colônia consideravelmente mais rápido. Esta expansão foi maior do que poderia ser explicado apenas pelo crescimento (Figura 07 b, c e d). Vale mencionar que as colônias expandidas de PAL5^T formadas por meio de motilidade, apresentam uma consistência de um filme fino, que quebra em fragmentos quando uma força mecânica é aplicada, indicando a existência de um grau de organização dentro da colônia.

A hipótese de que o Mut29 tenha perdido seu flagelo ou tenha dificuldades na sua movimentação sugere que possivelmente essa estirpe também tenha problemas na colonização de plantas e formação de biofilme, já que os flagelos têm um papel importante na formação de biofilmes (PRATT e KOLTER, 1998). Portanto, foram realizados experimentos com o objetivo de investigar e comparar a formação de biofilmes nas estirpes selvagem e mutantes, PAL5^T e Mut29, respectivamente.

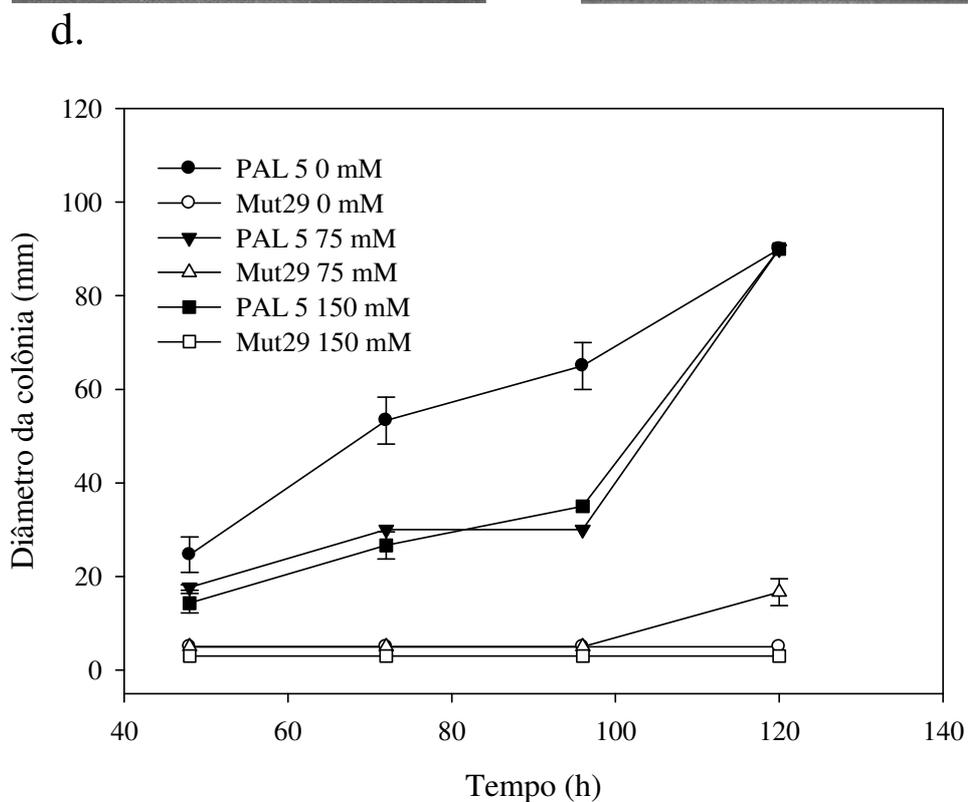
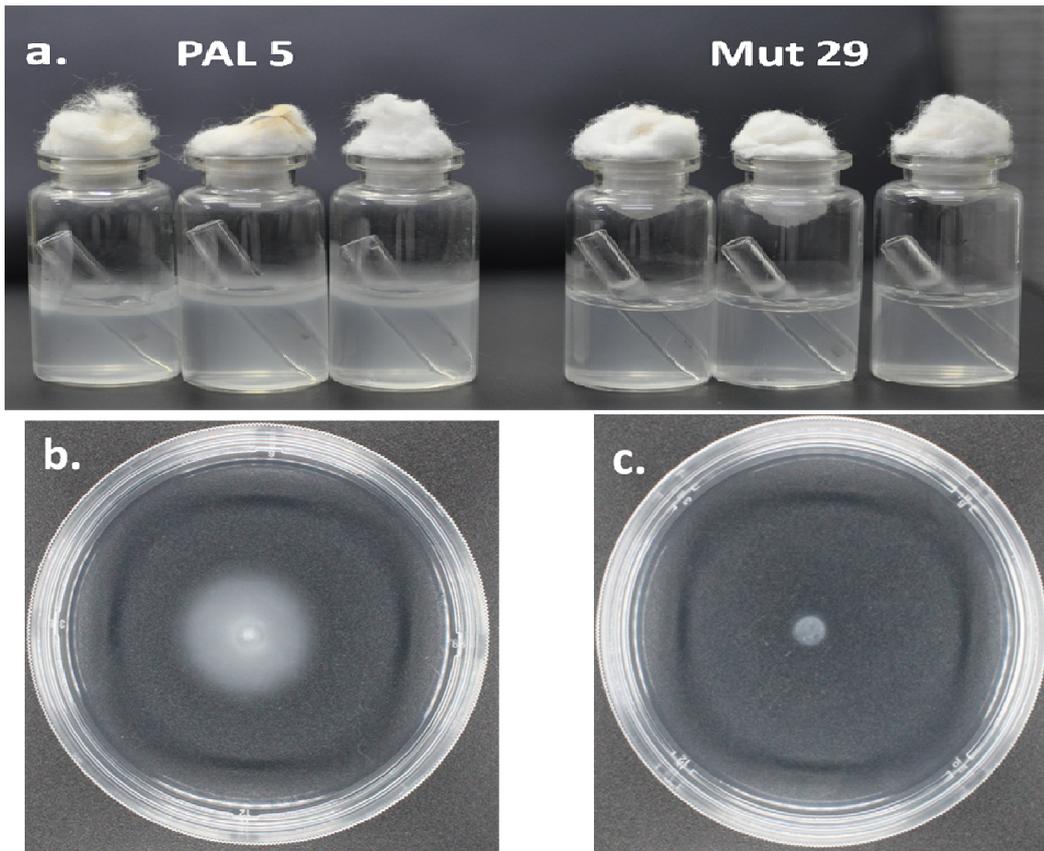


Figura 07. Testes de motilidade com PAL5^T e Mut29. Em a - Ensaio de tubo de vidro em meio semi-sólido”; b e c - Ensaio em placas com “agar de motilidade” e, d - Diâmetro do halo de crescimento por até 120 horas de incubação. Os erros padrão das médias de três repetições estão representados por barras.

O uso da lã de vidro como substrato para formação de biofilmes possibilitou a formação de agregados de células de PAL5^T após 72 h de crescimento apresentando valores médios de 0,25 de D.O._{560nm} enquanto que no Mut29 estes agregados foram observados no mutante, porém em menor quantidade com valores médios de 0,05 de D.O._{560nm} (Figura 08)

Esses resultados também sustentam a hipótese de que a mutação na proteína EnvZ tenha afetado a formação de flagelos em *G. diazotrophicus*.

Em *G. diazotrophicus* a formação de biofilme está relacionada à síntese de exopolissacarídeos (EPS) e o gene *gumD* foi identificado por MENESES et al (2011) como responsável pela produção dessas substâncias. ROUWS et al. (2008), estudando células obtidas de placas de motilidade mostrou que a estirpe selvagem PAL5^T de *Gluconacetobacter diazotrophicus* apresentava vários flagelos peritríquicos que provavelmente lhe auxiliam no deslocamento e colonização de plantas. Nesse mesmo trabalho também foi demonstrado que o gene *flgA* tem relação direta na formação de flagelos nessa bactéria e o silenciamento desse gene levou a uma diminuição significativa na produção de biofilmes no mutante em relação à estirpe selvagem PAL5^T.

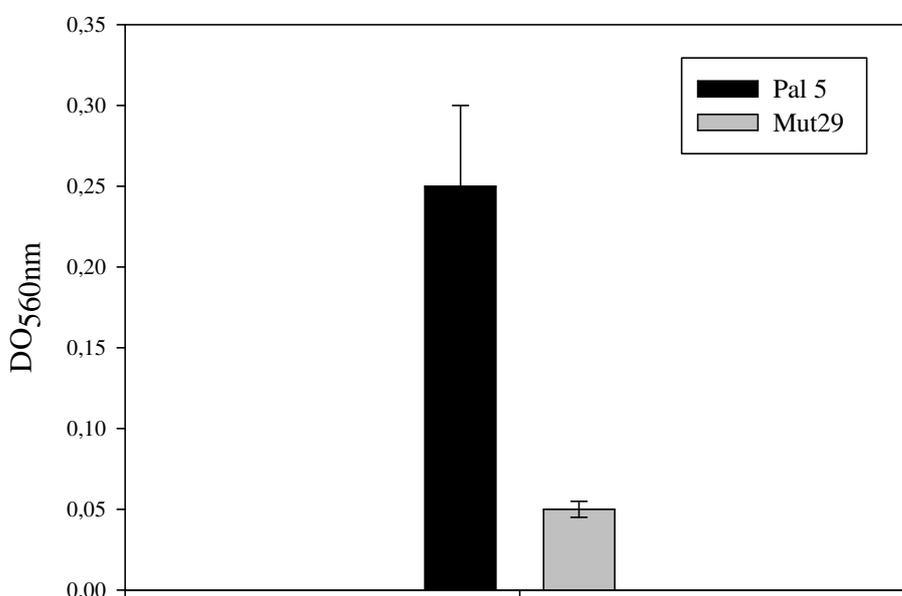


Figura 08. Testes de formação de biofilme para PAL5^T e Mut29 em LGI-P com lã de vidro crescidas durante 72 h. Os erros padrão das médias de três repetições estão representados por barras.

4.5 - Análise do Padrão de Expressão Gênica por PCR em Tempo Real.

No experimento de Atividade da Redução de Acetileno em meio LGI-P com concentrações crescentes de PEG400, foi verificada a expressão de genes relacionados à osmotolerância e a FBN em *G. diazotrophicus*. Quando a estirpe selvagem PAL5^T apresentou atividade da nitrogenase (64 h após incubação) foram feitas as extrações de RNA.

Para o gene *envZ*, como esperado, sua expressão foi relativamente baixa para o Mut29 em todos os tratamentos em comparação a estirpe selvagem; entretanto, para PAL5^T, os maiores valores foram observados no controle (sem PEG400) e na menor concentração que corresponde a 75 mM (Figura 09a). Esses resultados podem indicar que em *G. diazotrophicus* a proteína EnvZ deixa de atuar quando a bactéria é colocada em condições mais extremas de pressão osmótica.

Por outro lado, o regulador de resposta, *ompR*, responsável por promover a expressão das porinas OmpF e OmpC, teve sua maior expressão quando PAL5^T estava em sua maior concentração de PEG400 (Figura 09b), o que não parece muito coerente, uma vez que nessa mesma concentração *envZ* está relativamente baixa, isso pode se dar possivelmente pela fosforilação de OmpR por outras Histidinas quinase.

O gene *nifA*, em bactérias, é um regulador transcricional responsável pela transcrição dos genes *nif* (codificam para a nitrogenase) e são regulados pela concentração de Nitrogênio no meio (TEIXEIRA et al., 1999). Nesse experimento *nifA* apresentou maiores expressões em PAL 5, estando de acordo com a leitura da atividade da nitrogenase que não mostrou nenhuma atividade para o Mut29, enquanto que para PAL5^T, houve fixação em todos os tratamentos. Apesar dos valores baixos da expressão de *nifA* em Mut29, podemos observar também na Figura 09c que sem o osmólito PEG400 houve uma pequena expressão desse gene. Dessa forma, podemos sugerir que mesmo não apresentando taxa de fixação nesse tratamento, é provável que o gene *envZ* em condições de pressão osmótica esteja ligado a fixação de nitrogênio em *G. diazotrophicus*.

Resultados parecidos foram encontrados por GUEDES (2010) quando cultivou as duas estirpes em LGI e LGI-P, que observou que no primeiro meio o Mut29 apresentava uma taxa elevada na expressão de *nifA*, porém quando a mesma estirpe foi cultivada em LGI-P, onde há uma maior pressão osmótica, o mesmo não acontecia, mostrando uma redução significativa da expressão de *nifA*. Já em PAL5^T, onde *envZ* estava íntegro, a sua expressão foi superior quando cultivada em meio LGI-P, indicando que essa histidina osmosensora está ligada a FBN em *G. diazotrophicus*.

Em *G. diazotrophicus*, *nifB* está relacionado a produção do cofator FeMo para a nitrogenase (TEIXEIRA et al., 1999), nesse experimento sua expressão, como esperado, foi similar a do gene *nifA* apresentando maiores valores em PAL5^T do que em Mut29 (Figura 09d). Esses resultados sustentam novamente a hipótese de que *envZ* tenha relação direta com a FBN nesta bactéria. OLIVEIRA (2008) escrutinou uma biblioteca de *G. diazotrophicus* utilizando sorbitol a fim de identificar genes envolvidos com a tolerância osmótica e, identificou quatro mutantes sensíveis a altas concentrações desse osmólito, sendo um desses mutantes o *nifU* que nessa bactéria está relacionado a atividade fixadora de nitrogênio, evidenciando a grande ligação existente nos processos de FBN e osmotolerância.

Os genes *ntrXY* apresentaram o mesmo perfil de expressão um do outro e em *Azospirillum brasilense* estão envolvidos na percepção da concentração de nitrogênio extracelular e atuam como regulador potencial do metabolismo do nitrato, onde codificam proteínas que fazem parte de um sistema de dois componentes, sendo NtrY uma proteína transmembrana quinase sensora e NtrX uma proteína ativadora de transcrição (ISHIDA et al., 2002). Entretanto, em *G. diazotrophicus* a função desse par de genes ainda não foi caracterizada. Para esse experimento, os picos de maiores valores de expressão, para ambos os genes foi observado em PAL5^T com 150 mM de PEG400 e o Mut29 sem o osmólito (Figura 9e e 9f). Para o Mut29, o interessante a se observar é que, assim como para *nifA*, houve uma expressão relativa de *ntrXY* na condição sem osmólito, mesmo sem apresentar atividade da nitrogenase. Por outro lado, os resultados de ARA para PAL5^T não condizem com os obtidos no experimento de expressão, uma vez que os tratamentos sem PEG400 e com apenas 75 mM deste osmólito não apresentaram altos valores de expressão desse par de genes.

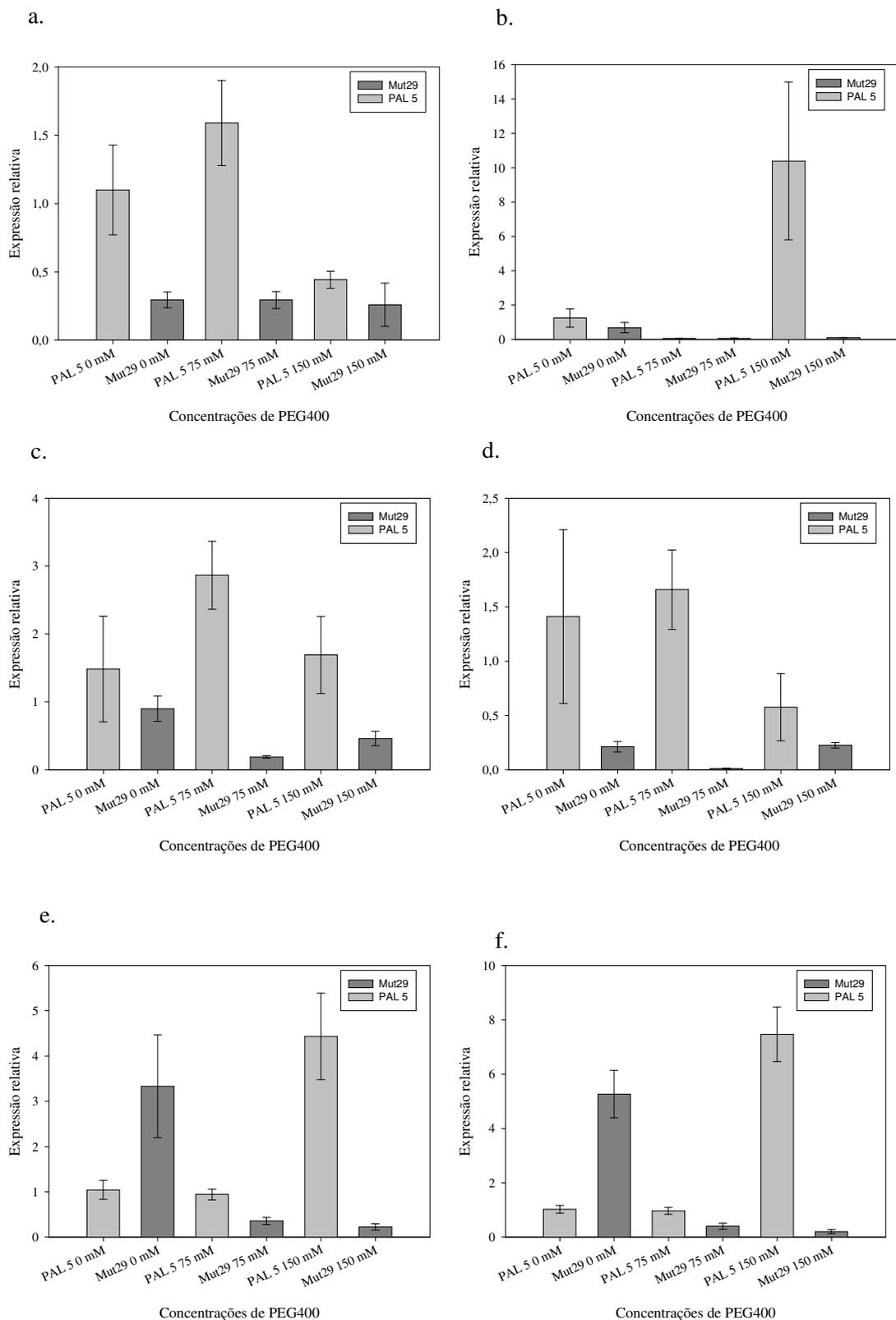


Figura 09. Avaliação da expressão dos genes que codificam a - histidina quinase osmosensora (*envZ*), b - Regulador de resposta (*ompR*), c - ativador transcricional (*nifA*), d - síntese de cofator Fe-Mo (*nifB*); e- proteína reguladora de Nitrogênio (*ntrX*), f - proteína reguladora de Nitrogênio (*ntrY*) através de qPCR, na estirpe mutante Mut29 e selvagem PAL5^T em meios LGI-P suplementado com concentrações crescentes de PEG400. Erro padrão média representado por linha vertical no centro das barras.

5 - CONCLUSÕES

O crescimento do Mut29 não foi afetado diretamente pelas altas concentrações dos osmólitos, apresentando comportamento similar ao da estirpe selvagem.

A mutação em *envZ* afetou o mecanismo de FBN em *G. diazotrophicus*, tanto em meio semi-sólido, para todos os osmólitos, quanto em meio líquido para o reagente PEG400.

G. diazotrophicus perdeu sua mobilidade em meio semi-sólido com a mutação em *envZ*, além de apresentar baixa capacidade na formação de biofilme.

Possivelmente existem outros mecanismos que regulam a tolerância de *G. diazotrophicus* a altas pressões osmóticas diferentes do conjunto EnvZ/OmpR.

Os genes *nifA* e *nifB*, *ntrX* e *ntrY* foram afetados em presença das diferentes concentrações de PEG400 no Mut29 e PAL 5^T.

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Visto a grande complexidade para entendimento dos mecanismos que regulam a osmotolerância e o envolvimento do conjunto EnvZ/OmpR na FBN em *G. diazotrophicus*, torna-se necessário estudos posteriores envolvendo a expressão gênica de genes relacionados com esses dois processos em ambas as estirpes.

Entre esses, se destacam os que codificam para as porinas OmpC e OmpF, sensores e transportadores de potássio como *kdpD*, *kdpE* e *kdpABC*, que estão envolvidos na osmotolerância. Além dos genes *nifHDK* envolvidos diretamente na FBN, assim como os que codificam para a nitrogenase.

A visualização do Mut29 por microscopia eletrônica de varredura seria mais uma interessante investigação a respeito dessa estirpe, uma vez que haveria a confirmação da perda de flagelos nessa bactéria.

Por fim, torna-se necessário a condução de experimentos de inoculação, incluindo o Mut29, com plantas micropopagadas e conduzidos em casa de vegetação para ratificar a importância de EnvZ em *G. diazotrophicus*.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, B.; DRETS, G.M. Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. **Canadian Journal Microbiology**, v. 41, p. 918–924, 1995.
- ASHBOLT, N.J.; INKERMAN, P.A. Acetic acid bacterial biota of the pink sugarcane mealybug, *Saccharicoccus sacchari*, and its environs. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 707–712, 1990.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.; DÖBEREINER, J. Recent advances in biological nitrogen fixation with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p. 911–922, 1997.
- BALDANI, J.I.; AZEVEDO, M.S.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J.. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S.; Lopes, A.S.; Guilherme, L.R.G.; Faquin, V.; Furtini Neto, A.E.; Carvalho, J.G. (Eds), Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Viçosa: SBCS/UFLA, p. 621–666. 1999.
- BATISTA, F. R.; HERNANDEZ L.; FERNANDEZ, J. R., ARRIETA, J.; MENENDEZ, C.; GOMEZ, R.; TAMBARA, Y. ; PONS, T. Substitution of Asp-309 by Asn in the Arg-Asp-Pro (RDP) motif of *Acetobacter diazotrophicus* levansucrase affects sucrose hydrolysis, but not enzyme specificity, **Biochemistry Journal**, v. 337, p. 503–506, 1999.
- BARBOSA, E. A., PERIN, L., E REIS, V. M.. Uso de diferentes fontes de carbono por estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isoladas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 827–833. 2006.
- BASTIAN, F.; COHERN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 7–11, 1998.
- BERTALAN, M.; ALBANO, R.; DE PÁDUA, V. ; ROUWS, L.; ROJAS, C. ; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K.; SCHWAB, S.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, A.; FRANÇA, L.; MAGALHÃES, V.; ALQUÉRES, S. ; CARDOSO, A.; ALMEIDA, W.; LOUREIRO, M. ; NOGUEIRA, E.; CIDADE, D.; OLIVEIRA, D.; SIMÃO, T.; MACEDO, J.; VALADÃO, A.; DRESCHSEL, M.; FREITAS, F.; VIDAL, M.S.; GUEDES, H.V.; RODRIGUES, E.; MENESES, C.; BRIOSO, P.; POZZER, L.; FIGUEIREDO, D.; MONTANO, H.; JUNIOR, J.; DE SOUZA FILHO, G.; MARTIN QUINTANA FLORES, V.; FERREIRA, B.; BRANCO, A.; GONZALEZ, P.; GUILLOBEL, H.; LEMOS, M.; SEIBEL, L., MACEDO, J.; ALVESFERREIRA, M.; SACHETTO-MARTINS, G.; COELHO, A.; SANTOS, E.; AMARAL, G.; NEVES, A.; PACHECO, A.B.; CARVALHO, D.; LERY, L.; BISCH P.; RÖSSLE, S.C.; ÜRMÉNYI, T.U.; RAEL PEREIRA, A.R.; SILVA, R.; RONDINELLI, E.; KRÜGER, W.V.; MARTINS, O.; BALDANI, J.I.; FERREIRA, P.C.G. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics**, v. 10, p. 450, 2009.

- BLANCO, Y.; BLANCH, M.; PIÑÓN, D.; LEGAZ, M.E.; VICENTE, C. Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineas* (Pathogen) studied in alginate immobilized sugarcane stalk tissues. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, No. 4, p. 366–371, 2005.
- BODDEY, R.M., URQUIAGA, S., REIS, V.M. and DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 137, p. 111–117, 1991
- BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and others grasses. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 28, p. 889–895, 2001.
- BRANDA, S.S.; VIK, A; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **TRENDS in Microbiology**, v.13, No.1, p. , 2005.
- CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23–31, 1988.
- CHOWDHURY, S.P.; NAGARAJAN, T.; TRIPATHI, R.; MISHRA, M.N.; LE RUDULIER, D.; TRIPATHI, A.K. Strain-specific salt tolerance and osmoregulatory mechanisms in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 267, p. 72–79, 2007.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar, segundo levantamento. Brasília. 18p., 2012.
- CSONKA, L.N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. **Archive of Microbiology Reviews**, v. 53, p.121–147, 1989
- DAVID, M.; DAVERAN, M-L.; BATUT, J.; DEDIEU, A.; DOMERGUE, O.; GHAI, J.; HERTIG, C.; BOISTARD, P.; KAHN, D. Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. **Cell**, Cambridge, v.54, p.671–683, 1988.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p 621–631, 2004.
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v. 44, p. 310–313, 1992.
- DONG, Z.; CANNY, M.J.; MCCULLY, M.E.; REGLA ROBOREDO, M.; FERNANDEZ CABADILLA, C.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiology**, v. 105, p. 1139–1147, 1994.
- EPSTEIN, W. Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.39, p.73–78, 1986.
- FERNANDES, M.S. Absorção e metabolismo de nitrogênio em plantas. Itaguaí: UFRRJ,. 50 p. (UFRRJ. Boletim Técnico, 1). 1978.

FUENTES-RAMIREZ, L.E.; GIMENEZ-SALGADO, I.R.; ABARCA-OCAMPO, CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. **Plant and Soil**, v. 154 p. 145–150, 1993.

GALINSKI, E.A.; TROPER, H.G. Microbial behaviour in salt stressed ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v.15, p.95–108, 1994.

GILLIS, K., KERSTERS, K., HOSTE, B., JANSSENS, D., KROPPESTEDT, R.M., STEPHAN, M.P., TEIXEIRA, K.R.S., DÖBEREINER, J., DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. Nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 361–364. 1989.

GUEDES, H. V. Identificação e caracterização de genes envolvidos no processo de Fixação Biológica e Assimilação do Nitrogênio em *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5: Ênfase em um gene do tipo histidina quinase. Tese (Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal), UFRJ, 2010.

HARTMANN, A.; PRABJU, S.R.; GALINSKI, E.A. Osmotolerance of diazotrophic rhizosphere bacteria. **Plant and Soil**, v. 137, p. 105–109, 1991

HERTIG, C.; LY, R.Y.; LOUARN, A-M.; GARNERONE, A-M.; DAVID, M.; BATUT, J.; KAHN, D.; BOISTARD, P. *Rhizobium meliloti* regulatory gene *fixJ* activates transcription of *R.meliloti nifA* and *fixK* genes in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 1736–1738, 1989.

IRVINE, J.E. Saccharum species as horticultural classes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 186–194, 1999.

ISHIDA, M.L.; ASSUMPÇÃO, M.C.; MACHADO, H.B.; BENELLI, E.M.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Identification and characterization of the two-component NtrY/NtrX regulatory system in *Azospirillum brasilense*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 6, p. 651–661, 2002.

JIMÉNEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; MASCARUA-ESPARZA, M.A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Gluconacetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3676–3683, 1997.

JIAN, S.; INOUE, M.; EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 27, p. 24155–24161, 2002

KIM, D. J.; BOYLAN, B.; GEORGE, N.; FORST, S. Inactivation of *ompR* promotes precocious swarming and *flhDC* expression in *Xenorhabdus nematophila*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 5290–5294, 2003.

LEONARDO, M. R.; FORST, S. Re-examination of the role of the periplasmic domain of EnvZ in sensing of osmolarity signals in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 22, p. 405–413, 1996.

LINU, M.S.; STEPHEN, J.; JISHA, M.S. Phosphate solubilizing *Gluconacetobacter* sp. *Burkholderia* sp. and their potential interaction with Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **International Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 2, p. 79–87, 2009.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2\Delta\Delta C_t$ Method. **Methods**, v. 25, n. 04, p. 402–408, 2001.

LOGANATHAN, P.; SUNITHA, R.; PARIDA, A.K.; NAIR, S. Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from new host plant (*Eleusine coracana* L.). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 86, p. 1053–1058, 1999.

MASCHER, T.; HELMANN, J.D. ; UNDEN, G. Stimulus perception in bacterial signaltransducing histidine kinases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 4. p. 910–938, 2006.

MATTISON, K.; KENNEY, L.J. Phosphorylation alters the interaction of the response regulator OmpR with its sensor kinase EnvZ. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 11143–11148, 2002.

MENESES, C.H.S.G.; ROUWS, L.F.M.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; VIDAL, M.S.; BALDANI, J.I. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 12, 2011

MILLER, L.D.; YOST, C.K.; HYNES, M.F.; ALEXANDRE, G. The major chemotaxis gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is essential for competitive nodulation. **Molecular Microbiology**, v. 63, p. 348–362, 2007.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N-fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. From Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, p. 157–164, 1999.

MUTHUKUMARASAMY, R.; CLEENWERCK, I.; REVATHI, G.; VADIVELU, M.; JANSSENS, D.; HOSTE, B.; KANG, U.G.; KI-DO, P.; SON, C.Y. T.; CABALLEROMELLADO, J. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. **Systematic Applied Microbiology**, v. 28, p. 277–286, 2005.

MUTHUKUMARASAMY, R.; KANG, U.G. PARK, K.D. JEON, W.T.; PARK, C.Y.; CHO, Y.S.; KWON, S.W.; SONG, J.; ROH, D.H.; REVATHI, G. Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. **Journal Applied Microbiology**, v. 102, p. 981–991, 2007.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility Soils**, v. 21, p. 197–200, 1996.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, p. 205–215, 2002.

OLIVEIRA, A.L.M.; SIMÕES-ARAÚJO J.L.; BALDANI, J.I. 2005. Extração conjunta de DNA e RNA bacteriano de alta pureza. Comunicado Técnico 75. Embrapa Agrobiologia. Seropédica – RJ. 2005.

OLIVEIRA, M.V.V. Isolamento e caracterização de mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* defectivos para osmotolerância. Dissertação (Biociências e Biotecnologia). UENF, 2008.

OLIVEIRA, A.L.M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European journal of soil biology**, v. 45, p 106–113, 2009.

OOSTHUIZEN, M.C.; STEYN, B.; LINDSAY, D.; BRÜZEL, V.S.; VON HOLY, A. Novel method for the proteomic investigation of a dairy-associated *Bacillus cereus* biofilm. **FEMS Microbiology Letters**, v. 194, p. 47–51, 2001.

PEREIRA, W; LEITE, J. M.; HIPÓLITO G. S.; SANTOS, C. L. R.; REIS, V. M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 2, p. 363-370. 2013.

PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J.I.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; REIS, V.M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **Int J Syst Evol Microbiol**. V. 56, n.8, p. 1931–1937, 2006.

POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; QUESADA, D.M.; XAVIER, R.P.; COELHO, C.H.M.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. **Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) para a cultura cana-de-açúcar no Brasil**. Documentos 144 - Embrapa Agrobiologia, p. 26, 2001.

POSTGATE, J.R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge, Cambridge University Press, 252 p. 1982.

PRATT, L.A; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 285–293, 1998.

RECORD JR. M.T.; COURTENAY, E.S.; CAYLEY, D.S.; GUTTMAN, H.J. Responses of *Escherichia coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. **Trends Biochemistry Science**, v. 23, 143–148, 1998.

REINHARD, K. Bacterial Stimulus Perception and Signal Transduction: Response to Osmotic Stress. **The chemical records**, v. 10, p. 217–229, 2010.

REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; DOBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 401–405, 1994.

REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. **Archives of Microbiology**, v. 171, p. 13–18, 1998.

REIS, V.M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.; SCHMID, M.; BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, 2155–2162, 2004.

REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; PEREIRA, W.; SILVA, M.F.; HIPÓLITO, G.; OLIVEIRA, R.P.; MORAIS, R.F.; LEITE, J.M.; SCHULTZ, N.; BAPTISTA, R.B.; Eficiência Agronômica do inoculante de cana-de-açúcar aplicado em três ensaios conduzidos no estado do Rio de Janeiro durante o primeiro ano de ciclo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 45. EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica, 2009.

RESENDE, A.S.. **A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) como suporte da fertilidade nitrogenada dos solos e da produtividade da cultura de cana-de-açúcar: uso de adubos verdes.** 143f. Dissertação (mestrado) – UFRRJ, Seropédica – RJ. 2000.

ROUWS, L.F.M.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; HEMERLY, A.S.; BALDANI, J.I. Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of a flagellar mutant. **Archives of Microbiology**, v. 189, p. 397–405, 2008.

SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F.; SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO JÚNIOR, J. B.; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 2, p. 261–268, 2012.

SLEATOR, R.D.; HILL, C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolyte in bacterial stress and virulence. **FEMS Microbiology Review**, v. 26, p. 49–71, 2001.

STEPHAN, M.P.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, K.R.S.; MARTINEZ-DRETS; DÖBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 77, p. 67–72, 1991.

TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; BUSTILLOS-CRISTALES, M.R.; JIMENEZ-SALGADO, T.; CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMIREZ, L.E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. **Microbial Ecology**, v. 39, p. 49–555, 2000.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, 356, p. 35–49, 2012.

TEIXEIRA, K.R. dos S.; WULLING, M.; MORGAN, T.; GALLER, R.; ZELLERMANN, E. M.; BALDANI, J.I.; KENNEDY, C.; MELETZUS, D. Molecular analysis of the chromosomal region encoding the *nifA* and *nifB* genes of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 176, p. 301–309, 1999.

TEJERA, N.A.; ORTEGA, E.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.; LLUCH, C. Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 528–535, 2003.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. **Soil Science Society of American Journal**, v. 56, p. 105–114, 1992.

URQUIAGA, S.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. E DÖBEREINER. **Fixação biológica de nitrogênio na cultura de cana-de-açúcar: Perspectivas**. Workshop sobre avaliação e manejo dos recursos naturais em áreas de exploração da cana-de-açúcar. Aracaju, SE, CPATC, 11 a 13 de novembro, 126p. 1997.

VAN LOON, G.W.; DUFFY, S. J. Microbiological processes. **In: Environmental Chemistry**. New York: Oxford University, 2001. Cap. 15. p. 492.

XAVIER, R. P.. **Adubação verde em cana-de-açúcar: influência na nutrição nitrogenada e na decomposição dos resíduos da colheita**. Dissertação (mestrado) – UFRRJ, Seropédica – RJ. 2002

WHITE, D. The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes. Second Edition, Oxford University Press, New York, 2000.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T.; The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 61, p. 1244–1251, 1997.

YUAN, J.; WEI, B.; SHI, M.; GAO, H. Functional Assessment of EnvZ/OmpR Two-Component System in *Shewanella oneidensis*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e2370, 2011.

ZHAO, S.; FERNALD, R. D.; Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Journal of Computational Biology**. V. 12, n. 8, p. 1047-1064, 2005.