

MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A CÁDMIO, COBALTO E ZINCO
EM *Gluconacetobacter diazotrophicus*, UMA BACTÉRIA
PROMOTORA DO CRESCIMENTO VEGETAL

ALINE CHAVES INTORNE

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Campos dos Goytacazes, RJ

Agosto, 2012

MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A CÁDMIO, COBALTO E ZINCO
EM *Gluconacetobacter diazotrophicus*, UMA BACTÉRIA
PROMOTORA DO CRESCIMENTO VEGETAL

ALINE CHAVES INTORNE

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

Orientador: Prof. *D. Sc.* Gonçalo Apolinário de Souza Filho

Campos dos Goytacazes, RJ

Agosto, 2012

MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A CÁDMIO, COBALTO E ZINCO
EM *Gluconacetobacter diazotrophicus*, UMA BACTÉRIA
PROMOTORA DO CRESCIMENTO VEGETAL

ALINE CHAVES INTORNE

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

Aprovada em 03 de agosto de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Jean Luiz Simões de Araújo (*D. Sc. Ciências Biológicas*) - EMBRAPA Agrobiologia

Fábio Lopes Olivares (*D. Sc. Agronomia - Ciências do Solo*) - UENF/LBCT

Marília A. Berbert de Molina (*D. Sc. Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica*) - UENF/LBT

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

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

*Esta Tese é dedicada às pessoas mais importantes da minha vida, minha querida família. Em especial, ao meu amado Tio Noel, que sempre acreditou em mim.
Saudades eternas*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar forças para seguir em diante mesmo nas horas mais difíceis;

Aos meus pais por darem suas vidas pelas filhas e as minhas irmãs, companheiras a distância;

Ao Bruno, pelos momentos juntos, nas alegrias e tristezas;

À toda minha família maravilhosa por me apoiarem e torcerem tanto por mim;

Ao professor Gonçalo pelos desafios, aprendizado e confiança;

Aos professores Libo e Ping, que me acolheram com todo carinho e me ensinaram a quebrar barreiras na ciência e na vida;

Aos membros da banca: *D. Sc.* Jean Simões, *D. Sc.* Fábio Olivares e *D. Sc.* Marília Berbert-Molina pelas valiosas contribuições ao trabalho;

Ao revisor, *D. Sc.* André Carvalho, pela atenção, disponibilidade e as ricas contribuições;

Ao amigo e companheiro de jornada, Marcos Vinicius, pelo carinho, confiança e risadas de todo dia;

Aos demais colegas de equipe pela atenção, carinho e enriquecedora troca de experiências;

Aos colegas de College Station - TX por todo apoio, acolhimento, amizade e aprendizado;

Aos professores, técnicos e colegas do Laboratório de Biotecnologia;

À todos que, de algum modo, contribuíram para eu estar aqui hoje;

Ao CNPq, FINEP, FAPERJ e FENORTE pelo apoio financeiro;

À FAPERJ, UENF e Texas A&M University pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche;

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

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	01
CAPÍTULO 1.....	03
<i>A bactéria <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>: promoção do crescimento vegetal, aplicação biotecnológica e genômica funcional</i>	
Resumo.....	04
1. Introdução.....	05
2. Isolamento e classificação.....	06
3. Características gerais.....	07
4. Metabolismo de carbono.....	08
4.1. Metabolismo de sacarose.....	10
4.2. Metabolismo de glicose.....	11
4.3. Metabolismo de frutose.....	12
5. Hospedeiros.....	13
6. Locais de colonização.....	14
7. Interação bactéria-planta.....	18
7.1. Mecanismo de Quorum Sensing.....	20
8. Promoção do crescimento vegetal.....	21
8.1. Fixação biológica de nitrogênio.....	22
8.2. Produção de fitormônios.....	24
8.3. Solubilização de nutrientes.....	25
8.4. Produção de sideróforos.....	28
8.5. Biocontrole de fitopatógenos.....	29

9. Genoma.....	30
10. Conclusão.....	30
11. Referências bibliográficas.....	32
CAPÍTULO 2.....	45
O papel essencial do determinante <i>czc</i> para resistência a cádmio, cobalto e zinco em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5	
Resumo.....	46
1. Introdução.....	47
2. Objetivo geral.....	49
2.1. Objetivos específicos.....	49
3. Material e métodos.....	50
3.1. Cepas bacterianas, meios e condições de cultivo.....	50
3.2. Concentração inibitória mínima (CIM).....	51
3.3. Ensaio de solubilização de zinco.....	51
3.4. Determinação de sensibilidade ao metal no mutante.....	51
3.5. Isolamento de DNA e <i>Southern Blotting</i> do mutante.....	52
3.6. Identificação do sítio de inserção do transposon Tn5.....	52
3.7. Organização genômica do determinante <i>czc</i>	53
3.8. Análise filogenética da proteína CzcA.....	53
4. Resultados.....	55
4.1. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5 e a resistência a cádmio, cobalto e zinco.....	55
4.2. Mutante sensível a metal.....	55
4.3. Caracterização da inserção de Tn5 no mutante GDP30H3.....	55
4.4. O determinante <i>czc</i> e a resistência a metal em <i>G. diazotrophicus</i>	58
5. Discussão.....	61
6. Conclusão.....	66
7. Referências bibliográficas.....	67
CAPÍTULO 3.....	73
Caracterização dos mecanismos de resistência aos estresses provocados por cádmio, cobalto e zinco em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5	

Resumo.....	74
1. Introdução.....	75
2. Objetivo geral.....	77
2.1. Objetivos específicos.....	77
3. Material e métodos.....	78
3.1. Cepas bacterianas e meios de cultivo.....	78
3.2. Metais solúveis.....	78
3.3. Seleção de mutantes sensíveis a metal.....	79
3.4. Isolamento de DNA e <i>Southern Blotting</i> dos mutantes.....	79
3.5. Identificação do sítio de inserção do transposon Tn5.....	79
4. Resultados.....	80
4.1. Seleção de mutantes sensíveis a metal.....	80
4.2. Análise de sequência dos mutantes sensíveis a metal.....	83
5. Discussão.....	87
6. Conclusão.....	93
7. Referências bibliográficas.....	94
2. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	97
ANEXOS.....	98

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Morfologia de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5 (x 1000).....	08
Figura 2: Utilização de fontes de carbono por estirpes e isolados de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	09
Figura 3: Organização estrutural do operon mostrando os genes envolvidos na via de metabolismo da sacarose.....	10
Figura 4: Metabolismo de glicose em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	12
Figura 5: Locais de colonização de endófitos diazotróficos na raiz do hospedeiro.....	15
Figura 6: Modelo propondo os níveis de regulação durante a associação de cana-de-açúcar e <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	20

CAPÍTULO 2

Figura 1: Ensaio de Concentração Inibitória Mínima de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5 e avaliação da sensibilidade do mutante GDP30H3 para cádmio, cobalto e zinco.....	56
Figura 2: Caracterização do determinante <i>czc</i> em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5.....	57
Figura 3: Modelo de resistência a cádmio, cobalto e zinco em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5.....	65

CAPÍTULO 3

Figura 1: Número total e porcentagem de mutantes sensíveis a cádmio (Cd), cobalto (Co) e zinco (Zn).....	80
Figura 2: Mutantes de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> sensíveis a metais.....	82
Figura 3: Biossíntese de glutatona.....	88
Figura 4: Biossíntese de metionina.....	89
Figura 5: Redução de espécies reativas de oxigênio.....	90
Figura 6: Interação de proteínas de efluxo de metal de diferentes famílias na detoxificação celular.....	92

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Plantas, fungos e insetos colonizadas por <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	14
Tabela 2: Ação antagonística de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> contra fitopatógenos.....	29

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Comparação de sequência da proteína CzcA de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5 com proteínas CzcA homólogas.....	59
Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) de íons metálicos para <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5 e bactérias relacionadas.....	62

.CAPÍTULO 3

Tabela 1: Total de mutantes selecionados quanto à sensibilidade a cádmio, cobalto e zinco, divididos de acordo com a classificação que obtiveram em relação ao crescimento das colônias na presença dos metais referidos.....	81
Tabela 2: Caracterização da inserção de Tn5 nos mutantes de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5 sensíveis a metais.....	84

RESUMO

No último século, a poluição aumentou a disponibilidade de metais na biosfera, tornando a contaminação por metal um grande problema ambiental. *Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria promotora do crescimento vegetal, cuja distribuição ocorre associada à diversas espécies vegetais e nichos ecológicos. Este microrganismo foi isolado em 1988 e 20 anos depois seu genoma foi sequenciado, resultando em um crescente interesse em sua potencial aplicação biotecnológica. A presente tese dedicou-se a explorar características relevantes desta bactéria, com ênfase na sua resistência a metais pesados. No Capítulo 1, foi realizada uma revisão bibliográfica sobre a bactéria, destacando seus aspectos moleculares e aplicações biotecnológicas inovadoras. No Capítulo 2, foi avaliado o nível de tolerância a cádmio, cobalto e zinco pela bactéria, buscando identificar a via de resistência responsável por tal característica. Inicialmente, a estirpe selvagem foi avaliada através da determinação das concentrações inibitórias mínimas dos compostos solúveis $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e ZnCl_2 . *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 foi resistente a altas concentrações de Cd, Co e Zn, com concentrações inibitórias mínimas de 1,2; 20 e 20 mM, respectivamente. A triagem de uma biblioteca de mutantes de inserção na presença de ZnO, revelou que o mutante GDP30H3 foi incapaz de crescer na presença zinco. Este mutante também foi altamente sensível a $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e ZnCl_2 . Sua caracterização molecular revelou que a mutação afetou o gene *czcA*, que codifica uma proteína central envolvida no efluxo de metal em bactérias resistentes a Cd, Co e Zn. Análises *in silico* mostraram que *czcA* é um componente do operon de resistência *czcCBARS*. No Capítulo 3, são apresentados dados do estudo dos mecanismos envolvidos na resistência a estes três metais na bactéria, através da identificação e caracterização de novos mutantes sensíveis a Cd, Co e Zn. Para tanto, 2.554 mutantes de inserção foram testados quanto a sensibilidade a $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e ZnCl_2 nas concentrações de 0,5; 10 e 2 mM, respectivamente. Para resistência a metal foram identificados 134 mutantes defectivos. O sequenciamento dos 19 mutantes mais afetados mostrou o envolvimento de transportadores de efluxo e, principalmente, de vias relacionadas ao estresse oxidativo, além de proteínas hipotéticas. Foi encontrado um sistema de efluxo eficiente para detoxificação da célula e um mecanismo elaborado de vias oxidativas, que atuam promovendo a sobrevivência da bactéria em elevadas concentrações de cádmio, cobalto e zinco. Este é o primeiro estudo que caracteriza a alta tolerância de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 a metais pesados e revela os mecanismos de resistência envolvidos.

Palavras-chave: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, genômica funcional, resistência a metal, cádmio, cobalto, zinco.

ABSTRACT

In the last century, pollution increased the availability of metals in the biosphere, making the metal contamination a major environmental problem. *Gluconacetobacter diazotrophicus* is a plant growth promoting bacteria, which is associated with several plant species and ecological niches. *Gluconacetobacter diazotrophicus* was isolated in 1988 and 20 years after its genome was sequenced, resulting in an increasing interest in its potential biotechnological applications. This thesis is dedicated to explore relevant characteristics of the bacterium, with emphasis on its resistance to heavy metals. In Chapter 1, we conducted a literature review on *Gluconacetobacter diazotrophicus*, emphasizing its molecular and innovative biotechnological applications. In Chapter 2, we measured the level of tolerance to cadmium, cobalt and zinc in bacteria in order to identify the pathway responsible for this resistance trait. Initially, the wild-type strain was evaluated by determining the minimum inhibitory concentrations of soluble compounds $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and ZnCl_2 . *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 was resistant to high concentrations of Cd, Co and Zn, with minimum inhibitory concentrations of 1.2, 20 and 20 mM, respectively. In a screening of a library of insertion mutants in the presence of ZnO, GDP30H3 was identified as a mutant unable to grow in the presence of zinc. This mutant was also highly sensitive to $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and ZnCl_2 . Its molecular characterization revealed that the mutation affecting the *czcA* gene, which encodes a protein involved in the central efflux resistant bacteria metal Cd, Co and Zn. *In silico* analysis showed that *czcA* is a resistance component of *czcCBARS* operon. In Chapter 3, we studied the mechanisms involved in resistance to these three metals in bacteria, through the identification and characterization of novel mutants sensitive to Cd, Co and Zn. Therefore, 2,554 insertional mutants were tested for sensitivity to $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and ZnCl_2 in concentrations of 0.5, 10 and 2 mM, respectively. There were identified 134 defective mutants to metal resistance. The sequencing of the 19 most affected mutants showed the involvement of efflux transportadores and especially pathways related to oxidative stress, as well as hypothetical proteins. It was found an efficient efflux system for detoxification of the cell and an elaborate mechanism of oxidative pathways, which act by promoting the survival of the bacterium in high concentrations of cadmium, cobalt and zinc. This is the first study that characterizes the high tolerance of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 to heavy metals and reveals the mechanisms of resistance involved.

Keywords: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, functional genomic, metal resistance, cadmium, cobalt, zinc.

1. INTRODUÇÃO

Os metais pesados têm grande utilidade para o homem, pois são empregados na fabricação de utensílios como canos, baterias, pilhas, mas também estão entre os agentes tóxicos mais conhecidos. O elevado desenvolvimento industrial ocorrido nas últimas décadas tem sido um dos principais fatores responsáveis pela contaminação do ambiente com metal. Esses elementos podem ser bioacumulados, passando de uma espécie para outra ao longo da cadeia alimentar. Nos sistemas biológicos, muitos metais são essenciais para o crescimento dos organismos, entretanto são requeridos em baixas concentrações.

A ação dos metais pesados é muito diversificada. Entre os mais perigosos estão mercúrio, cádmio, cromo e chumbo. Os metais diferem de outros agentes tóxicos porque não são sintetizados nem destruídos pelo homem. A atividade industrial diminui significativamente a permanência desses metais nos minérios, bem como a produção de novos compostos, além de alterar a distribuição desses elementos no planeta. Os metais fazem parte dos despejos de indústrias em todos os países do mundo. A presença de metais muitas vezes está associada à localização de regiões agrícolas e industriais.

O uso de plantas para aliviar prejuízos causados pelo excesso de metais, chamado de fitorremediação, proporciona benefícios quanto ao acúmulo de metal encontrado no solo e na água, já que apresenta baixo custo e maior segurança para o homem e o ambiente. No entanto, o crescimento lento e a reduzida biomassa de plantas em ambientes contaminados com metal limitam a eficiência da fitorremediação. Assim, uma possibilidade de intensificar a produção de biomassa é utilizar bioinoculantes promotores do crescimento vegetal. Há pouca informação quanto ao potencial de microrganismos endofíticos para auxiliar a fitorremediação. Estas bactérias são de interesse particular por se localizarem no interior da planta, já que têm a vantagem de estar relativamente protegidas de competição e grandes estresses no ambiente. Um melhor entendimento das características de resistência a metal nestas bactérias é um pré-requisito para o desenvolvimento da fitorremediação efetiva de ambientes contaminados.

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria promotora do crescimento vegetal identificada como um endofítico diazotrófico. Sua associação

já foi relatada em várias espécies de planta. A bactéria possui como características promotoras do crescimento: a fixação biológica de nitrogênio, a produção de auxina, giberelina e sideróforos, a solubilização dos nutrientes minerais, e o biocontrole de fitopatógenos. Seu genoma foi sequenciado recentemente, impulsionando estudos de genômica funcional que visam caracterizar vias metabólicas relevantes, como a responsável pela solubilização de fósforo e zinco, que já foi recentemente caracterizada. Tais estudos sugerem que a bactéria é capaz de crescer na presença de elevadas concentrações de zinco. Com isso, a solubilização de zinco, a influência deste íon no controle de fitopatógeno e a produção de sideróforos, que conhecidamente são capazes de quelar ferro e outros metais impulsionaram o início deste trabalho com o objetivo de avaliar a resistência a metal em *G. diazotrophicus* PAI 5.

Neste sentido, o presente trabalho dedicou-se a explorar características biotecnologicamente relevantes de *G. diazotrophicus*, com ênfase a sua resistência a metais pesados. No Capítulo 1, encontra-se um artigo de revisão sobre *G. diazotrophicus*, resultado de uma extensa pesquisa bibliográfica sobre a bactéria e suas principais características. Foram discutidos aspectos fisiológicos, sua localização em diferentes nichos ecológicos e a relação com hospedeiros. As características promotoras do crescimento vegetal foram detalhadamente abordadas, destacando os aspectos moleculares. Aplicações biotecnológicas inovadoras de *G. diazotrophicus* ainda pouco estudadas também foram incluídas. Este artigo está sendo finalizado para posterior submissão. No Capítulo 2, é apresentado um artigo recentemente publicado, em que avaliou-se a tolerância a cádmio, cobalto e zinco em *G. diazotrophicus* PAI 5, tendo sido identificado um componente essencial da via de resistência aos metais através de um mutante incapaz de crescer na presença de Cd, Co e Zn. No Capítulo 3, são apresentados dados dos estudos dos mecanismos envolvidos na resistência a estes três metais em *G. diazotrophicus* PAI 5, através da identificação e caracterização de novos mutantes sensíveis a Cd, Co e Zn. Neste trabalho foi encontrado um número elevado de genes, que participam da resposta aos estresses na bactéria. Este artigo científico está em fase de preparação. O presente trabalho é o primeiro estudo a caracterizar a elevada tolerância de *G. diazotrophicus* PAI 5 a metais pesados e revelar os mecanismos de resistência envolvidos.

CAPÍTULO 1

**A BACTÉRIA *Gluconacetobacter diazotrophicus*: PROMOÇÃO DO
CRESCIMENTO VEGETAL, APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA E GENÔMICA
FUNCIONAL**

Resumo

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria Gram-negativa isolada primeiramente de tecidos de cana-de-açúcar e classificada como um organismo endofítico diazotrófico. Atualmente, *G. diazotrophicus* é conhecida com uma bactéria promotora do crescimento vegetal por mediar o ganho de biomassa em um grande número de espécies de planta. Também tem sido estudada em associação com fungos, insetos e nematódes, ocupando diferentes nichos ecológicos. Suas características incluem, além da fixação biológica de nitrogênio, a produção de fitormônios, a solubilização de nutrientes, a produção de sideróforos e o biocontrole de fitopatógenos. O sequenciamento do genoma da bactéria disponibilizou uma gama de informações e uma ferramenta única para estudar vias metabólicas relevantes. Com isso, os estudos de genômica funcional estão voltados para a caracterização das vias promotoras do crescimento vegetal e para o entendimento da interação com o hospedeiro no intuito de estabelecer uma associação mais eficiente. Os estudos moleculares provêm também informação a cerca de outras características da bactéria menos discutidas com potencial de emprego biotecnológico como a produção de levana, ácido glucônico e pirroloquinolina quinona. Nesta revisão, é apresentado uma visão geral sobre os aspectos fisiológicos da bactéria com ênfase nas suas características aplicadas na promoção do crescimento vegetal. Uma discussão a cerca dos estudos de genômica funcional e seu uso potencial como produto biotecnológico também é abordada.

Palavras-chave: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, bactéria endofítica, promoção do crescimento vegetal, fixação biológica de nitrogênio, genômica funcional.

1. Introdução

Na década de 50 deu-se início aos estudos da fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) em gramíneas, no Brasil. Estes trabalhos foram liderados pela pesquisadora Johanna Döbereiner e estimulados pela descoberta de novos organismos fixadores de nitrogênio atmosférico (N₂), principalmente associados à rizosfera de gramíneas. Um novo impulso ocorreu na década de 70 com o avanço das técnicas utilizadas nestes estudos, principalmente, através da introdução do meio semi-sólido isento de fonte de nitrogênio e do método de redução do acetileno. As décadas subsequentes, 80 e 90, foram marcadas respectivamente pelo isolamento de microrganismos fixadores, chamados diazotróficos, e pela pesquisa voltada para a interação bactéria-plantas e suas aplicações agrícolas. Os estudos estiveram voltados principalmente para ecologia e seleção de estirpes e caracterização do processo ligado ao estabelecimento endofítico (Baldani e Baldani, 2005). A partir de 2000, são verificados trabalhos voltados para uso como bioinoculante em associação com outros microrganismos em diferentes espécies vegetais e com o advento do sequenciamento de genomas, os estudos focaram no entendimento das vias metabólicas através de dados moleculares.

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria promotora do crescimento vegetal descrita a pouco mais de 20 anos atrás (Cavalcante e Döbereiner, 1988; Saravanan *et al.*, 2007a). Identificada como um endofítico diazotrófico, destaca-se como um modelo de estudo para o estabelecimento deste tipo de interação (Cavalcante e Döbereiner, 1988; Cocking, 2003). Foi relatada sua associação com aproximadamente 60 espécies, majoritariamente vegetais, mas também incluindo fungos e insetos. A bactéria possui como principais características promotoras do crescimento: a capacidade de fixação biológica de nitrogênio, a produção de auxina, giberelina e sideróforos, a solubilização dos nutrientes minerais fósforo e zinco, e biocontrole de fitopatógeno (Saravanan *et al.*, 2007a). Também é dotada de outras características de elevado potencial biotecnológico, como: a biossíntese de levana, ácido glucônico, ceto-derivados e pirroloquinolina quinona, elevada resistência a condições ácidas, calor e estresse osmótico. Seu uso na agricultura tem potencial para economizar milhões de dólares gastos anualmente com insumos, reduzindo danos ao meio ambiente

causados pela aplicação excessiva de fertilizante e agrotóxico com baixa eficiência no uso. Com isso, seu genoma foi sequenciado em 2009, impulsionando estudos de genômica funcional, que visam caracterizar os genes encontrados e vias metabólicas economicamente relevantes (Bertalan *et al.*, 2009; Intorne *et al.*, 2009). Esta revisão propõe sumarizar o conhecimento atual sobre os aspectos fisiológicos de *G. diazotrophicus*, baseando-se nas publicações recentes sobre aspectos moleculares, ressaltando sua importância e aplicações biotecnológicas.

2. Isolamento e classificação

Em 1987, Lima e colaboradores mostraram que algumas variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) brasileiras obtidas de diferentes regiões do país podem obter em torno de 60% do seu nitrogênio assimilado através de FBN (Lima *et al.*, 1987). No ano seguinte, foi isolado no Brasil um microrganismo diazotrófico a partir de amostras de raiz e colmo de cana-de-açúcar pela adição de caldo de cana-de-açúcar ao meio de cultivo. A bactéria recém descoberta recebeu o nome de *Saccharobacter nitrocaptans* (Cavalcante e Döbereiner, 1988). No entanto, este mesmo trabalho traz um adendo no qual ressalta, com base em análises de RNA e DNA, que seria necessário reclassificá-la como uma nova espécie pertencente ao gênero *Acetobacter*. Desta forma, um ano após foi adotada a nomenclatura *Acetobacter diazotrophicus* em substituição a *Saccharobacter nitrocaptans* (Gillis *et al.*, 1989). Mais uma mudança ocorreu quase uma década depois, quando foi proposta uma alteração na taxonomia da família Acetobacteraceae baseada em análises de RNA ribossomal. Um novo gênero foi criado e a bactéria *Acetobacter diazotrophicus* foi renomeada como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, nomenclatura adotada atualmente. Este foi o primeiro microrganismo diazotrófico descrito na família Acetobacteraceae, pertencente à ordem Rhodospirillales, classe Alphaproteobacteria (Yamada *et al.*, 1998).

3. Características gerais

G. diazotrophicus é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica obrigatória e não-formadora de esporos. Possui formato de bacilo com extremidades arredondadas. Suas células se movem por meio de flagelos peritríqueos ou laterais, sem movimento espiralado. Elas podem se apresentar de modo isolado, em arranjos de diplobacilos ou em cadeias de tamanho variável (Cavalcante e Döbereiner, 1988; Stephan *et al.*, 1991). Na presença de NaCl, NH₄Cl, NH₄NO₃, pesticidas e zinco são observadas alterações de morfologia com o surgimento de células alongadas (Muthukumarasamy *et al.*, 2002a; Madhaiyan *et al.*, 2006; Saravanan *et al.*, 2007a; Boniolo *et al.*, 2009) (Fig. 1). Recentemente foi observado que o alongamento provocado por NaCl deve-se a uma resposta específica ao ânion cloreto (Cl⁻) e não em decorrência da perda de água ou presença de Na⁺ (de Oliveira, comunicação pessoal). A temperatura ótima de crescimento da bactéria é 30 °C e o pH ótimo é 5,5 (Cavalcante e Döbereiner *et al.*, 1988). *G. diazotrophicus* não cresce em meios com valores de pH superiores a 7,0, enquanto a FBN pode ocorrer em pH tão baixo quanto 2,5, apesar de menos eficiente nesta condição (Stephan *et al.*, 1991). Diazotróficos em geral apresentam seu potencial máximo de crescimento celular e FBN em valores de pH próximos à neutralidade, o que não ocorre em *G. diazotrophicus* (Fisher e Newton, 2005). Segundo Tejera e colaboradores (2003), a bactéria tem alta tolerância a elevadas temperaturas (até 50 °C) e concentrações de sais no meio de cultura (até 200 mM de NaCl), e é sensível a condições de seca, devido a redução de 10¹⁰ para 10⁶ ufc.ml⁻¹ após 1 dia de tratamento. No entanto, a bactéria mantém-se em 10⁶ ufc.ml⁻¹ durante o período de tempo restante avaliado (28 dias) (Tejera *et al.*, 2003).

Neste sentido, a bactéria *G. diazotrophicus* possui várias características fisiológicas, que serão apresentadas nos próximos tópicos. Tais características são de elevado interesse biotecnológico por apresentar mecanismos para metabolizar variadas fontes de carbono, o que confere a bactéria versatilidade para ocupar diferentes nichos ecológicos.

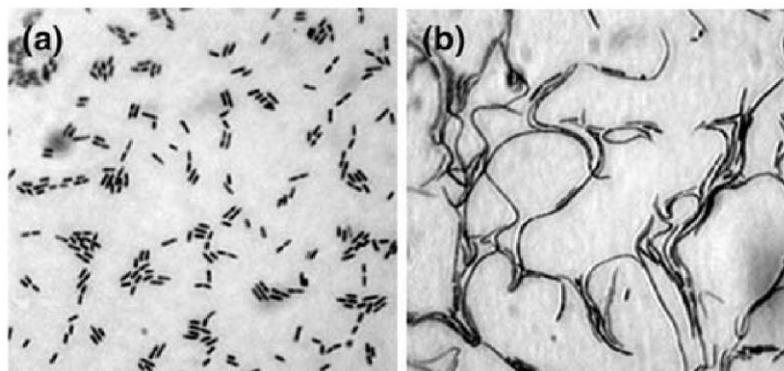


Figura 1: Morfologia de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 (x 1000). Crescimento em meio DYGS após 12 h de cultivo sem NaCl **(a)** e suplementado com 200 mM de NaCl **(b)**. Adaptado de Boniolo *et al.* (2009).

4. Metabolismo de carbono

Devido a sua associação com plantas ricas em açúcar, acreditava-se que a melhor fonte de carbono para o cultivo de *G. diazotrophicus* fosse a sacarose, com concentração mais favorável ao seu crescimento de 10%, tolerando até 30% (Cavalcante e Döbereiner, 1988). No entanto, em estudo posterior, foi verificado que o melhor crescimento da bactéria ocorre em gluconato, seguido por glicose, glicerol e então, sacarose (Ureta *et al.*, 1995). *G. diazotrophicus* é ainda capaz de metabolizar diversos outros compostos como os monossacarídeos frutose, galactose e xilose. Outras fontes de carbono também metabolizáveis incluem manitol, etanol, glicerol e sorbitol (Gillis *et al.*, 1989; Alvarez e Martinez-Drets *et al.*, 1995; Bellone *et al.*, 1997). Em estudo realizado por Barbosa e colaboradores (2006) foram testadas 40 fontes de carbono em diferentes cepas e isolados de *G. diazotrophicus*. A bactéria foi capaz de metabolizar 22 destas fontes, que incluem açúcares, alcoóis e compostos fenólicos (Fig. 2).

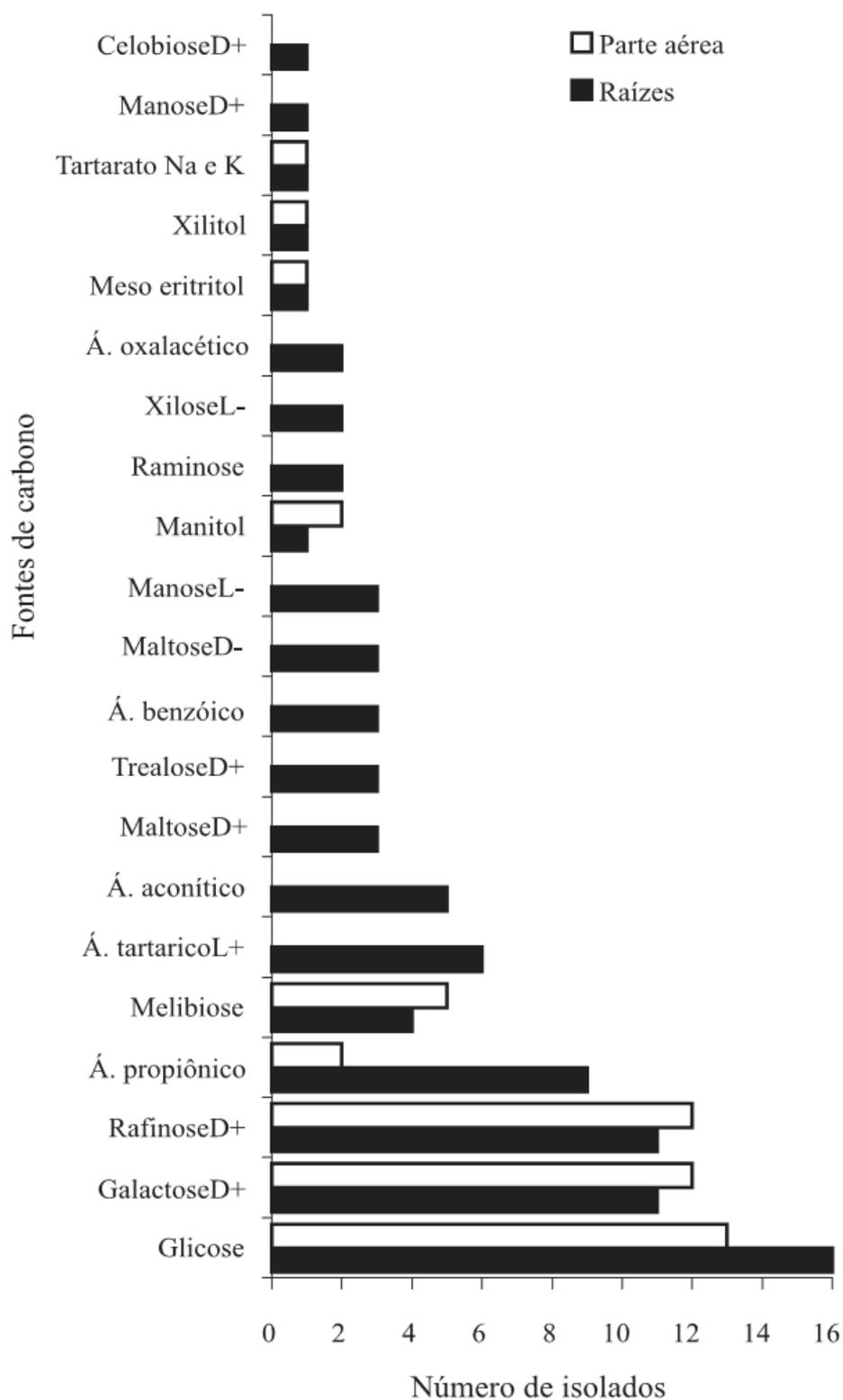


Figura 2: Utilização de fontes de carbono por estirpes e isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Tais bactérias foram obtidas de raiz e parte aérea de cultivares de cana-de-açúcar. Adaptado de Barbosa *et al.* (2006).

4.1. Metabolismo de sacarose

Em *G. diazotrophicus*, sacarose não é transportada para o interior da célula. Ela é metabolizada extracelularmente através de uma invertase, que possui atividade sacarolítica, chamada levanasucrase (Alvarez e Martinez-Drets, 1995; Hernández *et al.*, 1995). A levanasucrase é a enzima chave no metabolismo do açúcar por esta bactéria (Arrieta *et al.*, 1996). Esta enzima é codificada pelo gene *IsdA*, que é expresso constitutivamente (Hernández *et al.*, 2000). A levanasucrase é secretada via periplasma por um mecanismo dependente de peptídeo-sinal (Hernández *et al.*, 1999a). No ambiente extracelular, a enzima catalisará a clivagem de sacarose nos sacarídeos menores, glicose e frutose, que são internalizados e metabolizados. Outra molécula formada será a levana, um exopolissacarídeo, que atuará como reserva energética, desempenhando também outros papéis fundamentais para a bactéria (Hernández *et al.*, 1995; Menéndez *et al.*, 2009). A produção de levana e sua importância será discutida no tópico 4.3.

Após o sequenciamento do genoma de *G. diazotrophicus* foi possível verificar que os genes envolvidos no metabolismo da sacarose se organizam em uma ilha gênica situada no cromossomo da bactéria (Bertalan *et al.*, 2009; Velázquez-Hernández *et al.*, 2009) (Fig. 3). Já foi verificado que os genes *IsdA* e *IsdB* estão organizados em operon e são relacionados a síntese e quebra da levana, respectivamente. Eles codificam as enzimas levanasucrase (*IsdA*) e exolevanase (*IsdB*) (Menéndez *et al.*, 2009). Os demais genes (*IsdX*, *G*, *O*, *E*, *F*, *H*, *I*, *J*, *L*, *M*, *N* e *D*) codificam proteínas, que compõe o sistema de secreção tipo II, responsável pela secreção da levanasucrase para o ambiente extracelular (Arrieta *et al.*, 2004).

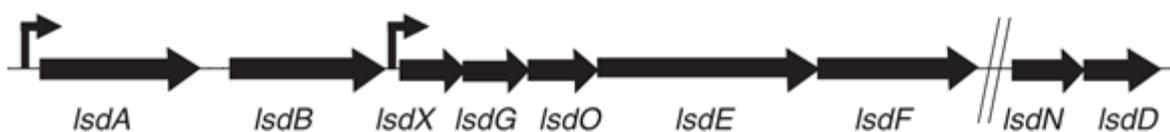


Figura 3: Organização estrutural do operon mostrando os genes envolvidos na via de metabolismo da sacarose. ↗: indicam as sequências abertas de leitura. Adaptado de Velázquez-Hernández *et al.* (2009).

4.2. Metabolismo de glicose

O metabolismo de glicose é realizado, principalmente, através da via das pentoses fosfato (VPF) (Luna *et al.*, 2006), sendo os produtos desta via oxidados no Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (CAT) (Alvarez e Martínez-Drets, 1995). Stephan e colaboradores (1991) verificaram que durante a fase que antecede o crescimento exponencial, o metabolismo aeróbico se apresenta intensificado, com consumo de glicose e queda concomitante do pH do meio. No entanto, sem aumento na concentração de biomassa. Então, foi mostrado que à medida que o açúcar é consumido, outra substância de caráter redutor é formada, identificada como ácido glucônico (Stephan *et al.*, 1991).

Posteriormente, foi observado que a bioconversão de glicose a ácido glucônico é realizada no espaço periplasmático. Isto se dá pela ação da enzima glicose desidrogenase (GDH), que se localiza na membrana plasmática, utilizando pirroloquinolina quinona (PQQ) como cofator. Esta compartimentalização da respiração celular no periplasma pode atuar como um mecanismo importante de proteção da nitrogenase, que se encontra no citoplasma. Tal enzima é responsável pela FBN, e é sensível a altas tensões de O₂ (Galar e Boiardi, 1995). Luna e colaboradores (2006) mostraram que a síntese da quinoproteína glicose desidrogenase (PQQ-GDH) é estimulada por condições de alta demanda energética, como a FBN. A Figura 4 sumariza o metabolismo de glicose em *G. diazotrophicus*.

Os genes que codificam as proteínas GDH e PQQ em *G. diazotrophicus*, assim como mutantes nocautes para estas proteínas foram avaliados em estudo recente (Intorne *et al.*, 2009). Naquele trabalho buscou-se elucidar o mecanismo relacionado com a característica de solubilização de nutrientes apresentada pela bactéria. Foi encontrado que isto se dá pela redução de pH em consequência da produção de ácido glucônico (Intorne *et al.*, 2009).

É válido ressaltar que as proteínas PQQ e GDH têm aplicação biotecnológica. O ácido glucônico, produto derivado da atividade destas proteínas, é não-corrosivo, não-volátil, atóxico e sem odor. Por apresentar tais características, possui ampla aplicação não só na agricultura, mas também na indústria. A produção de ácidos orgânicos é um processo relevante na indústria de papel, cimento, alimentícia, farmacêutica e metalúrgica. Somado a isto, ainda

pode ser considerado um produto biodegradável (Ramachandran *et al.*, 2006; Singh e Kumar, 2007). PQQ tem sido demonstrado como um fator da promoção do crescimento vegetal (Choi *et al.*, 2008; Shahab *et al.*, 2011). Adicionalmente, PQQ tem mostrado grande importância em animais. É reconhecido seu papel estimulando crescimento de neonato. Há também benefícios em funções cognitivas, imune e antioxidante, assim como proteção contra danos cardíacos e neurológicos, e envolvimento em vias de sinalização celular como a mitocôndriogênese (Rucker *et al.*, 2009).

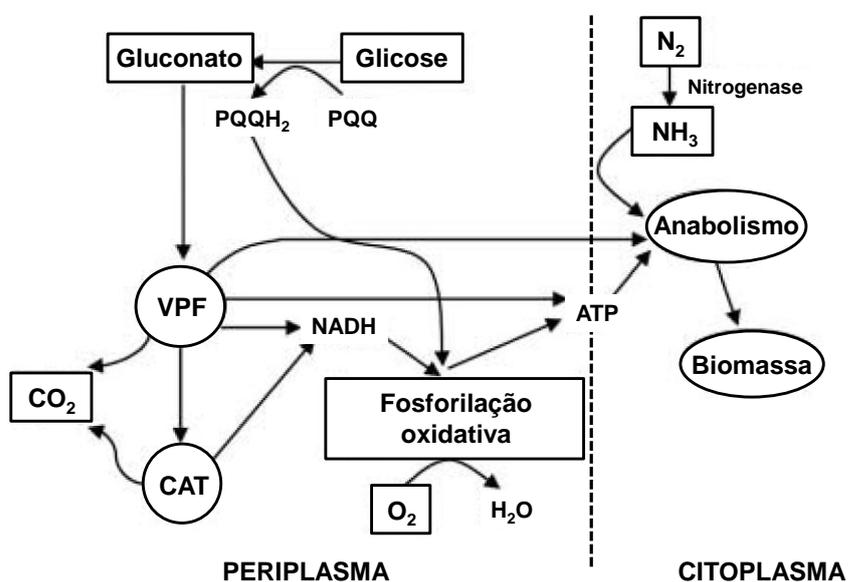


Figura 4: Metabolismo de glicose em *Gluconacetobacter diazotrophicus*. VPF: via das pentoses fosfato. CAT: ciclo dos ácidos tricarbóxicos. Adaptado de: Luna *et al.* (2000).

4.3. Metabolismo de frutose

Após a quebra da sacarose, além dos monossacarídeos glicose e frutose, é produzido um polissacarídeo de frutose conhecido como levana. Em *G. diazotrophicus*, estas reações ocorrem no ambiente extracelular e são mediadas pela enzima levanasucrase. Este polissacarídeo atua como reserva energética utilizada em condições de baixa concentração de frutose. Isto se dá pela indução da expressão gênica de *IsdB*, que codifica a exolevanase (Menéndez *et al.*, 2009). Esta enzima atua na quebra da levana, liberando frutose para internalização. Com

isso, atendendo a demanda energética celular. As levanas também desempenham outros papéis. Elas podem proteger as bactérias contra estresses ambientais (Banguela e Hernández, 2006). Neste sentido, desempenham função específica relacionada ao habitat do microrganismo, estando envolvida com a sobrevivência no solo, na interação com hospedeiro, assimilação de nutrientes e formação de biofilme (Velázquez-Hernández *et al.*, 2009).

A levana e as enzimas levanasucrase e exolevanase são reconhecidas por seu potencial biotecnológico. Levana é bastante utilizada na indústria por apresentar propriedades como: (i) adoçantes naturais com baixo valor calórico, (ii) fibras solúveis dietéticas, (iii) promotores probióticos do crescimento de bifidobactérias, (iv) promotores da absorção mineral (v) imunomoduladores e (vi) anticarcinógenos (Velázquez-Hernández *et al.*, 2009). Com isso, vários estudos têm sido realizados no intuito de avaliar tal via em *G. diazotrophicus*. Estes trabalhos visam, principalmente, produzir este composto em elevadas concentrações e induzir a expressão das enzimas levanasucrase e exolevanase em outros organismos (Hernández *et al.*, 1999b; Trujillo *et al.*, 2001; Menéndez *et al.*, 2002; Menéndez *et al.*, 2004; Trujillo *et al.*, 2004; Menéndez *et al.*, 2005; Banguela *et al.*, 2011).

5. Hospedeiros

Apesar da ocorrência de *G. diazotrophicus* ter sido originalmente descoberta em variedades de cana-de-açúcar brasileiras (Cavalcante e Döbereiner, 1988), a bactéria tem sido observada em vários países. A bactéria já foi isolada na Argentina, Austrália, Barbados, Canadá, Coréia, Cuba, Estados Unidos da América, Índia, México, Porto Rico, Quênia e Uruguai (Caballero-Mellado *et al.*, 1995; Barbosa *et al.*, 2006; Saravanan *et al.*, 2007b).

Somado a cana-de-açúcar, que é seu hospedeiro melhor relatado, vários outros hospedeiros têm sido descritos como inoculados com esta bactéria. Entre estes hospedeiros, estão culturas de elevada importância econômica como trigo, milho, arroz, sorgo e tomate (Tab. 1). Como observado, além de plantas, *G. diazotrophicus* é capaz de colonizar insetos presentes na cultura de cana-de-açúcar e fungos micorrízicos. Tal associação com micorrizas e outras bactérias

têm trazido resultados interessantes pela ação sinérgica dos microrganismos em bioinoculantes (Meenakshisundaram e Santhaguru, 2011).

Tabela 1: Plantas, fungos e insetos associados com *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Hospedeiro	Referência
<i>Saccharum</i> spp. (cana-de-açúcar)	Cavalcante e Döbereiner, 1988
<i>Saccharicoccus sacchari</i> (cochonilha – inseto)	Ashbolt e Inkerman, 1990
<i>Ipomoea batatas</i> (batata-doce)	Paula <i>et al.</i> , 1991
<i>Sorghum vulgare</i> (sorgo doce)	Paula <i>et al.</i> , 1991
<i>Glomus clarum</i> (micorriza arbuscular)	Paula <i>et al.</i> , 1991
<i>Coffea arabica</i> L. (café)	Jimenez-Salgado <i>et al.</i> , 1997
Banana, chá	Matiru e Thomson, 1998
<i>Eleusine coracana</i>	Loganathan <i>et al.</i> , 1999
<i>Ananas comosus</i> (abacaxi)	Tapia-Hernández <i>et al.</i> , 2000
Manga	Muthukumarasamy <i>et al.</i> , 2002b
<i>Beta vulgaris</i> L. (beterraba)	Madhaiyan <i>et al.</i> , 2004
<i>Raphanus sativus</i> L. (rabanete)	Madhaiyan <i>et al.</i> , 2004
<i>Daucus carota</i> L. (cenoura)	Madhaiyan <i>et al.</i> , 2004
<i>Oryza sativa</i> L. (arroz)	Muthukumarasamy <i>et al.</i> , 2005
<i>Cucurbita moschata</i> (abóbora)	Dibut <i>et al.</i> , 2005
<i>Citrullus lanatus</i> L. (melância)	Dibut <i>et al.</i> , 2005
<i>Carica papaya</i> L. (mamão papaia)	Dibut <i>et al.</i> , 2005
<i>Rosa canina</i> L.	Dibut <i>et al.</i> , 2005
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cocking <i>et al.</i> , 2006
<i>Brassica napus</i> (canola)	Cocking <i>et al.</i> , 2006
<i>Trifolium repens</i> (trevo branco)	Cocking <i>et al.</i> , 2006
<i>Elaeis guineensis</i> Jacq. (dendezeiro)	Om <i>et al.</i> , 2009
<i>Manihot esculenta</i> Crantz (mandioca)	Dibut <i>et al.</i> , 2010
<i>Xanthosoma</i> spp. (inhame)	Dibut <i>et al.</i> , 2010
<i>Sorghum bicolor</i> (sorgo)	Adriano-Anayab <i>et al.</i> , 2006
<i>Zea mays</i> (milho)	Adriano-Anayab <i>et al.</i> , 2006
<i>Triticum aestivium</i> (trigo)	Luna <i>et al.</i> , 2010
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	Luna <i>et al.</i> , 2011
<i>Agave tequilana</i>	Ruiz <i>et al.</i> , 2011
<i>Pennisetum purpureum</i>	Videira <i>et al.</i> , 2012
Xerófitas - 32 espécies	Hanna <i>et al.</i> , 2012

6. Locais de colonização

G. diazotrophicus é amplamente conhecida como um endófito capaz de colonizar os tecidos radiculares e a parte aérea de cana-de-açúcar pela penetração de raízes, como demonstrado por microscopia ótica e eletrônica (James *et al.*, 1994; Olivares *et al.*, 1996). Na superfície radicular, a bactéria se concentra nas regiões de junção das raízes laterais. Dentro da raiz, localiza-se no

interior de células da epiderme e no apoplasto do colmo da cana-de-açúcar, sendo este último um local rico em sacarose. A bactéria é encontrada ainda dentro dos vasos de xilema, através do qual migra para a parte aérea por fluxo induzido pela transpiração vegetal (Dong *et al.*, 1994). Trabalhos com anticorpos evidenciam a localização de *G. diazotrophicus* nos vasos xilemáticos de cana-de-açúcar em população elevada. Isto sugere que este ambiente é um dos principais locais onde ocorre FBN na planta, possivelmente devido ao baixo teor de oxigênio presente neste tecido, condição necessária para funcionamento da nitrogenase (James *et al.*, 1994; James *et al.*, 2001). Em trabalho recente, Rouws e colaboradores (2010) monitoraram a colonização da bactéria em plantas de cana-de-açúcar e arroz através dos genes marcadores *gfp* e *gusA*, confirmando dados anteriores (Dong *et al.*, 1994; James *et al.*, 1994; James *et al.*, 2001) (Fig. 5).

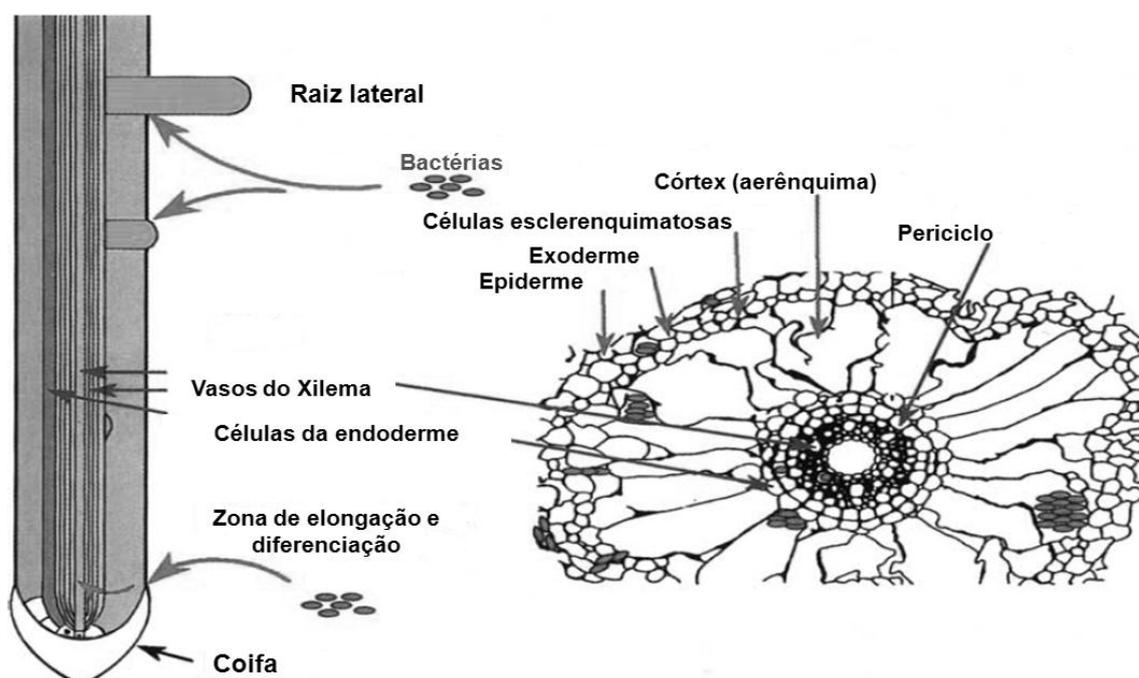


Figura 5: Locais de colonização de endófitos diazotróficos na raiz do hospedeiro. Adaptado de Hurek e Reinhold-Hurek (2003).

Bellone e colaboradores (1997) detectaram a bactéria intracelularmente no ápice radicular de cana-de-açúcar. O mesmo foi registrado em *Arabidopsis thaliana*, cuja colonização foi obtida por inoculação da bactéria em reduzido

número populacional (Cocking *et al.*, 2006). A colonização de plantas por *G. diazotrophicus* seria dada através das pontas de raiz por um cordão de infecção. No entanto, nesta situação as bactérias parecem ser lisadas pelo hospedeiro ou estas células do hospedeiro são encontradas mortas (James *et al.*, 1994). Bellone e colaboradores (1997) também descreveram o cordão de infecção e observaram a presença de uma membrana do hospedeiro envolvendo a bactéria, que permaneceu íntegra.

A produção intensificada de enzimas de degradação de parede celular já foi relatada durante a colonização de *G. diazotrophicus* em plantas de sorgo e milho (Adriano-Anayab *et al.*, 2006). É conhecido que rizóbio produz tais enzimas para assistir a penetração da planta. Com isso, existe a possibilidade que *G. diazotrophicus* se utilize deste mesmo mecanismo (Adriano-Anayab *et al.*, 2006). No entanto, é consenso que esta bactéria não vive dentro de células saudáveis do hospedeiro. Com isso, os poucos relatos de colonização intracelular são considerados controversos e podem representar uma forma de interação saprofítica (Carvalho *et al.*, 2011).

Em geral, a disseminação da bactéria é feita de planta para planta pela propagação vegetativa do hospedeiro (Paula *et al.*, 1991; Reis *et al.*, 1994). Porém, a presença da bactéria na rizosfera representa um outro modo de inoculação (Jimenez-Salgado *et al.*, 1997, Loganathan *et al.*, 1999, Muthukumarasamy *et al.*, 2007). Formas alternativas, como através das cochonilhas, que se alimentam de cana-de-açúcar também têm sido relatadas (Ashbolt e Inkerman, 1990).

O termo endófito inclui todos os organismos capazes de colonizar, durante algum momento do seu ciclo de vida, os espaços intercelulares e tecidos vasculares de diferentes órgãos vegetais, sem causar dano aparente, sintomas de doença e reações de hipersensibilidade na planta hospedeira (Kloepper e Beauchamp, 1992). *G. diazotrophicus* é considerado um organismo modelo para o estudo da interação entre bactérias endófitas e plantas não leguminosas, por apresentar um mecanismo de FBN eficiente, sem nodulação (Cocking, 2003). Baldani e colaboradores (1997) dividiram os endófitos diazotróficos em facultativos e obrigatórios. O primeiro refere-se aqueles organismos que apresentam boa sobrevivência no solo, na superfície e interior das raízes, e que colonizam diferentes hospedeiros. O segundo trata dos organismos com baixa

sobrevivência no solo e na superfície das raízes, presentes no interior da planta e que possuem alta especificidade com o hospedeiro. *G. diazotrophicus* foi classificada por estes autores como uma bactéria endófito diazotrófica obrigatória (Baldani *et al.*, 1997).

Externamente à planta, *G. diazotrophicus* é encontrada na rizosfera, mas não há tantos estudos que relatam a ocorrência (Jimenez-Salgado *et al.*, 1997; Loganathan *et al.*, 1999; Muthukumarasamy *et al.*, 2007; Saravanan *et al.*, 2007b). Quando se trata de amostras de solo, *G. diazotrophicus* tem seu isolamento prejudicado em virtude de apresentar, frequentemente, número inferior ao mínimo para detecção pelas técnicas convencionais. Baldani e Baldani (2005) sugerem que a bactéria esteja num estágio onde estão viáveis, mas não cultiváveis (Baldani e Baldani, 2005). Provavelmente, este estágio da bactéria relaciona-se à melhor habilidade para colonização e pode ser estimulada pelo exudado da raiz das plantas (Saravanan *et al.*, 2007b). No entanto, não há evidências que suportem esta hipótese. Acredita-se, que com o advento de novas técnicas como a metagenômica será possível responder tais questionamentos.

Tanto populações endófitas como rizosféricas são condicionadas por fatores bióticos e abióticos. Contudo, as endófitas estão mais protegidas destes fatores que as rizosféricas (Rosenblueth e Martínez-Romero, 2006), uma vez que o interior da planta apresenta-se como um ambiente nutritivamente rico e em homeostase (Cho *et al.*, 2007). Portanto, a população rizosférica de *G. diazotrophicus* pode apresentar-se reduzida devido as variações nas condições ambientais e a competição com outros organismos (Roesch *et al.*, 2006).

Jimenez-Salgado e colaboradores (1997) sugerem que a presença de *G. diazotrophicus* na rizosfera de plantas de café, deve-se ao estado nutricional do solo. Possivelmente, isto está relacionado com o elevado teor de matéria orgânica presente nestes solos. A degradação desta matéria orgânica pela comunidade microbiana enriquece o solo com fontes de carbono utilizáveis pelas bactérias. Adicionalmente, esta matéria orgânica pode proteger a bactéria contra fatores físico-químicos do solo, que venham a prejudicar seu desenvolvimento (Jimenez-Salgado *et al.*, 1997). Em solos de cultivo de arroz, onde *G. diazotrophicus* também foi isolada de zonas úmidas da rizosfera, foi verificado elevado teor de fósforo, o que favorece a propagação da bactéria no local (Muthukumarasamy *et al.*, 2007). É válido lembrar que, muitas vezes, antes do corte da cana-de-açúcar

são realizadas queimadas, que reduzem a matéria orgânica disponível nestes solos. Isto talvez possa justificar a baixa ocorrência de *G. diazotrophicus* na rizosfera desta planta (Jimenez-Salgado *et al.*, 1997).

7. Interação bactéria-planta

Cana-de-açúcar inoculada com *G. diazotrophicus* acumula polissacarídeos e taninos nas células do parênquima, o que sugere a ativação do sistema de defesa da planta (Dong *et al.*, 1997). Nas primeiras etapas da associação, o sistema imune vegetal é regulado por vias de sinalização complexas, estabelecendo-se a interação será benéfica ou não (Lambais, 2001).

Os espaços intercelulares e os tecidos vasculares da maioria dos órgãos de cana-de-açúcar são colonizados por *G. diazotrophicus* sem apresentar sintomas de doença (Reinhold-Hurek e Hurek, 1998). Entretanto, mesmo sem ocorrer danos, a planta deve manter o processo de invasão e proliferação bacteriana sob um controle rígido (Vargas *et al.*, 2003). O sucesso deste tipo de interação, provavelmente, depende de um sistema de detecção e resposta sofisticado. Isto permite à planta decifrar os sinais bacterianos e induzir o mecanismo de defesa apropriado, permitindo a sua invasão. Os mecanismos envolvidos neste processo têm sido estudados, mas pouco é conhecido (Vargas *et al.*, 2003).

Nogueira e colaboradores (2001) realizaram uma análise transcritômica da interação cana-de-açúcar e *G. diazotrophicus*. Os resultados obtidos sugerem a participação ativa da planta no processo de associação. Verificou-se a indução de genes relacionados à assimilação de nutrientes, resposta hormonal, promoção do crescimento e defesa vegetal. Em 2003, novas análises identificaram genes possivelmente envolvidos com processos de sinalização planta-bactéria. Estes genes foram exclusiva ou preferencialmente expressos em bibliotecas de cDNA de cana-de-açúcar infectadas com *G. diazotrophicus* (Vargas *et al.*, 2003).

Vinagre e colaboradores (2006) identificaram o gene de cana-de-açúcar, SHR5, que codifica um receptor tipo-quinase envolvido na interação. Os estudos demonstraram uma forte redução nos níveis de expressão de SHR5 em resposta a associação com as bactérias endófitas. Adicionalmente, o mesmo efeito na modulação de SHR5 não foi observado para a interação com outros

microrganismos, patogênicos e não-patogênicos. Isto sugere que a planta distingue microrganismos benéficos e patogênicos (Vinagre *et al.*, 2006).

Membros da via de sinalização do etileno apresentam modulação exclusiva em plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* (Arencibia *et al.*, 2006; Cavalcante *et al.*, 2007). Os perfis de expressão de genes da via de sinalização de etileno (um receptor de etileno e dois fatores de transcrição) são diferencialmente regulados em genótipos de cana-de-açúcar, que apresentam níveis contrastantes de eficiência na associação com a bactéria, resultando em taxas altas ou baixas de FBN. A regulação da expressão gênica também é diferenciada em resposta a microrganismos benéficos e patogênicos. Estes dados sugerem que a via de sinalização do etileno desempenha papel no estabelecimento da associação entre cana-de-açúcar e bactérias endófitas diazotróficas. Evidências indicam que o aumento no nível de receptores de etileno reduz as respostas de defesa na interação planta-bactéria, o que tornaria o hospedeiro mais tolerante a microrganismos específicos (Arencibia *et al.*, 2006; Cavalcante *et al.*, 2007).

Estudos da interação entre *G. diazotrophicus*, o patógeno *Ralstonia solanacearum* e plantas de batata-doce também mostram que a planta é capaz de distinguir endófito e patógeno no início da interação, o que permite uma resposta específica para cada tipo de organismo (Debarry *et al.*, 2005). Comparado ao patógeno, *G. diazotrophicus* causou produção menos pronunciada de espécies reativas de oxigênio nas células vegetais. Embora tenha causado alcalinização extracelular, teve ação menos efetiva que o patógeno. A acidificação do citoplasma, típica da interação planta-patógeno, não ocorreu na interação com a bactéria endófito, que inversamente causou alcalinização do citoplasma. Como a acidificação citosólica está associada a ativação dos genes de defesa, concluiu-se que as bactérias benéficas previnem a resposta de defesa tardia da planta ao induzir a alcalinização do citoplasma (Debarry *et al.*, 2005).

Um modelo propondo os níveis de regulação que controlam a associação de bactérias endófitas diazotróficas e cana-de-açúcar foi proposto (Carvalho *et al.*, 2011) (Figura 6). Neste modelo fica evidente que a eficiência da colonização depende de fatores como o genótipo da planta e características do ambiente. A regulação será mediada por diferentes fatores envolvendo desde receptores de tipo quinase até o controle do ciclo celular. Estes mecanismos regulam a defesa da planta, permitindo a promoção do crescimento vegetal. O conhecimento destes

mecanismos e das moléculas de sinalização envolvidas permitirá aplicações agrícolas futuras, que visem tornar esta associação mais eficiente (Vargas *et al.*, 2003). Isso é ainda mais relevante para cultivares de valor comercial, que apresentam baixo índice de colonização. Estes estudos resultarão em aumento da produção e redução do uso de insumos, diminuindo o impacto ambiental.

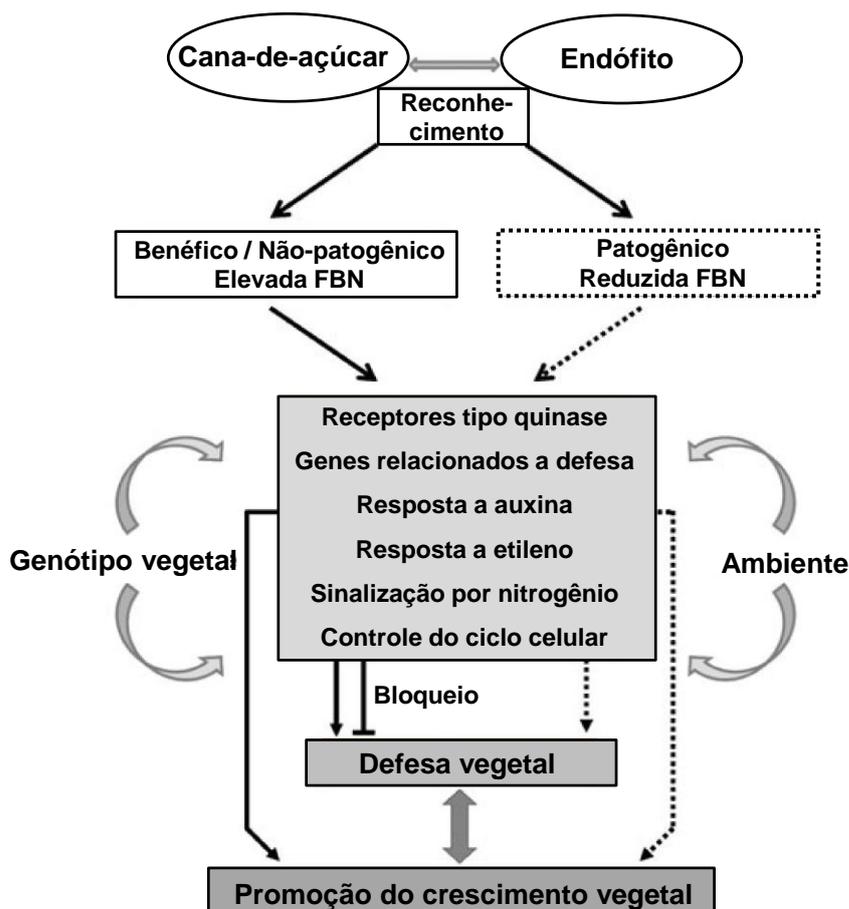


Figura 6: Modelo propondo níveis de regulação durante a associação de cana-de-açúcar e *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Linha contínua: respostas ativadas na interação de bactéria benéfica e não-patogênica com cultivar de cana-de-açúcar com elevada FBN. Linha pontilhada: respostas ativadas na interação de bactérias patogênicas e cultivar de cana-de-açúcar com reduzida FBN. Adaptado de Carvalho *et al.* (2011).

7.1. Mecanismo de Quorum Sensing

No âmbito da interação, a sinalização entre bactérias conhecida como Quorum Sensing (QS) pode ter grande participação ao controlar o tamanho da população no interior da planta durante a associação. Esta sinalização baseia-se

na síntese de sinais auto-indutores ao longo do crescimento bacteriano em um comportamento coordenado. Quando uma concentração limiar é atingida, estes sinais interagem com reguladores da transcrição, controlando o tamanho da população (Boyer e Wisniewski-Dyé, 2009). Em bactérias Gram-negativas, estas moléculas são usualmente N-acil homoserino lactonas (AHLs) (Babalola, 2010). Os sistemas QS já descritos têm sido relacionados à virulência, produção de metabólitos secundários, formação de biofilme, regulação da motilidade, conjugação, inibição do crescimento, entre outros (Williams *et al.*, 2007).

O sequenciamento do genoma de *G. diazotrophicus* PAI 5 permitiu a identificação de um sistema de QS completo em seu cromossomo (Bertalan *et al.*, 2009). Foram encontrados três genes QS: um gene sintase autoindutor (*luxI*) e dois genes reguladores da transcrição (*luxR*). Estes genes apresentam baixo conteúdo G+C (em torno de 50%) comparado ao conteúdo médio do genoma (66%), o que sugere que este mecanismo regulatório foi adquirido por transferência horizontal de genes (Nieto-Peñalver *et al.*, 2012). Recentemente, foi evidenciado a presença de moléculas tipo AHL produzidas pela estirpe PAI 5. Foram identificadas oito moléculas-sinal entre cadeias curtas e longas de AHLs: C6-, C8-, C10-, C12-, C14-, 3-oxo-C10-, 3-oxo-C12- e 3-oxo-C14-HSL. Esta foi a primeira descrição deste sistema de sinalização em *G. diazotrophicus*. A caracterização deste mecanismo irá revelar sua importância nas interações bactéria-bactéria e bactéria-planta (Nieto-Peñalver *et al.*, 2012).

8. Promoção do crescimento vegetal

Nas últimas décadas, vários efeitos positivos foram atribuídos às bactérias endófitas para o desenvolvimento da planta hospedeira. Em *G. diazotrophicus*, além da FBN, outras características têm sido evidenciadas como produção de fitormônios (Bastián *et al.*, 1998), solubilização de nutrientes (Mowade e Bhattacharyya, 2000; Saravanan *et al.*, 2007c), produção de sideróforo (Logeshwaran *et al.* 2009) e ação contra fitopatógenos (Muthukumarasamy *et al.*, 2000; Blanco *et al.*, 2005; Arencibia *et al.*, 2006). Deste modo, alguns autores têm inserido *G. diazotrophicus* no grupo das bactérias promotoras do crescimento vegetal (Saravanan *et al.*, 2007b).

Um grande número de trabalhos têm demonstrado a promoção de crescimento em várias espécies vegetais mediada pela bactéria, tais como: cana-de-açúcar (Chauhan *et al.*, 2010), arroz (Govindarajan *et al.*, 2008; Anitha e Thangaraju, 2010a), milho (Riggs *et al.*, 2001; Mehnaz e Lazarovits, 2006), sorgo (Meenakshisundaram e Santhaguru, 2011), dendezeiro (Om *et al.*, 2009), trigo (Luna *et al.*, 2010) e tomate (Luna *et al.*, 2011). Estes estudos mostraram que aspectos como genótipo da bactéria, cultivar e adubação nitrogenada são determinantes para a eficiência da associação (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1999; Munoz-Rojas e Caballero-Mellado, 2003; Suman *et al.*, 2005; Anitha e Thangaraju, 2010b). Em geral, é observado incremento de nutrientes, açúcares solúveis, pigmentos fotossintéticos, comprimento e número de raiz, ganho de parte aérea, o que reflete um aumento de biomassa vegetal. Os estudos estão concentrados na interação com cana-de-açúcar, observando-se até 42% de aumento na produtividade com uso da bactéria (Chauhan *et al.*, 2010). Entretanto, a melhor resposta de promoção de crescimento tem sido encontrada utilizando-se *G. diazotrophicus* em consórcios microbianos (Oliveira *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2006; Govindarajan *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2009).

Tendo em vista o potencial de aplicação de *G. diazotrophicus*, tem sido proposto seu uso como bioinoculante associada com outros microrganismos. Algumas patentes foram depositadas voltadas para intensificar o crescimento vegetal com o uso da bactéria e reduzir o uso de fertilizante nitrogenado (Triplett *et al.*, 2008; Vessey *et al.*, 2011). Em seguida, serão discutidos cada aspecto da promoção do crescimento vegetal mediado por *G. diazotrophicus*.

8.1. Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é um macronutriente altamente abundante na atmosfera terrestre e essencial à vida por participar na constituição de macromoléculas como ácidos nucléicos e proteínas. No entanto, sua disponibilidade como nitrogênio fixado é um dos fatores limitantes mais expressivos nos sistemas de produção agrícola. Esta limitação é decorrente da alta estabilidade química da sua forma gasosa (N₂) – a mais abundante – favorecida pela presença de uma tripla ligação. Portanto, sua pronta assimilação pela maioria dos seres vivos

requer sua conversão para uma forma combinada, que facilite sua absorção. Apenas uma pequena fração dos organismos consegue converter enzimaticamente o nitrogênio da atmosfera em amônia, que pode ser incorporada para aumento de biomassa e manutenção das células. Este processo é conhecido como FBN (Dixon e Kahn, 2004).

Desde a identificação da bactéria do gênero *Rhizobium* como fonte de FBN em nódulos radiculares de plantas leguminosas, muito interesse na pesquisa deste importante aporte de nitrogênio tem surgido. Em plantas não-leguminosas já se conhece uma variedade de bactérias fixadoras de nitrogênio em associação radicular. Contudo, a associação observada em leguminosas é diferente da verificada em gramíneas colonizadas por bactérias diazotróficas, pois nestas não é constatada a formação de nódulos nas raízes da planta (Boddey *et al.*, 2003). Estudos realizados nas décadas de 60, 70 e 80 estiveram concentrados nas bactérias da rizosfera como fontes preferenciais de FBN em gramíneas. Na década de 90, os trabalhos estiveram voltados para a possibilidade das bactérias localizadas internamente à planta serem as responsáveis pela FBN, destacando-se *G. diazotrophicus*.

Em 1991, Boddey e colaboradores demonstraram que *G. diazotrophicus* cresce e fixa N₂ em cana-de-açúcar eficientemente em baixas concentrações de sacarose (1%). Isto significa que a bactéria pode fixar N₂ inclusive dentro dos vasos de xilema, onde a concentração de sacarose varia entre 0 e 9% (Welbaum *et al.*, 1992). Baldani e Baldani (2005) relatam aumento de 28% em massa fresca da parte aérea em plantas micropropagadas inoculadas com *G. diazotrophicus* PAI 5. Boddey e colaboradores (2001) constataram que a FBN contribui com valores em torno de 30% na assimilação de nitrogênio por variedades de cana-de-açúcar. Segundo este trabalho, *G. diazotrophicus* é responsável pela maior parte do nitrogênio fixado.

Outro aspecto considerado é a capacidade de *G. diazotrophicus* realizar FBN mesmo em solos contendo nitrato, o que confere vantagem sobre outros diazotróficos, que normalmente são inibidos (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993). Isto se dá pela ausência da enzima nitrato redutase nesta bactéria (Cavalcante e Döbereiner, 1988). Assim, sua atividade diazotrófica não é prejudicada pela adição de fertilizante nitrogenado a partir deste composto (Reis *et al.*, 1994).

Análises moleculares utilizando mutantes da bactéria permitiram a identificação de 33 possíveis genes relacionados com FBN em *G. diazotrophicus*. Entre eles estão os genes *fix* e *nif*, que são bem caracterizados, e outros ainda com função desconhecida. Estes dados são importantes para elucidar o mecanismo de FBN em microrganismos endófitos (Lee *et al.*, 2000). Sevilla e colaboradores (2001), trabalhando com plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas inoculadas com *G. diazotrophicus* PAI 5 e comparando a um controle com bactéria mutante não fixadora de nitrogênio (*nif*), encontraram incrementos no acúmulo de nitrogênio e no conteúdo de matéria seca após 60 dias de cultivo. As plantas inoculadas com a cepa PAI 5 apresentaram 40% e 42% a mais de colmo fresco e massa seca foliar, respectivamente, quando comparadas com plantas inoculadas com a bactéria mutante. As evidências sugerem que pelo menos parte da promoção do crescimento observada está relacionada às contribuições da FBN. No entanto, os autores constataram que outros fatores, independentes da FBN, são bastante relevantes para o crescimento vegetal, uma vez que mutantes incapazes de fixar N₂ também promoveram crescimento. Acredita-se que a produção de fitormônios tenha uma grande contribuição.

8.2. Produção de fitormônios

Fitormônios são moléculas sinais que atuam como mensageiros químicos para controlar o crescimento e desenvolvimento vegetal. Há duas fontes destas moléculas para as plantas: a produção endógena pelos tecidos vegetais e a exógena pela ação de microrganismos. A habilidade de produzir fitormônios é muito difundida entre bactérias do solo e bactérias associadas com plantas (Baca e Elmerich, 2007).

Deste modo, outro efeito da colonização de plantas por *G. diazotrophicus* está relacionado à biossíntese de hormônios vegetais. Dentre os hormônios promotores de crescimento sintetizados pela bactéria encontram-se as auxinas, em especial o ácido indol acético (AIA). Este fitormônio atua sobre o crescimento das raízes, o que resulta no aumento do comprimento, número de raízes laterais e de pêlos radiculares (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993; Bastián *et al.*, 1998).

Lee e colaboradores (2004) desenvolveram um banco de 2.500 mutantes de *G. diazotrophicus* para análise do fenótipo de síntese de AIA, tendo sido encontrados três mutantes candidatos que apresentaram produção reduzida deste hormônio. Realizou-se a complementação do mutante que apresentava a menor produção de AIA (apenas 6% comparada à selvagem). O sequenciamento do fragmento que complementou o fenótipo mostrou que, possivelmente, a síntese de AIA, nesta bactéria, está relacionada com a biogênese do citocromo *c*. Neste mesmo trabalho, o mutante deficiente em citocromo *c* foi inoculado em plantas de cana-de-açúcar, e estas foram comparadas com plantas inoculadas com a bactéria selvagem. Foi observado que estas bactérias mutantes não causaram promoção do crescimento. Contudo, a capacidade de colonização e o multiplicação do mutante dentro da planta manteve-se similar à da bactéria selvagem. Com este trabalho, foi verificada a considerável contribuição da produção deste fitormônio para a promoção do crescimento vegetal.

As giberelinas, hormônios vegetais associados à elongação do caule, são um segundo grupo de fitormônios, que também já tiveram sua produção relatada em diazotróficos. No entanto, há poucos trabalhos na literatura avaliando esta característica na bactéria *G. diazotrophicus* (Bastián *et al.*, 1998). Com isso, a produção de fitormônios pela bactéria é uma área do conhecimento que deve ser mais explorada, já que os ganhos com esta característica são realmente consideráveis pelo que é mostrado no trabalho de Lee e colaboradores (2004).

8.3. Solubilização de nutrientes

Comumente, microrganismos necessitam solubilizar compostos insolúveis que ocorrem no ambiente, priorizando a liberação de metais essenciais e a utilização dos nutrientes associados. As formas insolúveis são disponibilizadas por prótons, ligantes quelados e por sistemas de oxirredução presentes na superfície celular e membranas das bactérias (Fasim *et al.*, 2002). A liberação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular tem sido sugerida como responsável pela solubilização de fosfato insolúvel em muitos estudos (Goldstein, 1995; Kim *et al.*, 1997; Rodriguez e Fraga, 1999; Khan *et al.*, 2006). Tais ácidos podem dissolver diretamente o fosfato mineral, como resultado da troca aniônica do PO_4^{-3}

por um ânion ácido, ou podem quelar ambos os íons ferro e alumínio associados com o fosfato.

G. diazotrophicus foi descrita como uma bactéria solubilizadora de fosfato (Maheshkumar *et al.* 1999), com potencial para liberar fósforo de formas fixadas sob condições *in vitro*. Durante a solubilização, foi detectada a liberação de succinato, tartarato, citrato e gluconato, o que sugere o envolvimento de ácidos orgânicos (Maheshkumar *et al.* 1999). Desde então, alguns trabalhos foram realizados visando avaliar esta característica promotora do crescimento vegetal em diferentes isolados de *G. diazotrophicus* (Mowade e Bhattacharyya, 2000; Saravanan *et al.*, 2003; Madhaiyan *et al.*, 2004; Saravanan *et al.*, 2007a; Saravanan *et al.*, 2007c; Saravanan *et al.*, 2007d; Intorne *et al.*, 2009; Sarathambal *et al.*, 2010; Crespo *et al.*, 2011).

Madhaiyan e colaboradores (2004) estudaram o potencial de diferentes estirpes de *G. diazotrophicus* isoladas de plantas de beterraba, café, cenoura e rabanete quanto à solubilização de fósforo e zinco. Este micronutriente foi avaliado considerando sua deficiência na maioria dos solos e baixa mobilidade após adubação, de um modo similar ao que ocorre com fósforo. Embora todas as estirpes isoladas tenham solubilizado fósforo eficientemente, a habilidade de solubilizar zinco diferiu entre os isolados (Madhaiyan *et al.*, 2004). Estudo posterior mostrou a descrição detalhada da solubilização de zinco em *G. diazotrophicus* (Saravanan *et al.*, 2007c). Foi identificado que esta característica seria mediada pela ação de ácido orgânico 5-cetoglucônico, produzido em grande quantidade pela bactéria. Isto foi confirmado através de análises moleculares com mutantes de *G. diazotrophicus* incapazes de solubilizar fósforo e zinco (Intorne *et al.*, 2009). A capacidade de solubilizar nutrientes apresentada pela bactéria está diretamente envolvida com a produção de ácido glucônico mediada pelo complexo PQQ-GDH. Em estudo recente, foi verificado aspectos associados a solubilização de fósforo e o complexo PQQ-GDH. Neste trabalho, a bactéria promoveu a solubilização de 98% do fósforo insolúvel (Crespo *et al.*, 2011). Quanto ao zinco, a eficiência de solubilização varia em torno de 40 a 50%, dependendo do composto e da cepa utilizados (Saravanan *et al.*, 2007c; Natheer e Muthukkaruppan, 2012).

A solubilização de nutrientes se torna especialmente interessante em bactérias associadas à plantas, pois uma vez solubilizados, tais compostos

podem tornar-se disponíveis para a absorção pelos vegetais. Trabalhos têm avaliado o papel de *G. diazotrophicus* quanto à solubilização de nutrientes e a interação com plantas. A disponibilização de zinco para plantas de milho foi claramente demonstrada pela ação da bactéria. Foi observado a absorção do nutriente pela planta intermediada por *G. diazotrophicus* através de compostos insolúveis marcados com ^{65}Zn . Somado a isso, quando comparado o efeito da bactéria em solo deficiente ou suficiente em zinco, o benefício foi maior em solo deficiente não esterilizado. Isto ressalta o papel da comunidade microbiana, mediando a solubilização do micronutriente (Sarathambal *et al.*, 2010). Foi verificado também que estudos *in vitro* utilizando tomate e trigo inoculado com *G. diazotrophicus* apresentaram intensa acidificação do meio de cultura pela presença de ácido glucônico. Não houve diferença entre os níveis de solubilização de fósforo sob condições de FBN e não-FBN (Crespo *et al.*, 2011).

Em trabalho realizado em 2007, avaliando a solubilização de zinco mediada pela bactéria, foi observada a indução de pleomorfismo celular (Saravanan *et al.*, 2007a). Com isso, é possível especular que esta seja uma resposta ao estresse causado pelo excesso de zinco no meio de cultura. Foi observado, ainda que a bactéria parece tolerar elevadas concentrações deste metal, que apesar de ser um micronutriente, em excesso causa danos aos organismos. Com isso, se torna interessante estudar a resistência a metal nesta bactéria e quais seriam os mecanismos envolvidos com esta característica.

8.4- Produção de sideróforos

Sideróforos são compostos de baixo peso molecular sintetizados por bactérias, fungos e plantas, que atuam na captação de ferro presente no ambiente, devido a sua característica de elevada afinidade por este cátion. Apesar de sua vasta abundância na crosta terrestre, o Fe^{3+} possui baixa solubilidade, de modo que os sideróforos agem como quelantes deste cátion, transportando-o para o interior celular (Hider e Kong, 2010).

Em *G. diazotrophicus* foi descrita a produção dos sideróforos salicilato, catecol e hidroxamato, sendo verificada a ausência de carboxilato (Logeshwaran *et al.*, 2009). Apesar do comportamento endófito, há trabalhos demonstrando a

presença da bactéria na rizosfera de plantas, o que justificaria sua necessidade de produzir sideróforos (Logeshwaran *et al.*, 2009).

Apesar da preferência por Fe^{3+} , os sideróforos também podem quelar outros metais. Há evidências de que metais podem ativar a produção de sideróforos em bactérias. Isto implica no envolvimento destes compostos na homeostase de metais, em especial na tolerância a metais pesados. A ligação dos metais ao sideróforo reduz a concentração de metal livre no meio, afetando sua difusão para o interior celular e a toxicidade (Schalk *et al.*, 2011). Neste sentido, é válido considerar a habilidade de *G. diazotrophicus* resistir a metal.

8.5- Biocontrole de fitopatógenos

A atividade exercida por *G. diazotrophicus* contra patógenos foi primeiramente demonstrada para o fungo *Colletotrichum falcatum*, causador da podridão vermelha em cana-de-açúcar, uma das principais pragas que atinge esta cultura. A atuação da bactéria se dá através da inibição do crescimento fúngico *in vitro*. O mecanismo de ação permanece desconhecido, no entanto, sugere-se a presença de propriedades fungistáticas ou fungicidas. Somado a isso, acredita-se que a redução do pH mediada pela bactéria prejudica o crescimento do fungo (Muthukumarasamy *et al.*, 2000). Mehnaz e Lazarovits (2006) relataram a ação antagonica de *G. diazotrophicus* contra uma gama de outros fungos. Na Tabela 2 são apresentados os fitopatógenos para os quais foi avaliado este tipo de ação mediada pela bactéria.

O antagonismo mediado por *G. diazotrophicus* contra outros organismos é melhor avaliado com o patógeno *Xanthomonas albilineans*, bactéria causadora da doença da escaldadura das folhas em cana-de-açúcar (Piñón *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2005; Arencibia *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2010). Blanco e colaboradores (2005) verificaram que *G. diazotrophicus* produz uma bacteriocina semelhante a uma lisozima, que age sobre o patógeno, inibindo seu crescimento. Além da produção de bacteriocina, foi demonstrada a indução de resistência sistêmica por *G. diazotrophicus* mediando o biocontrole de *X. albilineans*. Isto se dá pela ativação dos mecanismos de defesa das plantas de cana-de-açúcar inoculadas previamente com *G. diazotrophicus*. Tais mecanismos tornam-se uma proteção para a planta contra a infecção por *X. albilineans* (Arencibia *et al.*, 2006).

Tabela 2: Ação antagonística de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra fitopatógenos.

Organismo	Referência
<i>Xanthomonas albilineans</i> ^a	Blanco <i>et al.</i> , 2005; Blanco <i>et al.</i> , 2010
<i>Meloidogyne incognita</i> ^b	Bansal <i>et al.</i> , 2005; Saravanan <i>et al.</i> , 2007d
<i>Colletotrichum falcatum</i>	Muthukumarasamy <i>et al.</i> , 2000
<i>Fusarium solani</i>	Mehnaz e Lazarovits, 2006
<i>F. solani phaseoli</i>	Mehnaz e Lazarovits, 2006
<i>F. sambicinum</i>	Mehnaz e Lazarovits, 2006
<i>F. culmorum</i>	Mehnaz e Lazarovits, 2006
<i>F. moniliforme</i>	Mehnaz e Lazarovits, 2006
<i>F. graminearum</i>	Mehnaz e Lazarovits, 2006
<i>Helminthosporium carbonum</i>	Mehnaz e Lazarovits, 2006

^aBactéria^bNematóide

As espécies não indicadas correspondem à fungos.

Juntamente com fungos e bactérias, os fitonematóides apresentam grande importância dentre os patógenos conhecidos. O nematóide das galhas, *Meloidogyne incognita*, destaca-se como um dos mais importantes, pois é capaz de infectar quase todas as espécies cultivadas. Estudos têm mostrado a ação *in vitro* e *in planta* de *G. diazotrophicus* contra *M. incognita* (Bansal *et al.*, 2005; Saravanan *et al.*, 2007d). De acordo com Bansal *et al.* (2005), a redução do pH, a excreção de amônia e a produção de ácidos graxos voláteis pela bactéria são os agentes responsáveis pela redução na eclosão de ovos e na incidência do patógeno. Experimentos em casa de vegetação com plantas de algodão em solo naturalmente infestado com o nematóide ao longo de três anos mostraram a promoção do crescimento vegetal, que atingiu ganhos de produtividade de até 85% comparado ao controle (Bansal *et al.* 2005). Ácidos orgânicos produzidos pela bactéria também mostraram ação nematicida. Além disso, estes ácidos são responsáveis pela solubilização de compostos de zinco o que sugere ainda, que a disponibilização de íons Zn^{2+} pela bactéria contribui para o efeito deletério na população de nematóides, devido à toxicidade do metal (Saravanan *et al.*, 2007d). Ensaio realizados *in vitro* mostraram a ação da bactéria, alcançando até 75% de mortalidade do nematóide na presença de ZnO. O tratamento com 25% de ácido glucônico foi o que apresentou melhor resultado com 90% de mortalidade. Experimentos com plantas de tomate *in vitro* mostraram que a presença da bactéria reduz em 35% a infestação pelo nematóide. A bactéria na presença de ZnO reduz em 50%, enquanto o ácido reduz 80% (Saravanan *et al.*, 2007d).

Novamente, destaca-se a toxicidade de zinco, que neste caso atua sobre o patógeno, no entanto, sem afetar a bactéria negativamente.

9. Genoma

G. diazotrophicus PAI 5 foi o primeiro endófito diazotrófico da classe Alphaproteobacteria a ter seu genoma completamente sequenciado. Foram anotados aproximadamente 4.000 sequências codificantes. Estas sequências revelam características relacionadas ao estilo de vida endófito, incluindo 851 genes transferidos horizontalmente, relacionados com a adaptação ao habitat vegetal. Foram anotadas ainda mais de 1.000 sequências que codificam proteínas hipotéticas. Estes dados oferecem uma fonte de informação importante, que pode ser usada para manipular as interações planta-bactéria com o objetivo de melhorar a produção de culturas agrícolas, como a cana-de-açúcar. Dentre as outras aplicações biotecnológicas, estão a secreção de ácidos orgânicos e produção de bacteriocina e antifúngicos (Bertalan *et al.*, 2009). Logo, considerando-se a importância de *G. diazotrophicus*, um melhor entendimento da sua fisiologia permitirá o desenvolvimento de métodos mais eficientes para a sua inoculação em espécies vegetais e possíveis avanços biotecnológicos. Atualmente, a abordagem de genômica funcional utilizada para *G. diazotrophicus* abrange estudos de mutagenese e análise proteômica. Como relatado no presente trabalho, algumas vias vêm sendo mais estudadas, como a solubilização de nutrientes e os trabalhos de interação. Mas ainda há muito para ser elucidado.

10. Conclusão

Foi apresentado que *G. diazotrophicus* é uma bactéria com vasto potencial de aplicação. No entanto, torna-se evidente a falta de estudos quanto à produção de sideróforos e fitormônios, por exemplo, que são características importantes para a promoção do crescimento vegetal. As aplicações industriais também têm muito a expandir. São poucos os estudos que tratam do uso industrial de *G. diazotrophicus*. A maioria dos trabalhos está relacionada à produção de levana. No entanto, o ácido glucônico e a molécula de PQQ tem elevado potencial de aplicação. Com isso, concluímos que *G. diazotrophicus* é um organismo

promissor e que merece atenção da comunidade científica. Seu potencial biotecnológico não abrange somente a agricultura, onde se concentram o maior número de trabalhos, mas inclui também indústria de alimentos, construção civil, metalurgia e farmacêutica.

11. Referências bibliográficas

- ADRIANO-ANAYAB, M. L.; SALVADOR-FIGUEROA, M.; OCAMPO, J. A.; GARCÍA-ROMERA, I. Hydrolytic enzyme activities in maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) roots inoculated with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Glomus intraradices*. **Soil Biol. Biochem.** v. 38 p. 879-886. 2006.
- ALVAREZ, B.; MARTINEZ-DRETS, G. Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. **Can. J. Microbiol.** v. 41 p. 918-924. 1995.
- ANITHA, K. G.; THANGARAJU, M. Influence of N fertilization on colonization and activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane. **J. Agro. Crop. Sci.** v. 1 p. 6-11. 2010a.
- ANITHA, K. G.; THANGARAJU, M. Growth promotion of rice seedlings by *Gluconacetobacter diazotrophicus* under *in vitro* conditions. **J. Cell Plant Sci.** v. 1 p. 6-12. 2010b.
- ARENCIBIA, A. D.; VINAGRE, F.; ESTEVEZ, Y.; BERNAL, A.; PEREZ, J.; CAVALCANTI, J.; SANTANA, I.; HEMERLY, A. S. *Gluconacetobacter diazotrophicus* elicits a sugarcane defense response against a pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans*. **Plant Signal. Behav.** v. 1 p. 265-273. 2006.
- ARRIETA, J.; HERNÁNDEZ, L.; COEGO, A.; SUÁREZ, V.; BALMORI, E.; MENÉNDEZ, C.; PETIT-GLATRON M.-F.; CHAMBERT, R.; SELMAN, G. Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. **Microbiology** v. 142 p. 1077-1085. 1996.
- ARRIETA, J. G.; SOTOLONGO, M.; MENÉNDEZ, C.; ALFONSO, D.; TRUJILLO, L. E.; SOTO, M.; RAMÍREZ, R.; HERNÁNDEZ, L. A type II protein secretory pathway required for levansucrase secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **J. Bacteriol.** v. 186 p. 5031-5039. 2004.
- ASHBOLT, N. J.; INKERMAN, A. Acetic acid bacterial biota of the pink sugar cane mealybug, *Saccharococcus sacchari*, and its environs. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 56 p. 707-712. 1990.
- BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnol. Lett.** v. 32 p. 1559-1570. 2010.
- BACA, B. E.; ELMERICH, C. **Microbial production of plant hormones.** In: Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations, Elmerich, C. and W.E. Newton (Eds.). Springer, Dordrecht, pp: 113-143.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biol. Biochem.** v. 29. p. 911-922. 1997.

BALDANI, J. I.; BALDANI, L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 77. p. 549-579. 2005.

BANGUELA, A.; HERNÁNDEZ, L. Fructans: from natural sources to transgenic plants. **Biotecnol. Apl.** v. 23. p. 202-210. 2006.

BANGUELA, A.; RODRÍGUEZ, R.; ARRIETA, J. G.; MENÉNDEZ, C.; KAIRÚZ, E.; TRUJILLO, L. E.; HERNÁNDEZ, L. Levansucrase activity but not fructan accumulation in transgenic *IsdA*-expressing sugarcane recovered by optimized microprojectile bombardment of embryogenic calli. **Biotecnol. Apl.** v. 28 p. 216-220. 2011.

BANSAL, R. K.; DAHIYA, R. S.; NARULA, N.; JAIN, R. K. Management of *Meloidogyne incognita* in cotton, using strains of the bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Nematol. Mediterr.** v. 33. p. 101-105. 2005.

BARBOSA, E. A.; PERIN, L.; REIS, V. M. Uso de diferentes fontes de carbono por estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isoladas de cana-de-açúcar. **Pesq. Agropec. Bras.** v. 41 n. 5 p. 827-833. 2006.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 e A3 by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regul.** v. 24 p. 7-11. 1998.

BELLONE, C. H.; DE BELLONE, S. D. V. C.; PEDRAZA, R. O.; MONZÓN, M. A. Cell colonization and infection thread formation in sugar cane roots by *Acetobacter diazotrophicus*. **Soil Biol. Biochem.** v. 29 p. 965-967. 1997.

BERTALAN, M.; ALBANO, R.; PADUA, V.; ROUWS, L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K.; SCHWAB, S.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, A.; FRANCA, L.; MAGALHAES, V.; ALQUERES, S.; CARDOSO, A.; ALMEIDA, W.; LOUREIRO, M. M.; NOGUEIRA, E.; CIDADE, D.; OLIVEIRA, D.; SIMÃO, T.; MACEDO, J.; VALADAO, A.; DRESCHSEL, M.; FREITAS, F.; VIDAL, M.; GUEDES, H.; RODRIGUES, E.; MENESES, C.; BRIOSO, P.; POZZER, L.; FIGUEIREDO, D.; MONTANO, H.; JUNIOR, J.; FILHO, G.; FLORES, V.; FERREIRA, B.; BRANCO, A.; GONZALEZ, P.; GUILLOBEL, H.; LEMOS, M.; SEIBEL, L.; MACEDO, J.; ALVES-FERREIRA, M.; SACHETTO-MARTINS, G.; COELHO, A.; SANTOS, E.; AMARAL, G.; NEVES, A.; PACHECO, A. B.; CARVALHO, D.; LERY, L.; BISCH, P.; ROSSLE, S. C.; URMENYI, T.; VON KRUGER, W.; MARTINS, O.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5. **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 albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. **J. Biosci. Bioeng.** v. 99. p. 366-371. 2005.

BLANCO, Y.; LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane endophyte, inhibits xanthan production by sugarcane-invading *Xanthomonas albilineans*. **J. Plant Interac.** v. 5 p. 241-248. 2010.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant Soil** v. 137. p. 111-117. 1991.

BODDEY R. M.; POLIDORO J. C.; RESENDE A. S.; ALVES B. J. R.; URQUIAGA S. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugarcane and other grasses. **Aust. J. Plant Physiol.** v. 28 p. 889-905. 2001.

BODDEY, M. R.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant Soil** v. 252 p. 139-149. 2003.

BONIOLO, F.; RODRIGUES, R.; DELATORRE, E.; DA SILVEIRA, M.; FLORES, V.; BERBERT-MOLINA, M. A. Glycine betaine enhances growth of nitrogen-fixing bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 under saline stress conditions. **Curr. Microbiol.** v. 59 p. 593-599. 2009.

BOYER, M.; WISNIEWSKI-DYÉ, F. Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. **FEMS Microbiol. Ecol.** v 70 p 1-19. 2009.

CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTEZ-RAMIREZ, L. E.; REIS, V. M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* population and identification of a new genetic distance group. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 61 p. 3308-3013. 1995.

CARVALHO, T. L. G.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Sugarcane genetic controls involved in the association with beneficial endophytic nitrogen fixing bacteria. **Tropical Plant Biol.** v. 4 p. 31-41. 2011.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant Soil** v. 108 p. 23-31. 1988.

CAVALCANTE, J. J. V.; VARGA, C.; E. M. NOGUEIRA, E. M.; VINAGRE, F.; SCHWARCZ, K.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. **J. Exp. Bot.** v. 58 p. 673-686. 2007.

CHAUHAN, H.; SHARMA, A.; SAINI, S. K. Response of sugarcane to endophytic bacterial inoculation. **Indian J. Sugarcane Technol.** v. 25 p.1-4. 2010.

CHO, H.; PARK, S.; RYU, C.; KIM, J. F.; KIM, J. Interference of quorum sensing and virulence of the rice pathogen *Burkholderia glumae* by an engineered endophytic bacterium. **FEMS Microbiol. Ecol.** v. 60. p. 14-23. 2007.

CHOI, O.; KIM, J.; KIM, J.-G.; JEONG, Y.; MOON, J. S.; PARK, C. S.; HWANG, I.

Pyrroloquinoline Quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B161. **Plant Physiol.** v. 146 p. 657-668. 2008.

CRESPO, J. M.; BOIARDI, J. L.; LUNA, M. F. Mineral phosphate solubilization activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment. **Agric Sci.** v. 2 p. 16-22. 2011.

COCKING, E. C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant Soil** v. 252 p. 169-175. 2003.

COCKING, E. C.; STONE, P. J.; DAVEY, M. R. Intracellular colonization of roots of Arabidopsis and crop plants by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **In vitro Cell. Dev. Biol. Plant** v. 42 p. 74-82. 2006.

DEBARRY, M.; MARTEN, I.; NGEZAHAYO, A.; KOLB, H.-A. Differential defense responses in sweet potato suspension culture. **Plant Sci.** v. 168 p. 1171-1179. 2005.

DIBUT, B.; ORTEGA, M.; MARTÍNEZ, R.; FEY, L.; RÍOS, Y. Nuevos aislados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica para Cuba. **Cul. Trop.** v. 26 p. 5-10. 2005.

DIBUT, B.; MARTÍNEZ, R.; RÍOS, Y.; ORTEGA, M.; PLANA, L.; TEJADA, G.; RODRÍGUEZ, J. Estudio de la asociación *Gluconacetobacter diazotrophicus*-viandas tropicales en suelo ferralítico rojo. i. selección de cepas efectivas para la biofertilización de boniato, yuca y malanga. **Cul. Trop.** v. 31 p. 51-57. 2010.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 2. p. 621-631. 2004.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; MCCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. R.; CABADILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A. Nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. **Plant Physiol.** v. 105. p. 1139-1147. 1994.

DONG, Z.; MCCULLY, M. E.; CANNY, M. J. Does *Gluconacetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data. **Ann. Bot.** v. 80 p.1471-58. 1997.

FASIM, F.; AHMED, N.; PARSONS, R.; GADD, G. M. Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 213. p. 1-6. 2002.

FISHER K.; NEWTON, W.E. Nitrogenase proteins from *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane-colonizing bacterium. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1750. p. 154-165. 2005.

FLORES-ENCARNACIÓN, M.; CONTRERAS-ZENTELA, M.; SOTO-URZUA, L.; AGUILAR, G. R.; BACA, B. E.; ESCAMILLA, J. E. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. **J. Bacteriol.** v. 181. p. 6987-6995. 1999.

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

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; CABALLERO MELLADO, J.; SEPÚLVEDA J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. **FEMS Microbiol. Ecol.** v. 29 p. 117-128. 1999.

GALAR, M. L.; BOIARDI, J. L. Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.43 p. 713-716. 1995.

GILLIS, M.; 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. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 39. p. 361-364. 1989.

GOLDSTEIN, A. H. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. **Biol. Agric. Hortic.** v. 12 p. 185-193. 1995

GOVINDARAJAN, M.; KWON, S.-W.; WEON, H.-Y. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 23 p. 997-1006. 2007.

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; KWON, S.-W.; WEON, H.-Y.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. **Microbial. Ecol.** v. 55 p. 21-37. 2008.

HANNA A. L.; YOUSSEF, H. H.; AMER, W. M.; MONIB, M.; FAYEZ, M.; HEGAZI, N. A. Diversity of bacteria nesting the plant cover of north Sinai deserts, Egypt. **J. Adv. Res.** doi:10.1016/j.jare.2011.11.003. (in press) 2012.

HERNÁNDEZ, L.; ARRIETA, J.; MENÉNDEZ, C.; VAZQUEZ, R.; COEGO, A.; SUÁREZ, V.; SELMAN-HOUSSEIN, G.; PETIT-GLATRON, M. F.; CHAMBERT, R. Isolation and enzymatic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. **Biochem. J.** v. 309 p. 113-118. 1995.

HERNÁNDEZ, L.; ARRIETA, J.; BETANCOURT, L.; FALCÓN, V.; MADRAZO, J.; COEGO, A.; MENÉNDEZ, C. Levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4 is secreted via periplasm by a signal-peptide-dependent pathway. **Curr. Microbiol.** v. 39 p. 146-152. 1999a.

HERNÁNDEZ, L.; RAMÍREZ, R.; HORMAZA, J. V.; MADRAZO, J.; ARRIETA, J. Increased levansucrase production by a genetically modified *Acetobacter*

diazotrophicus strain in shaking batch cultures. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 28 p. 41-44. 1999b.

HERNÁNDEZ, L.; SOTOLONGO, M.; ROSABAL, Y.; MENÉNDEZ, C.; RAMÍREZ, R.; CABALLERO-MELLADO, J.; ARRIETA, J. Structural levansucrase gene (*IsdA*) constitutes a functional locus conserved in the species *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Arch. Microbiol.** v. 174 p. 120-124. 2000.

HIDER, R. C.; KONG, X. Chemistry and biology of siderophores. **Nat. Prod. Rep.** v. 27 p. 637-657. 2010.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. **J. Biotechnol.** v. 106. p. 169–178. 2003.

INTORNE, A. C.; OLIVEIRA, M. V. V.; LIMA, M. L.; SILVA, J. F.; OLIVARES, F. L.; DE SOUZA FILHO, G. A. Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. **Arch. Microbiol.** v. 191 p. 477-483. 2009

JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by nitrogen fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **J. Exp. Bot.** v. 45 p. 757-766. 1994.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; DE OLIVEIRA, A. L.; DOS REIS, F. B.; DA SILVA, L. G.; REIS, V. M. Further observations on the interaction between sugarcane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. **J Exp. Bot.** v. 52 p. 747-760. 2001.

JIMENEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; MASCARUA-ESPARZA, M. A.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing Acetobacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 63 p. 3676-3683. 1997.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review. **Agron. Sustain. Dev.** v. 26 p. 1-15. 2006.

KIM, K. Y.; JORDAN, D.; KRISHNAN, H. B. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 153 p. 273–277. 1997.

KLOEPPER, J. W.; BEAUCHAMP C. J. A review of issues related measuring colonization of plant roots by bacteria. **Can. J. Microbiol.** v. 38 p. 1219-1232. 1992.

LAMBAIS, A. *In silico* differential display of defense-related expressed sequence tags from sugarcane tissues infected with diazotrophic endophytes. **Genet. Mol. Biol.** v. 24 p. 103-111. 2001.

LEE, S.; RETH, A.; MELETZUS, D.; SEVILLA, M.; KENNEDY, C. Characterization of a major cluster of *nif*, *fix*, and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. **J. Bacteriol.** v. 182 p. 7088-7091. 2000.

LEE, S.; FLORES-ENCARNACION, M.; CONTRERAS-ZENTELLA, M.; GARCIA-FLORES, L.; ESCAMILLA, J. E.; KENNEDY, C. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome *c* biogenesis genes. **J. Bacteriol.** v. 186 p. 5385-5391. 2004.

LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ¹⁵N aided nitrogen balance. **Soil Biol. Biochem.** v. 19 p. 165–170. 1987.

LOGANATHAN, P.; SUNITA, R.; PARIDA, A. K.; NIR, S. Isolation and characterization of two genetically distinct groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine coracana* L. **J. Appl. Microbiol.** v. 87 p. 167-172. 1999.

LOGESHWARAN, P.; THANGARAJU, M.; RAJASUNDARI, K. Hydroxamate siderophores of endophytic bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolated from sugarcane roots. **Aust. J. Basic Appl. Sci.** v. 3 p. 3564-3567. 2009.

LUNA, M. F.; MIGNONE, C. F.; BOIARDI, J. L. The carbon source influences the energetic efficiency of the respiratory chain of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 54 p. 564-569. 2000.

LUNA, M. F.; BERNARDELLI, C. E.; GALAR, M. L.; BOIARDI, J. L. Glucose metabolism in batch and continuous cultures of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 3. **Curr. Microbiol.** v. 52 p. 163-168. 2006.

LUNA, M. F.; GALAR, M. L.; APREA, J.; MOLINARI, M. L.; BOIARDI, J. L. Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Biotechnol. Lett.** v. 32 p. 1071-1076. 2010.

LUNA, M. F.; APREA, J.; CRESPO, J. M.; BOIARDI, J. L. Colonization and yield promotion of tomato by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Appl. Soil Ecol.** doi:10.1016/j.apsoil.2011.09.002. (in press) 2011.

MADHAIYAN, M.; SARAVANAN, V. S.; JOVI, D. B. S. S.; LEE, H.; THENMOZHI, R.; HARI, K.; SA T. M. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. **Microbiol. Res.** v. 159. p. 233-243. 2004.

MADHAIYAN, A.; POONGUZHALI, S.; HARI, K.; SARAVANAN, V. S.; SA, T. Influence of pesticides on the growth rate and plant-growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Pestic. Biochem. Physiol.** v. 84 p. 143-154. 2006.

MAHESHKUMAR, K. S.; KRISHNARAJ, P. U.; ALAGAWADI, A. R. Mineral phosphates solubilizing activity of *Acetobacter diazotrophicus*: a bacterium associated with sugarcane. **Curr. Sci.** v. 76 p. 874-875. 1999.

MATIRU, V.; THOMSON, J. Can *Acetobacter diazotrophicus* be used as a growth promoter for coffee, tea and banana plants? In: Dakora, FD (Ed.) Proceedings of the 8th Congress of the African Association for Biological Nitrogen Fixation. University of Cape Town, South Africa, pp 129-130. 1998.

MEENAKSHISUNDARAM, M.; SANTHAGURU, K. Studies on association of arbuscular mycorrhizal fungi with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its effect on improvement of *Sorghum bicolor* (L.). **Int. J. Cur. Sci. Res.** v. 1 p. 23-30. 2011.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecol.** v. 51 p. 326-335. 2006.

MENÉNDEZ, C.; HERNÁNDEZ, L.; SELMAN, G.; MENDOZA, M. F.; HEVIA, P.; SOTOLONGO, M.; ARRIETA, J. G. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an exo-levanase gene from the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4. **Curr. Microbiol.** v. 45 p 5-12. 2002.

MENÉNDEZ, C.; HERNÁNDEZ, L.; BANGUELA, A.; PAÍS, J. Functional production and secretion of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*. **Enzyme Microbial Technol.** v. 34 p. 446-452. 2004.

MENÉNDEZ, C.; HERNÁNDEZ, L.; PAÍS J. M.; BANGUELA, A.; RAMÍREZ, R.; TRUJILLO, L. E.; ALFONSO, D.; ARRIETA, J. G. Identification and recombinant expression of a bacterial exolevanase useful for the production of high fructose syrups. **Biotechnol. Apl.** v. 22 p. 68-72. 2005.

MENÉNDEZ, C.; BANGUELA, A.; CABALLERO-MELLADO, J.; HERNÁNDEZ, L. Transcriptional regulation and signal-peptide-dependent secretion of exolevanase (LsdB) in the endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 75 p. 1782-1785. 2009.

MOWADE, S.; BHATTACHARYYA, P. Resistance of P-solubilizing *Acetobacter diazotrophicus* to antibiotics. **Curr. Sci.** v. 79 p. 1591-1594. 2000.

MUNOZ-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. **Microb. Ecol.** v. 46 p. 454-464. 2003.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; VADIVELU, M. Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal organism of red-rot of sugarcane. **Curr. Sci.** v. 78 p. 1063-1066. 2000.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LOGANATHAN, P. Effect of inorganic N on the population, *in vitro* colonization and morphology of *Acetobacter*

diazotrophicus (syn. *Gluconacetobacter diazotrophicus*). **Plant Soil** v. 243 p. 91-102. 2002a.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; SESHADRI, S.; LAKSHMINARASIMHAN, C. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn *Acetobacter dizotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Curr. Sci. India** v. 83 p. 137-145. 2002b.

MUTHUKUMARASAMY, R.; CLEENWERCK, I.; REVATHI, G.; VADIVELU, M.; JANSSENS, D.; HOSTE, B.; GUM, K. U.; PARK, K.-D.; SON, C. Y.; SA, T.; CABALLERO-MELLADO, J. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. **Syst. Appl. Microbiol.** 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. **J. Appl. Microbiol.** v. 102. p. 981-991. 2007.

NATHEER, S. E.; MUTHUKKARUPPAN, S. D. Assessing the *in vitro* zinc solubilization potential and improving sugarcane growth by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Ann. Microbiol.** v. 62 p. 435-441. 2012.

NIETO-PEÑALVER, C. G.; BERTINI, E. V.; FIGUEROA, L. I. Identification of N-acyl homoserine lactones produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 cultured in complex and synthetic media. **Arch. Microbiol.** v. 194 p. 615-622. 2012.

NOGUEIRA, E. M.; VINAGRE, F.; MASUDA, H. P.; VARGAS, C.; PÁDUA, V. L. M.; SILVA, F. R.; SANTOS, R. V.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. **Genet. Mol. Biol.** v.24 p. 199-206. 2001.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Soil Biol. Biochem.** 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 Soil** v. 242 p. 205-215. 2002.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Braz. J. Microbiol.** v. 34 p. 59-61. 2003.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant Soil** v. 284 p. 23-32. 2006.

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. **Eur. J. Soil Biol.** v. 45 p. 106-113. 2009.

OM, A. C.; GHAZALI, A. H. A.; KENG, C. L.; ISHAK, Z. Microbial inoculation improves growth of oil palm plants (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Trop. Life Sci. Res.** v. 20 p. 71-77. 2009.

PAULA, M. A.; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomea batatas*), sugarcane (*Saccharum* sp.) and sweet sorghum (*Sorghum bicolor*). **Biol. Fertil. Soils.** v. 11 p. 111-115. 1991.

PIÑÓN, D.; CASAS, M.; BLANCH, M.; FONTANIELLA, B.; BLANCO, Y.; VICENTE, C.; SOLAS, M. T.; LEGAZ, M. E. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugarcane pathogen. **Res. Microbiol.** v. 153 p. 345-351. 2002.

RAMACHANDRAN, S.; FONTANILLE, P.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. **Food Technol. Biotechnol.** v. 44 p. 185-195. 2006.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: deizotrophic endophytes. **Trends Microbiol.** v. 6 p. 139-144. 1998.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 10 p. 101-104. 1994.

RIGGS, P. J.; CHELIUS, M. K.; INIGUEZ, A. L.; KAEPLER, S. M.; TRIPLETT, E. W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Aust. J. Plant Physiol.** v. 28 p. 829-836. 2001.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnol. Adv.** v. 17 p. 319-339. 1999.

ROESCH, L. F. W.; OLIVARES, F. L.; PASSAGLIA, L. M. P.; SELBACH, P. A.; SACCOL DE SA, E. L.; CAMARGO, F. A. O. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 22 p. 967-974. 2006.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Mol. Plant Microbe Interact.** v. 19 p. 827-837. 2006.

ROUWS, L. F. M.; MENESES, C. H. S. G.; GUEDES, H. V.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I.; SCHWAB S. Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 51 p. 325-30. 2010.

RUCKER, R.; CHOWANADISAI, W.; NAKANO, M. Potential physiological importance of pyrroloquinoline quinone. **Altern. Med. Rev.** v. 14 p. 268-277. 2009.

RUIZ, S.; ADRIANO, L.; OVANDO, I.; NAVARRO, C.; SALVADOR, M. Biofertilization of micropropagated *Agave tequilana*: effect on plant growth and production of hydrolytic enzymes. **Afr. J. Biotechnol.** v. 10 p. 9623-9630. 2011.

SARATHAMBAL, C.; THANGARAJU, M.; PAULRAJ, C.; GOMATHY, M. Assessing the zinc solubilization ability of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in maize rhizosphere using labelled 65Zn compounds. **Indian J. Microbiol.** v. 50 p. S103-S109. 2010.

SARAVANAN, V. S.; SUBRAMONIAM, S. R.; RAJ, S. A. Assessing *in vitro* solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial (zsb) isolates. **Braz. J. Microbiol.** v. 34 p. 121-125. 2003.

SARAVANAN, V. S.; SIVARAJ, V.; OSBORNE, J.; MADHAIYAN, M.; MATHEW, L.; CHUNG, J.; AHN, K.; SA, T. Zinc metal solubilization by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and induction of pleomorphic cells. **J. Microbiol. Biotechnol** v. 17 p. 1477-1482. 2007a.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M.; SA, T. M. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteracea members: their possible role in plant growth promotion. **Microbiol. Ecol.** v. 1 p. 1-11. 2007b.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **hemosphere** v. 66 p. 1794-1798. 2007c.

SARAVANAN, V. S.; KALAIARASAN, P.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion (Zn^{2+}) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Appl. Microbiol.** v.44 p. 235-241. 2007d.

SCHALK, I. J.; HANNAUER, M.; BRAUD, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. **Environ. Microbiol.** v. 13 p. 2844-2854. 2011.

SEVILLA, M.; BURRIS, R. H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}N_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif mutant strains. **Mol. Plant Microbe Interact.** v. 14 p. 358-366. 2001.

SHAHAB, S.; AHMED, N. Growth promotion of mung beans by bacterial pyrroloquinoline. **The Internet J. Genomics Proteomics.** v. 1. 2011.

SINGH, O. V.; KUMAR, R. Biotechnological production of gluconic acid: future implications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 75 p.713-722. 2007.

STEPHAN, M. P.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, K. R. S.; MARTINEZ-DRETS, G.; DÖBEREINER, J. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 77 p. 67-72. 1991.

SUMAN, A.; GAUR, A.; SHRIVASTAVA, A. K.; YADAV, R. L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regul.** v. 47 p.155-162. 2005.

TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; BUSTILLOS-CRISTALES, T.; JIMENEZ-SALGADO, T.; CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. **Microbiol. Ecol.** v. 55 p. 39-49. 2000.

TEJERA, N. A.; ORTEGA, E.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.; LLUCH, C. Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacteobacter diazotrophicus*. **J. Appl. Microbiol.** v. 95 p. 528-535. 2003.

TRIPLETT, E. W.; KAEPLER, S. M.; CHELIUS, M. K. *Klebsiella pneumoniae* inoculants for enhancing plant growth. **United States Patent 7393678**. 2008.

TRUJILLO, L. E.; ARRIETA, J. G.; DAFHNIS, F.; GARCÍA, J.; VALDÉS, J.; TAMBARA, Y.; PÉREZ, M.; HERNÁNDEZ, L. Fructo-oligosaccharides production by the *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Enzyme Microb. Technol.** v. 28 p. 139-144. 2001.

TRUJILLO, L. E.; RIERA, R. G.; BANGUELA, A.; SOTO, M.; ARRIETA, J. G.; HERNÁNDEZ, L. Catalytical properties of N-glycosylated *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase produced in yeast. **Electronic J. Biotechnol.** v.7 2004.

URETA, A.; ALVAREZ, A.; RAMON, A.; VERA, M. A.; MARTÍNEZ-DRETS, G. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. **Plant Soil** v. 172 p. 271-277. 1995.

VARGAS, C.; PÁDUA, V. L. M.; NOGUEIRA, E. M.; VINAGRE, F.; MASUDA, H. P.; SILVA, F. R.; BALDANI, J. I.; CAVALCANTI, P. G. F.; HEMERLY, A. S. Signaling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic diazotrophic bacteria: a genomic approach. **Symbiosis** v. 35 p. 1-23. 2003.

VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, M. L.; BAIZABAL-AGUIRRE V. M.; BRAVO-PATIÑO, A.; CAJERO-JUÁREZ, M.; CHÁVEZ-MOCTEZUMA, M. P.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J. Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. **J. Appl. Microbiol.** v. 106 p. 1763-1778. 2009.

VESSEY, J. K.; FEI, H.; ABUDUREHEMAN, A. Use of *Gluconacetobacter* with reduced use of nitrogen fertilizer to improve beet crop production. **United States Patent 20110225679**. 2011

VIDEIRA, S. S.; OLIVEIRA, D. M.; MORAIS, R. I. F.; BORGES, W. L.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant Soil** v. 356 p. 51-66. 2012.

VINAGRE, F.; VARGAS, C.; SCHWARCZ, K.; CAVALCANTE, J.; NOGUEIRA, E. M.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N₂-fixing endophytic bacteria association. **J. Exp. Bot.** v. 57 p. 559-569. 2006.

YADAV, R. L.; SUMAN, A.; PRASAD, S. R.; PRAKASH, O. Effect of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Trichoderma viride* on soil health, yield and N-economy of sugarcane cultivation under subtropical climatic conditions of India. **European J. Agronomy** v. 30 p. 296-303. 2009.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. *Gluconacetobacter* nom. corrig. (*Gluconoacetobacter* [sci]). In Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, List no. 64. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 48 p. 327-328. 1998.

WELBAUM, G. E.; MEINZER, F. C.; GRAYSON, R. L.; THORNHAM, K. T. Evidence for and consequences of a barrier to solute diffusion between the apoplast and vascular bundles in sugarcane stalk tissue. **Aust. J. Plant Physiol.** v.19. p. 611-623. 1992.

WILLIAMS, P.; WINZER, K.; CHAN, W. C.; CÁMARA, M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. **Phil. Trans. R. Soc. B.** v. 362 p. 1119-1134. 2007.

CAPÍTULO 2

**O PAPEL ESSENCIAL DO DETERMINANTE CZC PARA RESISTÊNCIA A
CÁDMIO, COBALTO E ZINCO EM *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5**

Resumo

Os mecanismos de resistência a cádmio, cobalto e zinco foram caracterizados na bactéria promotora do crescimento vegetal *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. O nível de resistência da estirpe selvagem foi avaliada por meio do estabelecimento da concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos solúveis $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e ZnCl_2 . *G. diazotrophicus* PAI 5 foi resistente a altas concentrações de Cd, Co e Zn, com CIM de 1,2; 20 e 20 mm, respectivamente. A seleção de uma biblioteca de inserção a partir do transposon Tn5 EZ- $\langle\text{R6Kyor}/\text{KAN-2}\rangle$ na presença de ZnO revelou que o mutante GDP30H3 foi incapaz de crescer na presença do composto. Este mutante foi também altamente sensível a $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e ZnCl_2 . A caracterização molecular revelou que a mutação afetou o gene *czcA*, que codifica uma proteína envolvida no efluxo de metal. Análises *in silico* de mostraram que *czcA* é um componente do operon *czcCBARS*, juntamente com quatro outros genes *czc*. Este trabalho mostrou a alta tolerância de *G. diazotrophicus* PAI 5 a metais pesados e revelou que *czc* é determinante para tal habilidade na bactéria.

Palavras-chave: *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5, resistência a metal, determinante *czc*, cádmio, cobalto, zinco.

1. Introdução

Os metais são componentes naturais do ambiente. Alguns, como zinco e cobre, são requeridos como nutrientes essenciais aos seres vivos, atuando na regulação da expressão gênica, atividade de biomoléculas e estabilização estrutural do DNA (Ji e Silver, 1995; Bruins *et al.*, 2000). Outros, como mercúrio e chumbo, que não apresentam função biológica conhecida, são tóxicos aos seres vivos mesmo em quantidades traço (Pan e Wang, 2012). Em microrganismos, o excesso de determinados metais pode afetar o crescimento, a morfologia e o metabolismo (Giller *et al.*, 1998). A toxicidade ocorre através do deslocamento de íons essenciais presentes em moléculas biologicamente ativas, estabelecimento de interações deletérias com diferentes ligantes ou a formação de compostos inespecíficos complexos na parede celular (Nies, 1999). Como resultado, ocorre alteração na estrutura conformacional de macromoléculas, interferência na fosforilação oxidativa e no balanço osmótico celular (Bruins *et al.*, 2000).

Ao longo do processo evolutivo, vários mecanismos de resistência se desenvolveram em microrganismos visando atenuar a toxicidade causada por excesso de metal (Prapagdee e Watcharamusik, 2009). Dentre eles, destaca-se o efluxo ativo do metal, a síntese de compostos ligantes, o acúmulo e complexação do metal dentro da célula e a sua redução para estados menos tóxicos (Nies, 1999; Gadd, 2004). O principal processo para regulação intracelular da concentração de metal é baseado no seu transporte através da membrana plasmática (Nies e Silver, 1995). Sob condições normais, os metais essenciais e não-essenciais são transportados por sistemas de entrada não-específicos. Entretanto, em situações onde os íons metálicos estão em excesso, pode ocorrer a síntese de complexos protéicos específicos de efluxo de íons viabilizando exclusão dos metais não-essenciais (Nies e Silver, 1995).

CzcA é considerada uma proteína central para a resistência aos metais cádmio, cobalto e zinco em vários microrganismos, incluindo a bactéria tolerante *Cupriavidus metallidurans* CH34 (Nies, 2003; Monchy *et al.*, 2007; Von Rozycki e Nies, 2009; Janssen *et al.*, 2010). CzcA também tem sido caracterizada em outras espécies associadas com resistência a metal, tais como *Caulobacter crescentus* CB15N (Hu *et al.*, 2005), *Pseudomonas putida* CD2 (Hu e Zhao, 2007) e *Sinorhizobium meliloti* 1021 (Rossbach *et al.*, 2008). Juntamente com outras

proteínas, CzcA forma o chamado determinante Czc, que é um complexo multiprotéico associado a alto grau de resistência a cádmio, cobalto e zinco em bactérias (Nies, 2003).

Gluconacetobacter diazotrophicus PAI 5 é uma bactéria endófito promotora do crescimento vegetal (Saravanan *et al.*, 2007), que foi isolada pela primeira vez em cana-de-açúcar (Cavalcante e Döbereiner, 1988). Posteriormente, esta bactéria foi observada em vários outros hospedeiros, tais como capim-elefante, café, batata-doce, banana, abacaxi, cenoura, beterraba, rabanete e arroz (Saravanan *et al.*, 2007). Fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, ação contra fitopatógenos e solubilização de nutrientes minerais são várias das características de promoção do crescimento vegetal presentes em *G. diazotrophicus* PAI 5 (Saravanan *et al.*, 2007). A bactéria também apresenta resistência a antibióticos (Mowade e Bhattacharyya, 2000), o que sugere a atuação de mecanismos de multiresistência a drogas e/ou a expressão de bombas de efluxo (Pages *et al.*, 2008).

O genoma de *G. diazotrophicus* encontra-se sequenciado, disponibilizando grande quantidade de informação para estudos de genômica funcional (Bertalan *et al.*, 2009). O grande número de sistemas de transporte descrito é consistente com as várias características relacionadas com o estilo de vida endófito (Bertalan *et al.*, 2009). A disponibilidade destas informações tem possibilitado a caracterização de vias metabólicas relevantes na bactéria (Intorne *et al.*, 2009).

2. Objetivo geral

Avaliar os níveis de tolerância para cádmio, cobalto e zinco em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5, buscando identificar o mecanismo molecular da resistência a metal nesta bactéria através da caracterização molecular de um mutante sensível a zinco.

2.1. Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima das formas solúveis dos metais cádmio, cobalto e zinco para a bactéria *G. diazotrophicus* e o mutante GDP30H3 sensível a zinco;
- Identificar o gene interrompido no mutante GDP30H3 pelo transposon Tn5;
- Estudar a organização estrutural deste gene interrompido;
- Realizar análise filogenética da proteína alterada no mutante.

3. Material e métodos

3.1. Cepas bacterianas, meios e condições de cultivo

A estirpe selvagem *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 da Coleção de Cultura da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil) foi gentilmente cedida pelo Dr. Fábio L. Olivares. O mutante GDP30H3 foi obtido através de mutagênese insercional com transposon Tn5 EZ-<R6Kyor/KAN-2>. Ele foi isolado a partir de uma biblioteca de 2.554 mutantes. A seleção de GDP30H3 foi realizada na presença de 0,12 % de ZnO. Seu fenótipo é de inibição do crescimento na presença deste óxido diferentemente de *G. diazotrophicus* PAI 5 selvagem, que apresenta formação de colônia. Já na ausência de ZnO, mutante e selvagem crescem de modo similar com formação de colônia (Intorne *et al.*, 2009).

G. diazotrophicus PAI 5 e o mutante GDP30H3 foram cultivados em meio DYGS (Rodrigues Neto, 1986) e LGI modificado (composição em g.l⁻¹: glicose 10, K₂HPO₄ 0,2; KH₂PO₄ 0,6; MgSO₄·7H₂O 0,2; (NH₄)₂SO₄ 1,32; CaCl₂·2 H₂O 0,02; NaMoO₄·2 H₂O 0,002 e FeCl₃·6 H₂O 0,018 a 30 °C (Cavalcante e Döbereiner, 1988). *Escherichia coli* TransforMax EC100D (*pir*⁻) (Epicentre) cultivada em meio LB-Miller a 37 °C (Miller, 1972) foi usada nos estudos de clonagem seguindo a instrução do fabricante. Canamicina foi adicionado quando necessário (50 µg.ml⁻¹) (Intorne *et al.*, 2009). Os componentes dos meios foram dissolvidos em água destilada (DYGS e LB) ou água ultra-pura (LGI), e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min. O pH dos meios DYGS e LGI foi ajustado para 5,5 com KOH antes da esterilização. No preparo do meio sólido foi adicionado 15 g.l⁻¹ de agar-agar. Ainda nos meios sólidos DYGS e LGI, foi utilizado azul de bromotimol 0,5 % em KOH 0,2 M (5 ml.l⁻¹) como indicador de pH.

O cultivo de *G. diazotrophicus* PAI 5 e o mutante GDP30H3 em meio líquido foi realizado em Erlenmeyer com chicana (1.000 ml) contendo 100 ml de meio cobertos com manta de algodão envolta em gaze. Os frascos permaneceram sob agitação constante de 180 min⁻¹, em agitador-incubador orbital, por 18 h. O cultivo foi realizado até atingir fase exponencial equivalente a densidade ótica igual a 1,0 em 600 nm. Já o cultivo em meio sólido foi realizado

em placas de Petri, incubadas em estufa bacteriológica, cujo período de tempo variou de acordo com o ensaio realizado.

3.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Gotas (10 µl) da estirpe selvagem cultivada em meio LGI ($\sim 10^9$ células.ml⁻¹) foram plaqueadas em meio sólido LGI contendo concentrações variadas de sais metálicos (CdCl₂·H₂O, CoCl₂·6H₂O e ZnCl₂), esterilizados anteriormente por filtração. Para cada metal, foi determinada a menor concentração que inibiu visivelmente o crescimento bacteriano dentro de 6 dias. O ensaio foi repetido ao menos três vezes.

3.3. Ensaio de solubilização de zinco

Gotas (10 µl) da estirpe selvagem e o mutante GDP30H3 cultivados em meio DYGS ($\sim 10^9$ células.ml⁻¹) foram inoculadas em placas de Petri de DYGS controle e DYGS suplementado com ZnO 0,12 % (equivalente a 0,1 % de zinco). As placas foram incubadas por 2 dias (Saravanan *et al.*, 2007; Intorne *et al.*, 2009). O crescimento das colônias foi observado em ambos os meios e comparado. A formação do halo de solubilização foi avaliada. Este experimento foi repetido ao menos três vezes.

3.4. Determinação de sensibilidade ao metal no mutante

Gotas (10 µl) da estirpe selvagem e o mutante GDP30H3 cultivados em meio LGI ($\sim 10^9$ células.ml⁻¹) foram plaqueadas em meio LGI contendo 0,3 e 0,5 mM de CdCl₂·H₂O, 2,0 e 8,0 mM de CoCl₂·6H₂O, 2,0 e 8,0 mM de ZnCl₂. Estas concentrações foram definidas com base nos valores de CIM encontrados para a bactéria selvagem, abrangendo concentrações baixas e medianas. Os compostos foram adicionados em concentrações que viabilizassem o crescimento da estirpe selvagem. Concentrações mais elevadas não foram avaliadas, pois o mutante apresenta fenótipo de perda de função. Este experimento foi repetido ao menos três vezes.

3.5. Isolamento de DNA e *Southern Blotting* do mutante

O DNA genômico das bactérias selvagem e mutante foi isolado usando reagente Plant DNAzol (Invitrogen), seguindo protocolo do fabricante. O DNA genômico foi digerido com *EcoRI* (New England Biolabs), separado por eletroforese em gel de Agarose 0,8 % e então transferido para membrana de náilon (Hybond-N+, Amersham GE Healthcare). O transposon inteiro (2.001 bp) foi amplificado usando iniciador MEint (5'-CTG TCT CTT ATA CAC ATC T-3') a partir do mutante selecionado. As reações de PCR (20 µl) continham 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM de KCl; 1,5 mM de MgCl₂; 200 µM de cada dNTP; 0,5 µM do iniciador MEint, 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas) e 10 ng de DNA molde. As reações foram realizadas em termociclador (MasterCycler Gradient - Eppendorf) com desnaturação inicial a 95 °C por 5 min seguido de 40 ciclos de 95 °C por 60 s, 55 °C por 60 s, 72 °C por 90 s e extensão final a 72 °C por 30 min. O fragmento amplificado foi usado como sonda na hibridação. A marcação desta sonda e a hibridação foi realizada de acordo com o kit *Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System* (GE Healthcare). Então a membrana foi lavada e exposta a radiografia (Sambrook e Russel, 2001).

3.6. Identificação do sítio de inserção do transposon Tn5

Os fragmentos contendo as regiões genômicas flanqueando o ponto de inserção do transposon foram recuperados por autoligação do DNA total digerido com *EcoRI*, e clonado por eletroporação em *E. coli* TransforMax EC100D (*pir*⁻), seguindo as instruções do kit EZ-Tn5<R6Kyori/KAN-2>Tnp Transposome (Epicentre). Após a transformação, as células foram plaqueadas em placas de LB contendo canamicina. As colônias selecionadas tiveram seus plasmídeos purificados.

As sequências de nucleotídeos foram determinadas em sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems) com kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Foram usados iniciadores específicos para o transposon KAN-2-FP-1 and KAN-2-RP-1 disponíveis no kit EZ-n5<R6Kyori/KAN-2>Tnp. Aproximadamente 900 nucleotídeos foram sequenciados em cada região flanqueadora da inserção. A análise das

sequências foi realizada utilizando a ferramenta BLAST no *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (NCBI, 2012) nos dois genomas de *G. diazotrophicus* PAI 5 depositados na base de dados do NCBI (RefSeq: NC_010125 e NC_011365).

3.7. Organização genômica do determinante *czc*

As sequências dos genes compreendendo o determinante *czc* em *G. diazotrophicus* PAI 5 (RefSeq: NC_010125) e nas espécies bacterianas relacionadas foram obtidas através da base de dados do NCBI (NCBI, 2012). O locus *czc* de *Gluconacetobacter xylinus* NBRC 3288 - pGXY010 (RefSeq: NC_016037), que pertence ao mesmo gênero de *G. diazotrophicus* PAI 5 e *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (RefSeq: NC_014323), um outro endófito de cana-de-açúcar (Baldani *et al.*, 1986), foram incluídos nas análises de sequência. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (RefSeq: NC_002516), *Pseudomonas putida* KT2440 (RefSeq: NC_002947) e *Cupriavidus metallidurans* CH34 – pMOL30 (RefSeq: NC_007971) também foram avaliados, pois seus determinantes *czc* já foram caracterizados (Hassan *et al.*, 1999; Cánovas *et al.*, 2003; Grobe *et al.*, 2004). As bases de dados BioCyc (Caspi *et al.*, 2010) e Microbes Online (Dehal *et al.*, 2010) foram usadas para predição *in silico* da organização do operon.

3.8. Análise filogenética da proteína CzcA

A sequência protéica de CzcA obtida a partir de *G. diazotrophicus* PAI 5, sequências similares oriundas de bactérias fixadoras de nitrogênio e outras proteínas da superfamília de Resistência, Nodulação e Divisão Celular (RND) (Tseng *et al.*, 1999) foram utilizadas para análise filogenética. Estas sequências foram obtidas da base de dados UniProt (Uniprot, 2012) O alinhamento destas proteínas foi realizado através do ClustalW (parâmetro default) (Thompson *et al.*, 1994) e algoritmo Needle (EMBL-EBI, 2012). A proteína HAE3 de *Methanoregula boonei* 6A8 foi utilizada como grupo externo (Número de acesso do Uniprot: A7I766). Foram selecionados modelos de substituição ótima para análise filogenética através do programa ProtTest (Darriba *et al.*, 2011).

O resultado do alinhamento foi submetido ao programa MEGA versão 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) para gerar a árvore filogenética pelo método *Maximum Likelihood* (ML). Os parâmetros utilizados foram modelo de substituição WAG+F com sítio invariante (I) e sítio gama-distribuído, 1.000 *bootstrapped* e 4 categorias de taxa de substituição.

Foi obtido ainda a predição dos domínios estruturais e transmembranas (TMH) das proteínas CzcA avaliadas no presente trabalho. Isto foi possível através da utilização dos programas *Simple Modular Architecture Research Tool*-SMART (Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2009) e TMHMM Server v.2.0, (Krogh *et al.*, 2001), respectivamente.

4. Resultados

4.1. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 e a resistência a cádmio, cobalto e zinco

Os resultados da análise de resistência da bactéria para metais quando cultivada em meio sólido contendo $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e ZnCl_2 foi avaliada (Fig. 1A). *G. diazotrophicus* PAI 5 foi resistente a níveis elevados de Cd, Co e Zn, com concentrações máximas toleradas de 1,0; 18 e 16 mM, respectivamente. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) para Cd, Co e Zn foram 1,2; 20 e 20 mM, respectivamente. Foi encontrado que *G. diazotrophicus* PAI 5 é suscetível aos metais na seguinte ordem: $\text{Co} = \text{Zn} < \text{Cd}$.

4.2. Mutante sensível a metal

Conforme apresentado na Figura 1B, o mutante GDP30H3 não cresceu na presença de ZnO. Considerando-se que a causa de tal fenótipo foi a presença de zinco no meio de cultura, avaliou-se a sensibilidade deste mutante aos metais cádmio, cobalto e zinco. A Fig. 1C mostra que na ausência dos metais, GDP30H3 apresentou crescimento similar ao da bactéria selvagem. Porém, o mutante apresentou elevada sensibilidade quando crescido na presença dos metais cádmio, cobalto e zinco. GDP30H3 não cresceu nas concentrações mais elevadas dos três metais testados e foi afetado negativamente mesmo em baixas concentrações dos metais. Estes dados indicam o papel crucial do gene afetado na resistência da bactéria aos metais pesados cádmio, cobalto e zinco.

4.3. Caracterização da inserção de Tn5 no mutante GDP30H3

O número de inserções do transposon no cromossomo do mutante foi avaliado por *Southern Blotting*, utilizando DNA genômico digerido com *EcoRI* e a sequência do transposon como sonda. A Figura 1D mostra a presença de uma única banda no mutante. Através de predição *in silico*, o tamanho do fragmento hibridado corresponde a distância entre os sítios de restrição de *EcoRI* (4.601 pb)

observado na sequência do genoma mais a sequência de inserção do transposon (2.001 pb), totalizando 6.002 pb.

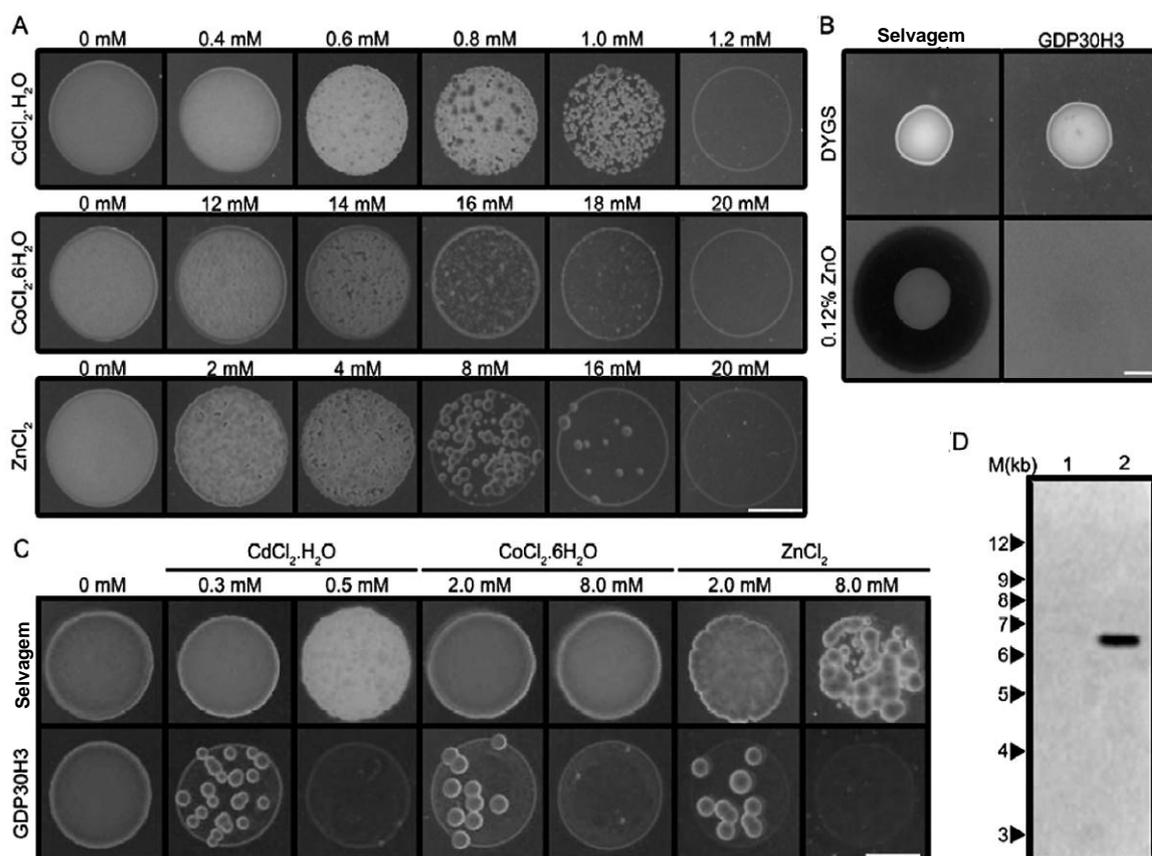


Figura 1: Ensaio de Concentração Inibitória Mínima de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 e avaliação da sensibilidade do mutante GDP30H3 para cádmio, cobalto e zinco. **(A)** Sensibilidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 aos metais em meio LGI. A primeira concentração apresentada foi a menor concentração que afetou o crescimento bacteriano. Concentrações inferiores a esta não reduziram a densidade da colônia. **(B)** Ensaio de solubilização com ZnO para estirpe selvagem e mutante GDP30H3 sensível a zinco em meio DYGS. **(C)** Comparação entre estirpe selvagem e mutante GDP30H3 quanto à sensibilidade para cádmio, cobalto e zinco em meio LGI. Todos estes experimentos foram realizados ao menos três vezes. A barra branca representa 1 cm. **(D)** *Southern Blotting* da estirpe selvagem e do mutante. Coluna 1: estirpe selvagem. Coluna 2: GDP30H3. O marcador de peso molecular é 1 kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

O gene interrompido pelo transposon no mutante foi identificado pelo sequenciamento das regiões flaqueadoras do sítio de inserção do transposon. De acordo com a base de dados do NCBI, o ID do gene é 5789610. A Figura 2A mostra a região genômica da inserção. GDP30H3 foi alterado no gene *czcA* (Locus tag: GDI_1513), que codifica uma proteína de resistência cobalto-zinco-

cádmio. Esta proteína tem sido caracterizada em algumas bactérias e está envolvida no efluxo de cátions (cobalto, zinco e cádmio).

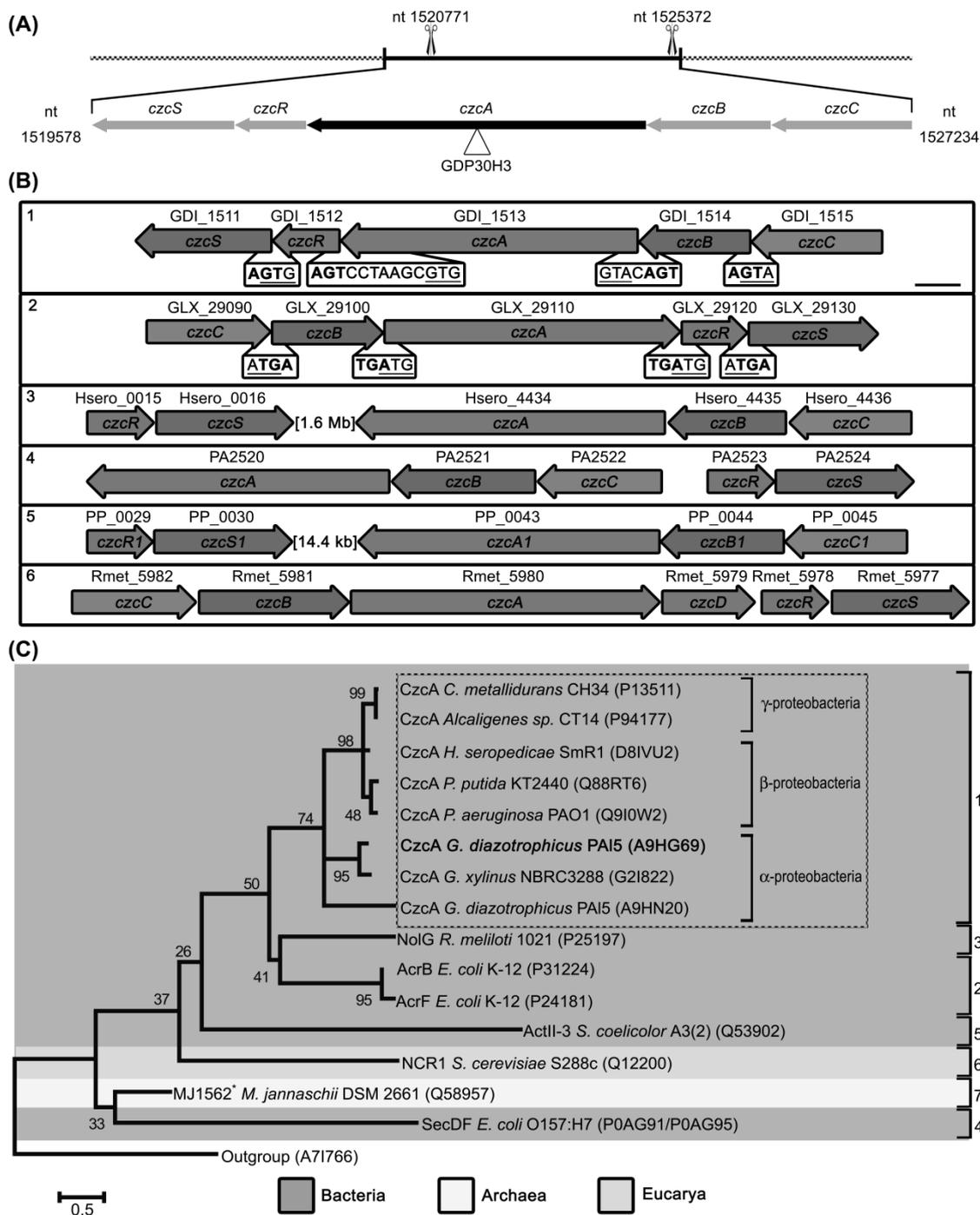


Figura 2: Caracterização do determinante *czc* em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. (A) Organização genômica dos genes flanqueando a inserção de Tn5 em *G. diazotrophicus* PAI 5 de acordo com a base de dados NCBI. Grupo gênico flanqueando *czcA*. As setas indicam a orientação da sequência aberta de leitura. Seta preta: gene interrompido neste estudo, setas cinzas: genes não interrompidos, tesouras: sítios de restrição de *EcoRI*, triângulo branco: sítio de inserção do transposon, nt: nucleotídeo.

Continuação: (B) Comparação da organização genômica do determinante *czc* em *G. diazotrophicus* PAI 5 e as espécies relacionadas. Entre parênteses segue o código de RefSeq do NCBI: **(1)** *G. diazotrophicus* PAI 5 (NC_010125), **(2)** *G. xylinus* NBRC 3288 (NC_016037), **(3)** *H. seropedicae* SmR1 (NC_014323), **(4)** *P. aeruginosa* PAO1 (NC_002516), **(5)** *P. putida* KT2440 (NC_002947) e **(6)** *C. metallidurans* CH34 (NC_007971). Letras sublinhadas nas caixas: códon de iniciação, e letras em negrito: códon de terminação. As setas indicam a orientação da sequência aberta de leitura. Os códigos acima das setas são os locus tag das sequências. A barra preta refere-se a 500 pb. **(C)** Alinhamento múltiplo e relação filogenética da sequência de aminoácidos dos membros da superfamília RND. Famílias da superfamília RND: **(1)** *Heavy Metal Efflux* (HME), **(2)** *Hydrophobe/Amphiphile Efflux-1* (HAE1), **(3)** *Nodulation Factor Exporter* (NFE), **(4)** *SecDF protein-secretion accessory protein* (SecDF), **(5)** *Hydrophobe/Amphiphile Efflux-2* (HAE2), **(6)** *Eukaryotic Sterol Homeostasis* (ESH), e **(7)** *Hydrophobe/Amphiphile Efflux-3* (HAE3). A família HME está destacada na caixa pontilhada. *CzcA* de *G. diazotrophicus* PAI 5 está com as letras em negrito. Os números nos nós indicam o suporte de *bootstrap*. O comprimento dos ramos é proporcional à distância evolucionária (barra de escala). O asterisco refere-se a uma proteína putativa de membrana. Os códigos entre parênteses são os números de acesso destas sequências. A proteína HAE3 de *Methanoregula boonei* 6A8 (Número de acesso do Uniprot: A71766) foi utilizada como grupo externo. Todas as análises de sequências foram realizadas usando a base de dados UniProt.

4.4. O determinante *czc* e a resistência a metal em *G. diazotrophicus*

A análise do contexto gênico de *czcA* revelou a sobreposição das extremidades da região codificadora com os genes adjacentes *czcR* e *czcB* (Locus tag: GDI_1512 e GDI_1514, respectivamente). Avaliando-se os genes subsequentes, foi observado que *czcS* e *czcC* (Locus tag: GDI_1511 e GDI_1515, respectivamente) também possuem regiões de sobreposição (Fig. 2B). Uma predição *in silico* usando as bases de dados BioCyc and Microbes sugere que a organização destes genes é em operon. Este conjunto de genes é conhecido como determinante *czc*, que é amplamente difundido em bactérias que possuem altos níveis de resistência a metais (Nies, 2003; Leedjäv *et al.*, 2008). Dois outros genes envolvidos no efluxo de metais pesados são localizados próximos a esta região do genoma. São eles *copA* (Locus tag: GDI_1508) e *copB* (Locus tag: GDI_1509), que codificam as proteínas de resistência a cobre A e B, respectivamente.

Também foi identificada a presença de uma segunda cópia do gene *czcA* (Locus tag: GDI_2438) localizada em outra região do cromossomo de *G. diazotrophicus*. Entretanto, os outros genes componentes do determinante *czcCBARS* não foram observados na vizinhança. Os genes adjacentes a esta

segunda cópia codificam uma bomba de efluxo da membrana externa (Locus tag: GDI_2437) e uma proteína de secreção da família HlyD (Locus tag: GDI_2439). Nesta região do genoma também foi observada a presença de genes codificantes para transposases (Locus tag: GDI_2423 e GDI_2424) e integrases (Locus tag: GDI_2426 e GDI_2443). Foi verificada baixa porcentagem de similaridade de sequência (52,3 %) e identidade (34,3 %) entre as duas cópias de *czcA* como mostrado na Tabela 1. Nenhum gene *czc* foi encontrado nas sequências dos três plasmídeos desta bactéria depositadas na base de dados NCBI (pGDIPAI5I - RefSeq: NC_010124, pGDIPal5II - RefSeq: NC_010123 e pGDIA01 - RefSeq: NC_011367).

Tabela 1. Comparação de sequência da proteína CzcA de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 com proteínas CzcA homólogas.

Organismo	Similaridade (%)	Identidade (%)	Tamanho ^a	TMH ^b	Número ^c
<i>G. diazotrophicus</i> PAI 5	100	100	1.031	12	A9HG69
<i>G. diazotrophicus</i> PAI 5 ^d	52,3	34,3	1.033	12	A9HN20
<i>G. xylinus</i> NBRC 3288	82,9	73,2	1.024	12	G21822
<i>C. metallidurans</i> CH34	58,9	39,9	1.063	11	P13511
<i>Alcaligenes</i> sp. CT14	59,1	40,0	1.063	11	P94177
<i>H. seropedicae</i> SmR1	58,2	39,2	1.073	10	D81VU2
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	59,4	39,7	1.051	10	Q910W2
<i>P. putida</i> KT2440	59,4	40,4	1.053	10	Q88RT6

^aNúmero de aminoácidos.

^bNúmero de domínios transmembrana (TMH).

^cNúmero de acesso do UniProt.

^dProteína correspondente a segunda cópia do gene *czcA* gene (Locus tag: GDI_2438).

Foi observada alta similaridade entre a organização genômica do determinante *czc* de *G. diazotrophicus* PAI 5 e do plasmídeo pGXY010 de *G. xylinus* NBRC 3288 quando as sequências homólogas foram comparadas (Fig. 2B). Uma segunda cópia do determinante *czc* foi encontrado no cromossomo de *G. xylinus* NBRC 3288. A análise comparativa com o genoma de *Herbaspirillum seropedicae* revelou a presença de duas regiões distintas codificadoras do determinante *czc* no genoma desta bactéria, o que também foi observado em *Pseudomonas aeruginosa* CMG103 e *Pseudomonas putida* KT2440 (Fig. 2B). A organização genômica do modelo de estudo para resistência a metal *Cupriavidus metallidurans* CH34 apresenta dois determinantes *czc*. Alguns genes *czc* não-

funcionais estão localizados no cromossomo 2 (*czcICBA-ubiG-czcSRL*), mas a maioria dos genes se encontra no seu plasmídeo pMOL30 (*czcMNICBADRSEJ*), que é completamente funcional (Van der Lelie *et al.*, 1997; Monchy *et al.*, 2007; Von Rozycki e Nies, 2009; Janssen *et al.*, 2010). A Figura 2B mostra os genes localizados no plasmídeo pMOL30, que é organizado em dois operons definidos como *czcCBA* e *czcDRS* (Grobe *et al.*, 2004).

A Figura 2C apresenta a filogenia de membros representativos das sete famílias, que formam a superfamília RND. Esta superfamília consiste de permeases, que atuam como bombas de efluxo de transporte de compostos. CzcA pertence à superfamília RND.

A Tabela 1 compara CzcA de *G. diazotrophicus* PAI 5 com outras proteínas CzcA homólogas, que têm sido encontradas em Proteobactérias. A proteína apresentou maiores identidade e similaridade com *G. xylinus* NBRC 3288 (73,2 % e 82,9 %, respectivamente). O tamanho da proteína variou de 1.024 a 1.073 aminoácidos entre as espécies analisadas. Predições funcionais baseadas na sequência de aminoácidos do gene *czcA* usando os programas SMART e TMHMM revelaram a presença de 10 a 12 regiões transmembrana nesta proteína (10-12), que é característico deste tipo de transportador. Todas estas proteínas contêm o domínio *ADAM Cysteine Rich* (ACR), cobrindo a maior parte do seu tamanho total.

5. Discussão

Gluconacetobacter diazotrophicus PAI 5 é uma bactéria promotora do crescimento vegetal capaz de solubilizar nutrientes, tais como zinco, o que sugere que esta bactéria contém genes, que conferem resistência à metais. No presente trabalho, a mutagenese insercional foi usada para analisar o determinante de resistência de PAI 5. Um transportador antiporter quimiosmótico foi encontrado.

Primeiramente, foi avaliada a suscetibilidade de *G. diazotrophicus* PAI 5 a cádmio, cobalto e zinco através de um ensaio de CIM. Os resultados mostraram que a bactéria foi altamente tolerante aos metais, quando comparada a outros organismos previamente caracterizados. Trajanovska e colaboradores (1997) avaliaram bactérias isoladas de ambiente contaminado com íons metálicos e encontraram *Corynebacterium* sp. AB18, *Arthrobacter* sp. E11 e *Cupriavidus metallidurans* CH34 (Trajanovska *et al.*, 1997). Em geral, os valores de CIM encontrados para estes microrganismos foram inferiores aos observados no presente trabalho para *G. diazotrophicus* PAI 5, especialmente aqueles para os íons cobalto e zinco (Trajanovska *et al.*, 1997) (Tab. 2). Similarmente, os estudos realizados com *Pseudomonas putida* 06909 (Seon-Woo *et al.*, 2001) e *Pseudomonas aeruginosa* CMG466 (Ahmed *et al.*, 2005) mostraram valores de CIM menores do que aqueles de *G. diazotrophicus* PAI 5, com diferenças maiores encontradas para o estresse com cobalto. Na Tabela 2 são apresentados os dados para estas bactérias comparados aos obtidos no presente trabalho para *G. diazotrophicus* PAI 5. Entretanto, é importante considerar que os ensaios foram realizados em meios de cultivo distintos, já que as exigências nutricionais são diferentes entre os microrganismos. Portanto, a biodisponibilidade ou toxicidade do íon metálico pode variar sob influência dos constituintes químicos de cada meio de cultura (Hughes e Poole, 1991).

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de íons metálicos para *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 e bactérias relacionadas.

Organismo	Cádmio	CIM ^a	Cobalto	CIM ^a	Zinco	CIM ^a	Referência
<i>G. diazotrophicus</i> PAI 5	CdCl ₂ ·H ₂ O	1,2	CoCl ₂ ·6H ₂ O	20,0	ZnCl ₂	20,0	Presente estudo
<i>C. metallidurans</i> CH34	CdCl ₂	0,2	Co(NO ₃) ₂	1,9	Zn(NO ₃) ₂	2,7	Trajanovska <i>et al.</i> , 1997
<i>Corynebacterium</i> sp. AB18 ^b	CdCl ₂	1,2	Co(NO ₃) ₂	2,7	Zn(NO ₃) ₂	2,5	Trajanovska <i>et al.</i> , 1997
<i>Arthrobacter</i> sp. E11 ^a	CdCl ₂	2,1	Co(NO ₃) ₂	2,5	Zn(NO ₃) ₂	3,1	Trajanovska <i>et al.</i> , 1997
<i>P. aeruginosa</i> CMG466	CdCl ₂	2,0	CoCl ₂	0,5	ZnCl ₂	1,5	Ahmed <i>et al.</i> , 2005
<i>P. putida</i> 06909	CdCl ₂ ·2.5H ₂ O	1,7	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,3	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	11,5	Seon-Woo <i>et al.</i> , 2001

^aConcentração dada em mM.

^bBactéria isolada de solo contaminado com metais.

Após verificada a elevada resistência de *G. diazotrophicus* PAI 5 a metais, foi avaliado o mecanismo molecular responsável por esta característica. Para tanto um mutante de inserção (GDP30H3) foi identificado, apresentando elevada sensibilidade para os estresses por cádmio, cobalto e zinco solúvel. O sequenciamento das bordas do sítio de inserção do transposon revelou que tal mutante foi afetado no gene *czcA*. Este gene se mostrou essencial para a resistência em todas as condições de estresse analisadas, pois sua interrupção afetou negativamente o crescimento da bactéria, mesmo nas concentrações mais baixas dos metais. *CzcA* codifica uma proteína pertencente à superfamília dos transportadores RND, que compõe a família de efluxo de metal pesado (*Heavy Metal Efflux* - HME), integrante do grupo HME1 (Tseng *et al.*, 1999). Este transportador *CzcA* está diretamente envolvido com a resistência a cobalto, zinco e cádmio, o que explica porque bactérias que possuem o gene *czcA* são altamente resistente a estes metais (Nies, 2003).

CzcA é um dos componentes do determinante *czc*, que codifica transportadores CBA - bombas transenvelope encontradas em bactérias Gram-negativas. Estas bombas são formadas por três componentes que atuam como antiporters quimiosmóticos (Leedjårv *et al.*, 2008). A bomba *CzcCBA* é composta de um grupo de proteínas com funções definidas. *CzcC*, um fator da membrana externa (*Outer Membrane Factor* - OMF), atua na membrana externa e transporta cátions para fora da célula (Koronakis *et al.*, 2000). *CzcB*, uma proteína de fusão da membrana, é distribuída pelo espaço periplásmico e realiza o transporte de metal, impedindo a liberação de cátions livres no periplasma. *CzcA* liga-se a *CzcB*, que está ligado a *CzcC*, e remove os íons a partir do citoplasma (Choudhury e Srivastava, 2001). Assim, a detoxicação ocorre através do efluxo de íon impulsionado por uma força próton motriz (Goldberg *et al.*, 1999). Existe ainda a expressão de dois reguladores, *CzcR* e *CzcS*, que formam um sistema de dois componentes. Este sistema é composto de duas proteínas, o sensor (*CzcS*, uma histidina quinase) e o regulador de resposta (*CzcR*), que regula a expressão de *czcCBA* através de uma cascata de fosforilação (Nies e Brown, 1998).

CzcA também tem sido descrita em outros estudos abordando resistência a metal em diferentes bactérias. Em *P. putida* CD2, após a varredura de mutantes sensíveis a cádmio, foi encontrada participação de cinco operons antiporter quimiosmótico *czc* envolvidos na resposta ao cátion divalente (Hu e Zhao, 2007).

A expressão do gene *czcA* também tem sido descrita em outros trabalhos, nos quais foi avaliado o perfil transcriptional de todo o genoma em resposta a metais de *Sinorhizobium meliloti* 1021 e *Caulobacter crescentus* CB15N (Hu *et al.*, 2005; Rossbach *et al.*, 2008). A indução de genes *czc* na presença de cobre foi demonstrada em *Myxococcus xanthus* (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2010). Portanto, a anotação de *copA* e *copB* no genoma de *G. diazotrophicus* PAI 5, além do determinante *czc*, justifica investigações adicionais em relação à resistência da bactéria para cobre.

A presença de cinco operons *czc* foi observada em *Comamonas testosteroni* S44. A avaliação da expressão destes genes em resposta a estresse por Zn^{2+} revelou que alguns genes *czcA* são induzidos e outros reprimidos na presença de Zn^{2+} (Xiong *et al.*, 2011). Estes resultados são consistentes com aqueles encontrados para *C. metallidurans* CH34, em que um operon *czc* é induzido por Zn^{2+} , outro é expresso constitutivamente e um terceiro é reprimido (Nies *et al.*, 2006; Von Rozycki e Nies, 2009). A existência de duas cópias diferentes do gene *czcA* no genoma de *G. diazotrophicus* PAI 5 sugere papéis diferentes para estas proteínas em resposta a metais.

Transportadores pertencentes à superfamília RND são amplamente distribuídos entre as bactérias Gram-negativas. Eles atuam como uma forma tripla atravessando a membrana interna e externa para detoxificar o citoplasma (Nikaido e Takatsuka, 2009; Nikaido, 2011). Eles são encontrados nos domínios da vida Archaea e Eucarya, indicando a importância evolucionária desta proteína (Tseng *et al.*, 1999). Então, é possível que este mecanismo de resistência a metal tenha estado presente no último ancestral comum universal (*Last Universal Common Ancestor* - LUCA). A natureza generalizada dos mecanismos de resistência indica a relevância biológica de manutenção desta superfamília nos distintos domínios ao longo da evolução. Em *G. diazotrophicus* PAI 5, a função de CzcA é essencial para a viabilidade das células em concentrações elevadas de cádmio, cobalto e zinco. No entanto, poucas proteínas RND têm sido caracterizadas. Assim, a informação adicional sobre os membros desta família é relevante e pode ser estendido para homólogos, considerando a similaridade entre as sequências (Tseng *et al.*, 1999).

Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que, na presença dos metais pesados cobalto, cádmio e zinco, *G. diazotrophicus* PAI 5 obtém sua

homeostase celular através do efluxo do excesso de cátions intracelulares por meio de transportadores. A medida que o sistema de detoxificação é danificado, o crescimento celular se torna inviável sob tais estresses. O mecanismo de efluxo de metais é mediado por transportadores CBA, que funcionam como antiporters formados por um complexo de proteínas. Este complexo atravessa a membrana celular, a partir do citoplasma até seu exterior, atuando ativamente no efluxo de substâncias tóxicas (Kim *et al.*, 2011; Long *et al.*, 2012). A Figura 3 ilustra o papel de *czc* no processo de detoxificação de cádmio, cobalto e zinco em *G. diazotrophicus* PAI 5. A apresentação deste modelo foi baseada na estrutura proposta por complexos CBA (Nies e Brown, 1998).

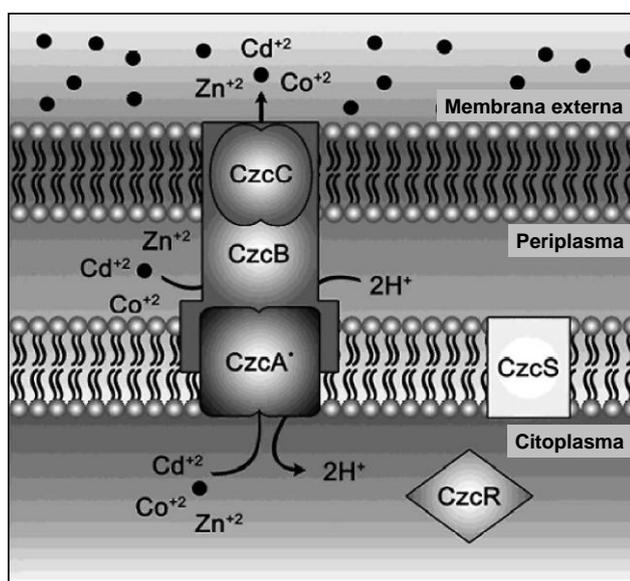


Figura 3: Modelo de resistência a cádmio, cobalto e zinco em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. Transportadores CBA atuam na detoxificação de moléculas tóxicas. O asterisco indica a proteína mutada neste estudo. Círculos pretos: metais. Adaptado de Nies (2003).

6. Conclusão

A partir dos dados obtidos, o presente trabalho demonstrou que:

- *G. diazotrophicus* PAI 5 é resistente a cádmio, cobalto e zinco;
- A proteína CzcA é essencial para a resistência a metal na bactéria;
- A análise *in silico* de CzcA com proteínas relacionadas revelou o papel do operon *czc* na resistência a metal em *G. diazotrophicus* PAI 5.

7. Referências bibliográficas

AHMED, N.; NAWAZ, A.; BADAR, U. Screening of copper tolerant bacterial strains and their potential to remove copper from environment. **Bull Environ. Contam. Toxicol.** v. 74 p. 219-226. 2005.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 36 p. 86-93. 1986.

BERTALAN, M.; ALBANO, R.; PADUA, V.; ROUWS, L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K.; SCHWAB, S.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, A.; FRANCA, L.; MAGALHAES, V.; ALQUERES, S.; CARDOSO, A.; ALMEIDA, W.; LOUREIRO, M. M.; NOGUEIRA, E.; CIDADE, D.; OLIVEIRA, D.; SIMÃO, T.; MACEDO, J.; VALADAO, A.; DRESCHSEL, M.; FREITAS, F.; VIDAL, M.; GUEDES, H.; RODRIGUES, E.; MENESES, C.; BRIOSO, P.; POZZER, L.; FIGUEIREDO, D.; MONTANO, H.; JUNIOR, J.; FILHO, G.; FLORES, V.; FERREIRA, B.; BRANCO, A.; GONZALEZ, P.; GUILLOBEL, H.; LEMOS, M.; SEIBEL, L.; MACEDO, J.; ALVES-FERREIRA, M.; SACHETTO-MARTINS, G.; COELHO, A.; SANTOS, E.; AMARAL, G.; NEVES, A.; PACHECO, A. B.; CARVALHO, D.; LERY, L.; BISCH, P.; ROSSLE, S. C.; URMENYI, T.; VON KRUGER, W.; MARTINS, O.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5. **BMC Genomics** v. 10 p.450. 2009.

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 45 p.198-207. 2000.

CÁNOVAS, D.; CASES, I.; LORENZO, V. Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. **Environ. Microbiol.** v. 5 p. 1242-1256. 2003.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant Soil** v. 108 p. 23-31. 1988.

CASPI, R.; ALTMAN, T.; DALE, J. M.; DREHER, K.; FULCHER, C. A.; GILHAM, F.; KAIPA, P.; KARTHIKEYAN, A. S.; KOTHARI, A.; KRUMMENACKER, M.; LATENDRESSE, M.; MUELLER, L. A.; PALEY, S.; POPESCU, L.; PUJAR, A.; SHEARER, A. G.; ZHANG, P.; KARP, P. D. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. **Nucleic Acids Res.** v. 38 p. D473-D479. 2010.

CHOUDHURY, R.; SRIVASTAVA, S. Zinc resistance mechanisms in bacteria. **Curr. Sci.** v. 81 p. 768-775. 2001.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. **Bioinformatics** v. 27 p.1164-1165. 2011.

DEHAL, P. S.; JOACHIMIAK, M. P.; PRICE, M. N.; BATES, J. T.; BAUMOHL, J. K.; CHIVIAN, D.; FRIEDLAND, G. D.; HUANG, K. H.; KELLER, K.; NOVICHKOV, P. S.; DUBCHAK, I. L.; ALM, E. J.; ARKIN, A. P. MicrobesOnline: an integrated portal for comparative and functional genomics. **Nucleic Acids Res.** v.38 p. D396-D400. 2010.

EMBL-EBI. European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute. <http://www.ebi.ac.uk>. 2012.

FRANKE, S.; GRASS, G.; RENSING, C.; NIES, D. H. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 185 p. 3804-3812. 2003.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma** v. 122 p. 109-119. 2004.

GILLER, K. E.; WITTER, E.; MCGRATH, S. P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. **Soil Biol. Biochem.** v. 30 p. 1389-1414. 1998.

GIONGO, A.; TYLER, H. L.; ZIPPERER, U. N.; TRIPLETT, E. W. Two genome sequences of the same bacterial strain, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5, suggest a new standard in genome sequence submission. **Stand Genomic Sci.** v. 2 p. 309-317. 2010.

GOLDBERG, M.; PRIBYL, T.; JUHNKE, S.; NIES, D. H. Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the RND protein family. **J. Biol. Chem.** v. 274 p. 26065-26070. 1999.

GROBE, C.; ANTON, A.; HOFFMANN, T.; FRANKE, S.; SCHLEUDER, G.; NIES, D. H. Identification of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance system Czc via promoter *czcNp* in *Ralstonia metallidurans*. **Arch. Microbiol.** v. 182 p. 109-118. 2004.

HASSAN, M.; VAN DER LELIE, D.; SPRINGAEL, D.; RÖMLING, U.; AHMED, N.; MERGEAY, M. Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Gene** v. 238 p. 417-425. 1999.

HU, P.; BRODIE, E. L.; SUZUKI, Y.; MCADAMS, H. H.; ANDERSEN, G. L. Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.** v. 187 p. 8437-8449. 2005.

HU, N.; ZHAO, B. Key genes involved in heavy-metal resistance in *Pseudomonas putida* CD2. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 267 p. 17-22. 2007.

HUGHES, M. N.; POOLE, R. K. Metal speciation and microbial growth-the hard (and soft) facts. **J. Gen. Microbiol.** v. 137 p. 725-734. 1991.

INTORNE, A. C.; OLIVEIRA, M. V. V.; LIMA, M. L.; SILVA, J. F.; OLIVARES, F. L.; DE SOUZA FILHO, G. A. Identification and characterization of *Gluconacetobacter*

diazotrophicus mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. **Arch. Microbiol.** v. 191 p. 477-483. 2009.

JANSSEN, P. J.; HOUDT, R. V.; MOORS, H.; MONSIEURS, P.; MORIN, N.; MICHAUX, A.; BENOTMANE, M. A.; LEYS, N.; VALLAEYS, T.; LAPIDUS, A.; MONCHY, S.; MÉDIGUE, C.; TAGHAVI, S.; MCCORKLE, S.; DUNN, J.; VAN DER LELIE, D.; MERGEAY, M. The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. **PLoS ONE** v. 5 p. e10433. 2010.

Jl, G.; SILVER, S. Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. **J. Ind. Microbiol.** v. 14 p. 61-75. 1995.

KIM, E.; NIES, D. H.; MCEVOY, M. M.; RENSING, C. Switch or funnel: how RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis. **J. Bacteriol.** v. 193 p. 2381-2387. 2011.

KORONAKIS, V.; SHARFF, A.; KORONAKIS, E.; LUISI, B.; HUGHES, C.; Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. **Nature** v. 405 p. 914-919. 2000.

KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **J. Mol. Biol.** v. 305 p. 567-580. 2001.

LEEDJÄRV, A.; IVASK, A.; VIRTA, M. Interplay of different transporters in the mediation of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. **J. Bacteriol.** v. 190 p. 2680-2689. 2008.

LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART 6: recent updates and new developments. **Nucleic Acids Res.** v. 37 p. D229-D232. 2009.

LONG, F.; SU, C.; LEI, H.; BOLLA, J. R.; DO, S. V.; YU, E. W. Structure and mechanism of the tripartite CusCBA heavy-metal efflux complex. **Phil. Trans. R. Soc. B.** v. 367 p. 1047-1058. 2012.

MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA. 1972.

MONCHY, S.; BENOTMANE, M. A.; JANSSEN, P.; VALLAEYS, T.; TAGHAVI, S.; VAN DER LELIE, D.; MERGEAY, M. Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. **J. Bacteriol.** v. 189 p. 7417-7425. 2007.

MORALEDA-MUÑOZ, A.; PÉREZ, J.; EXTREMERA, A. L.; MUÑOZ-DORADO, J. Differential regulation of six heavy metal efflux systems in the response of *Myxococcus xanthus* to copper. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 76 p. 6069-6076. 2010.

- MOWADE, S.; BHATTACHARYYA, P. Resistance of P-solubilizing *Acetobacter diazotrophicus* to antibiotics. **Curr. Sci.** v. 79 p. 1591-1594. 2000.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. 2012.
- NIES, D. H.; SILVER, S. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. **J. Ind. Microbiol.** v. 14 p. 189-199. 1995.
- NIES, D. H.; BROWN, N. **Metal ions in gene regulation**. Silver Sand Walden W, Chapman and Hall, London, UK. 1998.
- NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 51 p. 730-750. 1999.
- NIES, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 27 p. 313-339. 2003.
- NIES, D. H.; REHBEIN, G.; HOFFMANN, T.; BAUMANN, C.; GROSSE, C. Paralogs of genes encoding metal resistance proteins in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** v. 11 p. 82-93. 2006.
- NIKAIDO, H. Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.** v. 77 p. 1-60. 2011.
- NIKAIDO, H.; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1794 p. 769-781. 2009.
- PAGES, D.; ROSE, J.; CONROD, S.; CUINE, S.; CARRIER, P.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. Heavy metal tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. **PLoS ONE** v. 3 p. e1539. 2008.
- PAN, K.; WANG, W.-X. Trace metal contamination in estuarine and coastal environments in China. **Sci. Total Environ.** v. 421-422 p. 3-16. 2012.
- PRAPAGDEE, B.; WATCHARAMUSIK, A. Adaptive and cross-protective responses against cadmium and zinc toxicity in cadmium-resistant bacterium isolated from a zinc mine. **Braz. J. Microbiol.** v. 40 p. 838-845. 2009.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA, JR. V. A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathol.** v.12 p. 16. 1986.
- ROSSBACH, S.; MAI, D. J.; CARTER, E. L.; SAUVIAC, L.; CAPELA, D.; BRUAND, C.; BRUIJN, F. J. Response of *Sinorhizobium meliloti* to elevated concentrations of cadmium and zinc. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 74 p. 4218-4221. 2008.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers**. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods*

and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386. 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, W. D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA. 2001.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M.; SA, T. M. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteracea members: their possible role in plant growth promotion. **Microb. Ecol.** v.1 p. 1-11. 2007.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Chemosphere** v. 66 p. 1794-1798. 2007.

SCHULTZ, J.; MILPETZ, F.; BORK, P.; PONTING, C. P. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 95 p. 5857-5864. 1998.

SEON-WOO, L.; GLICKMANN, E.; COOKSEY, D. A. Chromosomal locus for cadmium resistance in *Pseudomonas putida* consisting of a cadmium-transporting ATPase and a MerR Family Response Regulator. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 67 p. 1437-1444. 2001.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol.** v. 28 p. 2731-2739. 2011.

TSENG, T.; GRATWICK, K. S.; KOLLMAN, J.; PARK, D.; NIES, D. H.; GOFFEAU, A.; SAIER, M. H. J. The RND Permease Superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** v. 1 p. 107-125. 1999.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** v. 22 p. 4673-4680. 1994.

TRAJANOVSKA, S.; BRITZ, M. L.; BHAVE, M. Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. **Biodegradation** v. 8 p. 113-124. 1997.

UNIPROT. Universal Protein Resource. <http://www.uniprot.org/>. 2012.

VAN DER LELIE, D.; SCHWUCHOW, T.; SCHWIDETZKY, U.; WUERTZ, S.; BAEYENS, W.; MEGEAY, M.; NIES, D. H. Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. **Mol. Microbiol.** v. 23 p. 493-503. 1997.

VON ROZYCKI, T.; NIES, D. H. *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. **Antonie van Leeuwenhoek** v. 96 p. 115-139. 2009.

XIONG, J.; LI, D.; LI, H.; HE, M.; MILLER, S. J.; YU, L.; RENSING, C.; WANG, G. Genome analysis and characterization of zinc efflux systems of a highly zinc-resistant bacterium, *Comamonas testosteroni* S44. **Res. Microbiol.** v. 162 p. 671-679. 2011.

CAPÍTULO 3

**CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ESTRESSES
PROVOCADOS POR CÁDMIO, COBALTO E ZINCO EM *Gluconacetobacter*
diazotrophicus PAI 5**

Resumo

A poluição elevou a disponibilidade de metais na biosfera. Deste modo, a contaminação por metal é um dos grandes problemas ambientais do mundo. A exposição de microrganismos a tais condições afeta negativamente o crescimento e a atividade bioquímica celular, devido a alterações na estrutura conformacional de ácidos nucleicos e proteínas. *Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria promotora do crescimento vegetal associada à diversas espécies vegetais e nichos ecológicos com distribuição cosmopolita. Recentemente, foi relatada sua resistência a metal pesado, tendo sido encontrado que a proteína CzcA é essencial para a tolerância a cádmio, cobalto e zinco. No entanto, os demais componentes das vias metabólicas envolvidas nesta resposta permanece desconhecido. O presente trabalho teve como objetivo identificar as principais proteínas envolvidas na resistência a cádmio, cobalto e zinco em *G. diazotrophicus* PAI 5. Para tanto, um biblioteca de 2.554 mutantes de inserção foi utilizada para selecionar mutantes sensíveis aos metais, cujos genes defectivos foram identificados por sequenciamento. Foram encontrados 16 genes distintos entre transportadores de efluxo de metal pesado, proteínas envolvidas na resposta oxidativa e proteínas hipotéticas. O estudo revelou o papel majoritário da resposta antioxidante como mediadora da resistência a metal na bactéria *G. diazotrophicus* PAI 5, destacando-se a detoxificação mediada por glutathione, ação de transportadores de influxo de manganês, dentre outras respostas. Somado a isso, observou-se um sistema de efluxo eficiente, típico de bactérias resistentes a metais pesados. O conjunto dos genes apresentados desempenha papel fundamental na homeostase celular da bactéria, o que, possivelmente, viabiliza sua sobrevivência em ambientes contaminados com metal.

Palavras-chave: *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5, resistência a metal, sistemas de efluxo, determinante *czc*, resposta oxidativa, glutathione.

1. Introdução

A poluição aumentou excessivamente no decorrer do século passado, elevando a disponibilidade de metais na biosfera a níveis tóxicos (Yan-de *et al.*, 2006). Deste modo, a contaminação por metal em solos é um dos grandes problemas ambientais do mundo. Estes elementos têm ação direta sobre a saúde pública e ecossistêmica (Abou-Shanab *et al.*, 2006).

Alguns metais são essenciais e participam de processos biológicos, regulando a expressão gênica e a atividade de biomoléculas (Bruins *et al.*, 2000). No entanto, em altas concentrações, mesmo metais essenciais tornam-se tóxicos. A exposição de microrganismos a concentrações excessivas destes compostos afeta negativamente seu crescimento, morfologia e atividade bioquímica (Giller *et al.*, 1998). Esta toxicidade se dá pelo deslocamento de metais essenciais de seus sítios de ligação nativos ou através de interações com diferentes ligantes. São formados também complexos inespecíficos prejudiciais na parede celular (Nies, 1999). O resultado desta ação são alterações na estrutura conformacional de ácidos nucléicos e proteínas, interferência na fosforilação oxidativa e no balanço osmótico (Bruins *et al.*, 2000).

Os microrganismos possuem vários mecanismos de resistência, que previnem a toxicidade causada por excesso de metal (Prapagdee e Watcharamusik, 2009). Estes mecanismos incluem efluxo ativo do metal, aumento da expressão de enzimas de detoxificação, acúmulo e complexação do metal dentro da célula, redução do metal para estados menos tóxicos e síntese de peptídeos ligantes, proteínas ou polissacarídeos como metalotioneínas e substância polimérica extracelular – exopolissacarídeo (EPS) (Nies, 1999; Gadd, 2004). É sabido, que estresses em geral desencadeiam uma resposta oxidativa exacerbada, de modo que defesas antioxidantes são necessárias. Esta defesa atua protegendo a célula dos danos oxidativos causados pelo agente estressante.

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria promotora do crescimento vegetal (Saravanan *et al.*, 2007a), primeiramente isolada no Brasil a partir de tecidos de cana-de-açúcar (Cavalcante e Döbereiner, 1988). Sua distribuição ocorre em vários locais do mundo, associada à diversas espécies vegetais e nichos ecológicos (Saravanan *et al.*, 2007a). Recentemente, foi relatada sua resistência a metal pesado, tendo sido encontrado que a proteína

CzcA é essencial para a tolerância a cádmio, cobalto e zinco (Intorne *et al.*, 2012). No entanto, os demais componentes das vias metabólicas envolvidas nesta resposta permanece desconhecido.

O presente trabalho teve como objetivo a identificação das principais proteínas envolvidas na resistência a cádmio, cobalto e zinco em *G. diazotrophicus* PAI 5. Para tanto, um biblioteca de mutantes de inserção foi utilizada para selecionar mutantes sensíveis aos referidos metais, cujos genes defectivos foram identificados por sequenciamento. Foram encontrados 16 genes distintos entre transportadores de efluxo de metal pesado, proteínas envolvidas na resposta oxidativa e proteínas hipotéticas. O estudo revelou o papel majoritário da resposta antioxidante como mediadora da resistência a metal na bactéria *G. diazotrophicus* PAI 5.

2. Objetivo Geral

Estudar os mecanismos envolvidos na resistência aos metais cádmio, cobalto e zinco em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5, através da identificação e caracterização de mutantes de inserção defectivos para tal característica.

2.1. Objetivos específicos

- Selecionar mutantes sensíveis aos metais cádmio, cobalto e zinco, a partir de uma biblioteca composta por 2.554 mutantes de inserção do transposon Tn5;
- Identificar os genes interrompidos pelo transposon em cada um dos mutantes defectivos selecionados;
- Caracterizar as vias de resistência detectadas, através de análise *in silico* das sequências dos genes afetados em cada mutante sensível aos metais.

3. Material e Métodos

3.1. Cepas bacterianas e meios de cultivo

A estirpe selvagem *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 da Coleção de Cultura da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil) foi gentilmente cedida pelo Dr. Fábio L. Olivares. Os trabalhos de seleção de mutantes de *G. diazotrophicus* sensíveis aos metais utilizaram uma biblioteca composta por 2.554 mutantes obtidos por mutagênese insercional com transposon Tn5 EZ-<R6Kyori/KAN-2> previamente construída (Intorne *et al.*, 2009).

G. diazotrophicus e seus respectivos mutantes foram cultivados em LGI modificado (composição em g.l⁻¹: glicose 10, K₂HPO₄ 0,2; KH₂PO₄ 0,6; MgSO₄·7H₂O 0,2; (NH₄)₂SO₄ 1,32; CaCl₂·2 H₂O 0,02; NaMoO₄·2 H₂O 0,002 e FeCl₃·6 H₂O 0,018 a 30 °C (Cavalcante e Döbereiner, 1988). *Escherichia coli* TransforMax EC100D (*pir*⁻) (Epicentre) cultivada em meio LB-Miller a 37 °C (Miller, 1972) foi usada nos estudos de clonagem seguindo a instrução do fabricante. Canamicina foi adicionado quando necessário (50 µg.ml⁻¹) (Intorne *et al.*, 2009). Os componentes dos meios foram dissolvidos em água destilada (LB) ou água ultra-pura (LGI), e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min. O pH do meio LGI foi ajustado para 5,5 com KOH antes da esterilização. No preparo do meio sólido foi adicionado 15 g.l⁻¹ de agar-agar. Ainda no meio sólido LGI, foi utilizado azul de bromotimol 0,5 % em KOH 0,2 M (5 ml.l⁻¹) como indicador de pH.

3.2. Metais solúveis

Os metais utilizados em sua forma solúvel foram cádmio (CdCl₂), cobalto (CoCl₂·6H₂O) e zinco (ZnCl₂). Os três metais foram preparados em soluções estoques de 0,5 M, esterilizadas por filtração. Os metais foram adicionados ao meio de cultura estéril no momento de vertê-lo nas placas de Petri. Isto foi realizado buscando evitar a formação de complexos de compostos presentes no meio com os metais durante a autoclavagem.

3.3. Seleção de mutantes sensíveis a metal

Os mutantes foram inoculados em placas de 96 poços (2 ml) com meio LGI e incubados a 30 °C sob agitação constante de 180 min⁻¹. Após 4 dias de cultivo, um replicador de 96 pinos (Boekel, Fisher Scientific) foi usado para plaqueamento. Buscando encontrar mutantes defectivos para resistência a metal, os 2.554 mutantes foram plaqueados em meio LGI controle e LGI suplementado com 0,5 mM de CdCl₂, 10 mM de CoCl₂.6H₂O e 2 mM de ZnCl₂. As concentrações usadas foram determinadas a partir das concentrações mínimas inibitórias usadas para a seleção dos mutates como descrito no item 3.2. do Capítulo 2. O critério utilizado para a determinação destas concentrações foi baseado naquela cuja concentração influencia minimamente o crescimento da estirpe selvagem PAI 5.

Após 7 dias de incubação, o crescimento da colônia foi analisado. Mutantes que não cresceram ou que foram prejudicados na formação da colônia foram selecionados por apresentar fenótipo sensível ao metal. Na análise dos resultados, os mutantes foram classificados visualmente em: “zero” (0) – sem crescimento, “um” (1) – pouco crescimento, “dois” (2) – crescimento mediano e “três” (3) – crescimento normal, este último usado como controle.

Os mutantes classificados como “zero” foram testados novamente para confirmação do fenótipo. As condições foram as mesmas descritas acima, com exceção de que estes mutantes foram carimbados em concentração celular conhecida (10⁹ células.ml⁻¹) nos respectivos meios de cultivo. Outra modificação foi que nesta etapa as concentrações de CdCl₂ (0,25 mM) e CoCl₂.6H₂O (5 mM) foram reduzidas. A concentração de ZnCl₂ (2 mM) permaneceu igual. Somente mutantes classificados inicialmente como “zero”, que confirmaram o fenótipo de sensibilidade na segunda etapa de seleção, seguiram para análise molecular.

3.4. Isolamento de DNA e *Southern blotting* dos mutantes

Estes ensaios foram realizados de acordo com o tópico 3.5 do Capítulo 2.

3.5. Identificação do sítio de inserção do transposon Tn5

Estes ensaios foram realizados de acordo com o tópico 3.6 do Capítulo 2.

4. Resultados

4.1. Seleção de mutantes sensíveis a metal

A partir dos dados obtidos nos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) relatados no Capítulo 2, foram determinadas as concentrações de cádmio, cobalto e zinco para seleção de mutantes defectivos envolvidos na resistência a metal em *G. diazotrophicus* PAI 5. O critério adotado foi utilizar a concentração do metal capaz de influenciar minimamente o crescimento da bactéria selvagem, permitindo que mutantes parcialmente afetados também fossem detectados. Deste modo, foram utilizados 0,5 mM de $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mM de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 2 mM de ZnCl_2 .

Entre os 2.554 mutantes testados foram identificados inicialmente 134 sensíveis, afetados em relação ao crescimento pela presença de pelo menos um dos metais utilizados. Na Figura 1 observa-se que cádmio afetou o maior número de mutantes, seguido por cobalto e zinco. Observa-se ainda, que 63 mutantes foram selecionados para mais de um metal, sugerindo vias comuns de respostas.

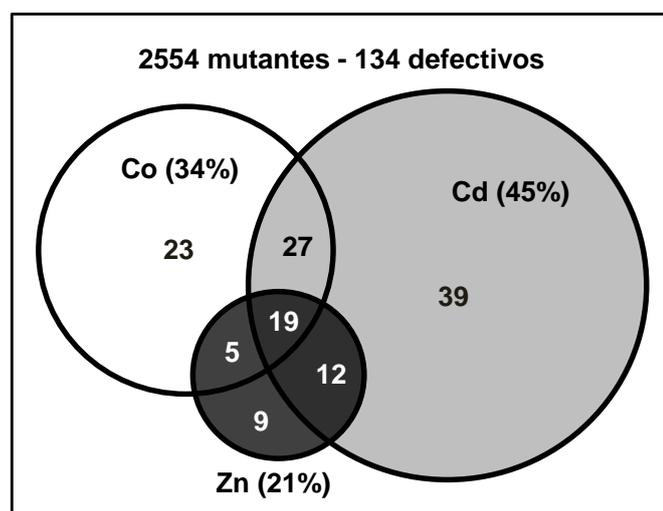


Figura 1: Número total e porcentagem de mutantes sensíveis a cádmio (Cd), cobalto (Co) e zinco (Zn). O tamanho do círculo é proporcional ao número de mutantes afetados para cada metal

Durante esta seleção inicial, os mutantes defectivos foram classificados como “zero”, para aqueles que não apresentaram crescimento na presença do metal, “um”, para mutantes que apresentaram pouco crescimento, e “dois”, para mutantes pouco afetados de acordo com o crescimento observado (Tab. 1). Como o número total de mutantes sensíveis foi elevado, as próximas etapas de análise foram conduzidas somente com aqueles mutantes mais afetados (grupo “zero”). Todos os mutantes selecionados que obtiveram classificação igual a “zero”, correspondente a ausência de crescimento, foram reavaliados para confirmação do fenótipo de sensibilidade em uma segunda etapa de seleção. Nesta segunda etapa, um total de 40 mutantes foi checado. Apesar do total de 55 mutantes “zero” somando-se os três estresses apresentados na Tabela 1, houve mutantes selecionados como “zero” para mais de um metal.

Tabela 1: Total de mutantes selecionados quanto à sensibilidade a cádmio, cobalto e zinco, divididos de acordo com a classificação que obtiveram em relação ao crescimento das colônias na presença dos metais referidos.

Mutantes afetados	Classificação
Cádmio: 97	Zero: 27
	Um: 39
	Dois: 31
Cobalto: 74	Zero: 18
	Um: 30
	Dois: 26
Zinco: 45	Zero: 10
	Um: 18
	Dois: 17
Zero: sem crescimento	
Um: muito pouco crescimento	
Dois: crescimento mediano	

Nesta etapa de confirmação dos mutantes, as concentrações de cádmio e cobalto foram reduzidas pela metade, ou seja, 0,25 mM e 5 mM, respectivamente. Para zinco, foi mantido 2 mM. Isto foi realizado novamente para garantir que mutantes afetados para o crescimento não fossem selecionados. Ao final desta etapa, dentre os 40 mutantes testados, 19 confirmaram o fenótipo de sensibilidade para pelo menos um dos metais avaliados (Fig. 2). No entanto, a ausência de crescimento não se manteve para todos. Alguns se mostraram

4.2. Análise de sequência dos mutantes selecionados

O número de inserções do transposon no cromossomo dos mutantes selecionados foi analisado através de ensaio de *Southern Blotting*, que utilizou a sequência do transposon como sonda. A presença de uma banda única foi verificada para todos os mutantes avaliados. Quanto à estirpe selvagem, nenhuma banda foi identificada após hibridação (dados não mostrados).

Visando a identificação do gene interrompido pela inserção do transposon em cada mutante, buscou-se realizar a clonagem da região genômica na qual tal inserção ocorreu seguida do sequenciamento das regiões flanqueadoras adjacentes a este sítio. A identidade do gene interrompido em cada mutante foi avaliada para ambas as regiões flanqueadoras do ponto de inserção do transposon (Fig. 2 e Tab. 2). As sequências de nucleotídeos dos sítios alvos foram diferentes entre os 19 mutantes analisados. O conteúdo A + T variou de 0,0 a 55,5 % com média dos valores encontrados de 33,3 %. Estes dados indicam que a inserção do transposon ocorreu aleatoriamente no genoma de *G. diazotrophicus* PAI 5 (Tab. 2).

Na análise de sequência dos mutantes, optou-se por organizar os genes alterados em três categorias: transportadores de efluxo, proteínas envolvidas na resposta oxidativa e proteínas hipotéticas. O primeiro grupo compreende seis mutantes, sendo quatro deles afetados para todos os metais testados: cádmio, cobalto e zinco. Eles não cresceram na presença de nenhum dos três metais. Três mutantes foram afetados no mesmo gene *czcA*, em diferentes pontos de inserção. O quarto foi alterado no gene *czcC*. *ZitB* e *fieF*, os outros dois genes mutados codificam transportadores possivelmente mais específicos quanto aos metais alvos. Já o mutante afetado na proteína ZitB foi selecionado na presença de cobalto e zinco, enquanto FieF foi identificado somente no estresse mediado por zinco.

Tabela 2: Caracterização da inserção de Tn5 nos mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 sensíveis a metais.

Mutante	Sensibilidade	Sítio alvo	A + T	ID do gene	Gene	Função / Enzima
GDP6B10	Cd (0), Co (0), Zn (0)	CTCCAGGAC	33,3	5789610	<i>czcA</i>	Bomba de efluxo de metal pesado
GDP15G12	Cd (0), Co (0), Zn (0)	GTGTCCGCG	22,2	5789610	<i>czcA</i>	Bomba de efluxo de metal pesado
GDP17A4	Cd (0), Co (0), Zn (0)	GTTGACGCG	33,3	5789610	<i>czcA</i>	Bomba de efluxo de metal pesado
GDP15H6	Cd (0), Co (0), Zn (0)	GGGCATGAA	44,4	5789612	<i>czcC</i>	Bomba de efluxo de metal pesado
GDP26F1	Co (1), Zn (1)	GCGCAGCAC	22,2	5789011	<i>zitB</i>	Transportador de efluxo de Zn
GDP2E5	Co (2)	ATTCCGATG	55,5	5789012	<i>fieF</i>	Bomba de efluxo de ferro
GDP25B2	Cd (1), Co (1), Zn (0)	GTCATGGCT	44,4	5789380	<i>mntH</i>	Transportador de influxo de manganês
GDP27G12	Cd (1), Co (1), Zn (0)	CTCCAGGAC	33,3	5788946	<i>ggt</i>	Gama-glutamiltanspeptidase
GDP7D3	Cd (1), Co (1)	ACCTCCACC	33,3	5790924	<i>metH</i>	Metionina sintase
GDP17C2	Cd (1), Co (1)	GGGTCCGAAG	33,3	5790924	<i>metH</i>	Metionina sintase
GDP3D8	Co (0)	GACTGGTAC	55,5	5790019	<i>ssuC</i>	Transportador glicina-betaína
GDP2C1	Cd (0)	CGCGCGGG	0,0	5792460	<i>gshB</i>	Glutathione sintetase
GDP2A12	Zn (1)	TTTCCCGCT	44,4	5792167	<i>aldA</i>	Aldeído desidrogenase A
GDP21A1	Cd (1)	CTGCAGTTC	44,4	5788852	<i>zwf</i>	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GDP3F10	Co (2)	GCTGAACGG	33,3	5790477	<i>adeC</i>	Adenina deaminase
GDP6F4	Co (2)	GGCCCGGGC	0,0	5790846	<i>glnE</i>	Glutamato-amônia-ligase adenililtransferase
GDP26A3	Co (2)	GACCTGTTT	55,5	5792509	<i>frr</i>	Fator de reciclagem do ribossomo
GDP25H7	Cd (1), Co (1), Zn (1)	GGCCGAGGC	11,1	5792535	GDI_2176	ATPase predita
GDP14E7	Cd (0), Co (1)	GGTCTGGAG	33,3	5790233	GDI_2608	Desconhecida

A segunda categoria corresponde aos genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo, que é uma resposta secundária desencadeada por estresses em geral. Nestas situações, as espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas em grande quantidade, o que faz com que a célula ative um mecanismo protetor para minimizar os danos causados por estas moléculas. Foram obtidos 11 mutantes afetados para dez genes diferentes. Dentre os três grupos gênicos encontrados durante o sequenciamento dos mutantes sensíveis a metal, este possui o maior número de representantes. Mais da metade dos mutantes selecionados estão organizados neste grupo, o que revela a importância desta resposta no mecanismo de resistência a metal nessa bactéria.

O terceiro grupo é formado por duas proteínas hipotéticas, ainda sem função determinada. É possível que GDI_2176 atue como uma ATPase, já que possui domínio AAA, comumente encontrado neste tipo de proteína.

Entre os 19 mutantes caracterizados foram encontrados 16 genes defectivos. Destes genes, somente três não foram ativados em resposta a cobalto. Com isso, 81,25 % dos genes encontrados no estudo são importantes na resposta mediada por cobalto, sendo quatro essenciais (na sua ausência, a bactéria foi incapaz de crescer na presença do metal) e cinco ativados exclusivamente. É interessante observar que somente cobalto apresentou mutantes com crescimento mediano. O estresse com cádmio permitiu identificar nove genes envolvidos na resistência, o que corresponde a 56,25 % do total de clones sequenciados. Foram encontrados dois genes exclusivamente relacionados à resistência e cinco genes essenciais. Quanto ao zinco, foram identificados sete genes (43,75 %), mas somente um deles foi exclusivamente identificado para este metal e três foram essenciais para a tolerância. Deste modo, sugere-se que a resposta da bactéria é peculiar para cada metal, embora vários componentes possam papel na resposta comum aos três metais. No caso de cobalto, um grande número de genes é importante para a resistência. Possivelmente, diferentes vias participam da resposta, que é governada por vários genes (Fig. 1 e Tab. 2). Já para cádmio, apesar de um grupo ainda grande de genes participar da resistência (Fig. 1), o número de genes essenciais para a resistência é superior em comparação a cobalto e devem apresentar funções mais especializadas na resposta (Tab. 2). Com relação a zinco, um número menor de mutantes foi observado (Fig 1.), mas proporcionalmente o número de

genes determinantes para a resistência é próximo do que foi observado para cádmio (Tab. 2).

O mutante GDP30H3, alterado no gene *czcA*, também estava entre os mutantes selecionados. No entanto, por já ter sido caracterizado no capítulo anterior, não foi abordado novamente.

5. Discussão

O estudo dos mecanismos de resistência a cádmio, cobalto e zinco em *G. diazotrophicus* PAI 5 revelou o envolvimento de um grande número de genes relevantes para esta característica. Dentre eles, muitas codificam proteínas envolvidas na resposta oxidativa, ainda não caracterizada nesta bactéria. Também foram encontrados genes de transportadores de efluxo de metal, evidenciando mais uma vez o papel do determinante *czc* apontado como o maior responsável pela característica de resistência (Intorne *et al.* 2012). Adicionalmente, foram identificados genes de proteínas hipotéticas, sugerindo a existência de novas vias de resistência, ainda não caracterizadas em outros organismos.

Na célula microbiana, os metais absorvidos se ligam aos componentes do citoplasma e periplasma e são exportados pelos sistemas de efluxo. No entanto, os sistemas de efluxo não são capazes de alcançar todos os cátions metálicos do citoplasma, porque muitos destes íons já se encontram ligados. Assim, há um processo de particionamento entre sítios citoplasmático de ligação de metal e os sítios de ligação do substrato das proteínas de efluxo. Tanto o particionamento, quanto a ligação citoplasmática são pouco conhecidos (Helbig *et al.*, 2008).

O gene *gshB*, alterado no mutante GDP2C1 sensível ao cádmio, codifica a enzima glutationa sintetase (GS), que é responsável pela formação de glutationa (GSH) (Fig. 3A). Este peptídeo intracelular possui diversas funções, incluindo detoxificação e defesa antioxidante (Lu, 2000; Masip, 2006). Em muitos eucariotos, esta molécula é um importante fator de ligação na homeostase de metais de transição. Esta apreensão de cátions metálicos e seu consecutivo transporte para o vacúolo é a principal rota de detoxificação de metais. Contudo, em procariotos, há poucos trabalhos descrevendo a participação desta proteína em tais vias (Helbig *et al.*, 2008). GSH influencia a resistência a arsenito, mercúrio (Latinwo *et al.*, 1998), cobre, cromo, zinco e cádmio em *E. coli* (Helbig *et al.*, 2008). Há relatos da sua ação detoxificante na apreensão de cádmio em *Rhizobium leguminosarum* (Figueira *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2006). Os mutantes GDP6F4 e GDP27G12 reafirmam o envolvimento de GSH na resistência aos metais testados, pois eles foram afetados em genes que participam da síntese e degradação deste peptídeo, respectivamente. GDP6F4 foi alterado no gene que

codifica glutamato-amônia-ligase adenililtransferase (GlnE). Tal enzima participa na via de síntese de glutamato, que é um aminoácido precursor de GSH, regulando a transcrição de glutamina sintetase (Fig. 3). Já GDP27G12 foi alterado no gene *ggt*, que codifica uma glicoproteína de superfície celular, chamada gama-glutamiltanspeptidase (GGT). GSH e seus compostos conjugados são o substrato fisiológico mais abundante de GGT (Hanigan, 1998) (Fig. 3A). GGT pode contribuir para o metabolismo de xenobióticos através do processamento do seqüestro e posterior metabolização de conjugados de glutathione, mediando a detoxificação do organismo (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007). No entanto, é preciso destacar, em sua maioria, os trabalhos que caracterizam a participação de tais proteínas foram realizados em plantas e animais, sendo pouca informação encontrada e relacionada em bactéria.

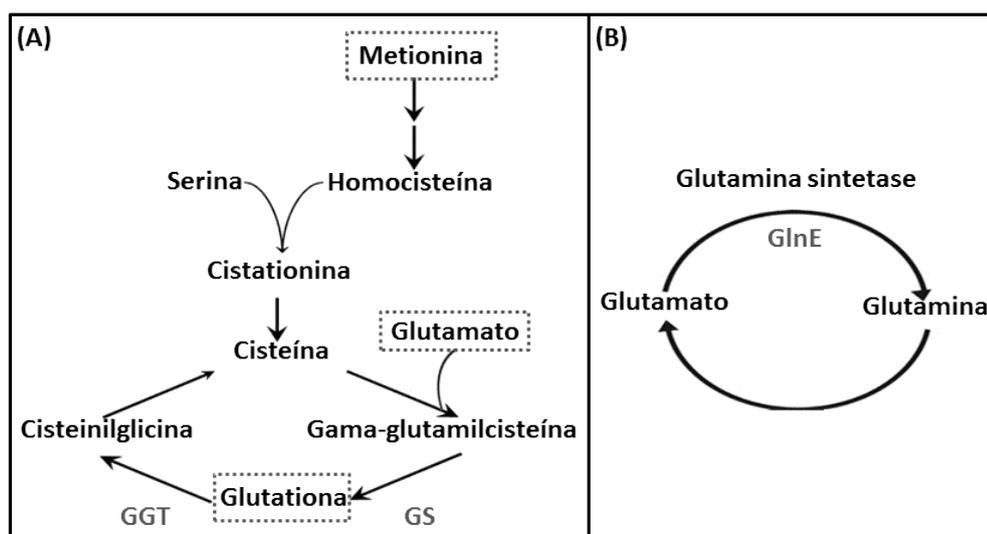


Figura 3: Biossíntese de glutathione. **(A)** Via metabólica de síntese de glutathione. **(B)** Produção de glutamato. Em cinza: pontos da via afetados neste estudo. Letras cinzas correspondem as enzimas: GGT: gama-glutamiltanspeptidase, GS: glutathione sintetase, e GlnE: glutamato-amônia-ligase adenililtransferase. Caixas cinzas pontilhadas correspondem aos compostos envolvidos na resposta a metal pesado em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5.

Outra via relevante para a resistência a cádmio, cobalto e zinco em *G. diazotrophicus* PAI 5 envolve o metabolismo de metionina, um aminoácido que possui grupamento tiol, precursor do peptídeo GSH (Fig. 3A). Os tióis são uma classe de derivados orgânicos, caracterizados pela presença de grupamentos

sulfidril reativos. Esta classe inclui GSH e metionina como tíois de baixo peso molecular. Nos sistemas biológicos, os tíois têm numerosas funções, incluindo papel central na defesa antioxidante (Dalle-Donne *et al.*, 2009). Devido a presença do grupamento tiol, metionina e GSH reagem rapidamente que as EROs, tendo um efeito protetor durante o estresse oxidativo. GDP7D3 e GDP17C2 foram afetados no gene que codifica metionina sintase (MS), o que levou ao fenótipo de sensibilidade aos metais. Esta enzima catalisa a síntese deste aminoácido, realizando a metilação da molécula (Fig. 4A). O influxo de glicina-betaína pelo transportador codificado por *ssuC*, gene alterado no mutante GDP3D8, também está relacionado a síntese de metionina (Fig. 4A). Glicina-betaína é um doador de radical metil, que atua do mesmo modo que MS, doando o grupamento metil para a formação do aminoácido (Fig. 4B). No presente estudo, a ativação destes genes revela o envolvimento da via de síntese de metionina na resistência a metais em *G. diazotrophicus* PAI 5.

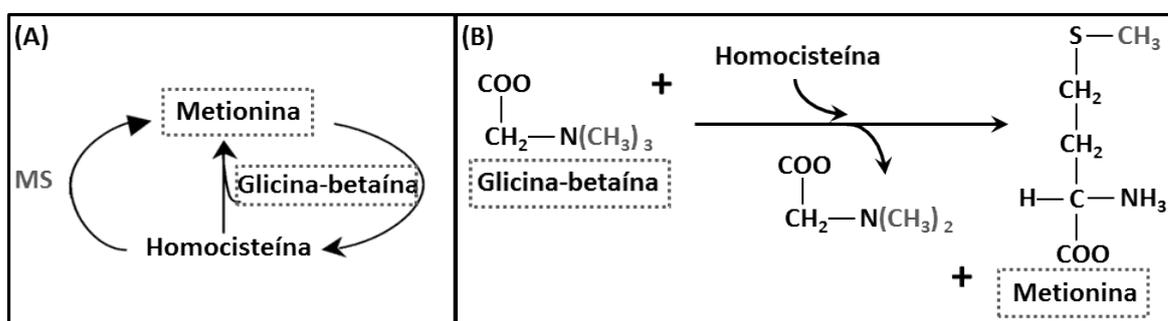


Figura 4: Biossíntese de metionina. **(A)** Via metabólica de síntese de metionina. **(B)** Produção de metionina a partir de homocisteína mais grupamento metil doado por glicina-betaína. Em cinza: pontos da via afetados neste estudo. Letras cinzas correspondem aos grupamentos metil e a enzima metionina sintase (MS). Caixas cinzas pontilhadas correspondem aos compostos envolvidos na resposta a metal pesado em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5.

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), alterada no mutante GDP21A1, também é induzida por estresse oxidativo. Esta enzima atua aumentando o poder redutor da célula na forma de NADPH, o que minimiza o ambiente oxidativo causado pelo excesso de metal, que desencadeou a produção exacerbada de EROs (Pomposiello *et al.*, 2000) (Fig. 5). É possível que o mesmo

papel seja desempenhado pela enzima aldeído desidrogenase, cujo gene foi afetado no mutante GDP2A12.

O influxo de manganês é outro mecanismo utilizado para conter o estresse oxidativo causado pelo excesso de metal nesta bactéria. O GDP25B2, afetado no gene *mntH*, que codifica um transportador de influxo de manganês, apresentou sensibilidade para aos três metais avaliados. Isto ocorre porque manganês pode quimicamente reduzir EROs, sem a necessidade de uma enzima (Imlay, 2008) (Fig. 5B). O suplemento de manganês em meio de cultura de mutantes defectivos para a enzima superóxido dismutase diminui ou erradica o fenótipo de sensibilidade observado em *E. coli*, *Bacillus subtilis* e *Sacharomyces cerevisiae* (Inaoka *et al.*, 1999; Al-Maghrebi *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 2005).

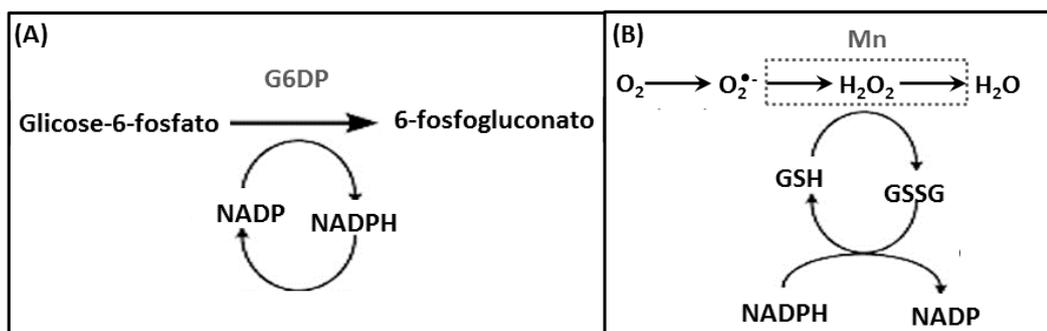


Figura 5: Redução de espécies reativas de oxigênio. **(A)** Formação de poder redutor (NADPH) a partir da ação de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). **(B)** Através de ação enzimática, NADPH media a redução de glutatona, que atua reduzindo as espécies reativas de oxigênio. Manganês (Mn) é capaz de realizar esta redução de forma independente de enzimas. Em cinza: pontos da via afetados neste estudo.

As outras duas proteínas associadas à resposta oxidativa, codificadas por genes afetados nos mutantes selecionados são adenina deaminase (mutante GDP3F10) e fator de reciclagem do ribossomo (mutante GDP26A3). Possivelmente, o envolvimento destas proteínas ocorre para reparar o dano causado pelo metal na molécula de DNA e na síntese proteica, respectivamente. A participação destas proteínas na resistência a metais em bactérias ainda não havia sido relatada, até o presente trabalho.

A identificação de transportadores de efluxo é um resultado esperado, pois em um estudo anterior com a bactéria *G. diazotrophicus* PAI 5 é relatado o papel

fundamental do determinante *czc* na resistência aos metais cádmio, cobalto e zinco (Intorne *et al.*, 2012). Neste sentido, o mutante encontrado com alteração no gene *czcC*, GDP15H6, complementa a informação já observada para *czcA*, sobre a relevância deste complexo protéico para a resistência. Estes transportadores são bombas transenvolpe de bactérias Gram-negativas formadas por três componentes, que atuam como antiportes quimiosmóticos (Leedjäv *et al.*, 2008). Quanto a não detecção de *czcB*, acredita-se que como a biblioteca é composta por cerca de 2.500 mutantes e não cobre totalmente o genoma de *G. diazotrophicus*, ou seja, os 4.000 possíveis genes (Bertalan *et al.*, 2009), realmente não se tenha obtido este mutante no desenvolvimento desta biblioteca (Intorne *et al.*, 2009).

Somado a *czcA* e *czcC*, foram encontrados outros dois transportadores de efluxo de cátions, *zitB* e *fieF*, que estão organizados lado-a-lado no genoma de *G. diazotrophicus* PAI 5. ZitB é um antiporte, que catalisa a troca de Zn^{2+} ou Cd^{2+} por H^+ , pertencente à uma extensa família de Facilitadores da Difusão de Cátions (CDF), que abrange transportadores encontrados em procariotos e eucariotos. Eles estão usualmente envolvidos no transporte de zinco e outros cátions divalentes, cruzando a membrana citoplasmática ou de organelas num movimento de efluxo (Paulsen e Saier, 1997; Lee *et al.*, 2002). A expressão de ZitB em *E. coli* é induzida por zinco e sua deleção resulta em hipersensibilidade ao metal (Grass *et al.*, 2001).

O último grupo de genes identificados codifica duas proteínas hipotéticas. Neste sentido, é válido destacar que o gene afetado no mutante GDP25H7 codifica uma proteína predita como ATPase, quando sua sequência é comparada em banco de dados. ATPases estão envolvidas no efluxo de metal pesado, ajudando na detoxificação celular (Agranoff e Krishna, 2004). Até o presente, os três principais mecanismos de efluxo de metais pesados conhecidos são: transportadores da família CDF, que atuam como trocadores quimiosmóticos íon-prótons; transportadores CBA, que atuam como antiportes formados por um complexo de proteínas que atravessa a célula, do citoplasma até seu exterior; e ATPases, que usam a energia do ATP para bombear íons para fora do citoplasma (Leedjäv *et al.*, 2008). Na Figura 6, tem-se um modelo de como estes mecanismos de resistência poderiam atuar na detoxificação celular de cátions bivalentes em *G. diazotrophicus*.

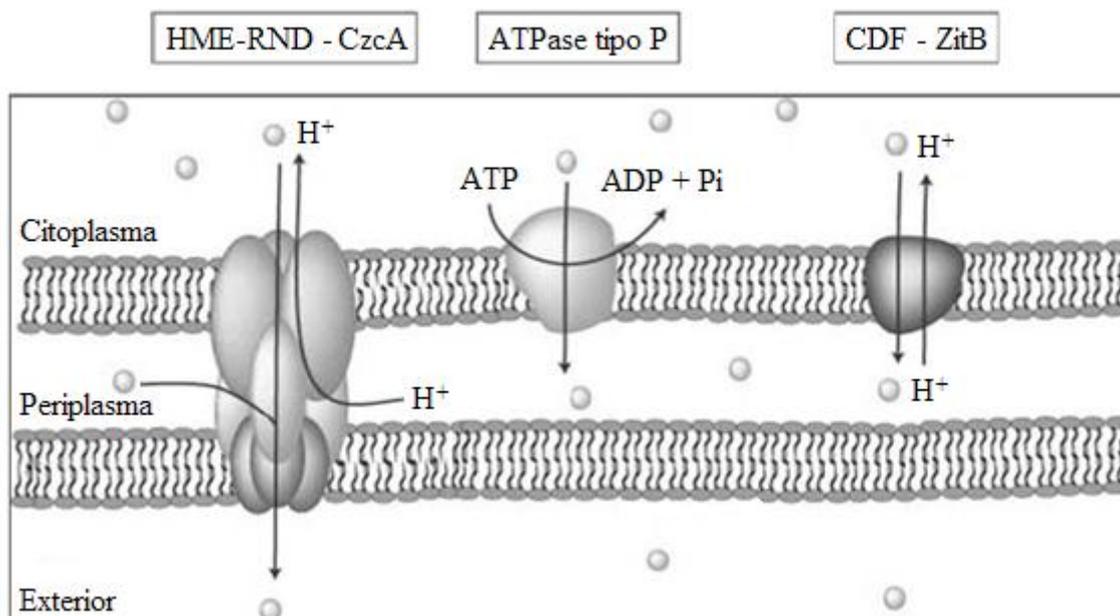


Figura 6: Interação de proteínas de efluxo de metal de diferentes famílias na detoxificação celular. Altos níveis de resistência a metais são alcançados através da interação de ao menos três famílias de transportadores de efluxo de metais, em um processo composto por duas etapas. As proteínas facilitadoras da difusão de cátion (CDF) translocam o substrato cruzando a membrana citoplasmática para o periplasma utilizando a entrada de prótons para o citoplasma como força motriz. Igualmente, ATPases tipo P transportam cátions metálicos através da hidrólise de ATP do citoplasma para o periplasma. Então, o complexo de efluxo HME-RND acopla o antiporte de prótons com o efluxo de cátions periplasmáticos para o lado de fora da célula. Pequenos círculos: metais divalentes. Adaptado de Haney *et al.* (2005).

6. Conclusão

A partir dos dados obtidos, o presente trabalho permite concluir que:

- Os mecanismos de resistência a cádmio, cobalto e zinco em *G. diazotrophicus* PAI 5 foram caracterizados;
- A detoxificação mediada por GSH, dentre outras respostas correlatas, revelaram o envolvimento de respostas antioxidantes;
- Observou-se também um sistema de efluxo eficiente, típico de bactérias resistentes a metais pesados;
- O conjunto destes genes desempenha papel fundamental na homeostase celular da bactéria *G. diazotrophicus* PAI 5, viabilizando sua sobrevivência na presença de metal.

7. Referências bibliográficas

ABOU-SHANAB, R. A. I.; ANGLE, J. S.; CHANEY, R. L. Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. **Soil Biol. Biochem.** v. 38. p. 2882-2889. 2006.

AL-MAGHREBI, M.; FRIDOVICH, I.; BENOVA, L. Manganese supplementation relieves the phenotypic deficits seen in superoxide-dismutase-null *Escherichia coli*. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 402 p. 104-109. 2002.

AGRANOFF, D.; KRISHNA, S. Metal ion transport and regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. **Front Biosci.** v. 9. p. 2996-3006. 2004.

BERTALAN, M.; ALBANO, R.; PADUA, V.; ROUWS, L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K.; SCHWAB, S.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, A.; FRANCA, L.; MAGALHAES, V.; ALQUERES, S.; CARDOSO, A.; ALMEIDA, W.; LOUREIRO, M. M.; NOGUEIRA, E.; CIDADE, D.; OLIVEIRA, D.; SIMÃO, T.; MACEDO, J.; VALADAO, A.; DRESCHSEL, M.; FREITAS, F.; VIDAL, M.; GUEDES, H.; RODRIGUES, E.; MENESES, C.; BRIOSO, P.; POZZER, L.; FIGUEIREDO, D.; MONTANO, H.; JUNIOR, J.; FILHO, G.; FLORES, V.; FERREIRA, B.; BRANCO, A.; GONZALEZ, P.; GUILLOBEL, H.; LEMOS, M.; SEIBEL, L.; MACEDO, J.; ALVES-FERREIRA, M.; SACHETTO-MARTINS, G.; COELHO, A.; SANTOS, E.; AMARAL, G.; NEVES, A.; PACHECO, A. B.; CARVALHO, D.; LERY, L.; BISCH, P.; ROSSLE, S. C.; URMENYI, T.; VON KRUGER, W.; 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.

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 45 p. 198-207. 2000.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant Soil.** v. 108 p. 23-31. 1988.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, G.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. **Trends Biochem. Sci.** v. 34 p. 85-96. 2009.

FIGUEIRA, E.; LIMA, I. G.; PEREIRA, S. I. A. Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae: glutathione as a detoxifying agent. **Can. J. Microbiol.** v. 51. p. 7-14. 2005.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma.** v. 122 p. 109-119. 2004.

GILLER, K.E.; WITTER, E.; MCGRATH, S.P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. **Soil Biol. Biochem.** v. 30 p. 1389-1414. 1998.

GRASS, G.; FAN, B.; ROSEN, B. P.; FRANKE, S.; NIES, D. H.; RENSING, C. ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 183. p. 4664-4667. 2001.

HANEY CJ, GRASS G, FRANKE S, RENSING C. New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 32. p. 215-226. 2005.

HANIGAN M. H. Gamma-glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. **Chem. Biol. Interact.** v. 42. p. 111-112. 1998.

HELBIG, K.; BLEUEL, C.; KRAUSS, G. J.; NIES, D. H. Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 190. p. 5431-5438. 2008.

IMLAY, J. A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annu. Rev. Biochem.** v. 77 p. 755-776. 2008.

INAOKA, T.; MATSUMURA, Y.; TSUCHIDO, T. Molecular cloning and nucleotide sequence of the superoxide dismutase gene and characterization of its product from *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** v. 181 p. 1939-1943. 1999.

INTORNE, A. C.; OLIVEIRA, M. V. V.; LIMA, M. L.; SILVA, J. F.; OLIVARES, F. L.; DE SOUZA FILHO, G. A. Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. **Arch. Microbiol.** v. 191, p. 477-483. 2009.

INTORNE, A. C.; OLIVEIRA, M. V. V.; LIMA, M. L.; MATTOS, L. M. P.; DE SOUZA FILHO, G. A. Essential role of the *czc* determinant for cadmium, cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. **Int. Microbiol.** v. 15 p. 69-78. 2012.

LATINWO, L. M.; DONALD, C.; IKEDIABI, C.; SILVER, S. Effects of intracellular glutathione on sensitivity of *Escherichia coli* to mercury and arsenite. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 242. p. 67-70. 1998.

LEE, S. M.; GRASS, G.; HANEY, C. J.; FAN, B.; ROSEN, B. P.; ANTON, A.; NIES, D. H.; RENSING, C. Functional analysis of the *Escherichia coli* zinc transporter ZitB. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 215. p. 273-278. 2002.

LEEDJÄRV, A.; IVASK, A.; VIRTA, M. Interplay of different transporters in the mediation of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. **J. Bacteriol.** v. 190. p. 2680-2689. 2008.

LIMA, A. I. G.; CORTICEIRO, S. C.; FIGUEIRA, E. Glutathione-mediated cadmium sequestration in *Rhizobium leguminosarum*. **Enzyme Microb. Technol.** v. 39. p. 763-769. 2006.

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Curr Top Cell Regul.** v. 36. p. 95-116. 2000.

MASIP, L.; VEERAVALLI, K.; GEORGIU, G. The many faces of glutathione in bacteria. **Antioxid. Redox Signal** v. 8 p. 753-762. 2006.

NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 51. p. 730-750. 1999.

OHKAMA-OHTSU N, ZHAO P, XIANG C, OLIVER DJ. Glutathione conjugates in the vacuole are degraded by gamma-glutamyl transpeptidase GGT3 in *Arabidopsis*. **Plant J.** v. 49. p. 878-88. 2007.

PAULSEN, I. T.; SAIER, M. J. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. **J. Membr. Biol.** v. 156. p. 99-103. 1997.

POMPOSIELLO, P. J.; BENNIK, M. H.; DEMPPE, B. Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. **J. Bacteriol.** v. 183 p. 3890-3902. 2001.

PRAPAGDEE, B.; WATCHARAMUSIK, A. Adaptive and cross-protective responses against cadmium and zinc toxicity in cadmium-resistant bacterium isolated from a zinc mine. **Braz. J. Microbiol.** v. 40 p. 838-845. 2009.

SANCHEZ, R. J.; SRINIVASAN, C.; MUNROE, W. H.; WALLACE, M. A.; MARTINS, J.; KAO, T. Y.; LE, K.; GRALLA, E. B.; VALENTINE, J. S. Exogenous manganous ion at millimolar levels rescues all known dioxygen-sensitive phenotypes of yeast lacking CuZnSOD. **J. Biol. Inorg. Chem.** v. 10 p. 912-923. 2005.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M.; SA, T. M. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteracea members: their possible role in plant growth promotion. **Microb. Ecol.** v. 1. p. 1-11. 2007c.

YAN-DE, J.; ZHEN-LI, H.; XIAO-E, Y. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. **J. Zhejiang Univ. Sci. B.** v. 8. p. 192-207. 2006.

2. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

No estudo de revisão bibliográfica realizado no presente trabalho foi verificada a escassez de dados quanto ao potencial biotecnológico da bactéria voltado para aplicação industrial. Apesar disto, conclui-se que *G. diazotrophicus* PAI 5 é um organismo muito promissor para uso tanto na agricultura, quanto na indústria, devendo ser melhor explorado. Isto é facilitado pela disponibilidade do sequenciamento do genoma desta bactéria.

G. diazotrophicus PAI 5 é resistente a elevadas concentrações de cádmio, cobalto e zinco. Os mecanismos envolvidos na resistência aos metais foram caracterizados. Um sistema de efluxo eficiente, típico de bactérias resistentes a metais pesados permite o crescimento da bactéria em tais condições. Foi identificado que a proteína CzcA é essencial para a resistência a Cd, Co e Zn, revelando o papel do operon *czc* em *G. diazotrophicus* PAI 5. A detoxificação mediada por GSH, a ação de transportadores de influxo de manganês, dentre outras respostas, revelam também a participação de mecanismos de defesa antioxidante na resistência a metais nesta bactéria.

Com isso, o trabalho fornece possibilidades para estudos da importância dos mecanismos de resistência na colonização de plantas pela bactéria e na tolerância de plantas colonizadas a metal pesado presente no solo. Torna-se interessante avaliar a performance desta bactéria promotora do crescimento vegetal na interação com plantas hospedeiras em estudos de fitorremediação.

Considera-se válido avaliar a resistência a outros metais pesados como cobre, já que a bactéria possui genes envolvidos na resposta a este metal. É necessário ainda realizar ensaios bioquímicos e fisiológicos com os mutantes apresentados no Capítulo 3 para um melhor entendimento das vias metabólicas, pois as atuais análises referem-se apenas a dados *in silico*.

ANEXOS

ARTIGOS PUBLICADOS

Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc

Aline C. Intorne · Marcos Vinicius V. de Oliveira ·
Mariana L. Lima · Juliana F. da Silva ·
Fábio L. Olivares · Gonçalo Apolinário de Souza Filho

Received: 22 July 2008 / Revised: 2 February 2009 / Accepted: 6 March 2009 / Published online: 2 April 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract *Gluconacetobacter diazotrophicus* is a plant-growth-promoting bacterium, which is able to colonize sugarcane and other plant species of economic importance. The potentially beneficial effects promoted by this bacterium on plants are nitrogen-fixation, production of phytohormones, action against pathogens and mineral nutrient solubilization. In this study, the molecular mechanisms associated with phosphorus and zinc solubilization were analyzed. A transposon mutant library was constructed and screened to select for mutants defective for phosphorous [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$] and zinc (ZnO) solubilization. A total of five mutants were identified in each screen. Both screenings, performed independently, allowed to select the same mutants. The interrupted gene in each mutant was identified by sequencing and the results demonstrate that the production of gluconic acid is a required pathway for solubilization of such nutrients in *G. diazotrophicus*.

Keywords *Gluconacetobacter diazotrophicus* · Genomic functional analysis · Transposon mutant library · Phosphorus solubilization · Zinc solubilization

Introduction

Gluconacetobacter diazotrophicus is a nitrogen-fixing endophytic bacterium, able to colonize several plant species. Among these species, sugarcane is its main host (Cavalcante and Döbereiner 1988), but other economically important crops are also colonized by this bacterium, such as coffee (Jimenez-Salgado et al. 1997) and rice (Muthukumarasamy et al. 2005). Besides nitrogen-fixation, *G. diazotrophicus* promotes other beneficial effects to plants, such as the production of phytohormones (Bastian et al. 1998), the action against pathogens (Muthukumarasamy et al. 2000; Blanco et al. 2005; Saravanan et al. 2007a) and solubilization of mineral nutrients (Mowade and Bhattacharyya 2000; Saravanan et al. 2007b). Considering these features, *G. diazotrophicus* has been described as a plant-growth-promoting bacterium (Saravanan et al. 2007c).

The ability to solubilize minerals allows microorganisms to access previously unavailable nutrients. Some of the major genera of bacteria with this ability are *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* and *Erwinia* (Rodríguez and Fraga 1999). Nutrient solubilization represents a very interesting feature in plant-associated bacteria. Once solubilized, such compounds may also become available for absorption by plants (Kuklinsky-Sobral et al. 2004).

In *G. diazotrophicus*, the ability to promote the solubilization of compounds of phosphorus has been demonstrated in vitro (Maheshkumar et al. 1999; Mowade and Bhattacharyya 2000; Suman et al. 2001; Madhaiyan et al. 2004). Phosphorus

A. C. Intorne and M. V. V. de Oliveira contributed equally to this work.

Communicated by Ursula Priefer.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00203-009-0472-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. C. Intorne · M. V. V. de Oliveira · M. L. Lima · J. F. da Silva ·
G. A. de Souza Filho (✉)
Laboratório de Biotecnologia,
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil
e-mail: goncalos@uenf.br

F. L. Olivares
Laboratório de Biologia Celular e Tecidual,
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
Campos dos Goytacazes, RJ 28013-600, Brazil

is a macroelement essential to the plant nutrition, whose deficiency is considered to be a major limiting factor for plant development in many agricultural soils (Arcand and Schneider 2006). This nutrient is assimilated only as soluble phosphate. Under natural conditions, however, most of the phosphate in the soil is insoluble (Khan et al. 2006).

Similarly, recent studies have shown that *G. diazotrophicus* promotes zinc solubilization in vitro (Saravanan et al. 2007a, b, d). Zinc is a nutrient, also essential to plant development, and is assimilated as zinc ion (Zn^{2+}). Zn deficiency is the most common micronutrient deficiency in crops, particularly in soils with high pH (White and Zasoski 1999).

The ability to solubilize phosphorus and zinc may represent an important component of the plant growth promotion demonstrated by *G. diazotrophicus*. However, the molecular mechanisms responsible for such characteristics in this bacterium remain unclear.

The present study aimed to identify genes of *G. diazotrophicus* involved in the solubilization of phosphorus and zinc nutrients. A transposon mutant library was constructed and analyzed to identify defective mutants. The interrupted genes in each of these mutants were identified, allowing to evaluate the mechanisms involved in the solubilization of these nutrients.

Materials and methods

Bacterial strains, media and growth conditions

The wild-type *G. diazotrophicus* PA15 bacterium used for the construction of the transposon mutant library was obtained from the Culture Collection of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil). *G. diazotrophicus* was grown in DYGS medium ($g\ L^{-1}$ composition: glucose 2, yeast extract 2, peptone 1.5, K_2HPO_4 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 and glutamic acid 1.5) (Rodrigues Neto et al. 1986) at 30°C (Cavalcante and Döbereiner 1988). *Escherichia coli* TransforMax EC100D (*pir*⁻) (Epicentre, Madison, WI, USA) was used for cloning studies following the manufacturer's instructions and the cells were grown in LB medium-Miller at 37°C (Miller 1972). Kanamycin was added when necessary ($50\ \mu g\ mL^{-1}$).

Preparation of *G. diazotrophicus* PA15 electrocompetent cells

G. diazotrophicus PA15 was cultured to reach mid-exponential phase in a 500 mL Erlenmeyer flask with baffles containing 50 mL of DYGS medium and then were collected at 4°C by centrifugation at 2,880g. The cells were washed four times with 40 mL ultrapure water at 4°C. Subsequently, the cells were resuspended in ultrapure water in

a volume equivalent to 20 times the volume of cells obtained.

Electroporation

The EZ-Tn5 <R6Kyori/KAN-2> Tnp Transposome Kit (Epicentre, Madison, WI, USA) was used following the manufacturer's instruction. Competent cells (50 μL) and 1 μL transposome (25 ng) were mixed, kept at 4°C for 30 min and then electroporated at 1.5 kV for 5 ms, using a 0.1 cm gap electroporation cuvette (Epicentre, Madison, WI, USA) and a TransPorator Plus System (BTX, San Diego, CA, USA). DYGS medium (1 mL) was added immediately after the pulse and the cells were then incubated with constant shaking ($180\ min^{-1}$). After 90 min, the cells were plated onto agar plates containing DYGS + kanamycin. Transformants were selected after 4 days of incubation.

Mutant screening

The transformants were grown in DYGS broth in titer plates (2 mL) with constant shaking ($180\ min^{-1}$). After 4 days, a 96 pin replicator (Boekel, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) was used to transfer the transformants to plates. To screen for mutants defective in phosphorus solubilization, the transformants were plated onto modified DYGS media containing $Ca_5(PO_4)_3OH$ at 0.54% (final concentration of phosphorus at 0.1%) (Mowade and Bhattacharyya 2000). After 2 days of incubation, it was possible to observe whether a solubilizing zone was formed around the colony. Mutants that were not formed or were damaged in the formation of this zone, as compared to the wild-type, were selected.

Separately, a screening was performed to find mutants defective for zinc solubilization. Transformants were plated onto modified DYGS media containing ZnO at 0.12% (final concentration of zinc at 0.1%) (Saravanan et al. 2007b). The incubation and the selection of mutants defective for zinc solubilization were performed in the same way as for phosphorus.

In order to confirm the mutants selected in the 2 screenings, one drop (10 μL) of the culture of each transformant ($10^9\ cells\ mL^{-1}$) was placed onto in Petri plates containing DYGS media + 0.54% $Ca_5(PO_4)_3OH$ or 0.12% ZnO as well as DYGS media (control) and incubated for at least 2 days. Throughout the screenings, the media was supplemented with kanamycin.

DNA isolation and Southern hybridization

Genomic DNA from the selected mutants was isolated using Plant DNAzol Reagent (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), following the manufacturer's protocol. The DNA was digested by *EcoRI* (New England Biolabs, MA, USA), separated by electrophoresis on 0.8% (w/v) agarose

gel and then transferred onto a nylon membrane (Hybond-N+, Amersham GE Healthcare, Little Chalfont, UK). The whole transposon (2,001 bp) was amplified using primer MEint (5'-CTG TCT CTT ATA CAC ATC T-3') from one of the selected mutants. The PCR reactions (20 µL) contained 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 0.5 µM of primer MEint, 1 U of Taq DNA polymerase (Fermentas) and 10 ng of DNA template.

Reactions were carried out in a thermocycler (MasterCycler Gradient—Eppendorf) with initial denaturation at 95°C for 5 min followed by 40 cycles of 95°C for 60 s, 55°C for 60 s, 72°C for 90 s and a final extension at 72°C for 30 min. The amplified fragment was labeled with [α -³²P] dCTP following T7 QuickPrime kit instructions (Amersham GE Healthcare, Little Chalfont, UK) and used as a hybridization probe. The hybridization was performed at 65°C and incubated for approximately 16 h. The membrane was then washed and exposed to X-ray (Sambrook and Russel 2001).

Identification of the transposon insertion sites

The genomic regions flanking the transposon insertion point were rescued by self-ligation of total DNA digested with EcoRI and electroporation in *E. coli* TransforMax EC100D (*pir*⁻) competent cells following EZ-Tn5 <R6Kyor/KAN-2> Tnp Transposome Kit instructions. After the electroporation, the cells were plated onto LB agar plates containing kanamycin. The colonies selected had their plasmids purified.

The nucleotide sequences were determined by using an ABI 3130 automatic sequencer (Applied Biosystems) and the Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems Inc., CA, USA) according to the manufacturer's instructions. We used the transposon-specific primers KAN-2-FP-1 and KAN-2-RP-1 available in the EZ-Tn5<R6Kyor/KAN-2>Tnp Transposome Kit. BLAST searches were performed at National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Results and discussion

Transposon mutagenesis

In order to perform the functional analysis of genes involved in the solubilization of phosphorus and zinc nutrients by *G. diazotrophicus*, a mutant library was constructed, where wild-type *G. diazotrophicus* PA15 was electroporated with transposomes Tn5. The assays provided a transformation efficiency of 1.3×10^4 mutants per µg of transposon DNA. The library contained a total of 1,630 transformants. The presence of the transposon was detected

Table 1 Characterization of transposome insertion derivatives of *G. diazotrophicus* PA15

Mutants	Target sites ^a	A + T (%)	GeneID ^b
GDP29H1	GGATGCAGG	33.3	5792149
GDP9G4	CTCCTGCAC	33.3	5792149
GDP12F6	CCCGGCGGG	0.0	5792150
GDP23A12	GTCTCGGCG	22.2	5792147
GDP29H4	CGTACCACG	33.3	5790698
GDP6B10	CTCCAGGAC	33.3	5789610
GDP21E1	GCGCGGAAC	22.2	5789515
GDP25B2	GTCATGGCT	44.4	5789380
GDP25H7	GGCCGAGGC	11.1	5792535
GDP26F1	GCGCAGCAC	22.2	5789011
GDP30H3	GCGCAGGGC	11.1	5789610
GDP6D5	AGGAAGAAC	55.5	5788836
GDP7C8	GGCCGAGGC	11.1	5790654
GDP10C8	GCTGAAGGA	44.4	5789660
GDP11G6	GTGCCAGTC	33.3	5792360
GDP25C8	CGCCTGGCC	11.1	5788812

^a Sequence of transposon insertion sites in mutants

^b GeneID according to the NCBI database

by PCR in all the mutants tested but no amplification was observed in wild-type *G. diazotrophicus* PA15 isolate (data not shown).

The DNA sequences of the flanking regions of the transposon from 16 mutants were obtained. All the insertions of EZ-Tn5 <R6Kyor/KAN-2> transposon resulted in a duplication of 9 bp of the target sites. The A + T content ranged from 0.0 to 55.5%, with average 23.4% (Table 1). Although such value is low, it is important to consider that the A + T content in the total genome of this bacterium is 34% (NCBI, accession no NC_010125). As shown in the Table 1, the nucleotide sequences of the target sites were different among the 16 mutants analyzed, demonstrating that the transposon insertions tend to occur randomly in the genome of *G. diazotrophicus* PA15, as previously observed by Rouws et al. (2008).

The genetic stability of this Tn5 transposon insertion, in *G. diazotrophicus* PA15, has been also demonstrated by Rouws et al. (2008). In such work, it was demonstrated that, after 50 generations, no new transposition event of this element occurred. Thus, the obtained library is appropriate for use in functional genomics analysis.

Screening mutants with altered solubilization zones

The insertion mutant library was used to search for mutants defective for the ability to solubilize phosphorus [Ca₅(PO₄)₃OH] and/or zinc (ZnO). In the phosphorus solubilization screening, the 1,630 transformants were plated in

DYGS modified medium containing $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. After 2 days of culture, five mutants, defective in producing a solubilization zone around the colony, were identified. These clones were selected and the phosphorous solubilization assay was repeated three times. Four of the mutants (GDP29H1, GDP9G4, GDP12F6 and GDP23A12) did not form any solubilization zone and the fifth (GDP29H4), showed a zone less intense compared to wild-type bacterium (Fig. 1a).

In parallel, we performed the screening for detection of mutants defective in the formation of a zinc solubilization zone. The 1,630 transformants were plated in DYGS modified medium containing ZnO. After 2 days of culture, five mutants defective in producing a solubilization zone around the colony were identified. These clones were selected and the zinc solubilization assay was repeated three times. Four of these mutants (GDP29H1, GDP9G4, GDP12F6 and GDP23A12) did not form any solubilization zone and the fifth (GDP29H4) formed a solubilization zone approximately four times smaller than that observed in wild-type bacterium (Fig. 1a).

Both screenings performed independently [for $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ and ZnO], allowed to select the same mutants (Fig. 1a). All transformants that were not able to solubilize $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, were also not able to solubilize ZnO, and vice versa. This was also true with the mutant that

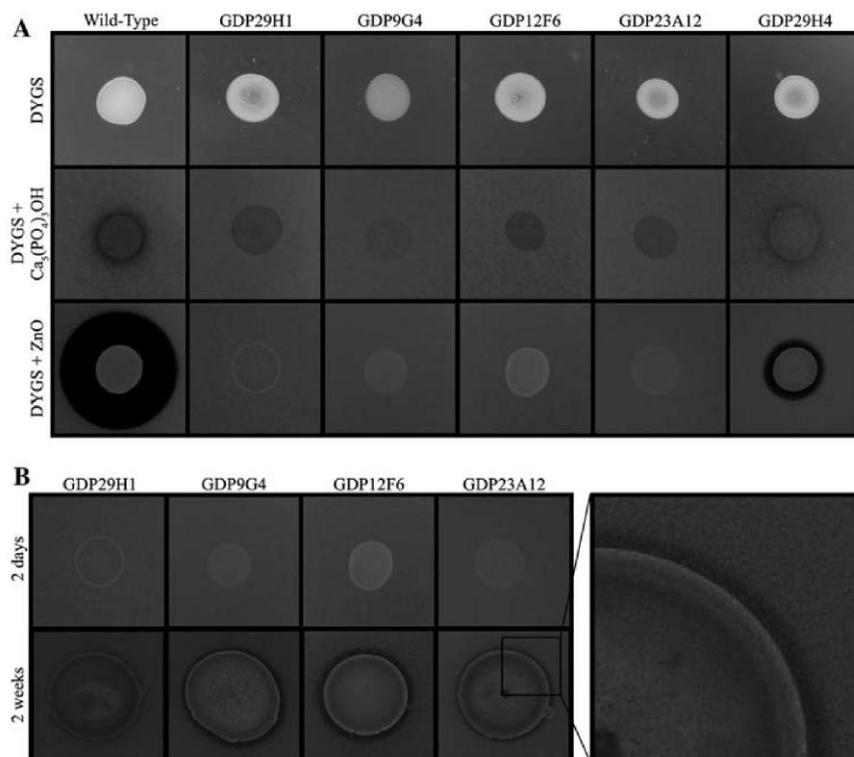
showed a reduced solubilization zone (GDP29H4). These results suggest that the zinc and phosphorus solubilization processes in *G. diazotrophicus* are probably associated with the same set of genes.

To analyze whether the phenotypes of the selected mutants that formed no solubilization zone would be maintained over a longer period, the four mutants (GDP29H1, GDP9G4, GDP12F6 and GDP23A12) were inoculated individually on DYGS medium containing the insoluble compound $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ or ZnO and incubated for 2 weeks. The results presented in Fig. 1b show that, for zinc, there was a formation of a small solubilization zone around the colony of all four mutants, which was not previously observed. For phosphorus, however, there was no formation of solubilization zone. It is important to consider that the phosphorus solubilization assay normally produces weaker zones than in the zinc assay, even for wild-type bacterium. Possibly, some phosphorous solubilization may be occurring, despite no zone has being observed.

Insertion analysis of the mutants with altered solubilizing zones

In order to verify whether the selected mutants contain single transposon insertions Southern hybridization was performed using the transposon sequence as a probe

Fig. 1 Mutants of *G. diazotrophicus* PA15 affected in the ability to solubilize phosphorus and zinc. **a** Wild-type and transformants were inoculated on DYGS agar plate, DYGS agar plate supplemented with 0.1% (w/v) of phosphorus [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$] and with 0.1% (w/v) of zinc (ZnO). Petri plates were incubated for 2 days. The solubilization zones around the colonies for phosphorus and for zinc were observed and compared with that of wild-type PA15. **b** Transformants were inoculated on DYGS agar plate supplemented with 0.1% (w/v) of zinc (ZnO). Petri plates were incubated for 2 days and for 2 weeks. A close-up of the zinc solubilizing zone of the GDP23A12 mutant is shown. Mutants altered in the phosphorus and zinc solubilization were screened out and retested three times



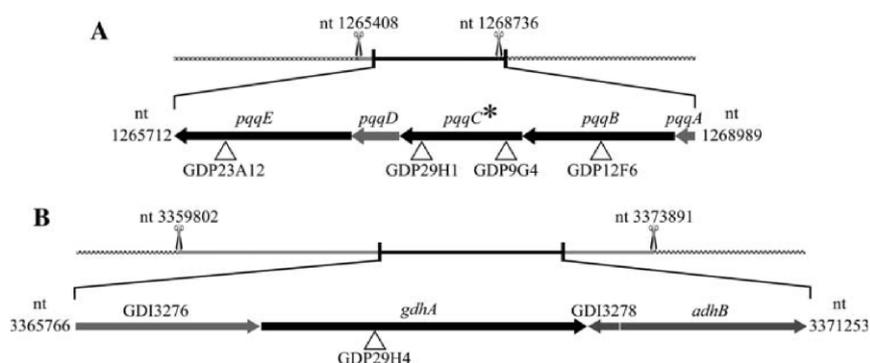


Fig. 2 Genomic organization of genes flanking Tn5 insertions in *G. diazotrophicus* PA15 according to the NCBI database. **a** Gene cluster flanking *pqqB*, *pqqC* and *pqqE*. **b** Gene cluster flanking *gdhA*. The arrows indicate the orientation of the ORF. Black arrows genes

disrupted in this study, gray arrows genes not disrupted, scissors *EcoRI* restriction site, asterisk two separate mutants with different insertion sites in the same gene, white triangles transposon insertion sites, nt nucleotide

(Supplementary Fig. S1). The four mutants (GDP29H1, GDP9G4, GDP12F6 and GDP23A12) who had similar phenotypes for phosphorus and zinc solubilization had bands of the same size (5,329 bp). This result suggests the presence of insertions in the same region of the genome. A band of a different size (1,600 bp) was observed in the fifth mutant (GDP29H4), indicating that the transposon insertion site occurred at a different point in the genome. This result is consistent with the phenotype analysis of the mutant GDP29H4 whose solubilization was reduced but not as much as for the other mutants.

Sequence analysis of genes affected in these mutants

In order to identify the gene interrupted by the transposon insertion in each of the five mutants, the flanking regions of the transposon insertion points were analyzed by sequencing. As observed in Fig. 2, all the mutants were affected in genes involved with the synthesis of gluconic acid (*pqqB*, *pqqC*, *pqqE* and *gdhA*). The *pqq* genes encode proteins involved in different stages of the cofactor pyrroloquinoline quinone (PQQ) production. This cofactor acts in the pathway of glucose dehydrogenase (GDH), an enzyme that converts glucose to gluconic acid (Felder et al. 2000). The *gdhA* gene, affected in the fifth mutant (GDP29H4), codes for the glucose dehydrogenase (GDH) enzyme.

The genes involved in PQQ biosynthesis have been characterized in several bacterial species and are organized into operons (Meulenberg et al. 1992; Toyama et al. 1997; Felder et al. 2000). A similar organization seems to occur in *G. diazotrophicus*. The results of the Southern hybridization assays and the sequence analysis reveal that, in four of the mutants, the insertions occur in the same region of the genome (Fig. 2a). Among these, two mutants contain insertions in different points of the same gene (GDP29H1 and GDP9G4) (Table 1; Fig. 2a). The side-by-side distribution

of *pqq* genes in the genome of *G. diazotrophicus* was confirmed by in silico analysis of the genome sequence from NCBI database (accession number NC_010125). Such genes are flanked by *EcoRI* sites in the genome. These data are in agreement with the size of the fragments observed in the southern blot assay, which correspond to the distance between the flanking *EcoRI* sites plus the transposon sequence (Fig. 2).

Unlike the others, the mutant affected in the *gdhA* gene (Fig. 2b) showed only a partial reduction of the solubilization zone for phosphorus and zinc, compared to wild-type bacterium (Fig. 1). This result could be explained by the presence of an additional *gdh* gene in *G. diazotrophicus*. In silico analysis on the complete genome of this bacterium (NCBI database) revealed the presence of one other glucose 1-dehydrogenase gene (*gdh* gene, geneID: 5790250) (data not shown). It is likely that this other gene is responsible for the remaining GDH activity, allowing the observed solubilization. The presence of more than one GDH genes has been observed in bacterial species such as *Acinetobacter calcoaceticus* (Matsushita et al. 1989) and *Pantoea citrea* (Pujol and Kado 1999).

In Gram-negative bacteria, the efficient solubilization of phosphate generally results from the production of gluconic acid. The ability of organic acids to solubilize compounds of phosphorus is attributed to mechanisms of acidification, chelation and exchange reactions (Omar 1998). The gluconic acid is produced by the extracellular oxidation of the glucose, performed by the quinoprotein glucose dehydrogenase (GDH-PQQ) (Rodríguez and Fraga 1999).

In *G. diazotrophicus*, the production of 5-keto-gluconic acid has been observed during zinc solubilization (Saravanan et al. 2007a, b). Our results corroborate this observation, demonstrating that mutations that affect the production of gluconic acid dramatically alter solubilization phenotype. After two weeks of incubation, however, it was

observed that the mutants were able to solubilize the compounds, suggesting the existence of other secondary compounds. The secretion of acids that are different from gluconic acid has been reported in *G. diazotrophicus* (Saravanan et al. 2007a, b).

Although *G. diazotrophicus* belongs to the Acetobacteriaceae family, mutants defective for acetic acid synthesis were not found in the present study. Similar results were shown in previous studies which analyzed the acids produced by this bacterium during Zinc solubilization (Saravanan et al. 2007a, b, c). The acetic acid production in acetobacteriaceae depends upon the oxidation of ethanol (Madigan et al. 1997). The absence of ethanol in the culture media used in our assays, explains the lack of mutants detected for genes involved in that process.

The gluconic acid production in *G. diazotrophicus* cultivation is intrinsically associated with the start of exponential growth. During this process, an intense aerobic metabolism occurs, with high glucose consumption and concomitant pH reduction. Gluconic acid, therefore, represents an important source of carbon for the bacterium (Stephan et al. 1991). The bioconversion of glucose to gluconic acid by the GDH enzyme occurs in the periplasmic space and requires the PQQ cofactor (Galar and Boiardi 1995). This mechanism allows for the maintenance of a low oxygen concentration in the cytoplasm, even under high respiratory activity. Considering that nitrogenase activity is reduced at high oxygen concentrations, this process represents an important aspect of biological nitrogen fixation in *G. diazotrophicus*, protecting such enzyme activity (Flores-Encarnacion et al. 1999; Galar and Boiardi 1995; Luna et al. 2006).

The availability of mutants defective for gluconic acid production provides interesting tools for further analyses of the role that periplasmic glucose conversion plays on bacterial growth and sugar metabolism. Similarly, it is also possible to analyze the effect of such mutations on the cytoplasmic oxygen concentration and the consequent nitrogenase activity.

Finally, with the data obtained in this study, we can state that gluconic acid production is the most important pathway for the solubilization of both nutrients (phosphorus and zinc) in *G. diazotrophicus*. The availability of the mutants will also be useful in future studies about the solubilization of other nutrients such as iron and copper. Additionally, it will be interesting to investigate whether gluconic acid production is important for the ability of the bacterium to colonize sugarcane plants. If the colonization is not affected, it will be possible to verify, *in vivo*, the actual contribution of nutrient solubilization to the plant growth promotion.

Acknowledgments The authors wish to thank Ana Paula da S. Amorim and Jenifer Bush for the English corrections and the

collaboration of Valéria C. L. Marques in the sequencing analysis (NAG-UENF). This research was supported by the CNPq, FINEP, FAPERJ and FENORTE. The first author received a CAPES fellowship.

References

- Arcand MM, Schneider KD (2006) Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *An Acad Bras Cienc* 78:791–807
- Bastian F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R, Bottini R (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 e A3 by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul* 24:7–11
- Blanco Y, Blanch M, Piñón D, Legaz ME, Vicente C (2005) Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. *J Biosci Bioeng* 99:366–371
- Cavalcante VA, Döbereiner J (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108:23–31
- Felder M, Gupta A, Verma V, Kumar A, Qazi GN, Cullum J (2000) The pyrroloquinoline quinone synthesis genes of *Gluconacetobacter oxydans*. *FEMS Microbiol Lett* 193:231–236
- Flores-Encarnacion M, Contreras-Zentela M, Soto-Urzuza L, Aguilar GR, Baca BE, Escamilla JE (1999) The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J Bacteriol* 181:6987–6995
- Galar MI, Boiardi JI (1995) Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:713–716
- Jimenez-Salgado T, Fuentes-Ramirez LE, Tapia-Hernandez A, Mascarua-Esparza MA, Martinez-Romero E, Caballero-Mellado J (1997) *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing Acetobacteria. *Appl Environ Microbiol* 63:3676–3683
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA (2006) Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture—a review. *Agron Sustain Dev* 26:1–15
- Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Gerdali IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol* 12:1244–1251
- Luna MF, Bernadelli CE, Galar ML, Boiardi JL (2006) Glucose metabolism in batch and continuous cultures of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL3. *Curr Microbiol* 52:163–168
- Madhaiyan M, Saravanan VS, Bhakiya Silba Sandal Jovi D, Lee H, Thenmozhi R, Hari K, Sa TM (2004) Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. *Microbiol Res* 159:233–243
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (1997) Brock biology of microorganism, 8th edn. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ
- Maheshkumar KS, Krishnaraj PU, Alagawadi AR (1999) Mineral phosphates solubilizing activity of *Acetobacter diazotrophicus*: a bacterium associated with sugarcane. *Curr Sci* 76:874–875
- Matsushita K, Shinagawa E, Adachi O, Ameyama M (1989) Quinoprotein D-glucose dehydrogenase of the *Acinetobacter calcoaceticus* respiratory chain: membrane-bound and soluble forms are different molecular species. *Biochemistry* 28:6276–6280
- Meulenbergh JJ, Sellink E, Riegman N, Postma PW (1992) Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae* pqq operon. *Mol Gen Genet* 232:284–294
- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

- Mowade S, Bhattacharyya P (2000) Resistance of P-solubilizing *Acetobacter diazotrophicus* to antibiotics. *Curr Sci* 79:1591–1594
- Muthukumarasamy R, Revathi G, Vadivelu M (2000) Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal organism of red-rot of sugarcane. *Curr Sci* 78:1063–1066
- Muthukumarasamy R, Cleenwerck I, Revathi G, Vadivelu M, Janssens D, Hoste B, Gum KU, Park KD, Son CY, Sa TM, Caballero-Mellado J (2005) Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. *Syst Appl Microbiol* 28:277–286
- Omar SA (1998) The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular - arbuscular - mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World J Microb Biot* 14:211–218
- Pujol CJ, Kado CI (1999) *gdhB*, a gene encoding a second quinoprotein glucose dehydrogenase in *Pantoea citrea*, is required for pink disease of pineapple. *Microbiology* 145:1217–1226
- Rodrigues Neto J, Malavolta VA Jr, Victor O (1986) Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. *Summa Phytopathol* 12:16
- Rodríguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17:319–339
- Rouws LFM, Simões-Araújo JL, Hemerly AS, Baldani JI (2008) Validation of Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of a flagellar mutant. *Arch Microbiol* 189:397–405
- Sambrook J, Russel WD (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 1st edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Saravanan VS, Kalaiarasan P, Madhaiyan M, Thangaraju M (2007a) Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion (Zn²⁺) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Appl Microbiol* 44:235–241
- Saravanan VS, Madhaiyan M, Thangaraju M (2007b) Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere* 66:1794–1798
- Saravanan VS, Madhaiyan M, Osborne J, Thangaraju M, Sa TM (2007c) Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteraceae members: their possible role in plant growth promotion. *Microb Ecol* 1:1–11
- Saravanan VS, Osborne J, Madhaiyan M, Mathew I, Chung J, Ahn K, Sa TM (2007d) Zinc metal solubilization by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and induction of pleomorphic cells. *J Microbiol Biotechnol* 17:1477–1482
- Stephan MP, Oliveira M, Teixeira KRS, Martinez-Drets G, Dobereiner J (1991) Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol Lett* 77:67–72
- Suman A, Shasany AK, Singh M, Shahi HN, Gaur A, Khanuja SPS (2001) Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. *World J Microbiol Biotechnol* 17:39–45
- Toyama H, Chistoserdova L, Lidstrom ME (1997) Sequence analysis of *pqq* genes required for biosynthesis of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacterium extorquens* AM1 and the purification of a biosynthetic intermediate. *Microbiology* 143:595–602
- White JG, Zasoski RJ (1999) Mapping soil micronutrients. *Field Crops Research* 60:11–26

RESEARCH ARTICLE

INTERNATIONAL MICROBIOLOGY (2012) 15:69-78
DOI: 10.2436/20.1501.01.160 ISSN: 1139-6709 www.im.microbios.org

**INTERNATIONAL
MICROBIOLOGY**

Essential role of the *czc* determinant for cadmium, cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5

Aline C. Intorne,^{1¶} Marcos Vinicius V. de Oliveira,^{1¶} Leandro de M. Pereira,² Gonçalo A. de Souza Filho^{1*}

¹Laboratory of Biotechnology, State University of North Fluminense Darcy Ribeiro, UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil. ²Laboratory of Computational Biology and Systems, Institute Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Received 12 March 2012 · Accepted 30 May 2012

Summary. The mechanisms of cadmium, cobalt and zinc resistance were characterized in the plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. The resistance level of the wild-type strain was evaluated through the establishment of minimum inhibitory concentrations (MIC) of the soluble compounds CdCl₂·H₂O, CoCl₂·6H₂O and ZnCl₂. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 was resistant to high concentrations of Cd, Co and Zn, with MICs of 1.2, 20 and 20 mM, respectively. Screening of an insertion library from transposon EZ-Tn5<R6Kyori/KAN-2> in the presence of ZnO revealed that the mutant GDP30H3 was unable to grow in the presence of the compound. This mutant was also highly sensitive to CdCl₂·H₂O, CoCl₂·6H₂O and ZnCl₂. Molecular characterization established that the mutation affected the *czcA* gene, which encodes a protein involved in metal efflux. *In silico* analysis showed that *czcA* is a component of the *czcCBARS* operon together with four other genes. This work provides evidence of the high tolerance of *G. diazotrophicus* PAI 5 to heavy metals and that *czc* is a determinant for metal resistance in this bacterium. [Int Microbiol 2012; 15(2):69-78]

Keywords: *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 · *czc* determinant · cadmium · cobalt · zinc · metal resistance

Introduction

Metals are natural components of the environment. Some metals, such as zinc and copper, serve as essential nutrients for living organisms and play a role in gene expression, bio-molecular activity and structural DNA stabilization [4,23].

Other metals, such as mercury and lead, do not have a known biological function and are toxic to living organisms even at trace amounts [42]. In microorganisms, an excess of certain metals may affect growth, morphology and metabolism [13]. Toxicity occurs through the displacement of essential ions present in biologically active molecules, deleterious interactions with ligands or the formation of non-specific complex compounds in the cell wall [36]. This results in alterations in the conformational structure of macromolecules and interferes with oxidative phosphorylation and the cellular osmotic balance [4].

Throughout evolution, microorganisms have developed several mechanisms to attenuate the toxicity from an excess of metals [43]. Active metal efflux, the synthesis of ligand

*Corresponding author: G.A. de Souza Filho
Laboratório de Biotecnologia
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
Campos dos Goytacazes
RJ 28013-600, Brazil
Tel. +55-2227397088
E-mail: goncalos@uenf.br

¶These authors contributed equally to this work.

compounds, the accumulation and complexation of metals inside the cell and the reduction of metals to less toxic forms have been highlighted [12,36]. The primary intracellular process for regulating an excess of metals is based on transporting the metals through the cytoplasmic membrane [34]. Under normal conditions, essential and non-essential metals are transported by nonspecific entry systems. However, when metal ions are in excess, specific ion efflux protein complexes may be synthesized to aid in the elimination of non-essential metals [34].

CzcA is one of the primary proteins in cadmium, cobalt and zinc resistance in several microorganisms, including the tolerant bacterium *Cupriavidus metallidurans* CH34 [22,31,37,57]. CzcA has been characterized also in other species associated with metal resistance, such as *Caulobacter crescentus* CB15N [18], *Pseudomonas putida* CD2 [19] and *Sinorhizobium meliloti* 1021 [45]. Together with other genes, *czcA* forms the *czc* determinant, which encodes a multi-protein complex associated with a high level resistance to cadmium, cobalt and zinc in bacteria [37].

Gluconacetobacter diazotrophicus PAI 5 is an endophytic bacterium that promotes plant growth [48] and was first isolated in sugarcane [6]. Later, this bacterium was detected in several other hosts, such as Cameroon grass, finger millet, coffee, sweet potato, tea, banana, pineapple, carrot, radish, beetroot and wetland rice [48]. Nitrogen fixation, phytohormone production, activity against phytopathogens, and the solubilization of mineral nutrients are several of the characteristics of plant growth promoted by *G. diazotrophicus* PAI 5 [48]. Moreover, this bacterium is resistant to antibiotics [33], which suggests the existence of multi-resistance mechanisms against drugs and/or the expression of efflux pumps [41].

The *G. diazotrophicus* PAI 5 genome has been sequenced, allowing further functional genomic studies [3]. The large number of transport systems described is consistent with several characteristics related to the endophytic lifestyle of the bacterium [3]. The availability of this information has facilitated characterization of the relevant metabolic pathways of this bacterium [21].

In the present study, the tolerance levels for cadmium, cobalt and zinc were evaluated in *G. diazotrophicus* PAI 5. The minimum inhibitory concentration of each metal that affected the development of the wild-type strain was measured in solid medium. Molecular characterization of a defective mutant sensitive to these metals enabled the identification of a gene crucial for cadmium, cobalt and zinc resistance in *G. diazotrophicus* PAI 5.

Material and methods

Bacterial strains, media and growth conditions. The *G. diazotrophicus* PAI 5 wild-type strain used in the present work was kindly provided by Dr. Fábio L. Olivares, from the Culture Collection of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil). *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 and the GDP30H3 mutant [21] were grown in DYGS medium [21,44] and modified LGI (g/l composition: glucose 10, K_2HPO_4 0.2, KH_2PO_4 0.6, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $[NH_4]_2SO_4$ 1.32, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.002 and $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.018) at 30 °C [6]. *Escherichia coli* TransforMax EC100D (*pir*⁻) (Epicentre, Madison, WI, USA) was used for cloning studies following the manufacturer's instructions. The cells were grown in LB medium-Miller at 37 °C [21,30]. Kanamycin (50 µg/ml) was added when necessary [21].

Minimum inhibitory concentration. In brief, 100 ml of wild-type strain was grown to exponential phase in 1000-ml Erlenmeyer flasks capped with baffles and containing LGI medium. Drops (10 µl) of the culture (10^9 cells/ml) were plated onto LGI solid medium containing the varying concentrations of metal salts ($CdCl_2 \cdot H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ and $ZnCl_2$). For each metal, the lowest concentration that inhibited visible growth within 6 days was determined. The assay was repeated at least three times.

Zinc solubilization assay. The wild-type strain and defective mutant were grown to reach exponential phase in DYGS medium. Drops (10 µl) of the culture (10^9 cells/ml) were inoculated on a DYGS agar plate control and on a DYGS agar plate supplemented with 0.1 % (w/v) ZnO at 0.12 %. Petri plates were incubated for 2 days [21,49]. Colony growth was observed and compared. This experiment was retested at least three times.

Determination of metal sensitivity in the defective mutant. The wild-type strain and defective mutant were grown to reach exponential phase in LGI medium. Drops (10 µl) of the culture (10^9 cells/ml) were plated onto LGI medium containing 0.3 and 0.5 mM $CdCl_2 \cdot H_2O$, 2.0 and 8.0 mM $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 2.0 and 8.0 mM $ZnCl_2$. The inhibitory concentrations were defined based on the MIC values determined for the wild-type strain at low and medium concentrations. The metal compounds were supplied in concentrations allowing viable growth of the wild-type strain. Higher concentrations were not measured because the mutant had a "loss-of-function" phenotype. Therewith, growth was monitored after 6 days. This experiment was repeated at least three times.

DNA isolation and Southern hybridization for mutant.

Genomic DNA from bacteria was isolated using Plant DNAzol Reagent (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), following the manufacturer's protocol. The genomic DNA was digested with *EcoRI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), separated by electrophoresis on a 0.8 % (w/v) agarose gel and then transferred onto a nylon membrane (Hybond-N+, Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, UK). The entire transposon (2001 bp) was amplified using primer MEint (5'-CTG TCT CTT ATA CAC ATC T-3') from the selected mutant. The PCRs (20 µl) contained 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM of each dNTP, 0.5 µM of primer MEint, 1 U of Taq DNA polymerase (Fermentas, Burlington, ON, CA) and 10 ng of DNA template. Reactions were carried out in a thermocycler (MasterCycler Gradient-Eppendorf) with an initial denaturation at 95 °C for

5 min followed by 40 cycles of 95 °C for 60 s, 55 °C for 60 s, 72 °C for 90 s and a final extension at 72 °C for 30 min. The amplified fragment was used as a hybridization probe. Probe labeling and hybridization were performed according to the Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). The membrane was then washed and exposed to X-ray [47].

Identification of the insertion site of transposon Tn5. The genomic regions flanking the transposon insertion point were rescued by self-ligation of total DNA digested with EcoRI and electroporation in *E. coli* TransforMax EC100D (*pir*⁻) competent cells following the instructions of the EZ-Tn5<R6Kyor/KAN-2>Tnp Transposome kit (Epicentre, Madison, WI, USA). After electroporation, the cells were plated onto LB agar plates containing kanamycin. Colonies were selected and their plasmids were then purified.

The nucleotide sequences were determined by using an ABI 3130 automatic sequencer (Applied Biosystems) and the Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The transposon-specific primers KAN-2-FP-1 and KAN-2-RP-1, available in the EZ-n5<R6Kyor/KAN-2>Tnp Transposome Kit, were used. Approximately 900 nucleotides were sequenced in each flanking region. BLAST searches were performed at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>]. There are two genome sequences of *G. diazotrophicus* PAI 5 available in the NCBI database (RefSeq: NC_010125 and NC_011365). These sequences were generated by two distinct groups and contain a considerable number of differences. In this study, data were checked in both genomes, and showed similar results for the sequences studied.

Genomic organization of the *czc* determinant. The sequences of genes comprising the *czc* determinant in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 (RefSeq: NC_010125) and related bacterial species were obtained through the NCBI database. The *czc* locus of *Gluconacetobacter xylinus* NBRC 3288 - pGXY010 (RefSeq: NC_016037), which belongs to the same genus as *G. diazotrophicus* PAI 5, and of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (RefSeq: NC_014323), another sugarcane endophyte, were included in the sequence analysis. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (RefSeq: NC_002516), *Pseudomonas putida* KT2440 (RefSeq: NC_002947) and *Cupriavidus metallidurans* CH34 - pMOL30 (RefSeq: NC_007971) were also evaluated because their *czc* determinants have already been characterized [5,16,17]. The BioCyc [<http://biocyc.org/>] [7] and Microbes Online [10] databases [<http://www.microbesonline.org/>] were used for an *in silico* prediction of the operon organization.

Phylogenetic analysis of the CzcA protein. The protein sequence of CzcA from *G. diazotrophicus* PAI 5, similar sequences from nitrogen-fixing bacteria, and proteins of the resistance, nodulation and cell division (RND) superfamily [53] were used for phylogenetic analysis. These proteins were aligned using ClustalW (default settings) [<http://align.genome.jp/>] [54] and Needle algorithm [<http://www.ebi.ac.uk>]. The HAE3 protein from *Methanoregula boonei* 6A8 was used as outgroup (Uniprot accession number: A71766). Optimal substitution models for phylogenetic analysis were selected using the software ProtTest [9].

The alignment result served as input for MEGA software version 5.0 [52] to generate a phylogenetic tree using the maximum likelihood (ML) method. The parameters used were the model of substitution WAG+F with

the invariant site (I) and the gamma-distributed site, 1000 bootstraps and four substitution rate categories. The results were visualized using MEGA software version 5.0 [52].

Predictions for the structural and transmembrane domains (TMH) of CzcA proteins were also obtained and evaluated. This analysis was performed using simple modular architecture research tool –(SMART) [<http://smart.embl-heidelberg.de/>] [28,50] and TMHMM Server v.2.0, [<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>] [26], respectively.

Results

***Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 and cadmium, cobalt and zinc resistance.** The resistance of this bacterium to metals when grown in solid medium containing CdCl₂·H₂O, CoCl₂·6H₂O and ZnCl₂ was evaluated; the results are shown in Fig. 1A. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 was resistant to high levels of Cd, Co and Zn, with maximum tolerated concentrations of 1.0, 18 and 16 mM, respectively. The MICs for Cd, Co and Zn were 1.2, 20 and 20 mM, respectively. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 was found to be susceptible to these metals in the following order: Co = Zn < Cd.

Metal-sensitive mutant. Figure 1B shows that the mutant GDP30H3 did not grow in the presence of ZnO. As this phenotype was due to the presence of zinc in the culture medium, the sensitivity of GDP30H3 to soluble cadmium, cobalt and zinc was evaluated. Figure 1C shows that, in the absence of metals, GDP30H3 had a growth rate similar to the wild-type strain. However, the mutant had high sensitivity to the presence of cadmium, cobalt and zinc. GDP30H3 did not grow when high concentrations of these metals were added, and growth was negatively affected even when they were supplied at low concentrations. These data indicate the crucial role of the affected gene in the resistance of the bacterium to the aforementioned heavy metals.

Characterization of the Tn5 insertion in the GDP30H3 mutant. The number of transposon insertions in the chromosome of the mutant was measured by Southern hybridization, performed using EcoRI-digested genomic DNA and the transposon sequence as a probe. Figure 1D shows the presence of one only band for the mutant. As predicted by *in silico* analysis, the size of the hybridized fragment corresponded to the distance between the EcoRI restriction sites (4601 bp) observed in the genome sequence plus the inserted transposon sequence (2001 bp), totaling 6602 bp.

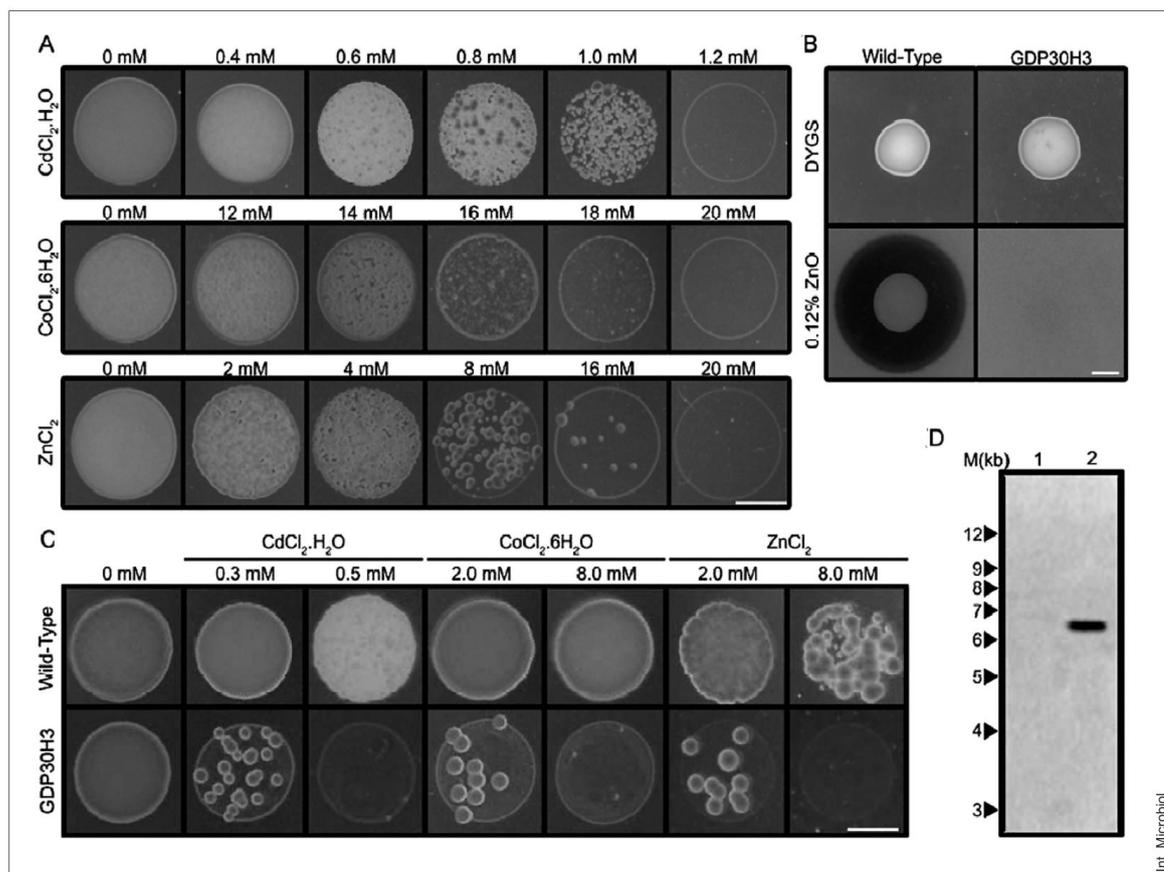


Fig. 1. (A) Sensitivity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 to cadmium, cobalt and zinc on LGI media. The first concentrations are those that first affected bacterial growth, i.e., lower concentrations did not reduce the colony density. (B) *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 mutant sensitive to zinc in ZnO solubilization assay in DYGS medium. (C) Comparison of sensitivities to cadmium, cobalt and zinc of the *G. diazotrophicus* PAI 5 wild-type strain and the mutant strain on LGI medium. All experiments were repeated at least three times. The white bar represents 1 cm. (D) Southern hybridization analysis of the *G. diazotrophicus* PAI 5 wild-type strain and the transformant. Lane 1: wild-type strain. Lane 2: GDP30H3. The molecular ladder is 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

The gene interrupted by the transposon insertion in the mutant was identified by sequencing the flanking regions of the transposon insertion. According to the NCBI database, the gene ID is 5789610. Figure 2A shows the genomic region of the transposon insertion. GDP30H3 was altered at gene *czcA* (Locus tag: GDI_1513), which encodes a cobalt-zinc-cadmium resistance protein. This protein has been characterized in several species of bacteria, where it was shown to be involved in the efflux of cations (cobalt, zinc and cadmium).

The *czc* determinant and metal resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. Analysis of the location of *czcA* revealed an overlap of the gene's cod-

ing region ends with the adjacent genes, *czcR* and *czcB* (Locus tag: GDI_1512 and GDI_1514, respectively). An evaluation of the subsequent genes showed that *czcS* and *czcC* (Locus tag: GDI_1511 and GDI_1515, respectively) also had overlapping regions (Fig. 2B). An *in silico* prediction using the BioCyc and Microbes databases suggested the organization of these genes in an operon. This set of genes is known as the *czc* determinant, which is widely found in bacteria that have high resistance levels for metals [27,37]. Two other genes involved in the efflux of heavy metals, *copA* (Locus tag: GDI_1508) and *CopB* (Locus tag: GDI_1509), are located near this genomic region. They encode the copper resistance proteins A and B, respectively.

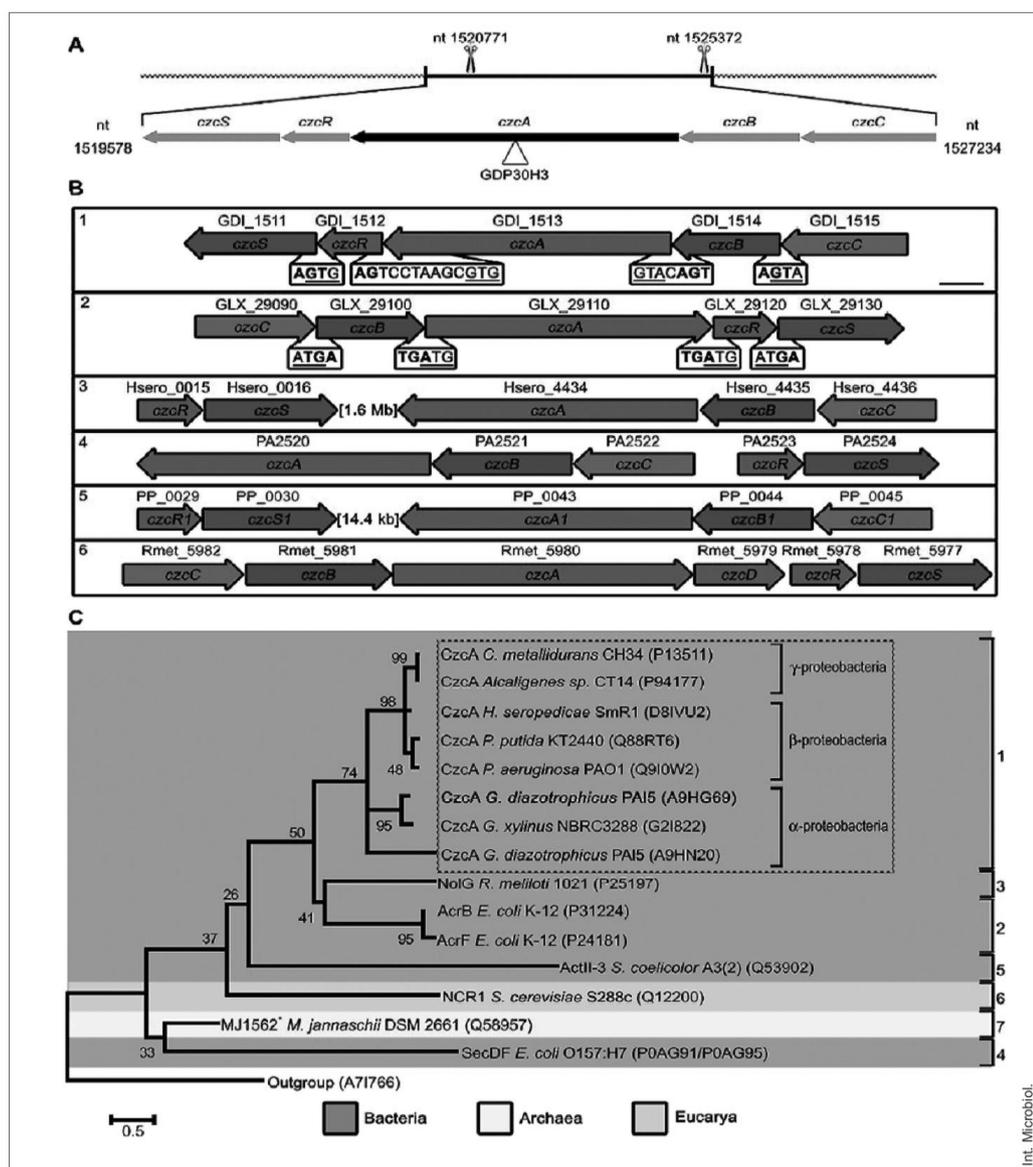


Fig. 2. (A) Genomic organization of genes flanking Tn5 insertions in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 according to the NCBI database. Gene cluster flanking *czcA*. The arrows indicate the orientation of the ORF. **Black arrows:** genes disrupted in this study, **gray arrows:** genes not disrupted, **scissors:** EcoRI restriction site, **white triangles:** transposon insertion sites, **nt:** nucleotide. (B) Comparison of the genomic organization of the *czc* determinant in *G. diazotrophicus* PAI 5 and related species following the RefSeq NCBI database: (1) *G. diazotrophicus* PAI 5 (NC_010125), (2) *G. xylinus* NBRC 3288 (NC_016037), (3) *H. seropedicae* SmR1 (NC_014323), (4) *P. aeruginosa* PAO1 (NC_002516), (5) *P. putida* KT2440 (NC_002947), and (6) *C. metallidurans* CH34 (NC_007971). Underlined letters in the boxes, start codon; and bold letters, termination codon. The arrows indicate the orientation of the ORF. The codes above the arrows are the locus tag of the sequences. Black bar: 500 bp. (C) Multiple alignment and phylogenetic relationship of the amino acid sequences of members of the RND superfamily. Families of the RND superfamily: (1) the heavy metal efflux (HME), (2) the hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1), (3) the nodulation factor exporter (NFE), (4) the SecDF protein-secretion accessory protein (SecDF), (5) the hydrophobe/amphiphile efflux-2 (HAE2), (6) the eukaryotic sterol homeostasis (ESH), and (7) the hydrophobe/amphiphile efflux-3 (HAE3). HME family is indicated in the box. *CzcA* from *G. diazotrophicus* PAI 5 is in bold. The numbers at the nodes indicate bootstrap support. Branch length is proportional to evolutionary distance (scale bar). Asterisk indicates a putative membrane protein MJ1562. Codes next to the proteins are the accession number of their sequences. All of the amino acid sequence analyses were performed using the UniProt database.

Table 1. Sequence comparison of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 CzcA protein with homologous CzcA proteins

Organism	Similarity (%)	Identity (%)	Length ^a	TMH ^b	Number ^c
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5	100	100	1031	12	A9HG69
<i>G. diazotrophicus</i> PAI 5 ^d	52.3	34.3	1033	12	A9HN20
<i>G. xylinus</i> NBRC 3288	82.9	73.2	1024	12	G2I822
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	58.9	39.9	1063	11	P13511
<i>Alcaligenes</i> sp. CT14	59.1	40.0	1063	11	P94177
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	58.2	39.2	1073	10	D8IVU2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	59.4	39.7	1051	10	Q9I0W2
<i>P. putida</i> KT2440	59.4	40.4	1053	10	Q88RT6

^aNumber of amino acids.^bNumber of transmembrane domains (TMH).^cAccession number from UniProt.^dProtein corresponding to the copy of the *czcA* gene (Locus tag: GDI_2438).

In addition, a second copy of the *czcA* gene was identified in another region of the *G. diazotrophicus* PAI 5 chromosome (Locus tag: GDI_2438). However, the other genetic components of the *czcCBARS* determinant were not observed in the vicinity. The genes adjacent to this region encode an efflux pump outer membrane protein (Locus tag: GDI_2437) and a HlyD family secretion protein (Locus tag: GDI_2439). This region also included transposase (Locus tag: and GDI_2423 GDI_2424) and integrase genes (Locus tag: and GDI_2426 GDI_2443). A low percentage of sequence similarity (52.3 %) and identity (34.3 %) was determined between the two *czcA* copies, as shown in Table 1. No *czc* gene was found in the sequences of the three plasmids of this bacterium deposited in the NCBI database (pGDIPAI5I - RefSeq: NC_010124, pGDIPAI5II - RefSeq: NC_010123 and pGDIA01 - RefSeq: NC_011367).

High similarity with the genomic organization of plasmid pGXY010 from *G. xylinus* NBRC 3288 was observed in a comparison of the organization of the *czc* genes of *G. diazotrophicus* PAI 5 and related homologs sequences (Fig. 2B). A second *czc* determinant was also found in the chromosome of *G. xylinus* NBRC 3288. Comparative analysis with the genome of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, another sugarcane endophyte [2], revealed the presence of two distinct coding regions of the *czc* determinant in the chromosome of this bacterium. These were also observed in *Pseudomonas aeruginosa* CMG103 and *P. putida* KT2440 (Fig. 2B) [5,17]. The genomic organization of *Cupriavidus metallidurans* CH34, a proteobacterium widely character-

ized with respect to its metal resistance, presents two *czc* determinants. Some non-functional *czc* genes are located on chromosome 2 (*czcICBA-ubiG-czcSRL*), but the majority of the genes is located on its plasmid, pMOL30 (*czcMNICBADRSEJ*), which is fully functional [22,31, 56,57]. Figure 2B shows the genes located on plasmid pMOL30, which is organized into two operons, *czcCBA* and *czcDRS* [16].

Figure 2C shows the phylogeny of representative members of the seven families that form the RND superfamily [53], which consists of permeases that act as efflux pumps to transport various compounds. CzcA belongs to this RND superfamily.

Table 1 provides a comparison of CzcA from *G. diazotrophicus* PAI 5 with other homologs of CzcA proteins that have been described from other Proteobacteria, including *nccA* (*C. metallidurans* A31), *czrA* (*P. aeruginosa* CMG103) and *cusA* (*E. coli* W3110 and *Myxococcus xanthus* DZF1) [11,17,32], all of which are part of triple-gene (CBA) loci encoding chemiosmotic antiporter complexes. The highest protein identity and similarity occurred with *G. xylinus* NBRC 3288 (73.2 % and 82.9 %, respectively). The sizes of the CzcA proteins in these species ranged from 1024 to 1073 amino acids. Functional prediction based on the amino acid sequence of the *czcA* gene using SMART and TMHMM revealed the presence of 10–12 transmembrane regions in CzcA, which is characteristic of this type of transporter. All of the analyzed proteins had an ADAM cysteine-rich (ACR) domain, covering most of the total length.

Discussion

Gluconacetobacter diazotrophicus PAI 5 is a plant-growth-promoting bacterium capable of solubilizing nutrients such as zinc. It is therefore likely to express genes that confer metal resistance. In the present study, transposon mutagenesis was used to analyze the metal-resistant determinant of PAI5, resulting in the identification of a chemiosmotic antiporter.

The susceptibility of *G. diazotrophicus* PAI 5 to cadmium, cobalt and zinc was first evaluated in an MIC assay. The results showed that this bacterium was highly tolerant of metals compared to other previously characterized organisms. Trajanovska et al. (55) evaluated bacteria isolated from environments contaminated with metal ions and identified *Corynebacterium* sp. AB18, *Arthrobacter* sp. E11 and *Cupriavidus metallidurans* CH34 among the isolated microorganisms [55]; the latter is a model organism used in metal resistance studies [22,31,37,57]. Overall, the MIC values determined for these organisms were lower than the values established in the present study for *G. diazotrophicus* PAI 5, especially those for cobalt and zinc [55] (Table 2). Similarly, studies performed with *Pseudomonas putida* 06909 [51] and *Pseudomonas aeruginosa* CMG466 [1] reported MIC values lower than those of *G. diazotrophicus* PAI 5, with the highest difference found for cobalt stress. Table 2 shows data from these bacteria relative to the values obtained in the present study for *G. diazotrophicus* PAI 5. However, these assays were performed in distinct culture media, and nutritional requirements differ among microorganisms. The bioavailability or toxicity of the metal ion may vary depending upon the chemical components of the culture medium [20].

After metal resistance was confirmed in *G. diazotrophicus* PAI 5, the molecular mechanism responsible for this property was studied. An insertion mutant (GDP30H3) highly susceptible to stress caused by soluble cadmium, cobalt and zinc was identified. Sequencing of the transposon insertion ends revealed that the *czcA* gene was altered in GDP30H3. This gene appears to be essential for resistance to all of the evaluated stress conditions because its disruption resulted in impaired bacterial growth even at the lowest metal concentrations. *CzcA* encodes a protein that belongs to the RND superfamily of transporters, which includes the heavy metal efflux family (HME-RND) belonging to the HME1 group [53]. The *CzcA* transporter is directly involved in the resistance to cobalt, zinc and cadmium, which explains why bacteria expressing the *czcA* gene are highly resistant to these metals [37].

CzcA is one of the proteins that belong to the *czc* determinant, which codes for CBA transporters, a group of trans-envelope pumps in gram-negative bacteria. These pumps are formed by three components that act as chemiosmotic antiporters [27]. The *CzcCBA* pump is composed of several proteins with defined functions. *CzcC*, an outer membrane factor (OMF), acts at the outer membrane and transports cations out of the cell [25]. *CzcB*, a membrane fusion protein, is distributed throughout the periplasmic space and is a metal transporter, preventing the release of free cations into the periplasm. *CzcA* binds to *CzcB*, which in turn is bound to *CzcC*, and removes these ions from the cytoplasm [8]. Thus, detoxification occurs through ion efflux driven by a proton motive force [15]. Two additional regulators of *CzcR* and *CzcS* gene expression form a two-component regulatory system made up of two proteins, the sensor (*CzcS*, a histidine

Table 2. MICs (mM) of metal ions for *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 and related bacterial species

Organism	Cadmium	MIC	Cobalt	MIC	Zinc	MIC	Reference
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5	CdCl ₂ ·H ₂ O	1.2	CoCl ₂ ·6 H ₂ O	20.0	ZnCl ₂	20.0	This study
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	CdCl ₂	0.2	Co(NO ₃) ₂	1.9	Zn(NO ₃) ₂	2.7	[55]
<i>Corynebacterium</i> sp. AB18 ^a	CdCl ₂	1.2	Co(NO ₃) ₂	2.7	Zn(NO ₃) ₂	2.5	[55]
<i>Arthrobacter</i> sp. E11 ^a	CdCl ₂	2.1	Co(NO ₃) ₂	2.5	Zn(NO ₃) ₂	3.1	[55]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CMG466	CdCl ₂	2.0	CoCl ₂	0.5	ZnCl ₂	1.5	[1]
<i>P. putida</i> 06909	CdCl ₂ ·2.5 H ₂ O	1.7	CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0.3	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	11.5	[51]

^aBacteria isolated from soil contaminated with metals.

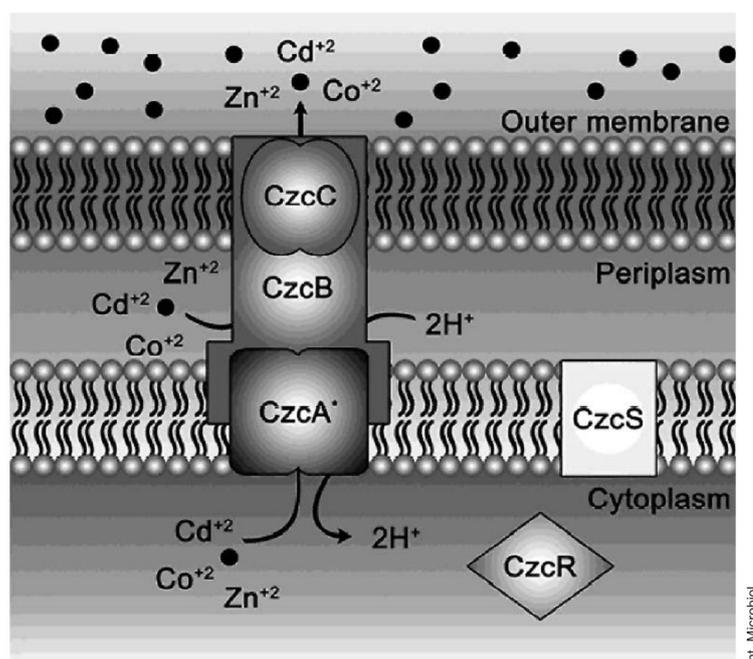


Fig. 3. Model for cadmium, cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 as mediated by the CBA transporters, which act in the detoxification of toxic molecules. Asterisk indicates the mutated protein in this study. The black circles represent metals. Adapted from [37].

kinase) and the response regulator (CzcR), which regulates the expression of *czcCBA* through a phosphorylation cascade [35].

CzcA has also been identified in other studies of metal resistance in various bacteria. In a screening of *P. putida* CD2 mutants susceptible to cadmium, five *czc* chemiosmotic antiporter operons were shown to be involved in the response to this divalent metal [19]. The expression of *czcA* has also been detected in other studies in which transcriptional whole-genome profiling in response to metals was carried out in *Sinorhizobium meliloti* 1021 and *Caulobacter crescentus* CB15N [18,45]. The induction of *czc* genes in the presence of copper has been demonstrated in *Myxococcus xanthus* [32]. The annotation of *copA* and *CopB* in the genome of *G. diazotrophicus* PAI 5, besides the *czc* determinant, therefore justifies further investigations regarding the copper resistance of this bacterium.

Five *czc* operons are present in *Comamonas testosteroni* S44. The expression of these genes in response to Zn^{2+} stress was analyzed, revealing that *czcA* genes are either Zn^{2+} -induced or downregulated by Zn^{2+} [58]. These results are consistent with those found for *C. metallidurans* CH34, in

which one *czc* operon is induced by Zn^{2+} , another is expressed constitutively, and the third is repressed [38,57]. The presence of two different copies of the *czcA* gene in the genome *G. diazotrophicus* PAI 5 suggests their different roles in the response to heavy metals.

Transporters belonging to the RND family are widespread especially among gram-negative bacteria. They form a tripartite structure, traversing both the outer and inner membrane to detoxify the cytoplasm [39,40]. They are also found in Archaea and Eukarya domains, indicating the protein's evolutionary importance [53] and suggesting that this metal resistance mechanism should have been present in the last universal common ancestor (LUCA). The widespread nature of this resistance mechanism indicates the biological relevance of maintaining this superfamily within the distinct evolutionary domains. In *G. diazotrophicus* PAI 5, CzcA function is essential for cell viability under high concentrations of cadmium, cobalt and zinc. However, few RND proteins have been characterized. Thus, additional information on members of this family is relevant and could be extended to homologues, considering the similarity of the remaining sequences [53].

Data obtained in the present study suggest that, in the presence of heavy metals (cobalt, cadmium and zinc), *G. diazotrophicus* PAI 5 reaches cellular homeostasis through the efflux of intracellular cation excess by means of transporters. If the detoxification system is damaged, cellular growth is impaired under these stressful conditions. The mechanism of metal efflux is mediated through CBA transporters, which act as antiporters formed by a protein complex. This complex bridges the cell membrane from the cytoplasm to the outside and acts in the efflux of toxic compounds [24,29]. Figure 3 illustrates the role of *czc* in the process of detoxification of cadmium, zinc and cobalt in *G. diazotrophicus* PAI 5. The layout of this model was based on the structure proposed for CBA complexes [35].

This study demonstrated that *G. diazotrophicus* PAI 5 is resistant to cadmium, cobalt and zinc cations and identified the CzcA protein as essential for metal resistance, which allowed for the *in silico* analysis of related proteins. When combined, these data reveal the crucial role of the *czc* operon in *G. diazotrophicus* PAI 5 and provide possibilities for further analyses on the importance of this mechanism in plant colonization by bacteria and in the tolerance of colonized plants to heavy metals present in soil.

Acknowledgments. The authors thank Valéria C. L. Marques for her collaboration in the sequencing analysis (NAG-UENF). This research was supported by the CNPq, FINEP, CAPES and FAPERJ. The first author received a FAPERJ fellowship.

Competing interests. None declared.

References

- Ahmed N, Nawaz A, Badar U (2005) Screening of copper tolerant bacterial strains and their potential to remove copper from environment. *Bull Environ Contam Toxicol* 74:219-226
- Baldani JI, Baldani VLD, Seldin L, Döbereiner J (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen fixing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 36:86-93
- Bertalan M, Albano R, Padua V, et al. (2010) Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5. *BMC Genomics* 10:450
- Bruins MR, Kapil S, Oehme FW (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* 45:198-207
- Cánovas D, Cases I, Lorenzo V (2003) Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. *Environ Microbiol* 5:1242-1256
- Cavalcante VA, Döbereiner J (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108:23-31
- Caspi R, Altman T, Dale JM, et al. (2010) The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res* 38:D473-D479
- Choudhury R, Srivastava S (2001) Zinc resistance mechanisms in bacteria. *Curr Sci* 81:768-775
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2011) ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27:1164-1165
- Dehal PS, Joachimiak MP, Price MN, Bates JT, Baumohl JK, Chivian D, Friedland GD, Huang KH, Keller K, Novichkov PS, Dubchak IL, Alm EJ, Arkin AP (2010) MicrobesOnline: an integrated portal for comparative and functional genomics. *Nucleic Acids Res* 2010 38:D396-D400
- Franke S, Grass G, Rensing C, Nies DH (2003) Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185:3804-3812
- Gadd GM (2004) Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122:109-119
- Giller KE, Witter E, Mcgrath SP (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biol Biochem* 30:1389-1414
- Giongo A, Tyler HL, Zipperer UN, Triplett EW (2010) Two genome sequences of the same bacterial strain, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5, suggest a new standard in genome sequence submission. *Stand Genomic Sci* 2:309-317
- Goldberg M, Pribyl T, Juhnke S, Nies DH (1999) Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the RND protein family. *J Biol Chem* 274:26065-26070
- Große C, Anton A, Hoffmann T, Franke S, Schleuder G, Nies DH (2004) Identification of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance system Czc via promoter *czcNp* in *Ralstonia metallidurans*. *Arch Microbiol* 182:109-118
- Hassan M, van der Lelie D, Springael D, Römling U, Ahmed N, Mergeay M (1999) Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 238:417-425
- Hu P, Brodie EL, Suzuki Y, McAdams HH, Andersen GL (2005) Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 187:8437-8449
- Hu N, Zhao B (2007) Key genes involved in heavy-metal resistance in *Pseudomonas putida* CD2. *FEMS Microbiol Lett* 267:17-22
- Hughes MN, Poole RK (1991) Metal speciation and microbial growth—the hard (and soft) facts. *J Gen Microbiol* 137:725-734
- Intorne AC, Oliveira MVV, Lima ML, Silva JF, Olivares FL, de Souza Filho GA (2009) Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Arch Microbiol* 191:477-483.
- Janssen PJ, Houdt RV, Moors H, et al. (2010) The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS ONE* 5:e10433
- Ji G, Silver S (1995) Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. *J Ind Microbiol* 14:61-75
- Kim E, Nies DH, McEvoy MM, Rensing C (2011) Switch or funnel: how RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis. *J Bacteriol* 193:2381-2387

Data obtained in the present study suggest that, in the presence of heavy metals (cobalt, cadmium and zinc), *G. diazotrophicus* PAI 5 reaches cellular homeostasis through the efflux of intracellular cation excess by means of transporters. If the detoxification system is damaged, cellular growth is impaired under these stressful conditions. The mechanism of metal efflux is mediated through CBA transporters, which act as antiporters formed by a protein complex. This complex bridges the cell membrane from the cytoplasm to the outside and acts in the efflux of toxic compounds [24,29]. Figure 3 illustrates the role of *czc* in the process of detoxification of cadmium, zinc and cobalt in *G. diazotrophicus* PAI 5. The layout of this model was based on the structure proposed for CBA complexes [35].

This study demonstrated that *G. diazotrophicus* PAI 5 is resistant to cadmium, cobalt and zinc cations and identified the CzcA protein as essential for metal resistance, which allowed for the *in silico* analysis of related proteins. When combined, these data reveal the crucial role of the *czc* operon in *G. diazotrophicus* PAI 5 and provide possibilities for further analyses on the importance of this mechanism in plant colonization by bacteria and in the tolerance of colonized plants to heavy metals present in soil.

Acknowledgments. The authors thank Valéria C. L. Marques for her collaboration in the sequencing analysis (NAG-UENF). This research was supported by the CNPq, FINEP, CAPES and FAPERJ. The first author received a FAPERJ fellowship.

Competing interests. None declared.

References

- Ahmed N, Nawaz A, Badar U (2005) Screening of copper tolerant bacterial strains and their potential to remove copper from environment. Bull Environ Contam Toxicol 74:219-226
- Baldani JI, Baldani VLD, Seldin L, Döbereiner J (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen fixing bacterium. Int J Syst Bacteriol 36:86-93
- Bertalan M, Albano R, Padua V, et al. (2010) Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5. BMC Genomics 10:450
- Bruins MR, Kapil S, Oehme FW (2000) Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicol Environ Saf 45:198-207
- Cánovas D, Cases I, Lorenzo V (2003) Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. Environ Microbiol 5:1242-1256
- Caspi R, Altman T, Dale JM, et al. (2010) The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. Nucleic Acids Res 38:D473-D479
- Choudhury R, Srivastava S (2001) Zinc resistance mechanisms in bacteria. Curr Sci 81:768-775
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2011) ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. Bioinformatics 27:1164-1165
- Dehal PS, Joachimiak MP, Price MN, Bates JT, Baumohl JK, Chivian D, Friedland GD, Huang KH, Keller K, Novichkov PS, Dubchak IL, Alm EJ, Arkin AP (2010) MicrobesOnline: an integrated portal for comparative and functional genomics. Nucleic Acids Res 2010 38:D396-D400
- Franke S, Grass G, Rensing C, Nies DH (2003) Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. J Bacteriol 185:3804-3812
- Gadd GM (2004) Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. Geoderma 122:109-119
- Giller KE, Witter E, Mcgrath SP (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. Soil Biol Biochem 30:1389-1414
- Giongo A, Tyler HL, Zipperer UN, Triplett EW (2010) Two genome sequences of the same bacterial strain, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5, suggest a new standard in genome sequence submission. Stand Genomic Sci 2:309-317
- Goldberg M, Pribyl T, Juhnke S, Nies DH (1999) Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the RND protein family. J Biol Chem 274:26065-26070
- Große C, Anton A, Hoffmann T, Franke S, Schleuder G, Nies DH (2004) Identification of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance system Czc via promoter *czcNp* in *Ralstonia metallidurans*. Arch Microbiol 182:109-118
- Hassan M, van der Lelie D, Springael D, Römling U, Ahmed N, Mergeay M (1999) Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Gene 238:417-425
- Hu P, Brodie EL, Suzuki Y, McAdams HH, Andersen GL (2005) Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. J Bacteriol 187:8437-8449
- Hu N, Zhao B (2007) Key genes involved in heavy-metal resistance in *Pseudomonas putida* CD2. FEMS Microbiol Lett 267:17-22
- Hughes MN, Poole RK (1991) Metal speciation and microbial growth—the hard (and soft) facts. J Gen Microbiol 137:725-734
- Intorne AC, Oliveira MVV, Lima ML, Silva JF, Olivares FL, de Souza Filho GA (2009) Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. Arch Microbiol 191:477-483.
- Janssen PJ, Houdt RV, Moors H, et al. (2010) The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. PLoS ONE 5:e10433
- Ji G, Silver S (1995) Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. J Ind Microbiol 14:61-75
- Kim E, Nies DH, McEvoy MM, Rensing C (2011) Switch or funnel: