

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Análise proteômica comparativa em *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL5 em resposta a presença de peróxido de hidrogênio e efeitos do estresse na colonização de plantas de arroz.**

**Jéssica de Paula Ferreira**

**2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA EM  
*Gluconacetobacter diazotrophicus* ESTIRPE PAL5 EM  
RESPOSTA A PRESENÇA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO  
E EFEITOS DO ESTRESSE NA COLONIZAÇÃO DE  
PLANTAS DE ARROZ.**

**Jéssica de Paula Ferreira**

*Sob a Orientação do pesquisador*  
**José Ivo Baldani**

*e Co-orientação da pesquisadora*  
**Marcia Soares Vidal**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

Seropédica, RJ  
Julho de 2016.

633.18

F383a

T

Ferreira, Jéssica de Paula, 1991-

Análise proteômica comparativa em *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL5 em resposta a presença de peróxido de hidrogênio e efeitos do estresse na colonização de plantas de arroz / Jéssica de Paula Ferreira - 2016.

94 f.: il.

Orientador: José Ivo Baldani.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

Bibliografia: f. 54-71.

1. Arroz - Cultivo - Teses. 2. Nitrogênio - Teses. 3. Nitrogênio - Fixação - Teses. 4. Fitotecnia - Teses. I. Baldani, José Ivo, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

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

**JÉSSICA DE PAULA FERREIRA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/07/2016

---

José Ivo Baldani - Ph. D. Embrapa Agrobiologia  
(Orientador)

---

Vanildo Silveira - Dr. UENF

---

Leonardo Médici - Dr. UFRRJ

## DEDICATÓRIA

*Às pessoas mais importantes da minha vida,  
meus amados e incomparáveis pais Benedito e Iraci,  
por toda ajuda, apoio, compreensão e amor sem medidas,  
**DEDICO***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar minha vida e por me sustentar em todos os momentos. Por me permitir senti-lo ao meu lado principalmente nos momentos mais difíceis, mostrando-me que nada acontece por acaso e que os trabalhos que não davam certo faziam parte de um propósito maior, que me levariam a obter novos conhecimentos e resultados.

Aos meus pais Benedito e Iraci, pelo amor infinito, pelo apoio incondicional nas situações de maior dificuldade, pelos conselhos e palavras encorajadoras nos momentos que me faltavam forças para prosseguir. Pai, Mãe, o senhor e a senhora são os motivos pelos quais eu nunca desisti, porque acima de tudo eu quero ser um orgulho para vocês. Eu os amo infinitamente e não existem palavras que possam exprimir minha gratidão, por tudo que fizeram e fazem por mim. Tudo que eu sou e tudo que conquistei foram graças a vocês e é pra vocês que dedico essa etapa alcançada.

Ao meu irmão Thiago, minha cunhada Miriam e ao meu sobrinho lindo, pelos momentos de alegria e descontração, pela torcida, apoio, carinho e amor.

Ao Dervan pela paciência, carinho, amor, compreensão e companheirismo especialmente nos momentos de desespero, pelas palavras de incentivo nas horas difíceis e por sua presença constante e diária mesmo que à distância.

Ao meu querido filho Betoven por sempre melhorar minha autoestima e por me proporcionar carinho e alegria nos momentos que as dificuldades pesavam sobre meus ombros.

Ao meu orientador Dr. José Ivo Baldani, agradeço por ter confiado em mim e por me dar segurança diante às dificuldades, mostrando-me que eu não estava sozinha, mas sim que teria seu apoio para resolver os problemas. Muito obrigada pela paciência e a maneira profissional com que lidou com minhas limitações e também por seu exemplo de total dedicação à vida científica e de superação de dificuldades, assim como por suas ideias e críticas.

À minha co-orientadora Marcia Soares Vidal, que foi a primeira a me dar um voto de confiança quando eu só era uma estudante de graduação, já se passaram alguns anos e desde então eu tenho muito a agradecer. Sou imensamente grata por todos os ensinamentos e por sua orientação impecável, pela disponibilidade em me escutar e resolver os problemas e por acreditar em mim.

Ao Dr. Vanildo Silveira, agradeço por ter me recebido no laboratório de Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense e por ter proporcionado que eu conhecesse o incrível mundo da Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas. Colaborando para obtenção dos dados aqui apresentados.

Agradeço aos estudantes do Laboratório de Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, em especial ao Ricardo, Ellen e Lucas por toda ajuda e por tudo que me ensinaram, além da troca de experiências. Sou muito grata a todos vocês, foi um prazer conhecê-los.

A todos da minha família, pelo apoio, incentivo e carinho sem medidas. Dentre todos, agradeço com muito carinho minha tia Nina (*in memoriam*), que foi uma das maiores incentivadoras na minha trajetória, aconselhando-me e apoiando em vários momentos.

Ao Cleiton que me apresentou o mundo da Biologia Molecular, protagonizando comigo resultados positivos e negativos, além de me ensinar, com muita didática, muito do que aprendi nessa caminhada.

À Patrícia Galvão por sua amizade, atenção e por compartilhar comigo seu conhecimento. Muito obrigada por todos os ensinamentos sobre Proteômica, assunto este que até então eu não conhecia, mas tudo se tornou mais fácil com seu apoio e experiência. E

também pela ajuda no experimento de arroz, desde a implementação até a coleta, sua colaboração foi fundamental.

A todos os amigos do Laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia que participaram e contribuíram para a conclusão desta etapa, além de tornar meus dias mais agradáveis: Elizabeth, Nathalia, Francine, Valeria, Paula, Bruna, Késia, Vanessa Santana, Carol Barra, Leonardo, Cleudison, Doreen, Andreas, Marcelo, Daniel, Amanda, Carol Nachi e Patrícia Gitahy.

A todos meus queridos amigos pessoais simplesmente por serem grandes amigos e por entenderem minha ausência inúmeras vezes, principalmente aqueles que compartilharam mais de perto de todas as situações vividas até o dia de hoje: Ivy, Camila, Micaela, Claudia e Guilherme.

À Khellrye Salermo e ao Bruno Tezolim, que me receberam e me hospedaram em sua casa, mesmo sem me conhecerem, proporcionando que eu pudesse realizar as atividades de pesquisa na Universidade Estadual do Norte Fluminense em Campos dos Goytacazes. O carinho e a hospitalidade com que me trataram me auxiliaram a chegar até aqui, vocês contribuíram para que este trabalho acontecesse e eu serei eternamente grata por isso. Muito obrigada, nunca me esquecerei do que fizeram por mim.

Aos membros da banca, tanto titulares quanto suplentes, professores Vanildo Silveira, Leonardo de Oliveira Médici, Leandro Azevedo Santos e Stefan Schwab pela participação e certamente pelas grandes contribuições para que este documento tenha sua qualidade aprimorada.

A Embrapa Agrobiologia, por toda a estrutura de trabalho e a todos os funcionários, Geraldo Baêta, Sr. Claudinho, Sr. Marildo, Wilson, Lucio, Mazinho, Carlinhos, Leandro, Tatiana Vidal.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela formação acadêmica.

Ao Curso de Pós-graduação em Agronomia - Fitotecnia, pela oportunidade e formação.

A CAPES, pela bolsa e auxílio financeiro.

A todos que, de alguma forma, colaboraram com este trabalho.

**Agradeço...**

**Agradeço!**

*“Combati o bom combate, terminei a minha carreira, guardei a fé.”  
2Timóteo 4, 7*

## **BIOGRAFIA**

Jéssica de Paula Ferreira nasceu aos 18 dias do mês de abril de 1991, no município de Barra Mansa, no estado do Rio de Janeiro. Filha de Benedito Ferreira e Iraci de Paula Ferreira, concluiu em 2009, o curso técnico em Agropecuária Orgânica no Colégio Técnico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CTUR). No mesmo ano, ingressou no curso de Engenharia Agrônoma da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde foi bolsista de iniciação científica do CNPq de abril de 2010 a junho de 2014, quando obteve a titulação de Engenheira Agrônoma. Em agosto de 2014, iniciou o curso de Mestrado na UFRRJ, junto ao Curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, desenvolvendo as análises experimentais na Embrapa Agrobiologia - CNPAB, sob orientação do Dr. José Ivo Baldani e da Dra. Marcia Soares Vidal.

## RESUMO

FERREIRA, Jéssica de Paula. **Análise proteômica comparativa em *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL5 em resposta a presença de peróxido de hidrogênio e efeitos do estresse na colonização de plantas de arroz.** 2016. 94p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

O nitrogênio é um nutriente absorvido em maiores quantidades pelas plantas e, apesar de ser abundante na atmosfera, encontra-se em uma forma não-assimilável. Entre as alternativas de entrada de N para os ecossistemas, fixação biológica de nitrogênio (FBN) é considerada como a mais viável, uma vez que reduz os custos e danos ao meio ambiente, diminui a dependência de fertilizantes nitrogenados e contribui para a fertilidade do solo. Este processo é realizado pela enzima nitrogenase e requer grandes quantidades de ATP fornecidos pela respiração aeróbica. Durante este processo, as espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser geradas, danificando as células, inibindo a atividade da nitrogenase e afetando os processos de fotossíntese e colonização. Para conseguir realizar a FBN e colonizar plantas, as bactérias endofíticas devem resistir de forma eficiente ou reparar os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio. *Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria diazotrófica endofítica que, quando submetida a estresse oxidativo, expressa proteínas que eliminam diretamente os oxidantes. Neste estudo, foi analisado o efeito do estresse oxidativo induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no perfil de expressão de proteínas e na colonização de *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 em plantas de arroz. Para tal, a estirpe selvagem de *G. diazotrophicus* foi cultivada em triplicata biológica em meio LGI-P modificado, seguido da exposição das células ao tratamento com a presença e a ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tratamento controle). As células foram coletadas em diferentes intervalos de tempo após a indução ou não com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foram realizadas coletas de 15, 30 e 60 minutos. A partir destes cultivos foram obtidas as proteínas totais de cada tratamento as quais foram analisadas por meio de proteômica quantitativa *label-free*. Na análise de espectrometria de massa foram identificadas proteínas em vários processos celulares como replicação, transcrição, divisão celular, proteólise, processos biossintéticos, transporte, entre outros. As proteínas envolvidas na defesa celular contra o estresse oxidativo foram identificadas após 30 minutos de exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com aumento da abundância de Peroxidase e Superóxido Dismutase. Além dessas proteínas, várias outras proteínas relacionadas aos processos de oxidação-redução também foram observadas com maior abundância diferencial. Em adição foi realizado um estudo visando verificar se o estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> afeta a colonização da estirpe PAL5 quando inoculada em plantas de arroz. Para tal, foi realizado o cultivo das plantas de arroz variedade IAC4440, inoculadas ou não com a estirpe PAL5 contendo o gene repórter *mcherry* inserido no plasmídeo pMP7604. As raízes foram coletadas e visualizadas em microscópio confocal, maceradas e plaqueadas em placas de meio LGI-P modificado para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Os resultados obtidos neste ensaio mostram que o estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não afetou a colonização desta bactéria nas plantas de arroz já que não houve diferença no número de UFC entre os diferentes tratamentos e a análise microscópica mostrou que a colonização endofítica das raízes pela estirpe PAL5 não foi alterada pelo estresse oxidativo. Os resultados da análise proteômica associada aos estudos de colonização sugerem que a bactéria PAL5 aciona mecanismos de proteção ao estresse oxidativo visando diminuir rapidamente os níveis de espécies reativas de oxigênio para que estes não afetem seu desenvolvimento e colonização endofítica.

**Palavras-chave:** Proteômica diferencial, Estresse oxidativo, Inoculação

## ABSTRACT

FERREIRA, Jéssica de Paula. **Comparative proteomic analysis in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strain PAL5 in response to the presence of hydrogen peroxide and the effects of stress on the colonization of rice plants.** 2016. 94p. Dissertation (Master in Fitotecnia). Institute of Agronomy, Department of Plant Science, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Nitrogen is the nutrient uptake in larger quantities by the plants and, despite being abundant in the atmosphere, it is found a non-assimilable form. Among the alternatives of input of N to ecosystems, nitrogen fixation (BNF) is considered as the most viable process, since it reduces the costs and damage to the environment, reduces the dependence of nitrogen fertilizers and contributes to soil fertility. This process is performed by nitrogenase, which requires large amounts of ATP provided by aerobic respiration. During this process, reactive oxygen species (ROS) may be generated, damaging the cells, inhibiting the activity of nitrogenase and affecting the processes of photosynthesis and colonization. To accomplish FBN and colonize plants, endophytic bacteria must resist efficiently or repair the damage caused by reactive oxygen species. *Gluconacetobacter diazotrophicus* is an endophytic nitrogen fixing bacteria which, when subjected to oxidative stress, express proteins that directly eliminate the oxidant. This study analyzed the effect of oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in protein expression profile and the colonization of *G. diazotrophicus* strain PAL5 in rice plants. To this end, the wild type *G. diazotrophicus* was grown in biological triplicate in modified LGI-P, followed by exposure of cells to treatment with the presence and the absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (control). Cells were collected at different time intervals after induction with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or not, sampling was performed 15, 30 and 60 minutes. From these cultures were obtained total protein from each treatment which were used in liquid chromatography analysis coupled to mass spectrometry (ESI-LC-MS/MS). Analysis of mass spectrometry for protein identifications in various cellular processes such as replication, transcription, cell division, proteolysis, biosynthetic processes, transport, among others. As proteins involved in cell and oxidative control were identified after 30 minutes of exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, with increased abundance of Peroxidase and Superoxide Dismutase. In addition proteins, several other proteins related to the oxidation-reduction processes were also observed with greater differential abundance. In addition, a study was conducted to verify whether the oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> affects the colonization of PAL5 strain when inoculated into rice plants. Rice plant variety IAC4440 was inoculated or not with *mcherry* PAL5 strain containing the reporter gene inserted in plasmid pMP7604. The roots were collected and examined in confocal microscope and the bacteria associated with roots were counted on plates medium modified LGI-P. The results showed that oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> did not affect the colonization of the bacteria in rice plants since there was no difference in the number of CFU among treatments and the microscopic analysis showed that endophytic colonization of the roots by the strain PAL5 it was not altered by oxidative stress. The results of proteomics associated with colonization studies suggest that PAL5 bacteria triggers protective mechanisms to oxidative stress to rapidly decrease the levels of reactive oxygen species so that they do not affect their development and endophytic colonization.

**Keywords:** Proteomics differential, Oxidative stress, Inoculation

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Quantificação de proteínas oriundas das coletas de 15, 30 e 60 minutos após a indução do estresse oxidativo ou não com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Leitura realizada no espectrofotômetro sob o comprimento de onda de 480 nm. Barras representam o desvio padrão e cada coluna expressa a média de três replicatas biológicas. .... 22
- Figura 2:** Diagrama de Venn esquematizando o perfil de abundância das proteínas identificadas para coleta de 60 minutos de exposição ou não ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ..... 23
- Figura 3:** Diagrama de Venn esquematizando o perfil de abundância das proteínas identificadas para coleta de 15 minutos de exposição ou não ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ..... 24
- Figura 4:** Diagrama de Venn esquematizando o perfil de abundância das proteínas identificadas para coleta de 30 minutos de exposição ou não ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ..... 24
- Figura 5:** Diagrama de Venn demonstrando as proteínas com abundância diferencial aumentada que foram comuns nos diferentes tempos de coleta ..... 25
- Figura 6:** Diagrama de Venn demonstrando as proteínas com abundância diferencial diminuída que foram comuns nos diferentes tempos de coleta ..... 25
- Figura 7:** Contagem de células de *G. diazotrophicus* PAL5 após maceração de raízes de arroz inoculadas ou não com células de PAL5 expostas ou não ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100µM). Após a maceração, o macerado foi plaqueado em meio LGI-P modificado Tc<sub>20</sub> sólido e UFC foi contada após 96 horas de incubação a 30°C. Sendo: T1= sem inoculação; T2= inoculado sem exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; T3= inoculado com exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 15 minutos; T4= inoculado com exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 minutos; T5= inoculado com exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 60 minutos. As letras representam médias que diferiram pelo teste de Scheffe's a 5% de probabilidade. ufc representa raízes lavadas e ufcfd representam raízes desinfestadas superficialmente. .... 45
- Figura 8:** Imagem de raízes de arroz não inoculadas com *G. diazotrophicus* PAL5 contendo plasmídeo pMP7604, sob ação de três filtros diferentes do microscópio confocal. Barra de escala representa 10 µm. .... 47
- Figura 9:** Imagem da raiz de arroz após 10 dias de inoculada com *G. diazotrophicus* PAL5 contendo plasmídeo pMP7604, sem a exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Barra de escala representa 10 µm. .... 48
- Figura 10:** Imagem da raiz de arroz após 10 dias de inoculada com *G. diazotrophicus* PAL5 contendo plasmídeo pMP7604, expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 15 minutos momentos antes à inoculação. Barra de escala representa 10 µm. . 49
- Figura 11:** Imagem da raiz de arroz após 10 dias de inoculada com *G. diazotrophicus* PAL5 contendo plasmídeo pMP7604, expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 minutos momentos antes à inoculação. Barra de escala representa 10 µm. . 50
- Figura 12:** Imagem da raiz de arroz após 10 dias de inoculada com *G. diazotrophicus* PAL5 contendo plasmídeo pMP7604, expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 60 minutos momentos antes à inoculação. Barra de escala representa 10 µm. . 51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Estirpe bacteriana e plasmídeo utilizado. ....	16
<b>Tabela 2:</b> Proteínas de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 identificadas com abundância aumentada após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 60 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio) (Continua). ....	26
<b>Tabela 3:</b> Continuação. ....	27
<b>Tabela 4:</b> Proteínas de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 identificadas com abundância diminuída após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 60 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio) (Continua). ....	28
<b>Tabela 5:</b> Continuação. ....	29
<b>Tabela 6:</b> Proteína de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 identificada apenas no tratamento sem Peróxido de Hidrogênio. ....	30
<b>Tabela 7:</b> Proteínas de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 identificadas com abundância aumentada após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 15 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio). ....	34
<b>Tabela 8:</b> Proteínas de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 identificadas com abundância diminuída após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 15 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio). ....	35
<b>Tabela 9:</b> Proteínas de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 identificadas com abundância aumentada após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 30 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio). ....	40
<b>Tabela 10:</b> Proteína de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 identificada apenas no tratamento com o Peróxido de Hidrogênio por 30 minutos. ....	41
<b>Tabela 11:</b> Proteínas de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 identificadas com abundância diminuída após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 30 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio). ....	42

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

- 2D-PAGE** - Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida  
**ADP** – Adenosina Difosfato  
**ATP** – Adenosina trifosfato  
**CHAPS** - 3-[(3-Colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato  
**DNA** – Ácido desoxirribonucleico, do inglês: *Deoxyribonucleic Acid*  
**D.O.** – Densidade Ótica  
**DYGS** - Meio de cultura rico para o isolamento de *Xanthomonas campestris*  
**DTT** – Ditioneitol  
**e<sup>-</sup>** – Elétron  
**ESI** - Ionização por spray de elétrons, do inglês: *Electrospray ionization*  
**kb** – Quilobase  
**LC** - Cromatografia líquida, do inglês: *Liquid Chromatography*  
**LGI-P** - Meio de cultura Lipman e Baldani – Pernambuco  
**MALDI** – Ionização por dessorção a laser assistida por uma matriz, do inglês: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*  
**MS** - Espectrometria de massas, do inglês: *Mass Spectrometry*  
**MS/MS** - Espectrometria de massas em sequencia, do inglês: *Tandem mass spectrometry*  
**ORF** – Fase aberta de leitura, do inglês: *Open Reading Frame*  
**PAL5** – Estirpe selvagem de *G. diazotrophicus*  
**pb** – Par de bases  
**pI** - Ponto Isoelétrico  
**rpm** – Rotações por minuto  
**TOF** - Tempo de voo, do inglês: *Time of flight*  
**Tris** – Tris (hidroximetil) aminometano, do inglês: *Tris (hydroxymethyl)-aminomethane*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> .....	3
2.2. O Processo de Fixação Biológica de Nitrogênio .....	5
2.3. Estresse Oxidativo .....	6
2.3.1. Espécies Reativas .....	6
2.3.2. Sistemas de defesa .....	8
2.3.2.1. Sistemas de defesa enzimáticos .....	8
2.3.2.2. Sistemas de defesa não enzimáticos .....	10
2.4. Estresse oxidativo na interação Planta-Bactéria .....	10
2.5. Proteômica .....	11
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	15
3.1. Objetivo Geral .....	15
3.2. Objetivos Específicos .....	15
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
4.1. Estirpes Bacterianas e Plasmídeos .....	16
4.2. Meio de cultivo .....	16
4.2.1. <i>G. diazotrophicus</i> .....	16
4.3. Condições de cultivo da estirpe PAL5 de <i>G. diazotrophicus</i> , indução de estresse oxidativo por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e lise celular .....	16
4.4. Análise Proteômica .....	17
4.4.1. Preparo e quantificação das amostras .....	17
4.4.2. Digestão de proteínas .....	18
4.4.3. Análise por espectrometria de massa .....	18
4.4.4. Identificação de proteínas e quantificação .....	19
4.5. Avaliação da colonização da estirpe em plantas de arroz .....	19
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
5.1. Cultivo, obtenção e quantificação do extrato proteico de células de <i>G. diazotrophicus</i> após indução com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	22
5.2. Análise de ESI-LC-MS/MS e identificação de proteínas .....	23
5.3. Avaliação em plantas de arroz .....	45
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	53
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54
<b>8. ANEXOS</b> .....	72

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria endofítica, aeróbica, Gram negativa, fixadora de nitrogênio, capaz de usar diversas fontes de carbono e crescer em pH 5,5. Foi originalmente obtida através de amostras de colmos e raízes de diferentes variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988; GILLIS et al., 1989), mas também já foi encontrada em arroz (*Oryza sativa*), batata-doce (*Ipomea batatas*), capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), café (*Coffea arabica*) e abacaxi (*Ananas comosus*) (DÖBEREINER et al., 1993; MUTHUKUMARASAMY et al., 2007).

A partir do sequenciamento do genoma de *G. diazotrophicus*, novas possibilidades foram abertas para a caracterização funcional de genes, sejam eles conhecidos ou desconhecidos, de promotores e seus reguladores (BERTALAN et al., 2009). A compreensão do papel da bactéria *G. diazotrophicus* e de sua associação com a cana-de-açúcar, pode servir como ferramenta para aperfeiçoar o seu potencial agrícola para a possível produção de inoculantes capazes de reduzir a aplicação de fertilizantes nitrogenados como também ser um agente de controle biológico dessa cultura.

A interação de *G. diazotrophicus* com plantas de cana-de-açúcar tem sido bastante estudada devido aos benefícios que esta interação pode trazer tanto para a planta quanto para a bactéria. Dessa forma já foi demonstrado que o habitat endofítico fornece vantagens a *G. diazotrophicus*, devido ao fato de que no interior da planta a disponibilidade de nutrientes é maior e a competição por nutrientes é reduzida. Do mesmo modo, para a planta hospedeira esta relação também é vantajosa, principalmente em condições de pouca disponibilidade de nitrogênio, já que a bactéria pode prover a planta com N fixado, bem como de outros compostos (DÖBEREINER, 1992).

A cana-de-açúcar é uma cultura de elevado valor econômico para o Brasil, de modo que, o aumento de sua produtividade é prioridade tanto para pesquisa agrícola como para as usinas. Aumentar a produtividade no campo envolve vários aspectos, como por exemplo, a geração de variedades mais produtivas, uso adequado de insumos e defensivos e controle de pragas e doenças. A utilização de microrganismos benéficos, que se associam com o vegetal, promove modificações fisiológicas que podem aumentar a eficiência do uso de insumos, da água e contribuir efetivamente na obtenção de nitrogênio do ar.

É uma das principais culturas para o agronegócio brasileiro, sendo a terceira em área cultivada, ficando atrás somente da soja e do milho (CONAB, 2013). De acordo com os dados da FAO a produção brasileira é três vezes maior que a produção indiana, o segundo maior produtor de cana-de-açúcar no mundo (FAO, 2011), sendo o Brasil o maior produtor de açúcar e etanol no mundo. Porém, a produção brasileira esta bem abaixo do potencial agrônomico da planta e entre os fatores que diminuem a produção, pode-se destacar o ataque de fitopatógenos e a deficiência nutricional de nitrogênio (SEGATO et al., 2006; DINARDO-MIRANDA et al., 2010; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Bactérias que crescem em ambientes oxigenados enfrentam um grande desafio que é resistir de forma eficiente ou reparar os danos causados por espécies reativas de oxigênio, também conhecidas como radicais livres. Os radicais livres formam-se em grandes quantidades como um inevitável subproduto de muitos processos bioquímicos, e é justamente em excesso que estes são prejudiciais às células. Eles podem ser definidos como quaisquer espécies químicas que contém elétrons desemparelhados. Elétrons desemparelhados aumentam reatividade química de um átomo ou molécula (BETTERIDGE, 2000).

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é o processo bioquímico pelo qual apenas algumas classes de microrganismos possuem a capacidade de converter N<sub>2</sub> atmosférico em

amônia (NH<sub>3</sub>), que pode ser incorporada pelas plantas em forma de componentes orgânicos. A FBN é realizada por diversas bactérias denominadas fixadoras de nitrogênio ou diazotróficas, que podem ser encontradas na rizosfera e no rizoplane de uma grande variedade de plantas não leguminosas, porém, evidências mostram que algumas bactérias mais evoluídas, que colonizam o interior da planta, são capazes de fixar nitrogênio e, por este fato são conhecidas como bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio ou bactérias endofíticas diazotróficas (DÖBEREINER, 1992), como por exemplo, a bactéria em estudo *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Em estudos realizados por Alquéres et al. (2010) verificou-se que as espécies reativas de oxigênio (ERO) podem diretamente inibir a atividade da nitrogenase e que diante disso *G. diazotrophicus* altera o seu metabolismo durante a FBN para driblar tal situação e conseguir realizar o processo de fixação de nitrogênio. Os autores observaram que durante a FBN, *G. diazotrophicus* ativa as vias antioxidantes que diminuem os níveis intracelulares de ERO protegendo a nitrogenase de toxicidade por tais elementos. Estes resultados complementam a hipótese de proteção respiratória a qual postula que o aumento no consumo de O<sub>2</sub> durante FBN permitiria produção de ATP suficiente e, ao mesmo tempo diminuiria os níveis de oxigênio intracelular, preservando a atividade da nitrogenase (DALTON e POSTGATE, 1968; FLORES-ENCARNACION et al., 1999; PAN e VESSEY, 2001; URETA e NORDLUND, 2002). Por isso, torna-se necessário entender as modificações e/ou respostas que ocorrem durante o estresse oxidativo na bactéria *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 de modo a contribuir para o uso eficiente da bactéria como biofertilizante.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Dentre as diversas bactérias diazotróficas isoladas da cana-de-açúcar destaca-se a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, que é considerada um dos principais organismos que podem contribuir para a elevada taxa de FBN na cultura (REIS et al., 1999). *G. diazotrophicus* é uma bactéria Gram-negativa, sendo agrupada na família *Acetobacteraceae* e pertencente ao grupo  $\alpha$  do filo das Proteobacteria (YAMADA et al., 1998). Inicialmente foi classificada como *Sacharobacter nitrocaptaans* e, posteriormente, como *Acetobacter diazotrophicus* (GILLIS et al., 1989). Em seguida, com base na sequência de 16S rRNA e tipo predominante de ubiquinona produzida, foi reclassificada como um membro do gênero *Gluconacetobacter* sendo, então, nomeada como *G. diazotrophicus* (YAMADA et al., 1997; YAMADA et al., 1998). Assim, após a reclassificação, o gênero *Gluconacetobacter* passou a contar com quatro espécies que apresentam a capacidade de fixar nitrogênio, sendo elas: *G. diazotrophicus*, *G. azotocaptans*, *G. johannae* (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988; FUENTES-RAMÍREZ et al., 2001; DUTTA e GACHHUI, 2007).

Originalmente foi isolada do interior de raízes e colmos de diferentes variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) cultivadas em diferentes partes do Brasil por Cavalcante e Döbereiner (1988). Entretanto, sua ocorrência tem sido relatada em outras espécies vegetais, como: batata-doce (*Ipomoea batatas*), capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), café (*Coffea arabica*) e abacaxi (*Ananas comosus*) (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997; TAPIA-HERNÁNDEZ et al., 2000), mostrando que a sua distribuição ecológica não se restringe apenas à cana-de-açúcar, podendo ser utilizada em outras espécies vegetais. A *G. diazotrophicus* tolera condições de estresse como pH menores que 3,0 e concentrações de sacarose de até 30% (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988).

Esta bactéria possui características fisiológicas bem peculiares, apresenta células com formato de bastonetes com extremidades arredondadas, tamanho variando entre 0,7 e 0,9  $\mu\text{m}$  x 2  $\mu\text{m}$  e mobilidade devida à presença de 1 a 3 flagelos laterais por célula (GILLIS et al., 1989; STEPHAN et al., 1991). São isoladas em meios semi-sólido LGI-P (REIS, 1994) e, após o período de sete a dez dias, apresentam uma película alaranjada, sendo que, abaixo da película, o meio fica incolor devido à assimilação do azul de bromotimol (DÖBEREINER et al., 1995). Quando cultivada em meio de cultura sólido, contendo caldo de batata, sacarose e ágar, apresentam colônias de cor marrom intenso, entretanto, em meio LGI-P sem fonte de nitrogênio, contendo sacarose, sais e azul de bromotimol, apresentam colônias laranja intenso (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988; DÖBEREINER et al., 1995).

Seu caráter endofítico foi sugerido quando foi isolada em grande número de plantas de cana-de-açúcar nos estados de Pernambuco, Alagoas, Minas Gerais e São Paulo e não foi encontrada no solo, mesmo no canavial, nem em doze espécies de ervas daninhas colhidas entre e dentro das fileiras de cana (REIS et al., 1988). Esse comportamento indica que não se trata de uma bactéria do solo, mas sim de uma bactéria cujo habitat é a planta e, que sua propagação se dá com o plantio dos toletes da cana (DÖBEREINER, 1990).

A localização de *G. diazotrophicus* na planta da cana-de-açúcar é ampla, onde pode ser encontrada em raízes, caules e partes aéreas de diversas variedades cultivadas no Brasil e na Austrália (LI e MACRAE, 1992; REIS et al., 1994). Além disso, seiva de xilema e espaços intercelulares do caule de cana tem sido sugeridos como prováveis sítios de localização da bactéria, sítios estes adequados à expressão da enzima nitrogenase, devido à baixa concentração de  $\text{O}_2$  existente nesses nichos (REIS et al., 1994; DONG et al., 1994).

Reis e Döbereiner (1998) relataram que a atividade máxima da nitrogenase em *G. diazotrophicus* pode ser observada a uma  $\text{pO}_2$  de 0,2 kPa e é independente da concentração

de sacarose. Essa pO<sub>2</sub> ótima também é observada em outras bactérias como *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum seropedicae* (HARTMANN e BURRIS, 1987; FU e BURRIS, 1989). Em uma pO<sub>2</sub> de 2 kPa, a atividade da nitrogenase é reduzida, sendo completamente inibida em 6 kPa de oxigênio. A atividade da nitrogenase não é inibida ou reprimida por altas concentrações de nitrato (25 mM), mas é parcialmente inibida por NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (TEIXEIRA et al., 1987).

Além da FBN, *G. diazotrophicus* também produz fitohormônios de crescimento, principalmente os fitohormônios auxina (ácido 3-indol acético, AIA) (FUENTES-RAMIREZ et al., 1993) e giberelina (BASTIÁN et al., 1998). *G. diazotrophicus* possibilita um aumento da disponibilidade de nutrientes através da solubilização de Fósforo e Zinco (SARAVANAN et al., 2007; LINU et al., 2009) e atua no processo de controle biológico, devido à atividade antagonista contra *Xanthomonas albilineans*, como resultado da produção de bacteriocina (PIÑÓN et al., 2002; BLANCO et al., 2005).

Além disso, *G. diazotrophicus* produz bacteriocinas, que são geralmente definidas como peptídeos produzidos por bactérias que inibem ou matam outros microorganismos relacionados ou não taxonomicamente (BALCIUNAS et al., 2013). Esse antimicrobiano é produzido em condições de estresse sendo capaz de inibir, quando em baixa concentração, isolados da mesma espécie e/ou taxonomicamente relacionados. Dessa forma, diferente de outros compostos antibacterianos, as bacteriocinas possuem ação letal primária e os organismos produtores são imunes a sua própria bacteriocina, uma propriedade que é mediada por proteínas de imunidade específica (COTTER et al., 2005; BALCIUNAS et al., 2013; MARTINEZ et al., 2013).

Considerando o grande potencial biotecnológico de *G. diazotrophicus* para uso na agroindústria, principalmente para a cultura da cana-de-açúcar, em 2002, foi iniciado o sequenciamento do genoma da estirpe PAL5 pelo projeto RIOGENE (FAPERJ/CNPq), que culminou, em 2009, com a publicação por Bertalan e colaboradores na revista BMC Genomics do artigo intitulado: “Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5”. Este genoma é constituído por dois plasmídeos e um cromossoma com 66,19% de conteúdo G+C. Os plasmídeos possuem um tamanho de 16,6 e 38,8 kb cada um e o cromossoma possui aproximadamente 3,9 Mb. Foram anotadas 3.938 ORFs, estando alguns de seus genes envolvidos com fixação biológica de nitrogênio, *quorum sensing*, defesa celular a estresses, metabolismo de açúcar, sistemas de transporte, biossíntese de polissacarídeos, entre outros. Com o sequenciamento, muita informação foi gerada, tornando-se necessário uma investigação profunda a fim de caracterizar e contextualizar as ORFs anotadas.

Pesquisas têm demonstrado que a inoculação com *G. diazotrophicus* em diferentes genótipos de cana-de-açúcar, principalmente nas cultivares RBs (RIDESA BRASIL), podem provocar uma série de mudanças anatômicas e fisiológicas na planta hospedeira. Dentre essas mudanças podem ser citadas as alterações na geometria da raiz, incremento da proporção relativa de raízes finas, área e comprimento radiculares, bem como incremento no teor de N, P e K em raízes e na parte aérea (OLIVARES et al., 2002; GALVÃO, 2012).

Em um trabalho realizado por Vargas et al. (2014) foi verificado que plantas de cana-de-açúcar cv. SP70-1143 inoculadas com *G. diazotrophicus* PAL5 sobreviveram a uma seca prolongada, enquanto plantas não inoculadas não sobreviveram. Os autores sugeriram que a inoculação com a bactéria endofítica conferiu tolerância à seca às plantas. Além de trabalhos sobre colonização em cana-de-açúcar, outras plantas hospedeiras têm sido exploradas na interação com *G. diazotrophicus* PAL5, como arroz e *Arabidopsis*. Em 2015, por exemplo, foi publicado um trabalho onde se estudou a colonização de *Arabidopsis thaliana* por *G. diazotrophicus* e os seus efeitos sobre a fisiologia, crescimento, e a ativação do sistema imunológico das plantas durante a associação. Neste trabalho, os autores concluíram que *G.*

*diazotrophicus* coloniza endofiticamente raízes de *A. thaliana*, promove o crescimento vegetal e aumenta a fotossíntese (DE SOUZA et al., 2015).

Os estudos têm avançado, buscando novos focos, como a caracterização dos sinais pelos quais as plantas de cana-de-açúcar podem decifrar os sinais das bactérias e responder com uma associação eficiente (VARGAS et al., 2003); e também os mecanismos moleculares envolvidos que promovem um crescimento da planta quando esta se associa com as bactérias endofíticas (XAVIER, 2007).

## 2.2. O Processo de Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio corresponde a aproximadamente 79% da composição da atmosfera terrestre, porém é um dos nutrientes que mais limita o crescimento vegetal, pois apesar de ser encontrado em grande concentração na atmosfera as plantas são incapazes de absorvê-lo em sua forma molecular gasosa ( $N_2$ ) ou convertê-lo a uma forma assimilável. A maioria das plantas obtém o nitrogênio do solo sob a forma de íon nitrato ( $NO_3^-$ ) ou íon amônio ( $NH_4^+$ ), fornecido por meio de adubação nitrogenada, mineralização da matéria orgânica ou através da fixação biológica de nitrogênio.

O processo de fixação de nitrogênio corresponde à conversão de nitrogênio molecular, atmosférico a uma forma assimilável pela planta. Este processo pode ser realizado por uma série de bactérias, denominadas fixadoras de nitrogênio ou diazotróficas. Estes microrganismos são divididos em três grupos: a) os de vida livre, que obtêm energia de compostos orgânicos do solo e fixam  $N_2$  independente de outros organismos (BALDANI et al., 1997); b) os que vivem em simbiose com outros organismos, como por exemplo, bactérias do gênero *Rhizobium* que utilizam fotossintetizados fornecidos por determinadas plantas no estabelecimento de relações simbióticas específicas (BALDANI et al., 1997); c) os de associação endofítica, representados por bactérias diazotróficas que colonizam diversos tecidos vegetais de plantas sem causar qualquer sintoma de doença. A interação entre bactérias diazotróficas endofíticas e gramíneas é um tipo particular de associação entre planta/diazotróficos. (DÖBEREINER, 1992).

A estequiometria da reação proposta para redução de  $N_2$  a duas moléculas  $NH_3$  é:  $N_2 + 16 ATP + 8 e^- + 8H^+ \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 Pi$ , onde  $e^-$  simboliza elétron e Pi simboliza o fosfato inorgânico. Este processo é considerado um processo exigente em energia, pois necessita de 16 moles de ATP (KIM e REES, 1994). Tal energia pode ser fornecida por respiração aeróbica (FLORES-ENCARNACION et al., 1999), onde substratos ricos em energia são oxidados doando elétrons para proteínas de membrana. Essas proteínas conservarão a energia do fluxo de elétrons sob a forma de potencial de membrana que será a força motriz para a síntese de ATP.

Durante a respiração, o oxigênio é o receptor final de elétrons, recebendo quatro elétrons e sendo reduzido à água. Entretanto, nesse processo alguns elétrons podem escapar da cadeia de transporte de elétrons e gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) (KOWALTOWSKI et al., 2009). Apesar da necessidade de fontes de alta energia para suportar a FBN, o que só é conseguido pela respiração, a nitrogenase é sensível ao oxigênio e ERO (ROBSON e POSTGATE, 1980).

Desse modo, além da bactéria sofrer danos oriundos do estresse oxidativo causado pelas espécies reativas de oxigênio, a Fixação Biológica de Nitrogênio também é afetada. Com isso, torna-se primordial o desenvolvimento de pesquisas que possam ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos desenvolvidos pela *G. diazotrophicus* para driblar e superar tais danos.

### 2.3. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo pode ser definido como um distúrbio no equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) e as defesas antioxidantes, ou seja, a concentração de oxigênio ativo aumenta para um nível que excede a capacidade de defesa da célula (HALLIWELL, 1994).

Os organismos aeróbios usam o oxigênio molecular ( $O_2$ ) para a respiração ou oxidação de nutrientes para a obtenção de energia. Nesse processo alguns elétrons podem escapar da cadeia de transporte de elétrons e gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) (KOWALTOWSKI et al., 2009).

Além da redução incompleta de oxigênio à água durante a respiração, as espécies reativas de oxigênio podem ser geradas por exposição à radiação, luz, metais ou oxidação-redução (redox), drogas ativas como o Paraquat (STORZ et al., 1990), em reações catalisadas pelas enzimas de defesa celular ao estresse oxidativo, reação de Fenton.

Todos os organismos aeróbios produzem espécies reativas de oxigênio, que podem atuar benéficamente no organismo, quando usadas pelo sistema de defesa da célula contra agentes patogênicos ou quando agem como moléculas mensageiras em vias de sinalização celular (ALQUÉRES et al., 2010). Os alvos biológicos para as espécies reativas de oxigênio são DNA, RNA, proteínas e lipídeos. Além destes, as EROs podem inibir a nitrogenase assim como o oxigênio, diminuindo assim a eficiência da FBN (ROBSON e POSTGATE, 1980).

#### 2.3.1. Espécies Reativas

As espécies reativas são compostos que em sua grande maioria são altamente reativos, são constituídas por três classes: espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de enxofre (EREs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). As espécies reativas também podem ser classificadas como radicais livres e compostos não radicalares (MAGDER, 2006; CAROCHO e FERREIRA, 2013). As EROs normalmente possuem duração de vida curta e sua recombinação química é quase imediata devido a forte tendência para estabilizar sua órbita externa, captando um elétron de outro átomo ou molécula (RICE-EVANS e BURDON, 1993).

Os radicais livres (RL) formam-se em grandes quantidades como um inevitável subproduto de muitos processos bioquímicos, e é justamente em excesso que estes são prejudiciais às células. Eles podem ser definidos como um átomo, molécula ou grupo de átomos capaz de existir sob forma independente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados, se comportando como moléculas altamente reativas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; HICKS, 2001). Portanto, os RLs podem ser formados pela adição ou perda de um elétron de uma substância não-radical (DRÖGE, 2002) e, conseqüentemente, podem gerar danos por reagir com diversas biomoléculas tais como a remoção de elétrons para manter sua estabilidade.

Nos organismos vivos encontram-se diversos radicais livres, entre eles estão radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) e ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ). O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), ozônio ( $O_3$ ) e oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ )<sup>2</sup> não são radicais livres mas estão envolvidos em reações químicas que geram radicais livres em organismos vivos e, são portanto, denominados, de espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; HENRIQUES et al., 2001; PICADA et al., 2003),

O ânion Superóxido é formado após a primeira redução do  $O_2$ , ocorrendo em quase todas as células aeróbicas; embora não ataque o DNA diretamente (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; FERREIRA e MATSUBARA, 1997), participa da reação de Haber Weiss gerando  $O_2$  e  $Fe^{+2}$ , o qual catalisa a reação de Fenton, formando o radical  $OH\cdot$

(BABIOR, 1997). Esse radical não tem alto poder oxidante, atuando na maioria das reações como um agente redutor (OGA, 2003).

O radical Hidroxila é extremamente reativo em sistemas biológicos, ou seja, uma vez formado, tem uma meia vida extremamente curta, reagindo rápido e inespecificamente no próprio sítio onde foi produzido. Assim, se este for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, pode inativar várias proteínas, ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Muitos dos danos são causados por radicais hidroxilas gerados a partir de  $H_2O_2$  através da reação de Fenton. O dano oxidativo está fortemente ligado ao ferro, devido à capacidade de  $Fe^{+2}$  reduzir  $H_2O_2$  (TOUATI, 2000). Ferro, um componente da reação de Fenton, potencializa a toxicidade do oxigênio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984). Desse modo, uma estratégia para minimizar o dano oxidativo seria limitar o conteúdo intracelular de ferro. Acredita-se que a regulação rigorosa do metabolismo do ferro, e seu acoplamento com regulação de defesas contra estresse oxidativo, é um fator essencial para a vida na presença de oxigênio (TOUATI, 2000).

O Peróxido de Hidrogênio é formado a partir de dois radicais superóxido, por conversão espontânea e enzimática. Em condições onde a concentração de prótons é baixa, a conversão espontânea é reduzida e o  $H_2O_2$  formado, é o produto da reação enzimática para eliminação do radical superóxido pela ação da enzima superóxido dismutase (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990). Apesar de não ser um radical livre, o  $H_2O_2$  é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical hidroxila. Tem vida longa, sendo capaz de atravessar camadas lipídicas e reagir com a membrana e com proteínas ligadas ao Fe. É formado principalmente na matriz mitocondrial, durante o processo de redução do oxigênio, ou pela dismutação do radical superóxido pela enzima superóxido dismutase (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Oxigênio *singlet* é a forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. Esta espécie reativa de oxigênio tem a capacidade de modificar o DNA diretamente, sendo considerado como a forma mais deletéria do oxigênio aos organismos. O seu tempo de meia-vida depende muito do meio onde se encontra. Em meio aquoso, sua meia-vida é muito pequena, pois ele se choca com as moléculas de  $H_2O$  transferindo sua energia, desativando-se e retornando à forma de oxigênio tripleto. Em meio orgânico é mais comum a ocorrência de choque com transferência de energia, sem reação química, seguida da dissipação dessa energia na forma de calor (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Os radicais livres podem atacar diretamente ácidos graxos poli-insaturados em membranas e iniciar a peroxidação lipídica. Um efeito inicial de peroxidação lipídica é uma diminuição na fluidez da membrana, o que altera as propriedades da membrana e pode perturbar as proteínas ligadas à ela de forma significativa. Este efeito funciona como um amplificador, mais radicais são formados, e ácidos poli-insaturados são degradados para uma variedade de produtos. Alguns deles, como aldeídos, são muito reativos e pode danificar moléculas tais como as proteínas (HUMPRIES et al., 1998).

Por estas razões, a maioria dos organismos aeróbicos possui mecanismos múltiplos e frequentemente sobrepostos para remover as espécies reativas de oxigênio. Para tanto, as células contam com uma quantidade considerável de enzimas com atividade antioxidante e de reparo que podem diferir no tempo de expressão, na localização celular ou na regulação. Muitas destas proteínas com propriedades antioxidantes são expressas em níveis baixos durante o crescimento normal, e tem a expressão aumentada em resposta a concentrações elevadas de  $H_2O_2$  e de  $O_2^{\bullet -}$  (STORZ e IMLAY, 1999).

### 2.3.2. Sistemas de defesa

Para remover as espécies reativas de oxigênio em excesso, geradas pela respiração e manter o equilíbrio redox, as células possuem um grupo de moléculas chamadas de antioxidantes, que inibem ou minimizam um processo de oxidação. Biologicamente, os antioxidantes protegem biomoléculas ou estruturas celulares contra os efeitos deletérios de substâncias que promovem a oxidação (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Os antioxidantes podem ser do tipo *scavenger*, que transformam um ERO em outra menos reativa, ou *quencher*, que consegue neutralizar completamente por meio da absorção de toda energia de excitação. Os sistemas de defesa também podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos.

#### 2.3.2.1. Sistemas de defesa enzimáticos

O sistema enzimático é constituído por pequenas moléculas solúveis em meio aquoso ou como em alguns exemplos, em meios lipídicos, que agem geralmente como varredores de radicais, removendo cataliticamente os oxidantes da solução (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Tal sistema age evitando o acúmulo de ânion radical superóxido ( $O_2^-$ ) e do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Ele é formado por diversas enzimas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a peroxidase (POX).

#### Superóxido Dismutase (SOD)

Essa enzima foi descrita, pela primeira vez, por Mc Cord e Fridovich, em 1969. É responsável por catalisar a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, conforme a reação abaixo (FRIDOVICH, 1998). Em condições fisiológicas essa reação pode acontecer espontaneamente, porém quando catalisada pela SOD a velocidade de dismutação é maior (SOUTHORN e POVIS, 1988).



As SODs são um grupo de metaloproteínas multiméricas encontradas em todos os organismos aeróbicos. Elas têm sido classificadas em quatro grupos de acordo com o componente metálico presente em seu sítio ativo: cobre/zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD), ferro (Fe-SOD) ou níquel (NiSOD), sendo que as Cu/Zn-SOD são consideradas as mais abundantes em vegetais (SCANDALIOS, 1993; MALLICK e MOHN, 2000; BAFANA et al., 2011).

A CuZnSOD ocorre em eucariotos, bactérias e cloroplastos. Em bactérias, tal enzima é codificada pelo gene *sodC* e encontra-se localizada no periplasma. A MnSOD é encontrada em procariotos e na mitocôndria, sendo codificada pelo gene *sodA* em procariotos. Enquanto que a FeSOD pode ser encontrada em procariotos e cloroplastos, sendo codificada pelo gene *sodB* em procariotos (IMLAY e IMLAY, 1996; BAFANA et al., 2011; CHIANG e SCHELLHORN, 2012). A enzima dependente de níquel, SodN, foi descrita apenas em *Streptomyces* e cianobactérias (BAFANA et al., 2011).

Em *E. coli* podem ser encontradas três tipos de superóxido dismutase: MnSOD, FeSOD e CuZnSOD. A produção de cada uma destas depende de reguladores transcricionais globais. Desse modo, a expressão dessas enzimas é modulada de acordo com condições ambientais específicas (COMPAN e TOUATI, 1993; BAFANA et al., 2011).

O gene *sodA* nessa bactéria é regulado por várias proteínas, como por exemplo, em resposta a geração de superóxido ocorre uma ativação desencadeada por SoxRS e essa regulação não compete com outros reguladores aeróbicos. O regulador do metabolismo de ferro, Fur, também regula *sodA* reprimindo-o em aerobiose. Em anaerobiose, Fur ou ArcA

(controle de regulação aeróbico) juntamente com Fnr (fumarato nitrato redutase) e IHF (fator de interação com o hospedeiro) reprimem *sodA* (COMPAN e TOUATI, 1993; BAFANA et al., 2011).

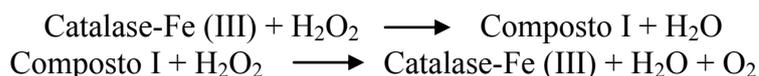
Além disso, MarA, ativador transcricional do operon de resistência múltipla a antibióticos marARB, também ativa *sodA* (JAIR et al., 1995). O gene *sodB* em *E. coli*, é regulado positivamente por Fur por meio do RyhB, um pequeno RNA (MASSÉ e GOTTESMAN, 2002; MASSÉ et al., 2005). Ademais, Fur é auxiliado por uma proteína ligadora de RNA chamada Hfq, na regulação de *sodB*, possivelmente auxiliando RyhB no pareamento RNA-RNA, pois Hfq demonstrou-se necessária para a atividade de RyhB (MASSÉ e GOTTESMAN, 2002).

As proteínas IHF e H-NS, também afetam a expressão de *sodB* (BAFANA et al., 2011). IHF possui a capacidade de reprimir a expressão de *sodB* independentemente de Fur. Enquanto H-NS, uma proteína responsável pela condensação do DNA no nucleóide bacteriano em enterobactérias, regula-o negativamente apenas na ausência de Fur (DUBRAC e TOUATI, 2000). O gene *sodC* em *E. coli* é induzido pelo fator sigma RpoS em fase estacionária e reprimido por Fnr em condição anaeróbica (GORT et al., 1999).

### **Catalase (CAT)**

A enzima catalase (CAT) é responsável por catalisar a redução do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água (H<sub>2</sub>O) e oxigênio (O<sub>2</sub>). É uma enzima tetraédrica que contém um grupo heme em cada subunidade, sendo encontrada em todos os organismos vivos. A inibição da CAT leva a um aumento das espécies reativas de oxigênio, proporcionando ao organismo um estresse oxidativo (SILVA et al., 2008). Em plantas existem pelo menos três tipos de catalases distintas, que diferem em termos de localização e regulação biossintética (SCANDALIOS et al., 1997).

O mecanismo catalítico dessa enzima é bastante similar ao da SOD, ou seja, a espécie é oxidada e em seguida reduzida (dismutação). Estudos sugerem que a CAT utiliza um mecanismo de dois estágios tanto nas reações peroxidativas como nas catalíticas.



No primeiro estágio o ferro do grupo heme da catalase interage com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formando um peróxido de ferro rico em oxigênio, denominado componente I. Em baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (< 10<sup>-6</sup>M), o componente I pode ser reduzido por uma variedade de doadores de hidrogênio. Em elevadas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o componente I reage com uma segunda molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzindo água e uma molécula de oxigênio (SCANDALIOS, 1994).

Em relação ao pH, a enzima pode ter sua atividade diminuída caso o pH seja menor que 4,0. Na faixa de 4,0 a 8,5, a atividade da catalase permanece constante, sendo que acima de 8,5 sua atividade volta a decair (CHANCE, 1952). Segundo alguns autores, a catalase é a enzima responsável pela conversão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigênio quando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> encontra-se em altas concentrações. Enquanto que a glutatona peroxidase transforma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água quando este se encontra presente, porém em baixas concentrações (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985).

### **Peroxidase (POX)**

Defesas bacterianas contra danos oxidativos mediados por peróxido incluem uma família de proteínas não-heme, proteínas não-selênio, distintas da catalase e glutatona peroxidase (CHRISTMAN et al., 1985; POOLE et al., 2003). As peroxidases são enzimas pertencentes à classe das oxidoredutases, as quais possuem a função de catalisar a oxidação

de componentes celulares, tais como peróxidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio (KVARATSKHELIA et al., 1997). Elas estão presentes em todos os compartimentos celulares e, são amplamente distribuídas nos reinos animal e vegetal, assim como, em microrganismos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985; BILES e MARTYN, 1993). O aumento de peroxidases tem sido correlacionado com mecanismos de resistência em um grande número de interações plantas-microrganismos (MOHAMMADI e KAZEMI, 2002).

As peroxidases podem diferir nos seus doadores de elétrons fisiológicos, que podem ser glutatona, tioredoxinas, NAD(P)H, ou citocromo c. Algumas proteínas com atividade de peroxidase também podem oxidar uma variedade de doadores de elétrons não-fisiológicos, incluindo corantes (MISHRA e IMLAY, 2012).

Peroxidases se dividem em duas categorias: peroxidases à base de tiol e peroxidases não-tiol. As peroxidases não-tiol também são conhecidas como peroxirredoxinas. Todas peroxirredoxinas contêm uma cisteína peroxidática conservada que reage com o  $H_2O_2$  ou hidroperóxidos orgânicos e forma um ácido sulfênico de cisteína. O resíduo de ácido sulfênico posteriormente reage com outro tiol (intra ou intermolecularmente) e forma um dissulfeto antes de ser reduzido de volta para tiol livre.

As variações no mecanismo pelo qual tióis são regenerados e na arquitetura da proteína permitem peroxirredoxinas serem ainda classificadas em quatro grupos: alquil hidroperóxido redutase (AhpCF), peroxidases tiol (TPX), proteína bacterioferritina comigratória (BCP), e glutatona peroxidase (GPx) (MISHRA e IMLAY, 2012).

### **2.3.2.2. Sistemas de defesa não enzimáticos**

O sistema de defesa não enzimático é realizado por moléculas que protegem alvos biológicos da oxidação, por apresentarem uma das três propriedades: supressão da formação de radical livre (quelação de metais ou inibição de enzimas geradoras de radicais livres), eliminação de radicais livres ou desativação, formando um produto estável e participação em processos de reparo (BOURNE e RICE-EVANS, 1999). Há uma variedade de moléculas com potencial para apresentar uma destas características, incluindo algumas do próprio organismo e outras exógenas, sintéticas ou naturais (SIES, 1993). Tal sistema é constituído pela glutatona, a vitamina C, a vitamina E, ubiquinol, os carotenóides e os flavonóides (MACHLIN e BENDICH, 1987). A vitamina C elimina os radicais livres do citoplasma, e outros compartimentos aquosos. A vitamina E e outros antioxidantes hidrofóbicos atuam fundamentalmente nas membranas e nas bicamadas lipídicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Os flavonóides são potentes antioxidantes capazes de atuar como aceptores de radicais livres (HUSAIN et al., 1987; YUTING et al., 1990) ou de íons metálicos (AFANAS'AV et al., 1989).

### **2.4. Estresse oxidativo na interação Planta-Bactéria**

Plantas hospedeiras podem se proteger da invasão de microorganismos utilizando vários mecanismos de defesa (SOTO et al., 2006). O maior mecanismo de defesa é produzir uma explosão oxidativa, que representa uma quantidade excessiva de espécies reativas de oxigênio (IANNELLI et al., 1999). A explosão oxidativa é uma resposta inicial nas reações de defesa da planta contra patógenos. Nessa explosão oxidativa ocorre o acúmulo principalmente de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  nos estágios iniciais da interação simbiótica, especialmente nos processos de infecção (SANTOS et al., 2001).

Dentre as espécies reativas de oxigênio liberadas pelas plantas, o  $H_2O_2$  é o mais estudado, este era visto antes como um composto tóxico para a célula. Hoje em dia, sabe-se que ele é mais do que isso. O  $H_2O_2$  atua como uma molécula sinalizadora que controla

diferentes respostas e estímulos, tanto em células animais como vegetais (FINKEL, 2000). Diante de diferentes condições de estresse a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é aumentada, indicando que este composto possui um papel importante na aclimação e tolerância cruzada, onde uma prévia exposição a um determinado estresse pode induzir uma tolerância a subseqüentes exposições ao mesmo estresse ou a outro tipo de estresse (NEILL et al., 2002a).

Para que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atue como sinalizador, sua produção e degradação devem ser reguladas (NEILL et al., 2002b). Ele é constantemente gerado por várias vias durante o metabolismo normal da planta, com isso é necessário um controle rigoroso de seus níveis para evitar que ocorra toxidez à própria célula produtora. Este controle é feito, principalmente, pela enzima catalase, que o degrada a água e oxigênio molecular (YANG e POOVAIAH, 2002).

O estresse oxidativo gerado devido ao ataque de fitopatógenos promove uma síntese rápida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com consecutiva liberação no apoplasto (BOLWELL, 1999; OROZCO-CARDENAS et al., 2001; RAO e DAVIS, 2001). Sua participação na defesa vegetal contra patógenos biotróficos é realizada através da indução da morte celular no local de infecção. Isso impede o crescimento e desenvolvimento do microrganismo invasor nos tecidos do hospedeiro (PELLINEN et al., 2002).

A capacidade de bactérias de se desenvolverem nos tecidos vegetais pode ser em parte, devido à capacidade que elas possuem de detoxificar o meio ao redor do sítio de infecção na presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o qual possui habilidade de penetrar mais facilmente através da membrana, afetando uma série de processos celulares.

A resposta de bactérias de vida livre e bacteróides às formas tóxicas de oxigênio é um importante fator para a nodulação e fixação de nitrogênio (JAMET et al., 2003). Na simbiose entre *Bradyrhizobium* e soja, por exemplo, *Bradyrhizobium japonicum* deve superar as EROs envolvidas no mecanismo de defesa da planta hospedeira, e se adaptar aos diferentes níveis de estresse oxidativo. A bactéria utiliza várias estratégias para lidar com EROs como produção de moléculas antioxidantes e enzimas detoxificadoras de EROs (SANTOS et al., 2001; BARLOY-HUBLER et al., 2004). Além disso, tem sido demonstrado que exopolissacarídeos (EPS) se constituem em uma camada mucosa protetora em condições ambientais adversas (D'HAENZE e HOLSTERS, 2004). Em mutantes de *Pseudomonas syringae*, deficientes na produção de EPS, a sensibilidade às ERO foi maior quando comparado a estirpe selvagem (KIRALY et al., 1997), evidenciando que EPS possui a capacidade de proteger a bactéria das EROs. Em 2010, Meneses sugeriu um papel do EPS de *G. diazotrophicus* PAL5 na motilidade, formação de biofilme e na tolerância a estresses ambientais como radiação UV-C e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. E em 2011, este mesmo autor avaliou o papel dos EPS de *G. diazotrophicus* PAL5 em relação à adesão e colonização na superfície de raízes de arroz, empregando um mutante deficiente na biossíntese do mesmo. Neste trabalho foi demonstrado que o mutante deficiente na biossíntese de EPS foi incapaz de aderir a superfície radicular e colonizar endofiticamente as raízes de arroz. Em contrapartida, quando as raízes de arroz foram co-inoculadas com EPS purificado e com a estirpe mutante, verificou-se que a adsorção e o ancoramento foram parcialmente restaurados (MENESES et al., 2011).

## 2.5. Proteômica

As proteínas são partes vitais dos organismos vivos, pois são os principais componentes para a construção da estrutura celular, além de atuarem como enzimas catalíticas em vias metabólicas, e como proteínas transdutoras de sinais em vias regulatórias celulares (GRAHAM et al., 2007). A capacidade de identificar e avaliar moléculas de proteína em larga escala depende de avanços em metodologias proteômicas de alto rendimento (ZHANG et al., 2010).

Proteoma é definido como o conjunto total de proteínas expressas por um organismo, células ou tecidos em um determinado momento, sob uma determinada condição e, portanto, é o complemento dinâmico das proteínas expressas por um genoma (WASINGER et al., 1995; WILKINS et al., 1996a; WILKINS et al., 1996b). Segundo Chen e Harmon (2006), a proteômica é uma ciência que permite avaliar quantitativa e qualitativamente um grande número de proteínas que atuam na bioquímica celular. Possibilitando dessa maneira, analisar precisamente, as alterações no estado ou no sistema celular durante o desenvolvimento e a resposta a fatores ambientais. Portanto, proteômica é uma tecnologia importantíssima para o estudo dos sistemas biológicos altamente complexos e dinâmicos.

Para sobreviver uma célula precisa ajustar sua composição proteica constantemente, de modo que consiga enfrentar as mudanças no ambiente (PARK, 2004). Devido a este fato, o proteoma está frequentemente sofrendo alterações em resposta aos estímulos externos, sendo mais complexo e mais dinâmico do que o genoma (SPEICHER, 2004). Assim, o mesmo organismo pode apresentar diferentes proteomas, os quais são resultado da expressão de um conjunto de genes e das modificações pós-traducionais das proteínas sintetizadas, em resposta às condições ambientais definidas (CELIS et al., 2000).

O estudo do proteoma evoca não apenas as proteínas em qualquer dada célula, mas também o conjunto de isoformas da proteína e modificações, as interações entre elas, a descrição estrutural da proteína e os seus complexos de ordem mais elevada (GROMOV e CELIS, 2000). A análise proteômica é realizada por meio da combinação de diversas tecnologias, incluindo a eletroforese de gel de poliacrilamida uni e bidimensional, espectrometria de massa, cromatografia líquida multidimensional e técnicas de bioinformática (PARDANANI et al., 2002).

Proteômica tem contado principalmente com duas principais estratégias para a separação e visualização de proteínas: (i) eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), seguido de identificação por espectrometria de massa, e (ii) procedimentos livres de géis, tais como separações multidimensionais acopladas a separações em microescala com espectrometria de massa em tandem automatizado (LC-MS/MS) (BAGGERMAN et al, 2005;. NIE et al., 2008).

2D-PAGE foi introduzido pela primeira vez em 1975 (O'FARRELL, 1975) e, normalmente, permite a detecção de apenas algumas centenas de proteínas após a sua separação, cobrindo assim apenas proteomas de "baixa complexidade" (ZHANG et al., 2010). Além disso, apesar de grande importância no progresso dos estudos de proteômica, 2D-PAGE possui dificuldade de automação, por se tratar de uma metodologia bastante laboriosa. Essa técnica também tem restrições nas separações das proteínas pouco abundantes nos organismos de estudo e com características de peso molecular ou pH extremas (CHEN e HARMON, 2006; ROGOWSKA-WRZESINSKA et al., 2013). Essa técnica inicialmente separa as proteínas pelo seu ponto isoelétrico (pI) através de focalização isoelétrica (primeira dimensão) numa tira de gradiente de pH imobilizado. Em seguida, é realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (segunda dimensão), separando centenas de polipeptídeos pelas massas moleculares (MM) (BOGUTH et al., 2000). A técnica de 2D-PAGE é muito útil na comparação de proteomas de um mesmo organismo submetido a condições diversas, ou também serve para comparar diversos isolados de uma cepa. Desse modo, mudanças como aumento ou decréscimo nos níveis de expressão podem ser detectadas, além disso, modificações pós-traducionais que modificam a massa molecular e modificações que interferem na carga líquida da molécula também podem ser detectados (BORGES e NEVES, 2015).

A identificação das proteínas presentes no perfil de eletroforese bidimensional é realizada pela espectrometria de massas, que é definida pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*) como o

estudo da matéria pela formação de íons em fase gasosa e posteriormente caracterizados por um espectrômetro de massas de acordo com sua massa, carga, estrutura ou propriedades físico-químicas (IUPAC Gold Book).

Outro método de separação é a Cromatografia Líquida, a qual substitui a eletroforese bidimensional, separando as amostras em colunas cromatográficas; permitindo assim a separação de proteínas hidrofóbicas, proteínas de alto e baixo peso molecular, e proteínas com valores de pI extremos. Nesse método a mistura complexa de peptídeos pode ser digerida por uma enzima específica e os peptídeos originados podem então ser separados em uma ou mais colunas. Neste caso, a identificação da proteína requer o sequenciamento de alguns de seus peptídeos através da fragmentação e o uso sequencial de dois analisadores de massas (LC-MS/MS) (LERY, 2007). Esta estratégia pode utilizar espectrômetros de massa com uma fonte de ionização do tipo *electrospray* (ESI). A combinação da separação de proteínas e peptídeos por cromatografia líquida com a identificação individual dos componentes por espectrometria de massas permite analisar milhares de proteínas presentes em misturas complexas. Essa técnica baseada na ionização por eletrodispersão acoplada a analisadores de massas, que permitem a fragmentação e o sequenciamento dos polipeptídeos, tem se mostrado altamente eficiente para analisar peptídeos e proteínas (MANN et al., 2001).

Nesse sistema, a solução contendo a amostra dissolvida passa através de um capilar, sob uma pressão atmosférica e alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (*spray*) e nessa região é aplicado um gás com alto fluxo e temperatura. A função desse gás é eliminar as moléculas de solvente, diminuindo as gotas previamente formadas até o limite onde a repulsão entre as cargas positivas supere a força de coesão dessa gota. Neste momento uma série de explosões começa a ocorrer até que ocorra a produção dos íons do analito a partir destas gotas. Os íons são então transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização, onde eles serão analisados e detectados (VÉKEY, 2001; ARDREY, 2003; CHIARADIA et al., 2008).

A proteômica tem grande importância em vários campos da ciência, devido o fato de que ela gera conhecimento sem precedentes permitindo assim a descoberta de proteínas envolvidas em rotas metabólicas nos diferentes processos celulares. Também possibilita a identificação de novos alvos farmacológicos e marcadores biológicos e identifica e caracteriza moléculas exógenas ou endógenas específicas de um determinado estado fisiológico (SANTOS et al., 2004; ROCHA et al., 2005; KUHNER et al., 2009). Portanto, a identificação de proteínas diferencialmente expressas permite associar a estes polipeptídeos diferentes eventos fisiológicos que ocorrem nas células, possibilitando uma nova visão dos sistemas biológicos (KORKUMAT et al., 2006).

O primeiro trabalho com proteômica de *G. diazotrophicus* PAL5 foi publicado em 2008 por Lery e colaboradores. Esse trabalho utilizou duas abordagens diferentes para obter a cobertura proteômica dessa bactéria. Utilizaram 2D-PAGE seguido de MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of Flight*) ou TOF-TOF (*Time of Flight/Time of Flight*) MS e 1-DE seguido de cromatografia em uma coluna C18 acoplada a um espectrômetro de massa ESI-Q-TOF (*Electrospray Ionization-Tandem Quadrupole/orthogonal acceleration-Time of Flight*) ou ESI-IT (*Electrospray Ionization-Ion Trap-Time of Flight*). Os autores identificaram 583 proteínas, sendo que estas encontram-se envolvidas em diferentes categorias funcionais como: vias metabólicas de nucleotídeos, aminoácidos, carboidratos e lipídeos, além de cofatores e produção de energia.

Dos Santos et al. (2010) avaliaram a expressão diferencial de proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 após sua inoculação *in vitro* em plântulas de cana-de-açúcar SP70-1143 micropropagadas através da técnica de 2D-PAGE. Os autores informam que 42 *spots* apresentaram alteração nos níveis de expressão quando compararam o perfil proteômico obtido das bactérias que haviam sido co-cultivadas com as plântulas e aquelas cultivadas no

meio de cultivo. Os resultados obtidos permitiram a avaliação da significância fisiológica de determinadas proteínas para o metabolismo de *G. diazotrophicus* e para as vias envolvidas na interação planta-bactéria.

Em 2011, Lery e colaboradores utilizaram abordagem proteômica visando estudar alguns aspectos moleculares da interação entre *G. diazotrophicus* PAL5 e plantas de cana-de-açúcar. Nesse trabalho os autores marcaram plântulas das variedades SP70-1143 (altamente responsiva a FBN) e Chunne (baixa resposta a FBN) e as células de *G. diazotrophicus* através da substituição de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  por  $^{15}\text{NO}_3$  e  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  nos meios de cultivos. As plantas cultivadas foram inoculadas com  $10^5$  UFC.ml<sup>-1</sup> de células bacterianas e, após um dia de inoculadas as raízes das plantas e o meio de cultivo foram coletados. Em seguida as proteínas foram extraídas para serem utilizadas nas análises de proteômica baseadas em espectrometria de massa quantitativa através da marcação metabólica com  $^{15}\text{N}$  das bactérias, amostras de raiz, e co-culturas. Foram identificadas nesse estudo mais de 400 proteínas, sendo que 78 delas foram diferencialmente expressas entre o co-cultivo com as plântulas e a bactéria controle. Comparando PAL5 em interação com os dois genótipos de cana-de-açúcar, foram identificadas proteínas com papel importante no reconhecimento celular. A bactéria expressou proteínas envolvidas na adaptação a condições atípicas e sistemas de sinalização durante a interação com ambos os genótipos, entretanto, SP70-1143 e Chunne mostraram respostas divergentes em contato com a bactéria. A variedade SP70-1143 superexpressou proteínas de cascata de sinalização, enquanto que a outra variedade (Chunne) apresentou expressão diferencial de proteínas envolvidas na remodelagem da cromatina e vias de degradação de proteínas. As células bacterianas oriundas de ambos os sistemas de co-cultivo tiveram expressão aumentada de proteínas envolvidas em vias de sinalização e metabolismo, o que provavelmente propiciou que as bactérias sobrevivessem e se adaptassem ao novo ambiente. Esses resultados sugerem que *G. diazotrophicus* PAL5 percebe e responde às duas variedades de cana-de-açúcar através de mecanismos gerais similares.

No ano seguinte, Galvão (2012) realizou um trabalho com objetivo de avaliar o perfil proteômico de *G. diazotrophicus* PAL5 e um mutante defectivo na produção de compostos indólicos (*lao*<sup>-</sup>) cultivados na presença e ausência de triptofano através da técnica de 2D-PAGE. Esse trabalho identificou 24 proteínas diferencialmente expressas, onde a maioria das proteínas com expressão reduzida em PAL5 cultivada em meio com triptofano em relação ao meio de cultivo sem esse aminoácido pertenceu à categoria de modificação pós-traducional, *turnover* de proteínas e chaperonas. No mutante *lao*<sup>-</sup> cultivado nas mesmas condições, grande parte das proteínas que foram expressas diferencialmente pertencia à categoria de produção e conversão de energia. Em adição, a maioria das proteínas que foram diferencialmente expressas no mutante *lao*<sup>-</sup> em comparação com a estirpe selvagem PAL5 pertencia à categoria de metabolismo e transporte de carboidratos. Segundo a autora do trabalho, não foram observadas proteínas relacionadas à biossíntese de triptofano em nenhuma condição analisada. E ela atribui isso ao baixo rendimento das identificações por espectrometria de massa.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a abundância diferencial de proteínas da estirpe selvagem PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus*, em resposta ao tratamento com peróxido de hidrogênio e verificar se o estresse oxidativo afeta a colonização da estirpe em plantas de arroz.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Identificar proteínas diferencialmente abundantes pela estirpe selvagem de *G. diazotrophicus* em resposta ao cultivo com peróxido de hidrogênio por meio de proteômica quantitativa *label-free*;
- Avaliar a colonização em plantas de arroz da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus* previamente submetida a estresse oxidativo pelo tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Estirpes Bacterianas e Plasmídeos

Tabela 1: Estirpe bacteriana e plasmídeo utilizado.

Estirpes	Genótipos, Fenótipos <sup>a</sup>	Referências
<b><i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i></b>		
PAL5 <sup>T</sup>	Estirpe selvagem, Km <sup>S</sup>	CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988; GILLIS et al., 1989; YAMADA et al., 1998.
<b>Plasmídeos</b>		
pMP7604	Tc <sup>R</sup>	LAGENDIJK et al., 2010

Km – Canamicina; Tc – Tetraciclina; Sobrescrito R - Resistente e S – Sensível

### 4.2. Meio de cultivo

#### 4.2.1. *G. diazotrophicus*

Foi utilizada a estirpe selvagem PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, obtida da Coleção de Culturas de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia. O cultivo foi realizado em meio DYGS líquido (2 g.l<sup>-1</sup> de glicose, 1,5 g.l<sup>-1</sup> de peptona, 2 g.l<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 0,5 g.l<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g.l<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, pH 6,0) (RODRIGUES NETO et al., 1986) ou LGI-P líquido modificado (0,5% (p/v) de glicose, 10 mmol.l<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 g.l<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,6 g.l<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g.l<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,02 g.l<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,001 g.l<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,001 g.l<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 1 ml.l<sup>-1</sup> de solução de vitaminas (10 mg de biotina e 20 mg de vitamina B6 em 100 ml de água destilada), pH 5,5) (REIS et al., 1994).

### 4.3. Condições de cultivo da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*, indução de estresse oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e lise celular

Células da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus* foram cultivadas em tubos de ensaio com capacidade para 15 ml contendo 5 ml de meio LGI-P modificado a 30°C e 180 rpm de agitação por um período de aproximadamente 48 horas. Após este período, inoculou-se as culturas crescidas em um erlenmeyer com capacidade de 2000 ml contendo 430 ml de meio LGI-P modificado, na inoculação utilizou-se uma densidade ótica (D.O.) de 0,01.ml<sup>-1</sup>. Após a inoculação o erlenmeyer foi incubado a 30°C sob agitação de 180 rpm. A D.O. foi verificada através do espectrofotômetro modelo Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 11.

A cultura bacteriana permaneceu sob agitação até que atingisse a D.O. de 0,6.ml<sup>-1</sup> (fase exponencial de crescimento) no comprimento de onda de 600 nm (D.O.<sub>600</sub>), quando então foi realizada a indução com 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizada como tratamento controle. A concentração de 100 µM foi utilizada neste trabalho, pois em trabalhos prévios realizados por DRESCHER (2011) foi verificado que esta concentração causava estresse oxidativo sem causar a morte celular.

Ao atingir a D.O. de 0,6.ml<sup>-1</sup>, o volume de total (430 ml) foi dividido em seis erlenmeyers com capacidade de 250 ml, de modo que em cada erlenmeyer foi colocado 70 ml da cultura crescida, volume adequado para três coletas (15, 30 e 60 minutos). Isso foi realizado para que em três erlenmeyers fosse realizada a indução com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e os outros três fossem usados como tratamento controle (sem indução com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Após essa separação foi adicionado 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a cultura líquida ficou sob agitação a 30°C e 180 rpm até o momento da coleta.

Após cada coleta, os sedimentos bacterianos foram coletados por centrifugação a  $4.000 \times g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e o pellet foi ressuscitado em solução de ressuspensão composta por  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$  de Tris-HCl,  $1,5 \text{ mmol.l}^{-1}$  de Cloreto de Magnésio e  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$  de Cloreto de Potássio (pH 8). Posteriormente, a amostra foi transferida para tubo com capacidade de 2 ml e novamente centrifugada. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  para realização da extração de proteínas posteriormente.

Para obtenção do extrato proteico, as amostras foram ressuscitadas em 1 ml de tampão de lise contendo  $7 \text{ mol.l}^{-1}$  de Ureia;  $2 \text{ mol.l}^{-1}$  de Tiuréia, 2% (p/v) de CHAPS e  $20 \text{ mmol.l}^{-1}$  de DTT e, posteriormente, submetidas a agitação por um período de 30 minutos. Passado este tempo, as amostras foram submetidas a sonicação em banho de gelo (10 ciclos de 20 segundos com amplitude de 20%) (sonicador modelo 500, da Fisher Scientific). Em seguida foram centrifugadas por 60 minutos a  $13.800 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para novos microtubos, sendo então submetidos por 30 minutos a centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. Os extratos protéicos contidos nos respectivos sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos e armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.4. Análise Proteômica**

##### **4.4.1. Preparo e quantificação das amostras**

As amostras foram preparadas conforme descrito no tópico 4.3. O extrato proteico obtido para cada coleta foi quantificado utilizando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). Inicialmente foi preparada a solução do reagente de trabalho, onde 100 partes do reagente A foram misturadas com 1 parte do reagente B, esta solução foi mantida sob refrigeração até o momento do uso. Posteriormente, foi preparada uma curva padrão utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA) na concentração de  $2 \text{ mg.ml}^{-1}$ , fornecida pelo kit. As reações de quantificação foram preparadas em microtubos de 1,5 ml, onde foram aplicados  $5 \mu\text{l}$  das amostras a serem quantificadas. Em cada microtubo foi adicionado  $500 \mu\text{l}$  do reagente precipitante, inclusive nos microtubos da curva padrão. Após a adição do precipitante as amostras foram vortexadas brevemente e incubadas por 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida,  $500 \mu\text{l}$  do co-precipitante foi aplicado e os tubos foram invertidos para proporcionar a mistura do reagente com as amostras. Feito isso, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a  $10000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ , o sobrenadante foi descartado com auxílio de uma pipeta e as amostras foram centrifugadas novamente por poucos segundos, para retirar o sobrenadante que possa ter restado nos microtubos. Posteriormente foram adicionados  $100 \mu\text{l}$  de solução de cobre e  $400 \mu\text{l}$  de água Ultrapura em cada microtubo, os tubos foram agitados brevemente em agitador de tubos do tipo vórtex para dissolver a proteína precipitada. Em seguida, foi adicionado 1 ml do reagente de trabalho em cada microtubo e misturou-se por inversão, os microtubos então foram incubados a temperatura ambiente por 20 minutos. Após os 20 minutos,  $200 \mu\text{l}$  do conteúdo dos microtubos foram aplicados em triplicata em microplacas de 96 poços. Foi realizada a leitura da D.O. a  $480 \text{ nm}$  (D.O.<sub>480</sub>) no leitor de microplacas Anthos Zenyth 200st da Biochrom, os dados de absorvância foram utilizados para gerar a curva padrão e essa curva foi usada para determinar a concentração das amostras.

#### 4.4.2. Digestão de proteínas

Antes de digerir as amostras referentes a coleta de 60 minutos, estas passaram pelo processo de precipitação com metanol e clorofórmio. Para tal, adicionou-se 400 µl de metanol em 100 µl de amostra, com concentração final de 100 µg, e a mistura foi homogeneizada em agitador de tubos do tipo Vórtex. Posteriormente, foram adicionados 100 µl de clorofórmio e mais uma vez homogeneizadas. Por fim, foram adicionados 100 µl de água ultrapura, vortexou-se a mistura e esta foi então submetida à centrifugação por 10 minutos a 14000 rpm. Em seguida, a fase aquosa superior foi descartada e 300 µl de metanol foram adicionados à fase orgânica. A amostra foi novamente submetida à centrifugação por 10 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Após a secagem, o precipitado foi ressuspensionado em 50 µl de bicarbonato de amônio a 50 mM ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) com auxílio de agitador de tubos do tipo Vórtex. Feito isso as amostras foram sonicadas por 10 minutos e, então, prosseguiu-se com a digestão. As amostras referentes às coletas de 15 e 30 minutos, foram analisadas posteriormente e foram preparadas através de outra metodologia. Inicialmente as amostras foram dessalinizadas em filtros Amicon® Ultra 0.5mL (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante.

Para a digestão de proteínas, 25 µl de 0,2% (v/v) RapiGest® (Waters, Milford, CT, USA) foi adicionado e as amostras foram agitadas brevemente em agitador de tubos do tipo Vórtex e incubadas num Thermomixer® Eppendorf a 80°C durante 15 minutos. Em seguida, 2,5 µl de DTT a 100 mmol.l<sup>-1</sup> foram adicionados e os tubos foram agitados e incubados a 60°C durante 30 minutos sob agitação. Em seguida, 2,5 µl de iodoacetamida 300 mmol.l<sup>-1</sup> (GE Healthcare) foram adicionados e as amostras foram agitadas e, em seguida, incubadas no escuro durante 30 minutos à temperatura ambiente. A digestão foi realizada por adição de 20 µl de solução de tripsina (50 ng.µl<sup>-1</sup>) (V5111, Promega, Madison, WI, USA) e incubação das amostras a 37°C durante a noite. Para precipitação do RapiGest®, 10 µl de ácido trifluoroacético 5% (v/v) (TFA, Sigma-Aldrich) foram adicionados e as amostras foram incubadas a 37°C durante 90 minutos, seguido por centrifugação durante 30 minutos a 15.000 x g. As amostras foram então transferidas para frascos de recuperação total para em seguida serem submetidos a análise por espectrometria de massas (Waters, EUA).

#### 4.4.3. Análise por espectrometria de massa

Um nanoAcquity UPLC ligado ao espectrômetro de massa SYNAPT G2-Si HDMS (Waters) foi usado para análise de ESI-LC-MS/MS. Misturas de peptídeos foram separados por cromatografia líquida usando 1 µl de amostras digeridas em corridas de aferição. A normalização entre as amostras foi baseada na contagem de íons totais constituídos por três repetições de cada amostra composta. Durante a separação, as amostras foram carregadas para a coluna C18 trap 5 µm (180 µm x 20 mm) nanoAcquity UPLC e, em seguida, para a coluna analítica de fase reversa (100 µm x 100 mm) HSS T3 nanoAcquity 1,8 µm a 600 nl.min<sup>-1</sup>, com uma temperatura de coluna de 60°C. Para eluição do peptídeo, o gradiente binário consistiu de água grau HPLC (Tedia, Fairfield, Ohio, EUA) e 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como a fase móvel A, e acetonitrila (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e ácido fórmico 0,1% como fase móvel B. Gradiente de eluição começou a 7% B até 40% B em 90,09 minutos e de 40% de B até 85% B até 94,09 minutos, mantida a 85% até 98,09 minutos, depois diminuiu para 7% B até 100,09 minutos e mantida a 7% de B ao fim em 108,09 minutos. Espectrometria de massa foi realizada no modo positivo e resolução, 35.000 FWHM, e a energia de transferência de colisão em rampa de 19 v a 45 v no modo de alta energia; tensões de cone e capilares de 30 v e 2800 v, respectivamente; e uma fonte de temperatura de 70°C. Em parâmetros de TOF, o tempo de verificação foi ajustado em 0,5 segundos no modo contínuo com uma gama de massa de 50 a 2.000 Da. A [GLU1]-

fibrinopeptídeo B humana (Sigma-Aldrich) foi usada como uma calibração externa. Aquisição de dados independente (DIA) escaneados com especificidade e seletividade adicionado a um dispositivo de mobilidade iônica não-linear 'T-wave' foi realizada (HDMS<sup>E</sup>).

#### 4.4.4. Identificação de proteínas e quantificação

Processamento do espectro e pesquisa no banco de dados foram realizadas utilizando Software Progenesis QI para Proteômica V.2.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, Reino Unido). Para as amostras referentes às coletas de 15 e 30 minutos foram utilizados os seguintes parâmetros: uma clivagem perdida, íons de fragmento mínimo por peptídeo igual a dois, íons de fragmento mínimo por proteína igual a cinco, peptídeos mínimos por proteína igual a dois, modificações fixas de carbamidometil (C) e modificações variáveis de oxidação (M) e grupo fosforil (STY), taxa de falsa descoberta (FDR) de 4%, no máximo, uma pontuação superior a cinco, e erros de massa máximos de 10 ppm. Já para as amostras oriundas da coleta após 60 minutos de exposição ou não ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizou-se os seguintes parâmetros: uma clivagem perdida, íons de fragmento mínimo por peptídeo igual a um, íons de fragmento mínimo por proteína igual a três, peptídeos mínimos por proteína igual a um, modificações fixas de carbamidometil (C) e modificações variáveis de oxidação (M) e grupo fosforil (STY), taxa de falsa descoberta (FDR) de 4%, no máximo, uma pontuação superior a cinco, e erros de massa máximos de 10 ppm. As massas de peptídeos gerados foram pesquisadas no banco de dados de sequências de proteínas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 UniProt (2015/11). Análises quantitativas relativas livres de marcador foram realizadas pela relação de contagem de íons de proteínas entre as amostras contrastantes. Após a análise no Progenesis e para assegurar a qualidade dos resultados, apenas as proteínas presentes em 3 de 3 corridas e com coeficientes de variação inferiores a 50% foram selecionadas. Para as proteínas originais, apenas aqueles presentes em 2 de 3 ensaios foram considerados, independentemente do fato do coeficiente de variação ter sido maior do que 0,5. Classificação funcional das proteínas identificadas foi realizada utilizando o programa Blast2go ([www.blast2go.com](http://www.blast2go.com)).

#### 4.5. Avaliação da colonização da estirpe em plantas de arroz

Com o objetivo de avaliar a colonização em plantas da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus* mediante estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi realizado um experimento utilizando a variedade de arroz IAC-4440. Esta cultura foi escolhida devido ao estabelecimento da metodologia em trabalhos anteriores do grupo (ROUWS et al., 2010; MENEZES, 2011) e ao curto tempo de desenvolvimento das plântulas.

Sementes de arroz da variedade IAC-4440 foram descascadas e sua superfície desinfestada com adaptação de Hurek et al. (1994). As sementes foram colocadas em um tubo falcon e 10 ml de álcool 70% foi adicionado, logo após o tubo falcon ficou sob agitação por 2 minutos. Em seguida, as sementes foram colocadas em erlenmeyer com capacidade para 250 ml, contendo 70 ml de hipoclorito de sódio + 30 ml de solução de desinfestação (1 g.l<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 30 g.l<sup>-1</sup> de NaCl e 1,5 g.l<sup>-1</sup> de NaOH). O erlenmeyer foi submetido a agitação vigorosa por 15 minutos. Passado os 15 minutos, as sementes foram transferidas para outro erlenmeyer contendo 50 ml de hipoclorito de sódio + 50 ml de solução de desinfestação e retornaram a agitação vigorosa por mais 15 minutos. Posteriormente, a solução foi descartada e as sementes foram acondicionadas em um terceiro erlenmeyer contendo 30 ml de hipoclorito de sódio + 70 ml de solução de desinfestação, onde permaneceram sob agitação por mais 15 minutos. Por fim, as sementes foram lavadas em água destilada estéril, sendo que

foram feitas 3 lavagens. Uma lavagem foi por 15 minutos, a segunda por 45 minutos e a terceira por 60 segundos sob agitação.

Após as lavagens em água destilada estéril, as sementes foram transferidas assepticamente para placas contendo meio Ágar-Água 0,5% suplementado com 0,5 g.l<sup>-1</sup> de extrato de levedura. Para a germinação, as placas vedadas com papel alumínio e incubadas por 72 h a 30°C. Após três dias de germinação as plântulas livres de contaminação por microrganismos foram transferidas para tubos de ensaio de 125 ml contendo 30 ml de solução de Hoagland's [1 ml.l<sup>-1</sup> de solução K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M, 1 ml.l<sup>-1</sup> de solução KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M, 2 ml.l<sup>-1</sup> de solução MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1M, 0,172 g.l<sup>-1</sup> de solução CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1 ml.l<sup>-1</sup> de solução FeEDTA (1,64%), 1 ml.l<sup>-1</sup> de solução de elementos menores para tubos (2,86 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1,81 g de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 0,22 g de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,08 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 0,02 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; pH6,5-7,0)], sem nitrogênio. Os tubos de ensaio com as plantas foram incubados por 4 dias com fotoperíodo de 12 horas.

Antes da inoculação a estirpe bacteriana utilizada no ensaio foi submetida ao estresse oxidativo com 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por diferentes intervalos de tempo (15, 30 e 60 minutos). As células foram cultivadas em erlenmeyers com capacidade para 500 ml contendo 185 ml de meio DYGS a 30°C e 130 rpm de agitação até que atingissem uma D.O. de 0,6 no comprimento de onda de 600 nm, quando então foi realizada a indução com 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizada como tratamento controle. A D.O. foi verificada através do espectrofotômetro modelo Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 11.

Ao atingir a D.O. de 0,6.ml<sup>-1</sup>, foi adicionado 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a cultura líquida ficou sob agitação durante os respectivos tempos utilizados no experimento (15, 30 e 60 minutos) a 30°C e 130 rpm. Após cada intervalo de tempo, o volume final de cultura contido nos erlenmeyers (185 ml) foi dividido em 6 tubos falcon de 50 ml, contendo cada um 30 ml de cultura. Esses tubos falcon foram submetidos à centrifugação por 10 minutos a 8000 rpm, posteriormente o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 1 ml de solução salina. Após a ressuspensão, novamente foi realizada uma centrifugação por 10 minutos a 8000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1 ml de solução salina. Esse 1 ml foi então inoculado nas plantas de arroz., o qual continha aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>. As plantas foram cultivadas por 10 dias sob fotoperíodo de 12 h.

Posteriormente, a estirpe selvagem PAL5 de *G. diazotrophicus* contendo o plasmídeo pMP7604 foi inoculada na solução de Hoagland's, com aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>. O controle foi inoculado com 1 ml de solução salina. As plantas foram cultivadas por 10 dias sob fotoperíodo de 12 h.

Para verificar o efeito do peróxido de hidrogênio na colonização da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus* nas plantas de arroz, análises microscópicas da bactéria, contendo o plasmídeo pMP7604, associada às plantas foram feitas utilizando o microscópio confocal AXIO OBSERVER Z1 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), adquirido pela Embrapa Agrobiologia. Para tal, após os 10 dias de inoculação, uma parte dos tecidos de raiz foram coletados para análise microscópica e o restante foi macerado para posterior quantificação de células bacterianas por contagem de UFC.

Para análise microscópica, o tecido radicular visualizado no microscópio foi o da região da coifa. Esta região foi então excisada e disposta entre lâmina e lamínula de vidro, embebidas em 40 µl de tampão PBS + glicerol [40% de PBS 1x (80 g.l<sup>-1</sup> de NaCl; 2 g.l<sup>-1</sup> de KCl; 14,4 g.l<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,4 g.l<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e 60% de glicerol)]. Feito isso, a lâmina foi acondicionada no microscópio confocal para visualização e captura das imagens.

Para a quantificação das células bacterianas, as plantas foram removidas dos frascos e as raízes de cada planta foram separadas da parte aérea. Em seguida, as raízes foram lavadas e desinfestadas, de modo que a contagem de UFC das raízes lavadas informaria o total de bactérias por tratamento (bactérias endofíticas e adsorvidas na raiz); enquanto que a contagem

das raízes desinfestadas informaria apenas o número de bactérias que possivelmente colonizaram a planta internamente (endofíticas). Após a lavagem ou desinfestação as raízes foram pesadas.

Para a lavagem as raízes foram imersas em 40 ml água destilada estéril por 10 segundos por três vezes consecutivas. Em seguida, as raízes foram maceradas em almofariz na presença de 1 ml de solução salina. A suspensão resultante foi então diluída em série e plaqueada em meio LGI-P suplementado com 20 mg.l<sup>-1</sup> de tetraciclina. O número de colônias foi computado após três dias de incubação a 30°C.

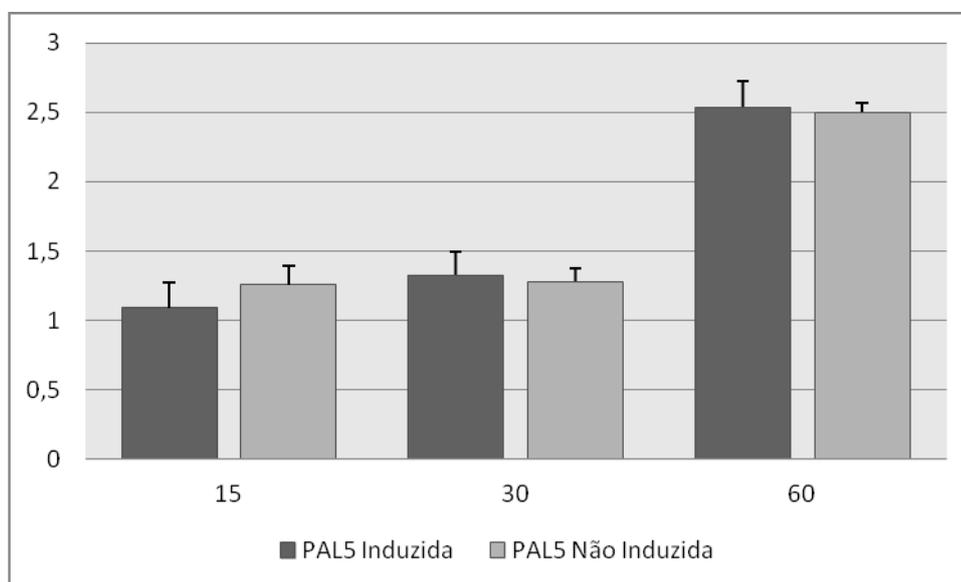
Para desinfestação as raízes foram imersas em 40 ml de cloramina-T 1% por 10 segundos, depois as raízes foram imersas em 40 ml de água destilada estéril também por 10 segundos. A próxima lavagem foi realizada em tampão fosfato 0,05 M e água destilada estéril, ambos por 10 segundos. Em seguida, as raízes foram maceradas com auxílio de um gral e pistilo na presença de 1 ml de solução salina. A suspensão resultante foi então diluída em série e plaqueada em meio LGI-P suplementado com 20 mg.l<sup>-1</sup> de tetraciclina. O número de colônias foi computado após três dias de incubação a 30°C.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Cultivo, obtenção e quantificação do extrato proteico de células de *G. diazotrophicus* após indução com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Após a realização de todas as etapas para obtenção do extrato proteico conforme descrito no item 4.3, o mesmo foi quantificado utilizando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) (Figura 1). A primeira análise realizada baseou-se em amostras oriundas de coletas realizadas aos 60 minutos após a indução com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esse tratamento foi escolhido baseado no fato que uma peroxidase (ORF GDI\_0414), regulada pelo mesmo promotor de uma bacteriocina (ORF GDI\_0415), possivelmente seria expressa com 60 minutos uma vez que DRESCHER (2011) demonstrou que essa bacteriocina era expressa após 60 minutos de indução com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No entanto, após a obtenção dos resultados da análise de expressão gênica e proteômica verificou-se que a peroxidase não foi diferencialmente expressa. Diante disso, buscas bibliográficas foram realizadas na literatura onde foi verificado que algumas bactérias expressam enzimas detoxificadoras de EROs em até 20 minutos, como é o caso de *Pseudomonas aeruginosa*, que aumenta os níveis de mRNA de *sodM* com 10 minutos de exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mas retornam aos níveis basais após 20 minutos (Palma et al., 2004). Além disso, segundo Ochsner e colaboradores (2000), um intervalo de 5 a 15 minutos já é o suficiente para detectar alterações nos níveis de mRNA por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* e outras bactérias.

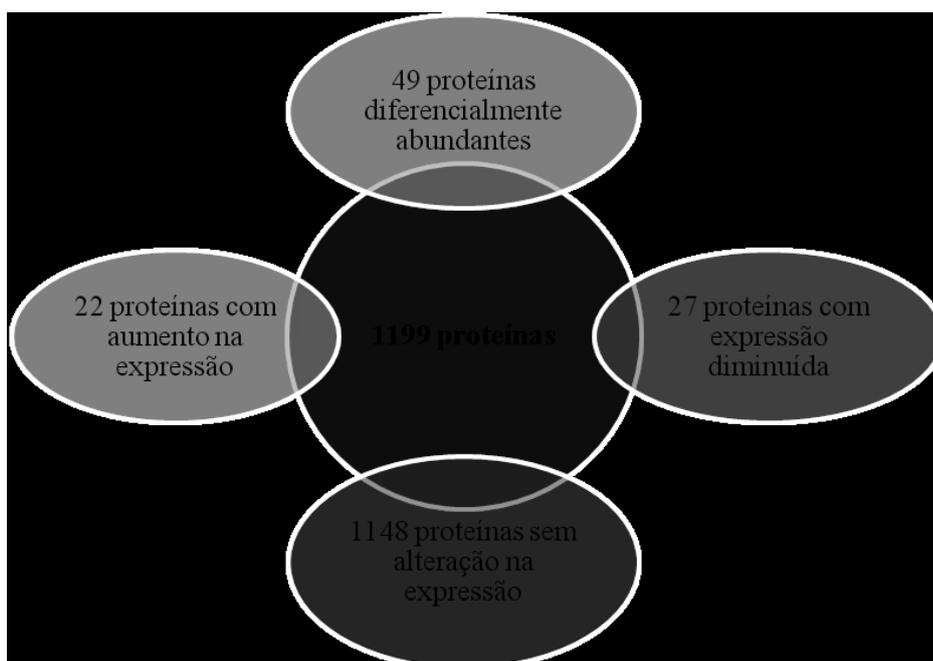
Desse modo, foi realizado um novo experimento onde realizou-se coletas com 15 e 30 minutos. As proteínas obtidas neste ensaio foram também submetidas a análise de ESI-LC-MS/MS conforme discutido abaixo.



**Figura 1:** Quantificação de proteínas oriundas das coletas de 15, 30 e 60 minutos após a indução do estresse oxidativo ou não com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Leitura realizada no espectrofotômetro sob o comprimento de onda de 480 nm. Barras representam o desvio padrão e cada coluna expressa a média de três replicatas biológicas.

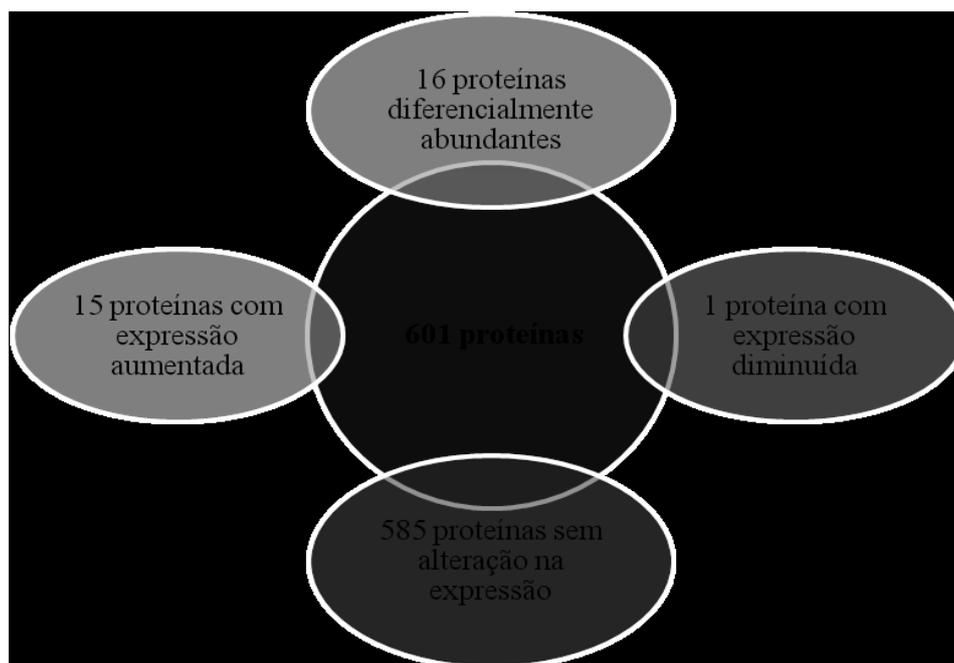
## 5.2. Análise de ESI-LC-MS/MS e identificação de proteínas

Como mencionado anteriormente, a primeira análise realizada foi a referente a coleta após a exposição ou não (controle) das células bacterianas à 60 minutos com  $H_2O_2$  (Figura 2). O espectrômetro de massas identificou 1199 proteínas, sendo que destas, apenas 49 proteínas apresentaram níveis de abundância alterados durante a realização do ensaio. O restante (1148 proteínas) não apresentou alteração. Também ocorreu a identificação de 1 proteína única na condição controle (Tabela 6). Das 49 proteínas com abundância diferencial, 22 proteínas tiveram maior abundância quando cultivadas na presença do  $H_2O_2$  (Tabela 2). As outras 27 proteínas diferencialmente abundantes tiveram sua abundância diminuída quando cultivadas na presença do  $H_2O_2$  (Tabela 4).



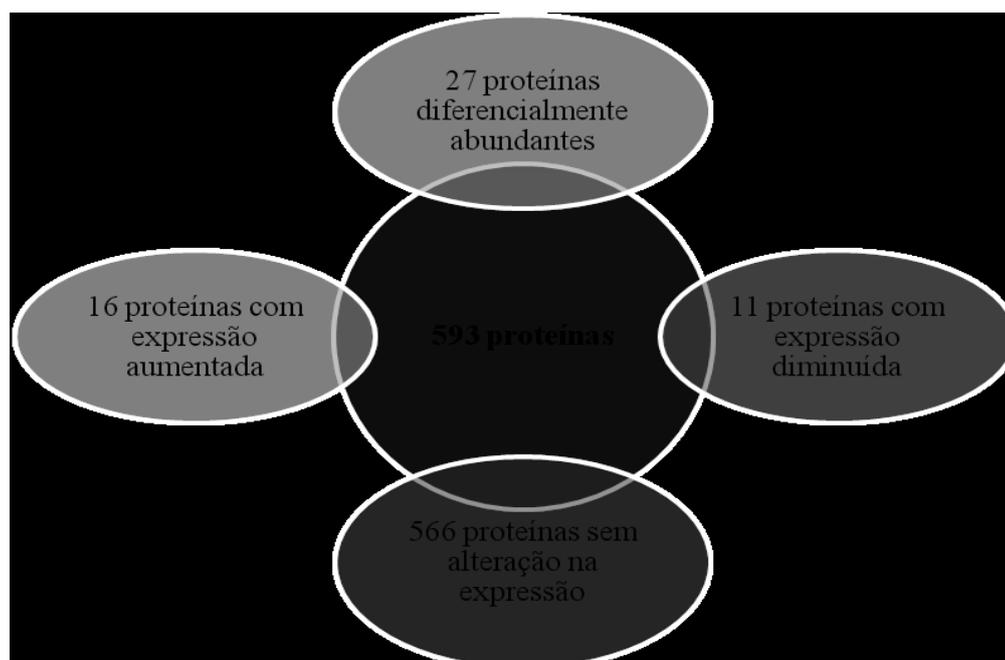
**Figura 2:** Diagrama de Venn esquematizando o perfil de abundância das proteínas identificadas para coleta de 60 minutos de exposição ou não ao  $H_2O_2$ .

Para a coleta de 15 minutos (Figura 3), foram identificadas 601 proteínas, sendo que destas, 16 proteínas foram diferencialmente abundantes ao nível de 5% de significância e o restante não teve abundância alterada durante o experimento. Das 16 proteínas diferencialmente abundantes, 15 tiveram abundância aumentada (Tabela 7) e 1 teve a abundância diminuída (Tabela 8) na presença do  $H_2O_2$ .



**Figura 3:** Diagrama de Venn esquematizando o perfil de abundância das proteínas identificadas para coleta de 15 minutos de exposição ou não ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

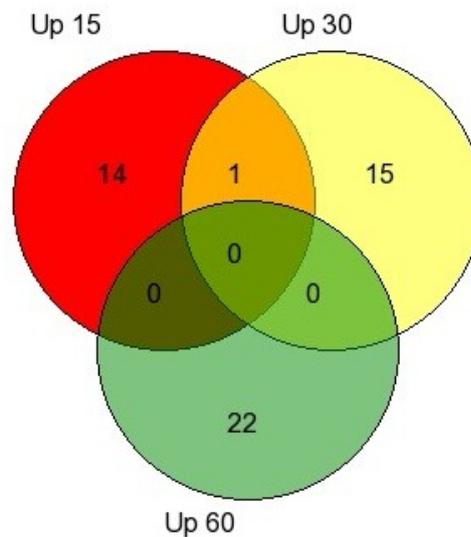
Já para a coleta de 30 minutos, identificaram-se 593 proteínas, sendo que destas, 27 proteínas foram diferencialmente abundantes ao nível de 5% de significância e o restante não teve abundância alterada durante o experimento. Das 27 proteínas diferencialmente abundantes, 16 tiveram abundância aumentada (Tabela 9) e 11 tiveram a abundância diminuída (Tabela 11) na presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nesta coleta foram identificadas 2 proteínas únicas, todas originárias do tratamento com indução por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabela 10).



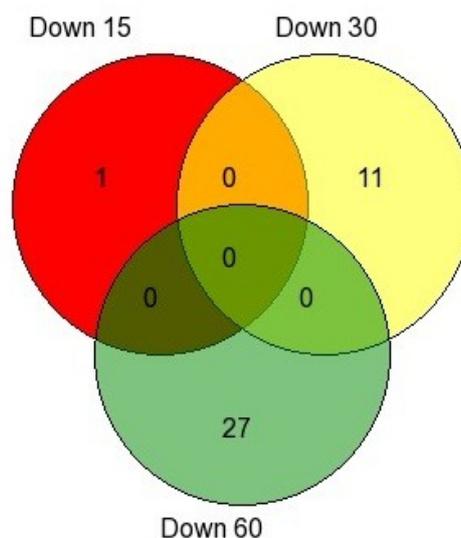
**Figura 4:** Diagrama de Venn esquematizando o perfil de abundância das proteínas identificadas para coleta de 30 minutos de exposição ou não ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

As proteínas identificadas foram classificadas segundo o processo biológico com auxílio do programa Blast2GO ([www.blast2go.com](http://www.blast2go.com)), como pode ser visto nas tabelas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11. Pode-se verificar que a expressão de algumas proteínas em *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 foi alterada em resposta às condições experimentais usadas, indicando a ativação e/ou desativação de sistemas durante a condição de estresse.

Comparando as proteínas diferencialmente abundantes nos diferentes tempos de coleta, pudemos verificar que uma proteína teve abundância diferencial em dois tempos de coleta. Essa proteína denominada 5 ribose-fosfato-isomerase A foi identificada com maior abundância aos 15 e 30 minutos, como pode ser visto na Figura 5. Já em relação às proteínas que tiveram diminuição na abundância, nenhuma proteína foi comum aos diferentes tempos de coleta, como mostrado na Figura 6.



**Figura 5:** Diagrama de Venn demonstrando as proteínas com abundância diferencial aumentada que foram comuns nos diferentes tempos de coleta.



**Figura 6:** Diagrama de Venn demonstrando as proteínas com abundância diferencial diminuída que foram comuns nos diferentes tempos de coleta.

**Tabela 2:** Proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 identificadas com abundância aumentada após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 60 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio) (Continua).

Acesso	Descrição	Contagem de Peptídeo	Peptídeo Único	Score	Anova (p)	Fold Change	Média Quantificação	Processo Biológico
A5YJ43	Ácido Dihidroxi desidratase (Fragmento)	37	2	244,2097	0,024499	1,612771	7088,546	Processo Biossintético de Isoleucina e Valina
A9HED6	Proteína de Membrana	15	6	119,8716	0,036062	1,576784	385245,7	--
A9HKQ2	Peptídeo Deformilase	2	1	11,0438	0,002889	2,871454	1595,07	Tradução
A9HIQ1	Peptidil-prolil Isomerase	13	4	96,7446	0,04003	1,681315	373700,2	Proteína de Isomerização Peptidil-Prolil; Dobramento de Proteína
A9HH12	Glicose-1-fosfato thimidililtransferase	28	2	186,2256	0,025798	2,117425	20143,81	Processo Biossintético de Polissacarídeo Extracelular
A9HGZ1	Sintase Fitoeno	14	10	102,7196	0,029466	1,679985	243068,9	Processo Biossintético
A9HFP7	Fator de Iniciação da Tradução IF-3	17	5	126,5817	0,035351	1,556155	128251,2	Iniciação da Tradução
A9HIG0	Molibdopterina converting Subunidade 1	4	3	30,9321	0,027739	1,545612	124698,3	Processo Biossintético do Cofator Mo-Molibdopterina
A9HIH5	Farnesiltranstransferase	23	13	165,155	0,033005	1,928485	421723,9	Processo Biossintético de Isoprenóide
A9HLH0	Proteína de segregação e condensação do cromossomo	2	1	11,1074	0,003722	2,307458	7560,783	Divisão Celular; Separação do Cromossomo
A9HKV0	Proteína de Membrana	60	1	428,5267	0,030931	2,254536	10309,89	Montagem da Membrana Externa de Bactéria Gram-negativa; Inserção de Proteína na membrana
B5ZL89	Peptidase S10	11	3	71,0591	0,032604	1,804019	21946,03	Proteólise

**Tabela 3:** Continuação.

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Contagem de Peptídeo</b>	<b>Peptídeo Único</b>	<b>Score</b>	<b>Anova (p)</b>	<b>Fold Change</b>	<b>Média Quantificação</b>	<b>Processo Biológico</b>
B5ZF13	Dioxigenase	4	3	27,8031	0,004218	2,363609	29025,6	--
B5ZF81	Proteína Banda 7	2	1	11,5008	0,020476	1,686275	7863,468	--
A9HP92	Proteína Hipotética GDI2615	2	1	12,3112	0,02936	3,06205	6073,671	--
B5ZFS0	Proteína Hipotética	2	2	12,3796	0,04863	1,721196	10821,83	--
A9HJU5	Exopolifosfatase	36	2	236,1086	0,016156	1,823347	6568,211	Processo Metabólico
A9HMW2	Proteína Hipotética GDI2415	2	1	10,9485	0,001385	1,550208	4171,272	--
B5ZLD5	DNA Topoisomerase 4 Subunidade A	8	4	45,6932	0,027436	1,759012	31720,5	Segregação do Cromossomo; Alteração topológica do DNA
A9HN56	Proteína Hipotética GDI2453	1	1	5,4503	0,029383	2,069755	7702,616	--
B5ZGN1	Proteína de Membrana	17	1	112,3355	0,013017	1,791287	2613,282	Processo Metabólico
A9HC17	Fator de silenciamento do ribossomo	6	3	33,3391	0,048173	1,910843	17533,36	Processo Biossintético de NAD; Montagem do Ribossomo Maduro; Regulação Negativa da Tradução; Regulação Negativa da Biogênese do Ribossomo

**Tabela 4:** Proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 identificadas com abundância diminuída após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 60 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio) (Continua).

Acesso	Descrição	Contagem de Peptídeo	Peptídeo Único	Score	Anova (p)	Fold Change	Média Quantificação	Processo Biológico
A9HKR2	Succinil-diaminopimelato desuccinilase	4	2	23,4155	0,001858	2,578053	26911,45	Proteólise; Processo Biossintético da Lisina através de Diaminopimelato; Processo Biossintético Diaminopimelato
A9HJ50	Fator 1 Liberação da cadeia peptídica	4	2	27,3213	0,026224	2,750073	23321,58	Terminação Traducional
A9H0E5	50S Proteína Ribossomal L21	11	7	118,9066	0,03114	1,615412	412543,9	Tradução
A9HS61	tRNA (guanina-N(1))-metiltransferase	4	1	30,875	0,007055	2,100737	8917,851	Metilação tRNA
Q288C7	Transportador ABC	10	1	71,3663	0,020849	1,643135	6518,601	Processo Metabólico
A9HFN6	Glicosil Transferase Grupo 1	2	1	11,1122	0,002028	2,421391	11032,55	Processo Biossintético
A9HFY2	Família de Proteína	14	6	101,8185	0,022669	1,837765	174447,5	--
A9HEE1	Proteína Conservada	1	1	5,8926	0,036837	1,694611	20344,23	--
A9HME5	Prolina Iminopectidase	4	3	29,6773	0,019233	2,273616	13616,05	Proteólise
A9HL44	ATPase AAA	18	12	123,1454	0,024691	1,679523	728197,8	Proteólise
A9H3K2	Pré-Proteína Translocase Subunidade SecY	4	3	23,9044	0,027844	2,090982	158250,8	Proteína de Segmentação; Transporte de Proteínas pelo complexo Sec; Transporte Transmembranar de Proteína Intracelular
A9HP16	Histidina Quinase	2	2	12,5612	0,043581	1,86258	16795,52	Fosforilação
B5ZJ22	Protease dependente de ATP subunidade HslV	13	10	107,8952	0,001764	1,56603	173768,7	Proteólise envolvida na Proteína Celular Processo Catabólico
A9H4G2	Proteína de ligação de ATP ao transportador ABC	55	3	413,3513	0,012311	1,832301	116365,3	Processo Metabólico

**Tabela 5:** Continuação.

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Contagem de Peptídeo</b>	<b>Peptídeo Único</b>	<b>Score</b>	<b>Anova (p)</b>	<b>Fold Change</b>	<b>Média Quantificação</b>	<b>Processo Biológico</b>
B5ZHI6	TPR Proteína contendo repetição	5	2	27,8171	0,000865	2,092146	25646,89	--
A9H6T9	Proteína Hipotética	2	2	11,2204	0,025974	2,056747	20090,65	--
A9H1U0	Proteína de Secreção Tipo VI	6	3	36,4958	0,009418	1,867456	76539,05	--
B5ZIU5	Transportador de múltiplas drogas	13	1	97,316	0,029709	1,744472	9770,226	Processo Biossintético do RNA; Transporte Transmembrana
A9HN12	Peptidase M61	41	4	328,6566	0,04808	1,691323	53313,76	Proteólise
B5ZKQ7	Amidase	25	5	190,2946	0,026979	2,071865	311128,4	Processo Metabólico
A9HNR2	Putativo UDP-glicose 6-desidrogenase	10	3	67,4305	0,041277	1,930129	9076,42	Processo Biossintético de Polissacarídeo; Processo de Oxidação-Redução
A9HKS4	Proteína de Membrana Insertase YidC	30	1	220,7216	0,035464	1,977932	927,3772	Transporte de Proteína; Proteína de inserção na membrana
B5ZHH4	Proteína de estresse geral	30	2	237,0222	0,030983	2,123713	83920,61	Processo de Oxidação-Redução
A9H922	Proteína Fosfoglicerato Mutase	6	1	35,0546	0,008328	1,501693	5795,303	Processo Metabólico
A9HBK2	Proteína de reparo da montagem do cluster Ferro-Enxofre	22	1	131,0786	0,005382	2,167858	2528,915	--
A9HIB1	Proteína Serina Treonina Quinase	57	1	446,0354	0,009604	2,696931	2125,089	Fosforilação de Proteína
A9HBZ3	Ribose-fosfato Pirofosfoquinase	25	12	155,8844	0,0449	1,656019	353818,6	Processo Biossintético 5-fosforibose 1-difosfato; Processo Metabólico do Nucleosídeo; Processo Biossintético do Ribonucleosídeo Monofosfato; Processo Biossintético do Nucleotídeo; Fosforilação

**Tabela 6:** Proteína de *G. diazotrophicus* PAL5 identificada apenas no tratamento sem Peróxido de Hidrogênio.

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Contagem de Peptídeo</b>	<b>Peptídeo Único</b>	<b>Score</b>	<b>Anova (p)</b>	<b>Fold Change</b>	<b>Média Quantificação</b>	<b>Processo Biológico</b>
B5ZI48	Proteína Hidrolase dependente de metais	31	1	232,236	3,89E-06	Infinito	1801,237	--

Nesta análise para tempo de coleta de 60 minutos não foram identificadas proteínas envolvidas na resposta celular ao estresse oxidativo, entretanto outras proteínas interessantes foram verificadas. Proteínas estas que possibilitaram o entendimento do processo de defesa em *G. diazotrophicus*. Por exemplo, foi identificada uma maior abundância da proteína Ácido Dihidroxi Desidratase, uma enzima transaminase envolvida no processo biossintético de isoleucina e valina mediando a transferência de um grupo amino do glutamato para os  $\alpha$ -cetoácidos alifáticos (RUDMAN e MEISTER, 1953). Essa proteína tem um cluster de ferro e enxofre ([4Fe-4S]) e este é relatado por ser facilmente inativado pelo estresse oxidativo (BROWN et al., 1995). Isso pode ser um indício de que com 60 minutos de exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* já havia se defendido das espécies reativas de oxigênio, caso contrário não teria ocorrido a expressão desta proteína tão sensível ao estresse oxidativo.

Também foram identificadas proteínas envolvidas com processo de tradução, como por exemplo, Peptídeo Deformilase, Fator de Iniciação da Tradução (IF-3) e Fator de silenciamento do ribossomo. A enzima Peptídeo Deformilase é responsável por catalisar a remoção do grupo N-formilmetionina do N-terminal após a tradução (GUAY, 2007). Além desta enzima, uma Metionina Amino Peptidase também participa da reação para obtenção da proteína madura (ADAMS e CAPECCHI, 1966; MEINNEL e BLANQUET, 1993). Peptídeo Deformilase é codificada pelo gene *def*, gene este essencial para o crescimento e a sobrevivência bacteriana (MAZEL et al., 1994; CHAN et al., 2003).

Proteínas Peptídeo Deformilases contendo ferro são conhecidas por serem sensíveis ao tratamento com agentes oxidantes por causa da oxidação de Fe<sup>+2</sup> a Fe<sup>+3</sup> no núcleo de ligação a metais, sendo estas inativadas na presença de oxigênio (RAJAGOPALAN e PEI, 1998). Segundo Anjem e Imlay (2012) metaloproteínas mononucleares são alvos comuns do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mas existem mecanismos estruturais e metabólicos para defender as células. Desse modo, podemos inferir mais uma vez que aos 60 minutos de exposição ao oxidante, *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 já havia feito com que os níveis de espécies reativas de oxigênio se tornassem toleráveis ao ponto de permitir que a expressão desta proteína ocorresse.

Outra proteína envolvida na tradução, que teve maior abundância foi o Fator de Iniciação da Tradução IF-3, que é um dos três fatores requeridos para a iniciação de síntese proteica em bactérias (GUALERZI e PON, 1990). Além desta proteína, também se observou o aumento da abundância de um Fator de Silenciamento do Ribossomo, conhecido por se ligar a subunidade maior do ribossomo, impedindo a associação da subunidade maior com a subunidade menor do ribossomo. Desse modo, a tradução é bloqueada (HAUSER et al., 2012). O fator de silenciamento do ribossomo retarda o crescimento celular pela inibição da síntese de proteínas durante períodos de disponibilidade de nutrientes reduzida (LI, et al., 2015). Esse mecanismo permite então que as células retardem seu crescimento e economizem energia e nutrientes como forma de adaptação a essa condição (HAUSER et al., 2012).

Também foi verificado um aumento na abundância de duas proteínas de membrana na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Uma delas está envolvida com a montagem da membrana externa de bactérias Gram-negativas, atuando na inserção de proteínas na membrana (Análise Blast2GO). A outra proteína de membrana não tem um processo biológico caracterizado até o momento. É interessante identificar proteínas de membrana de *G. diazotrophicus*, visto que é uma bactéria endofítica e necessita adaptar-se aos diferentes ambientes encontrados alterando seu envelope celular como forma de adaptação. Além disso, Muthukumarasamy e colaboradores (2002) demonstraram que as células de *G. diazotrophicus* apresentam morfologias diferentes conforme o meio extracelular em que estão vivendo e se estão ou não fixando nitrogênio.

Outra classe de proteínas que apresentaram maior abundância na presença do agente oxidante por 60 minutos foi a de proteínas envolvidas na divisão celular, como Proteína de segregação e condensação do cromossomo, ambas envolvidas da separação do cromossomo.

Várias proteínas envolvidas no processo de Proteólise tiveram abundância diminuída na condição em que *G. diazotrophicus* PAL5 foi cultivada na presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em comparação ao tratamento controle. Elas são responsáveis pela degradação de proteínas em aminoácidos através da hidrólise das ligações peptídicas. Durante o estresse oxidativo, as espécies reativas de oxigênio podem atacar diversos alvos biológicos, como por exemplo, ácidos nucleicos e proteínas. O ataque a uma molécula de DNA pode ocasionar uma mutação que possivelmente originará uma proteína defeituosa. Se caso o alvo das espécies reativas de oxigênio for uma proteína, estas podem ser danificadas pela oxidação direta dos seus resíduos de aminoácidos e cofatores ou por meio de peroxidação lipídica.

Nesse momento então, as proteases entram em ação, onde uma das principais funções é, obviamente, a eliminação de proteínas não-funcionais. Estes podem ser polipeptídeos desnaturados e agregados, onde a célula tem que tomar a decisão entre reparação, ou seja, desagregação e redobramento, ou degradação. Como nessa condição ocorreu a expressão diferencial de uma Peptidil-prolil Isomerase que está envolvida no dobramento proteico, pode ser que a atividade proteolítica diminuiu justamente porque a Peptidil-prolil-Isomerase estava atuando, realizando o redobramento proteico daquelas proteínas que possivelmente foram desnaturadas no processo oxidativo. Além disso, a menor abundância das enzimas proteolíticas pode ter ocorrido devido ao fato de que os danos celulares já haviam diminuído, não necessitando eliminar proteínas não-funcionais.

Um transportador de múltiplas drogas também teve abundância reduzida aos 60 minutos de exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indicando que a exportação de drogas tóxicas através de transportadores de multidrogas não se fazia necessário nesse momento. Outro grupo de proteínas com menor abundância foi proteínas envolvidas no processo de fosforilação. Os microrganismos podem alterar a transcrição de genes em resposta às condições no ambiente em que vivem, como baixa disponibilidade de nitrogênio ou fósforo, mudanças na temperatura e estresse oxidativo, adaptando-se as mudanças no meio. Essas adaptações ocorrem graças aos sistemas de detecção, responsáveis por monitorar continuamente o meio e transmitir sinais através das membranas para alvos intracelulares específicos. Na grande maioria dos casos, os sinais causam a inativação ou ativação de fatores de transcrição, o qual usualmente ocorre por fosforilação ou desfosforilação dos mesmos (WHITE, 2000). Faz parte desse sistema a proteína Histidina Quinase, a qual nessa condição de estudo teve uma redução na sua abundância. Histidina Quinase é uma proteína sensora, que recebe o sinal externo e transmite a uma proteína reguladora de resposta (RR), a qual, por sua vez, envia o sinal ao alvo. A Histidina Quinase possui um domínio de reconhecimento de sinal, o qual sob determinado estímulo, resulta em autofosforilação de um resíduo de histidina presente na região C-terminal, utilizando ATP. Em seguida, ocorre a transferência do grupo fosforil para um resíduo de aspartato na região N-terminal da proteína reguladora de resposta, ativando-a. A maioria das proteínas reguladoras de resposta se liga ao DNA funcionando como fatores de transcrição quando estão fosforiladas, levando a indução ou repressão da transcrição de genes específicos. A via de sinalização também inclui uma fosfatase que desfosforila o regulador de resposta, retornando ao seu estado não estimulado, onde mais uma vez pode responder a um novo sinal. Tal fosfatase pode ser a própria Histidina Quinase, o regulador de resposta ou outra proteína (WHITE, 2000).

Outra Quinase foi identificada com abundância minimizada na condição sem a presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em comparação a condição com indução do estresse oxidativo. Uma Ribose-fósforo Pirofosfoquinase, responsável pela biossíntese de ribonucleosídeos monofosfato e fosforilação (Blast2Go). Dessa maneira, podemos entender que a abundância

foi diminuída nessa condição porque na condição oposta (presença de  $H_2O_2$ ) ela foi maior. Isso leva a crer que na presença do  $H_2O_2$  a bactéria precisou produzir novos nucleotídeos, supostamente porque seus nucleotídeos foram atacados pelas EROs.

Proteínas envolvidas com secreção e transporte através da membrana também tiveram abundância diminuída, são elas: Transportador ABC e Proteína de Ligação de ATP ao transportador ABC; Proteína de Secreção Tipo VI, Pré-Proteína Translocase, Proteína de Membrana Insertase YidC. Algumas vias de secreção são observadas em diversas bactérias, sendo denominadas “Type Secretion System (TSS)”. Em bactérias Gram-negativas, em que a secreção envolve a translocação através das membranas interna e externa, são conhecidos seis classes gerais de sistemas de secreção de proteínas, cada uma das quais mostra uma diversidade considerável (TSENG et al., 2009). Entre estas seis classes temos o T1SS (Sistema de Secreção do Tipo 1) e o T2SS (Sistema de Secreção do Tipo 2), que são constituídos pelas proteínas que, aqui nesse estudo, tiveram expressão diminuída. A proteína de Ligação de ATP ao transportador ABC juntamente com Fatores de Membrana Externa e Proteínas de Fusão à Membrana compõem o T1SS (DELEPELAIRE, 2004); enquanto que a Pré-Proteína Translocase, Proteína de Membrana Insertase YidC compõem o T2SS. Os dois sistemas são responsáveis pela excreção de toxinas, proteases e lipases (BEECKMAN e VANROMPAY, 2010). Com esse resultado podemos inferir que se essas proteínas tiveram abundância minimizada na presença do agente oxidante após 60 minutos, seria um sinal de que a bactéria não estava produzindo proteases nem as enviando para o espaço periplasmático. Do mesmo modo também não estaria excretando toxinas.

Outra evidência de que aos 60 minutos a bactéria já havia diminuído os níveis intracelulares de  $H_2O_2$  e outras possíveis EROs formadas após indução de estresse oxidativo é o fato que ocorreu a diminuição da abundância de outras duas proteínas interessantes. A primeira é uma proteína de estresse geral envolvida com o processo de oxidação-redução, mostrando então que o ambiente oxidativo havia sido reduzido, dispensando a ação desta proteína. A segunda é uma proteína de reparo da montagem do cluster Ferro-Enxofre, provavelmente sua foi abundância foi menor porque o cluster Ferro-Enxofre já não estava mais sofrendo oxidação dos agentes oxidantes, de modo que não havia necessidade que sua estrutura fosse reparada.

Uma proteína única foi identificada na condição na ausência de  $H_2O_2$ , uma Hidrolase dependente de metais. Segundo o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB), as Hidrolases são enzimas que catalisam a reação de hidrólise de várias ligações covalentes. O nome, em geral, é dado pelo “substrato” + o sufixo “ase”, como é o caso das peptidases, que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas.

**Tabela 7:** Proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 identificadas com abundância aumentada após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 15 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio).

Acesso	Descrição	Contagem de Peptídeo	Peptídeo Único	Score	Anova (p)	Fold Change	Média Quantificação	Processo Biológico
A5YJ12	Acetoína desidrogenase resíduo dihidrolipoillisin subunidade acetiltransferase	5	2	28,8136	0,015924	6,147381	2509,744	Processo metabólico
A9HKK6	Oligoendopeptidase F	4	4	27,4608	0,008526	1,833656	66442,64	Proteólise
A9HK34	Choque frio CspE	10	7	85,8221	0,026718	1,668842	65523,61	Transcrição, modelada por DNA; Regulação da transcrição por DNA
A9HB30	Aldeído desidrogenase	5	4	30,3569	0,045115	4,690116	9067,088	Processo de oxidação-redução
A9H338	5 ribose-fosfato-isomerase A	4	3	32,1248	0,036028	2,238787	14229,84	Via das pentoses fosfato, ramo não-oxidativo
B5ZGW1	Ligação de ATP ao Transportador ABC de fosfato ligação de ATP	4	4	22,2045	0,042889	1,937526	21472,35	Processo metabólico; Fosfato de transporte de íons transmembrana
A9HA46	Transportador RND	21	14	147,7369	0,034808	1,550178	76433,75	Transporte
A9HM98	Determinação da forma de bastonete	2	2	12,8693	0,020697	15,67262	1342,214	Morfogênese celular
A9H438	Peptidase M16	13	10	83,7837	0,049265	1,962977	19385,09	Proteólise
A9HIW8	Regulador transcricional de choque frio	11	1	119,1477	0,047597	399,5455	5124,12	Regulação da transcrição modelada por DNA
A9HM62	Ligação de DNA cadeia simples	8	8	51157	0,03931	1,918741	12192,12	Reparo do DNA; Replicação do DNA; Recombinação de DNA
B5ZK38	Liase adenilosuccinato	15	7	95693	0,02495	2,157401	11967,67	Processo de biossíntese de AMP 'de novo'; Processo de biossíntese de IMP 'de novo'
A9HIT7	Proteína hipotética GD11870	3	1	16,9554	0,038201	4,340349	3369,533	-
A9H932	Receptor de sideróforos dependente de ferricromo	16	13	114,8323	0,040038	1,58608	49655,94	Transportes
B5ZLB7	NADH desidrogenase	8	6	46,2335	0,014612	2,581702	12931,69	Processo de oxidação-redução

**Tabela 8:** Proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 identificadas com abundância diminuída após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 15 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio).

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Contagem de Peptídeo</b>	<b>Peptídeo Único</b>	<b>Score</b>	<b>Anova (p)</b>	<b>Fold Change</b>	<b>Média Quantificação</b>	<b>Processo Biológico</b>
A9HRJ1	Glutamil-tRNA (Gln) amidotransferase subunidade C	4	2	30,5863	0,045237	2,606331	1185,683	Regulação da fidelidade da tradução; Tradução

Como pode ser observado na tabela 7, entre as proteínas com maior abundância na coleta de 15 minutos após a exposição das células ao agente oxidante, verificou-se a presença de duas proteínas envolvidas no processo de transcrição. Uma proteína denominada Choque frio e um Regulador transcricional de choque frio envolvida na regulação da transcrição por DNA, indicando que essas proteínas podem desempenhar funções além de proteção contra o choque por frio, sendo ativada em outras condições de estresse. Em baixas temperaturas, a tradução do mRNA é prejudicada, a resposta inicial bacteriana ao frio caracteriza-se pela ausência da síntese proteica geral. Por causa deste bloqueio transitório da iniciação de tradução, o crescimento celular também cessa transitoriamente (PHADTARE; YAMANAKA; INOUE, 2000). Tem sido demonstrado que a resposta ao choque frio é induzida quando a função ribossomal é inibida: o bloqueio da função ribossomal por mutações ou por antibióticos como cloranfenicol resulta em uma indução da resposta a choque frio (THIERINGER; JONES; INOUE, 1998). Desse modo, podemos entender que a resposta ao choque frio ocorrido em *G. diazotrophicus* PAL5 pode ter sido em função de uma redução do crescimento celular devido o estresse oxidativo.

Bae et al. (2000) observaram que a adição de CspA, CspE ou ainda, CspC de *E. coli* diminuiu a terminação transcricional *in vitro* em diversos terminadores, além de diminuir os tempos de pausa de transcrição. Além disso, a superexpressão *in vivo* de CspE e CspC a 37°C, mostrou-se capaz de induzir a transcrição de genes propostos como regulados por atenuação de transcrição. Portanto, as CSPs podem agir como antiterminadores de transcrição, e desfazer estruturas em RNAs nascentes que poderiam constituir terminadores intrínsecos ou alças terminadoras atenuadoras de transcrição.

*E. coli* possui diversas proteínas que são induzidas no frio como CspA, CspB, CspG, CspI, CsdA, RbfA, NusA, PNP, IF-2, H-NS, RecA, Hsc66 e HscB e a subunidade  $\alpha$  da DNA girase. Além destas proteínas *E. coli* apresenta outras proteínas que possuem o domínio CSD (*Cold Shock Domain*), mas não são expressas no frio, entre elas CspC e CspE são produzidas constitutivamente e CspD é a única induzida durante a fase estacionária (YAMANAKA; FANG; INOUE, 1998). CspE e CspC estão associados a condensação do cromossomo e ao processo de divisão celular em *E. coli* (YAMANAKA et al., 1994). Através de ensaios de microarranjos de DNA, também foi observado que CspE e CspC auxiliam genes como os da catalase peroxidase (*katG*) e da proteína de ligação a DNA a Dps a atingirem os níveis máximo de expressão, através de estabilização de mRNAs de *rpoS*. (PHADARE et al., 2006).

A proteína de ligação ao DNA cadeia simples também teve sua abundância elevada na presença do agente oxidante no período de 15 minutos. Essa é uma proteína essencial para todos os organismos vivos, envolvida nos processos de replicação de DNA, recombinação e reparo do DNA (MARCEAU, 2012). No presente estudo, acredita-se que esta proteína teve abundância superior quando comparada a condição sem a presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois agiu na reparação ao DNA contra os danos ocasionados pelas EROs.

Segundo Shamo (2001), os danos no DNA a partir de luz ultravioleta ou outros agentes frequentemente produzem lesões que perturbam o pareamento de bases do DNA, gerando uma aparência de DNA parcialmente desnaturado. A ligação da proteína ao DNA cadeia simples danificado serve para dois fins: primeiro, para proteger o DNA agora vulnerável a nucleases, e para recrutar enzimas de reparo ao dano. Após o recrutamento de enzimas que irão reparar o dano, por meio de uma série de interações altamente específicas proteína-proteína, a proteína de ligação ao DNA fita simple é deslocada de modo que a reparação do DNA possa começar.

Esse resultado corrobora com os dados apresentados por Chang e colaboradores (2006), que verificaram que *Staphylococcus aureus* responde ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por meio de indução de genes relacionados ao reparo de DNA entre 10 e 20 minutos de exposição ao agente oxidante. Eles afirmam que proteínas de reparo podem estar entre os mecanismos principais que a *S.*

*cereus* usa para neutralizar os efeitos letais de intermediários de oxigênio reativo. Além disso, os autores também asseguram que o sistema de reparo de DNA foi continuamente ativado em *S. cereus*, mesmo depois do crescimento, que tinha sido inicialmente inibido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ter sido retomado com a mesma taxa que as células não tratadas.

Também foi verificado que uma proteína receptora de sideróforos apresentou maior abundância na condição estressante. Essa resposta bacteriana ao estresse pode ter ocorrido com o objetivo de que ocorresse a formação do complexo Fe-Fur<sup>+2</sup>, pois esse complexo tem grande importância no controle de estresse oxidativo em bactérias. A formação deste complexo ocasionaria a repressão da transcrição de genes envolvidos na captação do Ferro, pois apesar de sua grande importância para diversos processos metabólicos, o excesso de tal elemento no interior das células pode ocasionar a formação de radicais hidroxilas (RATLEDGE e DOVER, 2000). Por este motivo as bactérias desenvolveram um sistema homeostático que controla os níveis intracelulares de ferro de modo a manter uma concentração suficiente para as necessidades essenciais das células, porém evitando danos oxidativos a elas. Os níveis de ferro no interior da célula são controlados através da regulação dos mecanismos de importação deste nutriente através da membrana. Em bactérias Gram-negativas, o sistema de homeostase de ferro é regulado pela proteína Fur (“Ferric Uptake Regulator”), onde esta exerce uma regulação transcricional sobre quase todos os genes implicados no transporte e incorporação deste metal em função da concentração intracelular existente (ESCOLAR et al., 1999). Fur atua, na maioria das vezes, como repressor da transcrição de genes alvos que codificam proteínas responsáveis pela captação de ferro, onde esta repressão requer o íon ferroso (Fe<sup>+2</sup>) como co-repressor. Em ambientes com presença de ferro, ocorre a formação de um complexo entre Fur e o íon ferroso, onde este complexo se liga a sequências nucleotídicas específicas, localizada na região promotora dos genes alvos, levando à repressão da transcrição destes genes. Caso contrário, na ausência de ferro, o complexo Fe<sup>+2</sup>-Fur não é formado e, portanto, não se ligará a região promotora dos genes sob seu controle de modo que os genes são transcritos, possibilitando a expressão das proteínas responsáveis pela captação de ferro (ESCOLAR et al., 1999).

A partir do exposto acima pode-se sugerir que *G. diazotrophicus* PAL5 possibilita a captação de ferro para que este forme um complexo com a proteína Fur, que apesar de não ter sido diferencialmente expressa, teve uma expressão um pouco maior na situação estressante em relação ao controle (1,25 vezes mais expressa em PAL5 Induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em relação a PAL5 Não Induzida). Esse complexo então atuaria reprimindo a expressão dos genes envolvidos na captação de ferro, limitando a quantidade deste elemento no interior celular, reduzindo então o potencial para a produção de EROs. Além disso, em *E. coli*, o complexo Fur-Fe<sup>+2</sup> indiretamente (através do RNA regulatório RyhB) ativa a expressão de genes que codificam proteínas de armazenamento de ferro bem como a superóxido dismutase dependente de Fe (*SodB*) (CORNELIS, et al., 2011).

Outras duas proteínas responsáveis por transporte de substâncias através da membrana foram identificadas com abundância diferencial. Uma proteína de ligação de ATP no Transportador ABC para transporte de fosfato e um transportador RND (*Resistance Nodulation Division*). A proteína de ligação de ATP no Transportador ABC atua no transporte transmembranar de fosfato inorgânico, ela é responsável por promover a hidrólise de ATP fornecendo assim a energia necessária ao transporte ativo de íons fosfato (CHAN e TORRIANI, 1996).

Transportadores ABC catalisam a translocação de vários substratos através da membrana bacteriana. Eles possibilitam a captação de nutrientes e moléculas (importadores) ou facilitam a extrusão de toxinas (exportadores) (DAWSON e LOCHER, 2006). O transportador RND, faz parte de um sistema que utiliza a força próton motriz como fonte de energia, é encontrado em todos os reinos de organismos vivos, e parecem estar envolvidos na

resistência a drogas, especialmente em bactérias Gram negativas (PAULSEN et al., 1996). Os transportadores RND funcionam como um complexo de proteínas que vão desde a membrana citoplasmática até a membrana externa.

Também foi detectada a abundância diferencial de duas enzimas desidrogenases na condição estressante, são elas Aldeído desidrogenase e NADH desidrogenase. O estresse oxidativo está acoplado à degradação por oxidação das membranas lipídicas, também conhecido como a peroxidação lipídica. Este processo gera diversos tipos de aldeídos, muitos dos quais são altamente reativos e tóxicos. Aldeído desidrogenases (ALDHS) metabolizam aldeídos endógeno e exógeno e, assim, reduzem o estresse oxidativo em procariotos e eucariotos. Regulação de ALDHS é uma resposta ao estresse nas bactérias, plantas, levedura e mamíferos (SINGH et al., 2013). NADH desidrogenases, são enzimas que catalisam reações de oxidação-redução, elas bombeiam prótons através da membrana interna de mitocôndrias ou na membrana plasmática de muitas bactérias (BRANDT, 2006). As enzimas NADH desidrogenases são específicas para o  $\text{NAD}^+$  como receptor de elétrons, elas removem dois átomos de hidrogênio dos seus substratos (NELSON e COX, 2002). Essas enzimas podem auxiliar na proteção celular contra o estresse oxidativo, através da transferência de elétrons para o  $\text{NAD}^+$ , evitando que esses elétrons escapem e se combinem diretamente com um átomo de oxigênio gerando uma forma parcialmente reduzida de oxigênio. Algumas moléculas são constitutivamente presentes e ajudam a manter um ambiente intracelular redutor ou ajudam a eliminar o oxigênio reativo. Entre estas moléculas antioxidantes não enzimáticas estão o NADPH e NADH (CABISCOL et al., 2000).

Uma proteína envolvida na morfogênese celular foi identificada na presença do agente oxidante com abundância aumentada, essa proteína foi descrita pelo Blast2GO como Proteína de determinação da forma bastonete. Como as bactérias são expostas a uma variedade de condições ambientais, elas precisam se adaptar ao ambiente para proporcionar a sua sobrevivência ótima em vários habitats. Durante uma ampla gama de efeitos adaptativos, ou como um mecanismo de defesa, sob diferentes condições ambientais ou de estresse, elas podem alterar a sua morfologia e utilizar plenamente os recursos disponíveis para suportar o crescimento e a reprodução máxima (YOUNG, 2006, 2007). Nesse contexto, Muthukumarasamy e colaboradores (2002), relataram que as células de *G. diazotrophicus* apresentam morfologias diferentes conforme o meio extracelular em que estão vivendo e se estão ou não fixando nitrogênio. Do mesmo modo, DE OLIVEIRA et al. (2016) demonstraram que células de *G. diazotrophicus* PAL5 apresentam fortes alterações morfológicas diante de estresse salino. Isso sugere que diante do estresse oxidativo, *G. diazotrophicus* PAL5 altera sua morfologia celular como forma de defesa.

Proteínas responsáveis pela proteólise também tiveram abundância aumentada, foram elas a Oligoendopeptidase F e Peptidase M16, indicando que nesse momento fazia-se necessário que algumas moléculas fossem degradadas, como por exemplo, proteínas defeituosas. Sua expressão pode ter sido maior porque o  $\text{H}_2\text{O}_2$  aplicado no meio de cultivo desencadeou danos celulares que deram origem a proteínas não-funcionais. Buscando resolver tal situação, a bactéria degrada essas proteínas com objetivo de impedir que o dano tome proporções maiores, como a morte celular.

Na coleta de 15 minutos, apenas uma proteína teve redução na abundância, sendo ela uma Glutamil-tRNA amidotransferase, esta proteína está envolvida no processo de tradução, sendo responsável por regular a fidelidade da tradução. A incorporação de aminoácidos codificadas corretamente em proteínas depende da ligação de cada aminoácido a um tRNA apropriado pelas enzimas aminoacil tRNA sintetases (Cooper, 2000). Glutamil-tRNA amidotransferase é um tipo de aminoacil tRNA sintetase responsável pela formação de Glu-tRNA pela esterificação de glutamato para a extremidade 3' do tRNA. É encontrada em organismos diferentes em duas formas: uma enzima discriminante (D-GluRS) que reconhece

exclusivamente tRNA<sup>Glu</sup> e uma enzima não-discriminante com especificidade relaxada que reconhece tanto tRNA<sup>Gln</sup> e tRNA<sup>Glu</sup> (ND-GluRS). ND-GluRS produz Glu-tRNA<sup>Gln</sup> em muitos organismos (a maioria das bactérias, archaea e as organelas eucarióticas) que carecem de GluRS. Glu-tRNA<sup>Gln</sup> é então transformado por um amidotransferase dependente de tRNA para Gln- tRNA<sup>Gln</sup> (FENG et al., 2005).

**Tabela 9:** Proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 identificadas com abundância aumentada após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 30 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio).

Acesso	Descrição	Contagem de Peptídeo	Peptídeo Único	Score	Anova (p)	Fold Change	Média Quantificação	Processo Biológico
A9HS05	50S ribossomal L28	5	4	37,8279	0,017286	6,564385	5570,0	Tradução
A9H3R5	50S ribossomal L3	12	12	75,8513	0,020898	1,50787	10331,33	Tradução
Q288C7	Transportador ABC	3	1	15,9003	0,040706	1,725528	695,2234	Processo metabólico
A9HPB9	Transportador ABC	4	1	21941	0,034789	1,998687	3342,788	-
A9HIU7	D-3-fosfoglicerato desidrogenase	3	3	17,4649	0,04391	3,23065	2095,006	Processo de biossíntese de L-serina; Processo de oxidação-redução
A9HIE2	Regulador de resposta de ligação ao DNA	4	3	24,8596	0,009695	3,917507	851,3064	Transcrição modelada por DNA; Sistema de transdução de sinal <i>phosphorelay</i> ; Regulação da transcrição modelada por DNA
B5ZHS1	Família de regulador transcricional	4	2	28,5587	0,025522	1,823339	5891,763	Regulação da transcrição modelada por DNA; Iniciação da transcrição do promotor da RNA polimerase II
B5ZED2	Glicosil-transferase família 1	3	3	16,5401	0,010153	7,421317	1031,476	Processo metabólico
A9HFY5	NAD(P)H: quinona oxidoreductase	4	3	24,1471	0,034362	2,213802	1807,6	Regulação negativa da transcrição, por DNA; Processo de oxidação-redução
A9HRT4	NADH quinona oxidoreductase Subunidade F	15	12	105,5195	0,008064	2,079288	41793,33	Processo de oxidação-redução;
A9HJV3	Nucleosídeo difosfato cinase	7	5	55,5209	0,03275	4,569866	20522,36	Processo biossintético de UTP, GTP e de CTP; Fosforilação do nucleosídeo difosfato;
A9HOR5	Oxidoreductase	3	3	16,7305	0,033305	9,602368	2442,688	Cadeia de transporte de elétrons
A9HEL6	Peptidase M1	2	1	11,4087	0,04882	21,53781	1195,734	Proteólise;
A9HPI6	Peroxidase	6	5	36,7162	0,046757	2,139705	5629,474	Detoxificação oxidante celular; Processo de oxidação-redução
A9H338	5 ribose-fosfato-isomerase A	4	3	32,1248	0,016827	2,916643	4354,546	Via das pentoses fosfato, ramo não-oxidativo
A9HL14	Superóxido dismutase	14	3	155,6088	0,037435	1,802401	10770,41	Remoção de radicais superóxido; Processo de oxidação-redução;

**Tabela 10:** Proteína de *G. diazotrophicus* PAL5 identificada apenas no tratamento com o Peróxido de Hidrogênio por 30 minutos.

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Contagem de Peptídeo</b>	<b>Peptídeo Único</b>	<b>Score</b>	<b>Anova (p)</b>	<b>Fold Change</b>	<b>Média Quantificação</b>	<b>Processo Biológico</b>
B5ZJX7	Cobalto quelatase	10	1	79,5376	0,01874	Infinito	377,1173	Processo metabólico
A9HIW8	Regulador transcricional de choque frio	11	1	119,147 7	0,026134	Infinito	12,2012	Regulação da transcrição modelada por DNA

**Tabela 11:** Proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 identificadas com abundância diminuída após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 30 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio).

Acesso	Descrição	Contagem de Peptídeo	Peptídeo Único	Score	Anova (p)	Fold Change	Média Quantificação	Processo Biológico
A9H3R6	30S ribossomal S10	11	10	76,1957	0,000815	1,726826	90425,35	Tradução
A9H0S9	Box Helicase DEAD DEAH	8	7	44,5524	0,037246	1,792781	5320,14	Processo metabólico
A9HCQ2	Frutose-1,6-bisfosfatase	23	5	188,3765	0,038676	1,727881	15313,53	Processo metabólico do glicerol; Gliconeogênese; Desfosforilação
A9HID1	IMP desidrogenase	6	5	44,2921	0,022192	2,923624	57111,65	Processo de oxidação-redução; Processo de biossíntese de GMP
A9HGS4	Membrana	2	2	11,1186	0,046752	1,912047	6663,88	-
A9HRU3	NADH desidrogenase	8	8	46,6103	0,009556	1,517896	38585,74	Processo de oxidação-redução; Transporte
A9GZP4	Membrana externa	9	6	69,4579	0,020967	1,647461	30050,14	-
A9H159	Oxidoredutase	3	2	17,4981	0,028646	2,026893	1471,08	Processo de oxidação-redução
B5ZJW6	Regulador transcricional de choque frio	10	1	109,9811	0,049429	4,548066	1453,943	Regulação da transcrição por DNA
A9HFP7	Fator de iniciação da tradução IF-3	16	11	103,1641	0,040726	1,588045	43954,24	Iniciação da tradução
A9HJC5	Transporte	5	5	55,5528	0,015664	1,751077	43164,24	Transporte

Quando as células de PAL5 foram coletadas após 30 minutos de exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi observada a expressão diferenciada de duas proteínas envolvidas na detoxificação celular, além de outras quatro proteínas envolvidas em reações de oxidação-redução. As proteínas envolvidas na detoxificação celular aqui identificadas foram Peroxidase e Superóxido Dismutase, as quais agem evitando o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio.

A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Ela existe em quatro formas dependendo do metal associado a ela (Cobre e Zinco, Manganês e Ferro), sendo que a proteína identificada nesse trabalho foi uma SOD dependente de ferro (FeSOD). Em *E. coli*, superóxido dismutase (SOD) dependente de ferro é uma enzima citoplasmática; como superóxido não pode atravessar as membranas, as enzimas que limpam as células devem estar localizadas dentro do compartimento celular que se destinam a proteger (IMLAY, 2013). A enzima FeSOD e MnSOD em *E. coli* são coordenadamente reguladas em resposta aos níveis de ferro. O repressor Fur complexado com ferro bloqueia a síntese de MnSOD quando os níveis de ferro são altos; quando os níveis de ferro são baixos, a desativação de Fur estimula a síntese de MnSOD e transcrição do pequeno RNA RyhB, o que desencadeia a mensagem de degradação de FeSOD (TARDAT e TOUATI, 1991; MASSE e GOTTESMAN, 2002). Controle por Fur também garante que o importador de manganês MntH seja induzido, permitindo assim a ativação de MnSOD (KEHRES et al., 2002). Juntos, este arranjo garante que FeSOD seja a isoenzima padrão e que MnSOD seja sintetizada quando FeSOD não pode ser ativada (GREENBERG et al., 1990; TSANEVA e WEISS, 1990).

A enzima Peroxidase, codificada pela ORF GDI\_2651 é uma Peroxirredoxina. As Peroxirredoxinas (Prxs) são uma família de enzimas peroxidase dependentes de cisteína que desempenham um papel dominante na regulação dos níveis de peróxido no interior das células. Estas enzimas, muitas vezes estão presentes em níveis elevados e capazes de rapidamente detoxificar peróxidos (PERKIN et al., 2015). A catalase e glutathione peroxidase também removem hidroperóxidos, estas foram consideradas por muito tempo como as principais enzimas responsáveis pela proteção das células contra tais agentes. No entanto, dados recentes sobre a reatividade e abundância das Prxs revelou que estas também são membros proeminentes da rede de defesa antioxidante. Existem indicações de que o papel de Prxs na defesa antioxidante é mais complexo do que a remoção de hidroperóxidos (POYNTON e HAMPTON, 2014).

Outras proteínas com abundância aumentada foram NAD(P)H:quinona oxidoredutase e NADH quinona oxidoredutase Subunidade F, estas são enzimas amplamente distribuídas e altamente induzíveis que reduzem substratos de quinona para hidroquinonas por uma reação de dois elétrons. Esta reação diminui o nível de quinona e, assim, minimiza a oportunidade para a geração de intermediários reativos de oxigênio por ciclos redox e para a depleção de grupos tiol intracelulares (DINKOVA-KOSTOVA e TALALAY, 2010).

Proteínas envolvidas com processo de transcrição e tradução também foram identificadas com abundância alterada sob 30 minutos de exposição ao oxidante. Quanto a transcrição ocorreu maior abundância das proteínas: Reguladora de resposta de ligação ao DNA (mtrA) e Regulador transcricional (Família MarR). Ambas são proteínas reguladoras, sendo que proteína de ligação ao DNA está envolvida no sistema de transdução de sinal e na regulação da transcrição. Indicando que após o estímulo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ocorre a transdução de sinal favorecendo a transcrição de genes. Quanto ao regulador transcricional MatR, ele foi primeiramente descrito em *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* como um repressor do operon *matABC*, envolvido na captação e conversão de malonato a acetil-CoA (LEE et al., 2000). Portanto, a expressão de MatR em *G. diazotrophicus* PAL5 indica uma potencial estratégia da bactéria para utilização do malonato como fonte de carbono.

Duas proteínas referentes a tradução também tiveram abundância aumentada nessa condição, ambas codificam proteínas da subunidade maior do ribossomo. Uma definida como Proteína L3 50S ribossomal, sendo caracterizada por ligar-se diretamente próximo da extremidade 3' do rRNA 23S, onde nucleia a montagem da subunidade 50S; essencial para a atividade de peptidiltransferase. A outra proteína foi definida pelo Blast2GO como Proteína L28 50S ribossomal, sendo também requerida para montagem da subunidade 70S do ribossomo.

Uma Nucleosídeo difosfato cinase (NDK) também foi mais abundante na presença do oxidante por 30 minutos, esta proteína é requerida para a síntese de nucleosídeos trifosfato (NTP) que não o ATP. Esta enzima provê nucleosídeos trifosfatados para a síntese de ácidos nucleicos, citosina trifosfato (CTP) para síntese de lipídeos, uracila trifosfato (UTP) para síntese de polissacarídeos e guanossina trifosfato (GTP) para o alongamento de proteínas, transdução de sinais, síntese proteica e metabolismo de energia (SUNDIN et al., 1996). Assim, NDK funciona no crescimento bacteriano, virulência, sinalização celular e síntese de polissacarídeos.

Proteínas do Transportador ABC também tiveram abundância aumentada em 30 minutos de exposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo identificadas duas proteínas pertencentes a esse sistema, porém apenas uma pôde ser classificada quanto ao seu processo biológico pelo Blast2GO. As duas proteínas foram nomeadas como Proteína do Transportador ABC. A proteína que foi caracterizada é uma proteína envolvida com ligação de ATP ao sistema de transporte do tipo ABC para o transporte de Fe<sup>+3</sup>, podendo atuar também no transporte de vitamina B12.

No tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocorreu a expressão de duas proteínas únicas, ou seja, proteínas que só se expressaram nessa condição, estas proteínas foram identificadas e classificadas como Cobalto Quelatase e Reguladora transcricional de choque frio. A proteína Cobalto Quelatase foi descrita por Raux e colaboradores (1998) como uma proteína envolvida na síntese de cobalamina, que insere cobalto durante a biossíntese de cobalamina (vitamina B12). A cobalamina (vitamina B12) é um cofator tetrapirrólico contendo cobalto envolvida em reações de rearranjo intramolecular e, recentemente, tem sido sugerido por ser um antioxidante intracelular. Ferrer e colaboradores (2016) investigaram o efeito da adição exógena de cobalamina em parâmetros de estresse oxidativo em *Leptospirillum* grupo II estirpe CF-1. Os resultados mostraram que a suplementação externa de cobalamina reduz os níveis de EROs intracelulares e os danos à biomoléculas, e também estimula o crescimento e a sobrevivência das células expostas ao estresse oxidativo exercida pelo íon férrico, peróxido de hidrogênio, cromato e diamida. Além disso, a exposição da estirpe CF-1 ao estresse oxidativo resultou na ativação da transcrição do gene *cbiA* que codifica CbiA da via biossintética da cobalamina. Estes dados sugerem que a cobalamina tem um papel importante na proteção redox da estirpe CF-1 *Leptospirillum*, suportando a sobrevivência do microrganismo sob condições ambientais extremamente oxidantes.

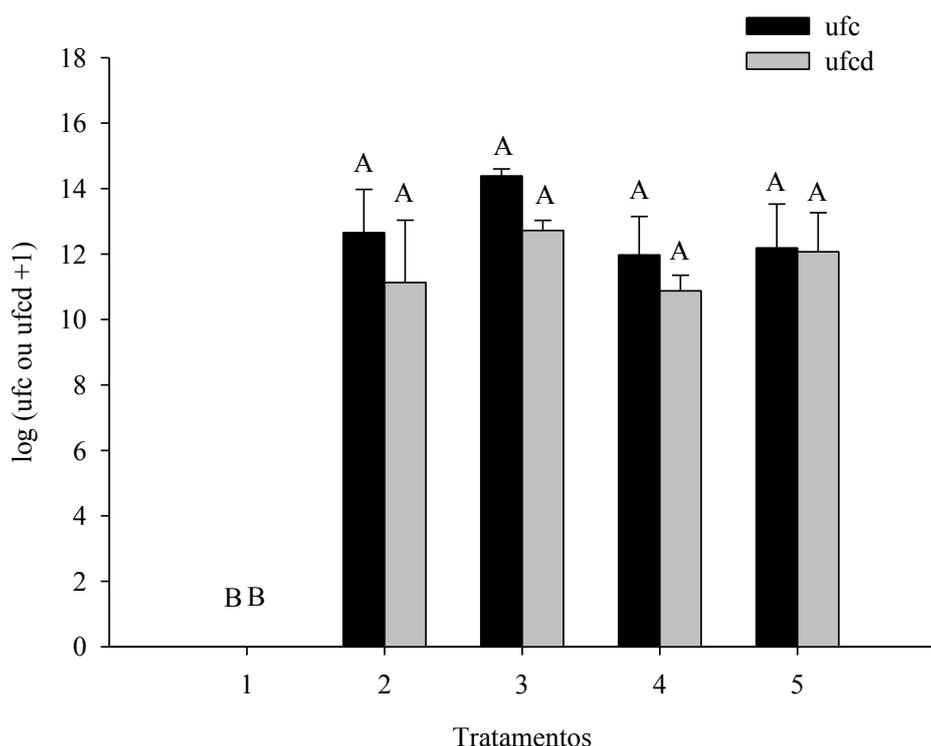
E o regulador transcricional de choque frio já foi descrito anteriormente na presença de peróxido de hidrogênio por 15 minutos, onde nessa condição teve sua abundância aumentada. Enquanto que quando exposta ao peróxido por 30 minutos essa proteína apareceu apenas no tratamento com a presença do oxidante, deixando de ser expressa no tratamento controle. Indicando que é uma proteína do metabolismo primário da bactéria, onde aos 30 minutos ela não é mais expressa. A ocorrência dessa proteína aos 30 minutos só ocorreu na presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Entre as proteínas que tiveram abundância diminuída, foram identificadas proteínas envolvidas em diferentes processos celulares como transcrição, tradução, reação de oxidação-redução, entre outros. É interessante perceber que aos 30 minutos já inicia o decréscimo na abundância de proteínas envolvidas com reações de oxidação-redução. Isso indica que nesse

momento o ambiente oxidante, ao qual a bactéria estava submetida, já estava mudando ao ponto de alterar a expressão das proteínas envolvidas na transcrição, tradução processos de oxidação-redução.

### 5.3. Avaliação em plantas de arroz

Os resultados da contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) em meio LGI-P modificado de raízes de plantas de arroz, inoculadas ou não com a estirpe PAL5 contendo o plasmídeo pMP7604 que expressa constitutivamente o gene repórter *mcherry* são apresentados na figura 7.

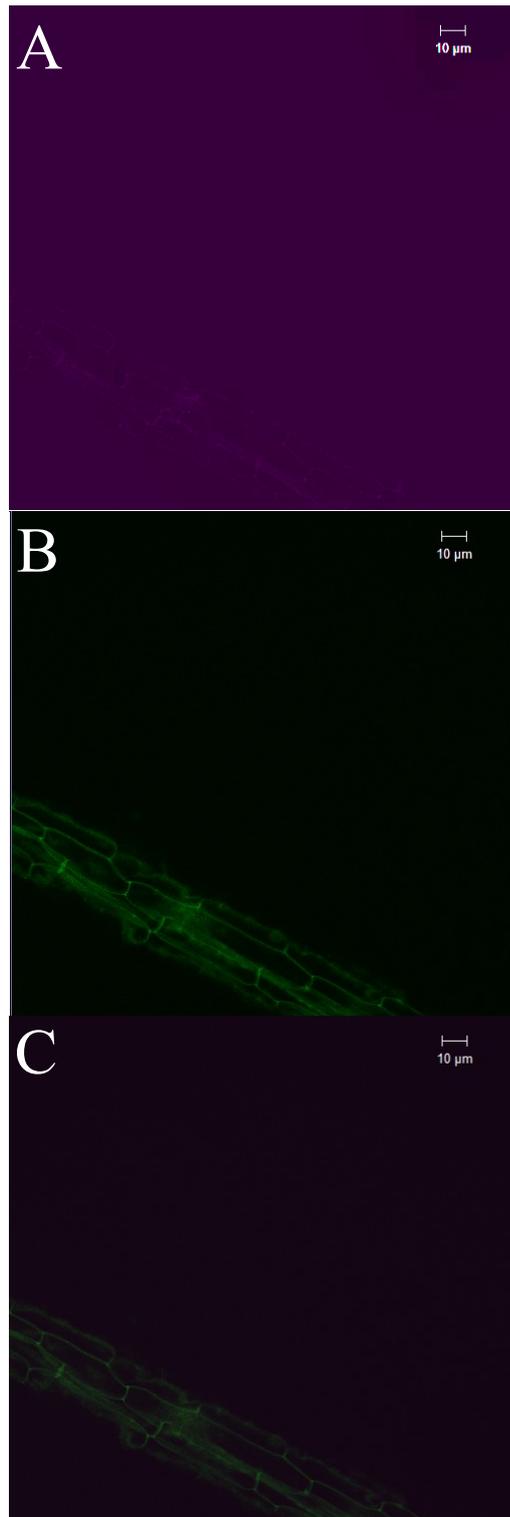


**Figura 7:** Contagem de células de *G. diazotrophicus* PAL5 após maceração de raízes de arroz inoculadas ou não com células de PAL5 expostas ou não ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100µM). Após a maceração, o macerado foi plaqueado em meio LGI-P modificado Tc<sub>20</sub> sólido e UFC foi contada após 96 horas de incubação a 30°C. Sendo: T1= sem inoculação; T2= inoculado sem exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; T3= inoculado com exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 15 minutos; T4= inoculado com exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 minutos; T5= inoculado com exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 60 minutos. As letras representam médias que diferiram pelo teste de Scheffe's a 5% de probabilidade. ufc representa raízes lavadas e ufdc representam raízes desinfestadas superficialmente.

A análise dos resultados mostrou que não houve diferença significativa na população das bactérias entre os tratamentos sugerindo que a colonização não foi afetada pelo estresse oxidativo induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Provavelmente a *G. diazotrophicus* PAL5 possui a capacidade de se defender rapidamente contra EROs, tais como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ao ponto da colonização das raízes pela bactéria não ter sido afetada. Alquéres et al. (2013), verificou que *G. diazotrophicus* ativa enzimas detoxificantes de EROs para lidar com o desafio redox no início do processo de infecção. Os autores utilizaram reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) para analisar o perfil de expressão de seis enzimas detoxificadoras de EROs (uma superóxido dismutase, GDI\_2168; duas glutatona redutases, GDI\_2216 e GDI\_2280; e três catalases GDI\_0079, GDI\_0467, e GDI\_2359), encontradas no genoma de *G. diazotrophicus*.

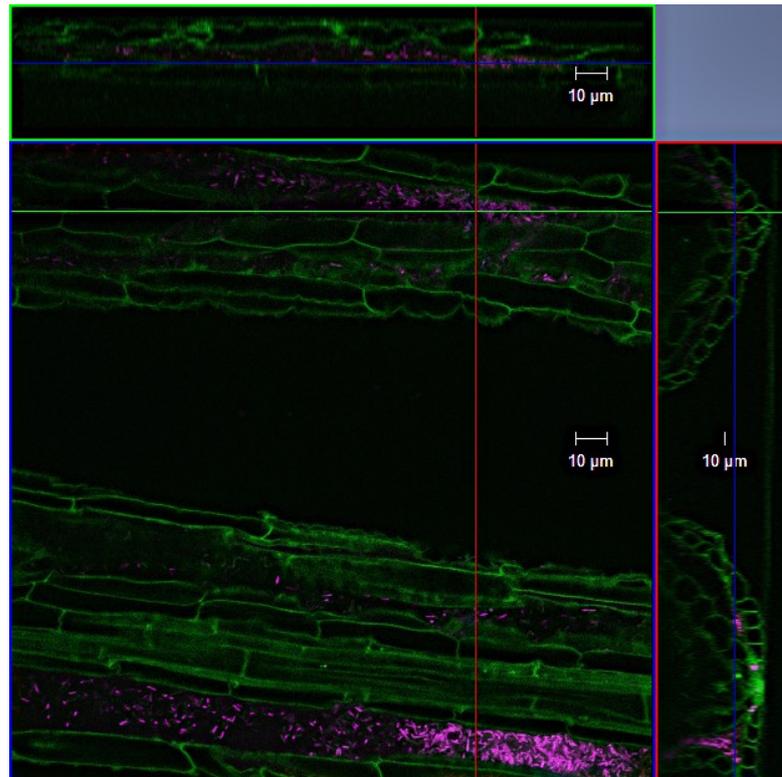
Todas essas enzimas tiveram um aumento do número de transcritos dentro das primeiras horas após a inoculação, esse resultado reforça a hipótese de que a bactéria neutraliza o forte desafio redox nas etapas iniciais da infecção, mantendo os níveis de expressão das enzimas detoxificadoras mais elevados, proporcionando assim que as bactérias desativem as EROs prejudiciais.

A análise da figura 8 confirma que não havia presença de células bacterianas no tratamento controle (não inoculado), indicando que o processo de desinfestação das sementes foi eficiente. A contagem de UFC também confirmou os dados já que não houve aparecimento de nenhuma colônia bacteriana nas placas de petri contendo meio de cultivo, derivados das diluições oriundas do macerado radicular.



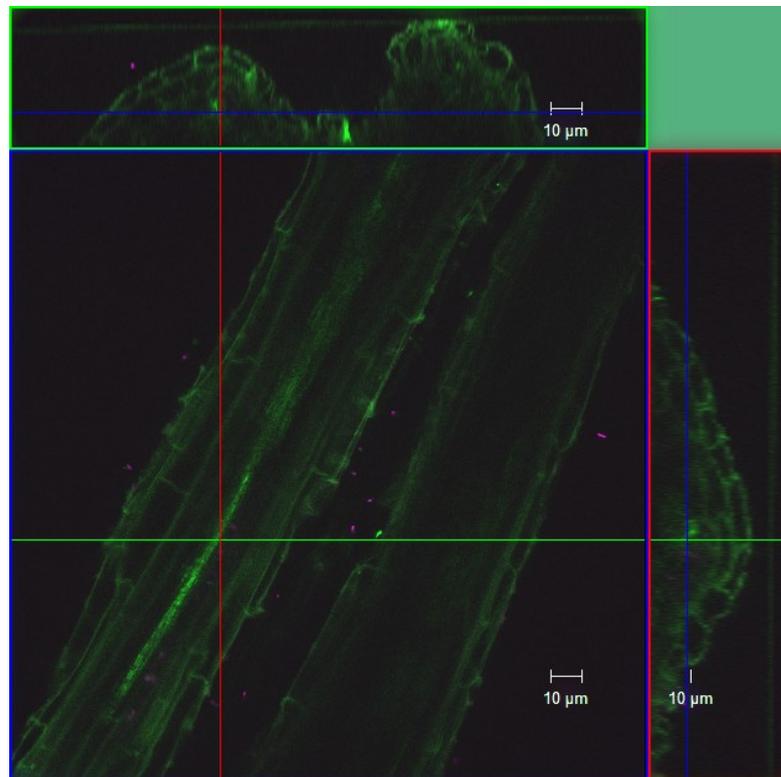
**Figura 8:** Imagem de raízes de arroz não inoculadas com *G. diazotrophicus* PAL5 contendo plasmídeo pMP7604, sob ação de três filtros diferentes do microscópio confocal. Barra de escala representa 10 µm.

A figura 9 mostra que a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* coloniza endofiticamente raízes de arroz, pois é possível verificar a presença de um grande número de células na raiz num intervalo de tempo de 10 dias após a inoculação. Este resultado corrobora com relatos de Rouws et al. (2010) que demonstraram que a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* coloniza raízes de arroz endofiticamente. Outros autores também já demonstraram a colonização de *G. diazotrophicus* nas plantas de batata doce (*Ipomoea batatas*), abacaxi (*Ananas comosus*) (BALDANI e BALDANI, 2005), arroz (*Oryza sativa*) (MUTHUKUMARASAMY et al., 2007) e *Arabidopsis thaliana* (DE SOUZA et al., 2016).



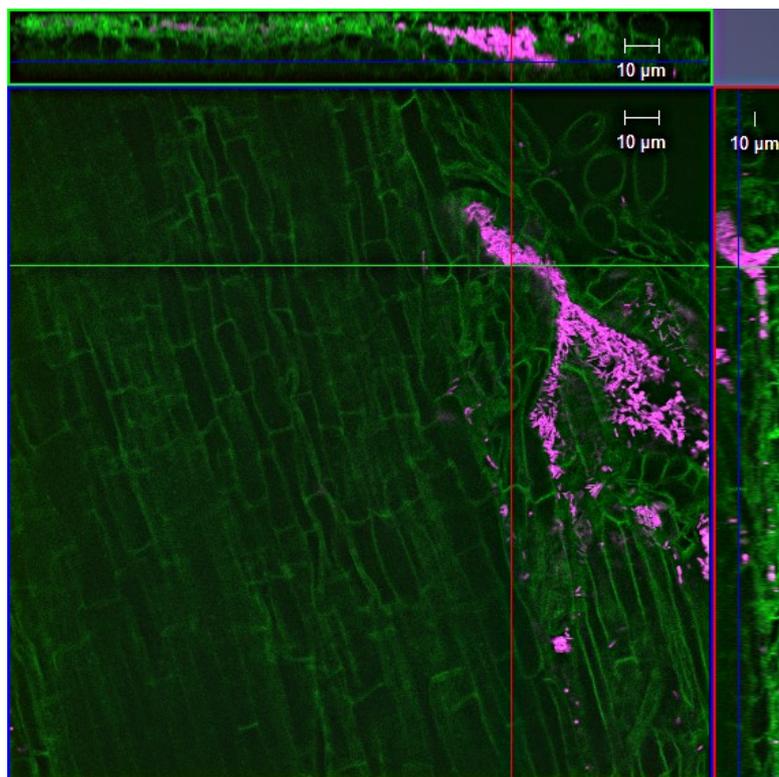
**Figura 9:** Imagem da raiz de arroz após 10 dias de inoculada com *G. diazotrophicus* PAL5 contendo plasmídeo pMP7604, sem a exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Barra de escala representa 10 μm.

Em relação a figura 10, a imagem confirma que *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 colonizou endofiticamente raízes de arroz, porém parece que a colonização foi afetada pelo tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Entretanto, os resultados de contagem de UFC mostraram que a população endofítica do tratamento após a exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não diferiu significativamente do tratamento controle (inoculado sem a exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Esse tratamento, inclusive, apresentou uma população endofítica maior que no tratamento controle, no entanto a diferença não foi significativa. A menor ocorrência de bactérias nessa foto deve ser atribuída a quantidade de lâminas examinadas no trabalho, as quais não permitiram avaliar um maior número de raízes. Dessa forma não foi possível visualizar as bactérias colonizando os tecidos conforme tinha sido observado na contagem de UFC. Têm-se evidências de que a bactéria estava colonizando endofiticamente os tecidos, devido o número de UFC observado nas placas oriundas de raízes desinfestadas superficialmente, no entanto, os resultados reforçam que campos avaliados não foram suficientes para visualizar a presença da bactéria.



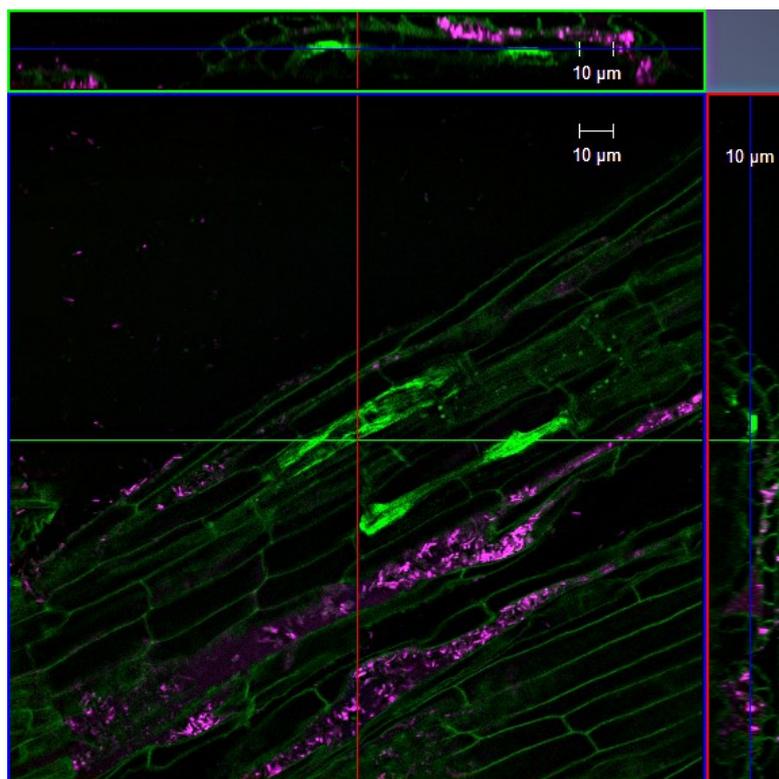
**Figura 10:** Imagem da raiz de arroz após 10 dias de inoculada com *G. diazotrophicus* PAL5 contendo plasmídeo pMP7604, expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 15 minutos momentos antes à inoculação. Barra de escala representa 10 µm.

A imagem confocal abaixo corrobora com os dados da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) das raízes de arroz referentes a exposição das células ao  $H_2O_2$  por 30 minutos. Podemos verificar na figura 11 que existe uma alta população bacteriana endofítica, novamente mostrando que o estresse oxidativo induzido momentos antes à inoculação não afetou a colonização de *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 em raízes de arroz cultivadas nas condições estabelecidas neste estudo.



**Figura 11:** Imagem da raiz de arroz após 10 dias de inoculada com *G. diazotrophicus* PAL5 contendo plasmídeo pMP7604, expostas ao  $H_2O_2$  por 30 minutos momentos antes à inoculação. Barra de escala representa 10 µm.

Resultados similares foram obtidos quando as células de *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 foram expostas por 60 minutos ao  $H_2O_2$  (Figura 12). Pode-se observar a colonização das raízes de arroz não foi afetada mesmo após a exposição ao tempo de 60 minutos.



**Figura 12:** Imagem da raiz de arroz após 10 dias de inoculada com *G. diazotrophicus* PAL5 contendo plasmídeo pMP7604, expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 60 minutos momentos antes à inoculação. Barra de escala representa 10 μm.

A análise conjunta de todas as imagens desse estudo sugere que a estirpe selvagem de *G. diazotrophicus* possui um sistema de defesa eficiente contra o estresse oxidativo. Isso porque mesmo após resistir o estresse induzido *in vitro*, também foi capaz de resistir às espécies reativas de oxigênio liberados pela planta de arroz no início da infecção. Santos e colaboradores (2001), afirmaram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e superóxido estão presentes nos processos de infecção e no desenvolvimento pleno da interação planta-bactéria desde o início do processo de colonização. Alquéres et al. (2013), avaliaram os níveis de EROs nas fases iniciais da interação endofítica entre plantas de arroz e *G. diazotrophicus* com auxílio de sondas fluorescentes sensíveis a EROs. A inoculação com *G. diazotrophicus* provocou um acúmulo de EROs em dois picos; um pico transiente ocorreu 10 minutos após a inoculação e um segundo pico, que foi mais forte e mais longo, entre 10 e 24 horas após a inoculação bacteriana. Isso indica que bactérias diazotróficas endofíticas podem ser percebidas como um intruso, fazendo com que a planta aumente a produção de EROs em defesa. Nesse estudo também foi verificado que após 48 horas a resposta às EROs foi diminuída.

EROs podem agir de diferentes maneiras durante a colonização bacteriana. Nos dois primeiros minutos da interação planta-bactéria, os níveis de EROs na planta aumentam rapidamente e de forma transiente (CÁRDENAS et al., 2008). Porém, após 5 minutos, as bactérias ou exopolissacarídeos inibem o fluxo de EROs (SHAW e LONG, 2003).

Cepas de *Sinorhizobium meliloti* mutadas em genes envolvidos na defesa antioxidante (glutaciona redutase e catalase) tiveram sua capacidade de infectar a planta afetada. Além da infecção na planta hospedeira, a estirpe mutante também teve sua eficiência na fixação biológica de nitrogênio afetada (JAMET et al., 2003; HARRISON et al., 2005). De maneira parecida, a mutação de um gene de *S. meliloti* com similaridade a uma tioredoxina envolvido na produção de melanina afetou a resposta a paraquat (estresse oxidativo induzido) e fixação

simbiótica de nitrogênio (CASTRO-SOWINSKI et al., 2007). Alquéres et al. (2013) demonstraram que mutantes insercionais de superóxido dismutase e glutatona redutase em *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 tiveram a colonização prejudicada. Esses resultados indicam que os mutantes não foram capazes de sobreviver à produção inicial de EROs pela planta e, portanto, foram incapazes de realizar uma colonização eficaz.

Segundo Palma e colaboradores (2004), *Pseudomonas aeruginosa* responde precocemente ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado por células fagocitárias humanas através de uma regulação positiva de mecanismos de proteção, incluindo a produção de citotoxinas que poderiam prejudicar o funcionamento de células imunitárias; e uma regulação negativa do metabolismo primário, talvez influenciado por proteínas de interrupção do crescimento codificadas por PA0671 e PA3008 (com similaridade para Sula and SfiA de *Escherichia coli*).

Dessa maneira podemos inferir que *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 também responde precocemente ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> visando evitar que este afete sua colonização na planta. Com os resultados obtidos através da abordagem proteômica verifica-se que proteínas detoxificadoras de espécies reativas de oxigênio tem expressão aumentada em 30 minutos de exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, demonstrando que *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 responde rapidamente ao estresse de modo a diminuir a concentração de espécies reativas de oxigênio para níveis que não afetem seu desenvolvimento, bem como a colonização endofítica. Provavelmente porque durante seu processo evolutivo *G. diazotrophicus* desenvolveu estratégias eficientes para ultrapassar barreiras oxidativas nas plantas hospedeiras visando colonizar nichos vantajosos ao seu desenvolvimento. Tais estratégias podem ser a resposta rápida às espécies reativas de oxigênio.

## 6. CONCLUSÕES

A avaliação revelou que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> altera o proteoma de *G. diazotrophicus* estirpe PAL5<sup>T</sup> e que proteínas responsáveis pela defesa celular contra o estresse oxidativo tiveram sua maior abundância aos 30 após exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A proteína responsável pela detoxificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verificada neste trabalho é classificada como peroxirredoxina, corroborando com Seaver e Imlay (2001), os quais descreveram que em doses baixas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as peroxidases são as primeiras enzimas que atuam na defesa celular.

Além destas proteínas verificamos o aumento na abundância da superóxido dismutase e várias outras proteínas envolvidas com processos de oxidação-redução, indicando que diante do estresse oxidativo *G. diazotrophicus* estirpe PAL5<sup>T</sup> expressa proteínas que eliminam diretamente oxidantes.

Proteínas responsáveis pela defesa celular contra o estresse oxidativo tem sua maior abundância aos 30 minutos após exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indicando que aos 15 minutos a bactéria estava começando a perceber o ambiente oxidativo em que ela se encontrava.

A análise proteômica diferencial sugere que 60 minutos após a indução de estresse oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a estirpe PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus* já havia diminuído a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno e possíveis EROs oriundas do estresse oxidativo induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para níveis toleráveis.

Os resultados de colonização de plantas de arroz com células estressadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por diferentes intervalos de tempo sugerem que o estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não afeta a colonização desta bactéria na planta de arroz.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J. M.; CAPECCHI, M. R. N-formylmethionyl-sRNA as the initiator of protein synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 55, n. 1, p. 147, 1966.
- ALQUÉRES, S. M.; OLIVEIRA, J. H. M.; NOGUEIRA, E. M.; GUEDES, H. V.; OLIVEIRA, P. L.; CÂMARA, F.; BALDANI, J. I.; MARTINS, O. B. Antioxidant pathways are up-regulated during biological nitrogen fixation to prevent ROS-induced nitrogenase inhibition in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Archives of microbiology**, v. 192, n. 10, p. 835-841, 2010.
- ALQUÉRES, S.; MENESES, C.; ROUWS, L.; ROTHBALLER, M.; BALDANI, I.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 8, p. 937-945, 2013.
- ANJEM, A.; IMLAY, J. A. Mononuclear iron enzymes are primary targets of hydrogen peroxide stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p.15544 –15556, 2012.
- AFANAS'AV, I. B.; OSTRACHOVITCH, E. A.; KORKINA, L. G. Effect of rutin its copper complex on superoxide formation and lipid peroxidation in rat liver cromosomes. **FEBS Letters**, v. 425, p. 256-258, 1989.
- ARENCIBIA, A. D; VINAGRE, F.; ESTEVEZ, Y.; BERNAL, A.; PEREZ, J.; CAVALCANTI, J.; SANTANA, I.; HEMERLY, A. *Gluconacetobacter diazotrophicus* elicits a sugarcane defense response against a pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans*. **Plant Signaling and Behavior**, v.1, n. 5, p. 265-273, 2006.
- BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edge sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 2, p. 141-155, 1997.
- BAGGERMAN, G.; VIERSTRAETE, E.; DE LOOF, A.; SCHOOF, L. Gel-based versus gel-free proteomics: a review. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 8, n. 8, p. 669-677, 2005.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L. V.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, v.29, p.911-922, 1997.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n.3, p. 549-579, 2005.
- BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R. S.; SCHWAB, S.; OLIVARES, F. L. HEMERLY, A. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; NOGUEIRA, E. M.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDOTTO, L. E. B.; SOARES, L. H. B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V. L. D.; CARVALHO, T. L. G.; ALVES, B. J. R.; JAMES, E. K.; JANTALIA, C. P.; FERREIRA, P. C. G.; VIDAL, M. S.; BODDEY, R. M. Fixação Biológica de Nitrogênio em Plantas da Família Poaceae (antiga gramineae). In: Mateus Rosas Ribeiro; Clístenes Willians Araújo do Nascimento; Mateus

Rosas Ribeiro Filho; José Ramon Barros Cantalice.. (Org.). **Tópicos em Ciência do Solo (Topics in Soil Science)**. Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. VI, p. 203-272, 2009.

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

BARBOSA, M. H. P. Perspectivas para o melhoramento da cana-de-açúcar. **Simpósio de Atualização em Genética e Melhoramento de Plantas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000. p.1-17.

BARLOY-HUBLER, F.; CHERON, A.; HELLEGOUARCH, A.; GALIBERT, F. Smc01944, a secreted peroxidase induced by oxidative stresses in *Sinorhizobium meliloti* 1021. **Microbiology**, v. 150, n. 3, p. 657-664, 2004.

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

BEECKMAN, D. S. A.; VANROMPAY, D. C. G. Bacterial Secretion Systems with an Emphasis on the Chlamydial Type III Secretion System. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 12, p. 17-42, 2010.

BENHAMOU, N.; GAGNÉ, S.; QUÉRÉ, D.L.; DEHBI, L. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect on the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Phytophthora ultimum*. **Phytopathology**, v. 90, p. 45-56, 2000.

BERTALAN, M.; ALBANO, R.; DE PADUA, V.; ROUWS, L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K.; SCHWAB, S.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, A.; FRANCA, L.; MAGALHÃES, V.; ALQUERES, S.; CARDOSO, A.; ALMEIDA, W.; LOUREIRO, M. M.; NOGUEIRA, E.; CIDADE, D.; OLIVEIRA, D.; SIMÃO, T.; MACEDO, J.; VALADÃO, A.; DRECHSEL, M.; FREITAS, F.; VIDAL, M.; GUEDES, H.; RODRIGUES, E.; MENESES, C.; BRIOSO, P.; POZZER, L.; FIGUEIREDO, D.; MONTANO, H.; JUNIOR, J.; DE SOUZA FILHO, G.; MARTIN QUINTANA FLORES, V.; FERREIRA, B.; BRANCO, A.; GONZALEZ, P.; GUILLOBEL, H.; LEMOS, M.; SEIBEL, L.; ALVES-FERREIRA, M.; SACHETTOMARTINS, G.; COELHO, A.; SANTOS, E.; AMARAL, G.; NEVES, A.; PACHECO, A. B.; CARVALHO, D.; LERY, L.; BISCH, P.; ROSSLE, S. C.; URMENYI, T.; RAELE PEREIRA, A.; SILVA, R.; RONDINELLI, E.; VON KRUGER, W.; MARTINS, O.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **BMC Genomics**, v. 10, p. 450, 2009.

BETTERIDGE, J. What is oxidative stress? **Metabolism**, v. 49, p. 3-8, 2000.

BISCH, P. M. Genômica Funcional: Proteômica. In: MIR, Luís et al (Org.). **Genômica**. São Paulo: Atheneu, Cap. 8. p. 139-162, 2004.

- 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. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, p. 366-71, 2005.
- BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, n. 6, p. 1037-1053, 2000.
- BOLWELL, G. P. Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. **Current Opinion in Plant Biology**, Danvers, v. 2, p. 287-294, 1999.
- BORGES, W. C.; NEVES, L. X. Análise proteômica: princípios e aplicações. In: MOREIRA, L. M. **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, cap. 09, p. 183-198, 2015.
- BOURNE, L. C.; RICE-EVANS, C. A. Detecting and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in humans: pharmacokinetics or urinary excretion of dietary ferulic acid. In: **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, (Part A), p. 91-151, 1999.
- BROWN, O. R.; SMYKRANDALL, E.; DRACZYNSKALUSIAK, B.; FEE, J. A. Dihydroxy-acid Dehydratase, a (4Fe-4S) Cluster-Containing Enzyme in *Escherichia coli*: Effects of Intracellular Superoxide Dismutase on Its Inactivation by Oxidant Stress. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.319, n.1, p. 10-22, 1995.
- BSAT, N.; HERBIG, A.; CASILLAS-MARTINEZ, L.; SETLOW, P.; HELMANN, J. D. *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. **Molecular Microbiology**, v. 29, p.189-198, 1998.
- CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, Barcelona, v. 3, p. 3-8, 2000.
- CARNEIRO JR, J. B. **Efeito do tratamento térmico e da inoculação de bactérias endofíticas no controle do raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar**. Tese de Doutorado, Campos dos Goytacases: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006. 212p.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.
- CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant & Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.
- CELIS, J. E.; KRUGHØFFER, M.; GROMOVA, I.; FREDERIKSEN, C.; ØSTERGAARD, M.; THYKJAER, T.; GROMOV, P.; YU, J.; PÁLSDÓTTIR, H.; MAGNUSSON, N.; ØRNTOFT, T. F. Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. **FEBS letters**, v. 480, n. 1, p. 2-16, 2000.
- CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da Cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2004.

CHAN, F. Y.; TORRIANI, A. PstB Protein of the Phosphatase-Specific Transport System of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 13, p. 3974-3977, 1996.

CHAN, P. F.; O'DWYER, K. M.; PALMER, L. M.; AMBRAD, J. D.; INGRAHAM, K. A.; SO, C.; LONETTO, M. A.; BISWAS, S.; ROSENBERG, M.; HOLMES, D. J.; ZALACAIN, M. Characterization of a novel fucose-regulated promoter (P<sub>fcsK</sub>) suitable for gene essentiality and antibacterial mode-of-action studies in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 6, p. 2051-2058, 2003.

CIANCIOTTO, N. P. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. **Trends in Microbiology**, v. 13, p. 581-588, 2005

CHEN, S.; HARMON, A. C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v.6, p.5504-16, 2006.

CHEYON, P. L.; ARCHIBALD, F. S. Manganese complexes and the generation and scavenging of hydroxyl free radicals. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 5, p. 325-333, 1988.

CHIANG, S. M.; SCHELLHORN, H. E. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 525, n. 2, p. 161-169, 2012.

CHRISTMAN, M. F.; MORGAN, R. W.; JACOBSON, F. S.; AMES, B. N. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. **Cell** v. 41, p. 753-762, 1985.

COMPAN, I.; TOUATI, D. Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 1687-1696, 1993.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (BRAZIL). **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, primeiro levantamento, abril/2013** – Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: CONAB, 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (BRAZIL). **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, primeiro levantamento, abril/2015** - Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: CONAB, 2015.

CORNELIS, P.; WEI, Q.; ANDREWS, S. C.; VINCKX, T. Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. **Metallomics**, v. 3, n. 6, p. 540-549, 2011.

da SILVA, R. A. ***Gluconacetobacter diazotrophicus*: estudos de mecanismos de biocontrole contra o raquitismo do raquitismo da soqueira (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) em cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos de *Saccharum*)**. Tese de doutorado. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009. 214p.

DAWSON, R. J. P.; LOCHER, K. P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. **Nature**, v. 443, n. 7108, p. 180-185, 2006.

DELEPELAIRE, P. Type I secretion in gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1694, n. 1, p. 149-161, 2004.

DE OLIVEIRA, M. V. V.; INTORNE, A. C.; VESPOLI, L. D. S.; MADUREIRA, H. C.; LEANDRO, M. R.; PEREIRA, T. N.; OLIVARES, F. L.; BELBERT-MOLINA, M. A.; DE SOUZA FILHO, G. A. Differential effects of salinity and osmotic stress on the plant growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **Archives of microbiology**, v. 198, n. 3, p. 287-294, 2016.

DE SOUZA, R. A. L. S.; DE SOUZA, S. A.; DE OLIVEIRA, M. V. V.; FERRAZ, T. M.; FIGUEIREDO, F. A. M. M. A.; DA SILVA, N. D.; RANGEL, P. L.; PANISSET, C. R. S.; OLIVARES F. L.; CAMPOSTRINI, E.; DE SOUZA FILHO, G. A. Endophytic colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its effect on plant growth promotion, plant physiology, and activation of plant defense. **Plant and Soil**, v. 399, n. 1-2, p. 257-270, 2016.

D'HAENZE, W.; HOLSTERS, M. Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 12, p. 555-561, 2004.

DILKS, K.; ROSE, R.W.; HARTMANN, E.; POHLSCHRÖDER, M. Prokaryotic Utilization of the Twin-Arginine Translocation Pathway: a Genomic Survey. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 4, p. 1478-1483, 2003.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TALALAY, P. NAD (P) H: quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 501, n. 1, p. 116-123, 2010.

DÖBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em Fixação Biológica de Nitrogênio no Brasil. **Estudos Avançados**, v.4, n.8, p. 144-152, 1990.

DÖBEREINER J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, v. 13, p. 1-13, 1992.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F.; REIS, V. M. Endophytic diazotrophs: The key to BNF in gramineous plants. In: HEGAZI, N.A.; FAYEZ, M.; MONIB, M. **Nitrogen Fixation with Non-Legumes**. Cairo: The American University in Cairo Press, 1993.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas em plantas não leguminosas**. Brasília: EMBRAPA – SPI: Itaguai-RJ. EMBRAPA – CNPAB, 60p, 1995.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; McCULLY, M.; REBOREDO, M. R.; FERNÁNDEZ, C.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems: a new role for the apoplast. **Plant Physiology**, v.105, p.1139-1147, 1994.

DOS SANTOS, M. F.; PÁDUA, V. L. M.; NOGUEIRA, E. M.; HEMERLY, A. S.; DOMONT, G. B.. Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. **Journal of Proteomics**, v.73, p. 917 - 931, 2010.

DUIJFF, B. J.; POUHAIR, D.; OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C.; LEMANCEAU, P. Implication of systemic induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* wcs417r and by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 903-910, 1998.

DUTTA, D.; GACHHUI, R. Nitrogen-fixing and cellulose producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov. isolated from Kombucha tea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.353-357, 2007.

DRECHSEL, Marcela Motta. **Antibiose de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra bactérias diazotróficas e fitopatogênica de cana-de-açúcar e caracterização molecular de genes envolvidos na síntese de substâncias antagônicas**. 2011. Tese (Doutorado em Agronomia, Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cells functions. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

ESCOLAR, L.; PEREZ-MARTIN, J.; LORENZO, V. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.2, p. 6223-6229, 1999.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSAT**, acesso 2014 <https://www.fao.org.br/>

FARR, S. B., KOGOMA, T. Oxidative Stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Microbiological Reviews**, v. 55, n.4, p. 561–585, 1991.

FENG, L.; TUMBULA-HANSEN, D.; MIN, B.; NAMGOONG, S.; SALAZAR, J.; ORELLANA, O.; SÖLL, D. (2005) in Aminoacyl-tRNA Synthetases, eds Ibba M, Cusack S (Landes, Georgetown, TX), p.314–319, 2005.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERRER, A.; RIVERA, J.; ZAPATA, C.; NORAMBUENA, J.; SANDOVAL, Á.; CHÁVEZ, R.; ORELLANA, O.; LEVICÁN, G. Cobalamin Protection against Oxidative Stress in the Acidophilic Iron-oxidizing Bacterium *Leptospirillum* Group II CF-1. **Frontiers in microbiology**, v. 7, 2016.

FINKEL, T. Redox-dependent signal transduction. **FEBS Letters**, v. 476, p. 52-54, 2000.

FILLOUX, A. The underlying mechanisms of type II protein secretion. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1694, p. 163–179, 2004.

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

FUENTES-RAMIREZ, L.; JIMENEZ-SALGADO, T., ABARCA-OCAMPO, I. R., CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, v. 154, n. 2, p. 145–150, 1993.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; WANG, E. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO MELLADO, J. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, v.51, p.1305-1314, 2001.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 1203-1209, 1998.

GALVÃO, P. G.. **Análise proteômica de estirpes selvagem PAL5 e mutante lao<sup>-</sup> de *Gluconacetobacter diazotrophicus* na presença e ausência de triptofano e o efeito de sua inoculação em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar.** Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

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. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, n. 3, p. 361-364, 1989.

GILMOUR, M. W.; GUNTON, J. E.; LAWLEY, T. D.; TAYLOR, D. E. Interaction between the IncHI1 plasmid R27 coupling protein and type IV secretion system: TraG associates with the coiled-coil mating pair formation protein TrhB. **Molecular microbiology**, v. 49, n. 1, p. 105-116, 2003.

GRAHAM, R. L. J.; GRAHAM, C.; MCMULLAN, G. Microbial proteomics: a mass spectrometry primer for biologists. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 1, p. 26, 2007.

GREENBERG, J. T.; MONACH, P.; CHOU, J. H.; JOSEPHY, P. D.; DEMPLE, B. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 16, p. 6181-6185, 1990.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 122-127, 2001.

GROMOV, P. S.; CELIS, J. E. From genomics to proteomics. **Molecular Biology**, v. 34, n. 4, p. 508-520, 2000.

GUALERZI, C. O.; PON, C. L. Initiation of mRNA translation in prokaryotes. **Biochemistry**, v. 29, n. 25, p. 5881-5889, 1990.

GUAY, D. R. P. Drug forecast-the peptide deformylase inhibitors as antibacterial agents. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 3, n. 4, p. 513, 2007

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence. **Lancet** v. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal**, v. 219, p. 1-14, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186 (Part B), p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine** 3. ed. New York, Oxford University Press; 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine** 3. ed. Clarendon, Oxford, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine** 4. ed. Oxford: Oxford university press, p. 888, 2007.

HALLMANN, J.; QUADT-HALMMANN, A.; MAHAFEE, W. F.; KLOEPFER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HÄUSER, R.; PECH, M.; KIJEK, J.; YAMAMOTO, H.; TITZ, B.; NAEVE, F.; TOVCHIGRECHKO, A.; YAMAMOTO, K.; SZAFIARSKI, W.; TAKEUCHI, N.; STELLBERGER, T.; DIFENBACHER, M. E.; NIERHAUS, K. H.; UETZ, P.. RsfA (YbeB) proteins are conserved ribosomal silencing factors. **PLoS Genetic**, v. 8, n. 7, p. e1002815, 2012.

HIKKS, J. J. **Bioquímica**. McGraw-Hill. México; 2001.

HENGGE, R.; BUKAU, B. Proteolysis in prokaryotes: protein quality control and regulatory principles. **Molecular microbiology**, v. 49, n. 6, p. 1451-1462, 2003.

HENRIQUES, J. A. P.; DAFRÉ, A. L.; PICADA, J. N.; MARIS, A. F.; SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, M.; AZEVEDO, J. L. (Ed). **Biotechnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Guaíba, Agropecuária. v. 1, p. 227-252, 2001.

HUMPRIES, K. M.; LI, S. Selective inactivation of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. **Biochemistry**, v. 37, p. 15835-15841, 1998.

HUREK, T.; REINHOLD, B.; VANMONTAGU, M.; KELLENBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain-BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 7, p. 1913-1923, 1994.

HUSAIN, S. R., CILLARD, J., CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2489-2491, 1987.

IANNELLI, M. A.; VAN BREUSEGEM, F.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; MASSACCI, A.. Tolerance to low temperature and paraquat-mediated oxidative stress in two maize genotypes. **Journal of experimental botany**, v. 50, n. 333, p. 523-532, 1999.

JACK, R.W.; TAGG J.R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiology Review**, v. 59, p. 171-200, 1995.

JAMES, R.; KLEANTHOS, C.; MOORE, G. R. The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. **Microbiology**, v. 142, p. 1569-1580, 1996.

JAMET, A.; SIGAUD, S.; VAN DE SYPE, G.; PUPPO, A.; HÉROUART, D.; Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti-Medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 16, n. 3, p. 217-225, 2003.

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

JACK, R. W.; TAGG J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiology Review**, v. 59, p. 171-200, 1995.

KEHRES, D. G.; JANAKIRAMAN, A.; SLAUCH, J. M.; MAGUIRE, M. E. Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *mntH* transcription by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup>. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 12, p. 3151-3158, 2002.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v.33, p.389–397, 1994.

KIRALY, Z.; EL-ZAHABY, H. M.; KLEMENT, Z. Role of extracellular polysaccharide (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. **Journal of Phytopathology**, v. 145, n. 2-3, p. 59-68, 1997.

KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochemistry**, v. 70, p. 337-349, 1988.

KOWALTOWSKI, A. J.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 333–343, 2009.

KÜHNER, S.; VAN NOORT, V.; BETTS, M. J.; LEO-MACIAS, A.; BATISSE, C.; RODE, M.; YAMADA, T.; MAIER, T.; BADER, S.; BELTRAN-ALVAREZ, P.; CASTAÑO-DIEZ, D.; CHEN, W. H.; DEVOS, D.; GÜELL, M.; NORAMBUENA, T.; RACKE, I.; RYBIN, V.; SCHMIDT, A.; YUS, E.; AEBERSOLD, R. Proteome organization in a genome-reduced bacterium. **Science** (New York, NY) v.326, p.1235–1240, 2009.

LAGENDIJK, E. L.; VALIDOV, S.; LAMERS, G. E.; De WEERT, S.; BLOEMBERG, G. V. Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. **FEMS microbiology letters**, v. 305, n. 1, p. 81-90, 2010.

LEFEVRE, K. R.; CORDES, M. H. J. Retroevolution of  $\lambda$  Cro toward a stable monomer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 5, p. 2345-2350, 2003.

LERY, L. M. S. **Análise proteômica da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus*: estabelecimento de um banco proteômico, análise diferencial e implicações na anotação do genoma.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Biofísica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Rio de Janeiro, 183 p., 2007.

LERY, L. M.; COELHO, A.; VON KRUGER, W. M.; GONÇALVES, M. S.; SANTOS, M. F.; VALENTE, R. H.; SANTOS, E. O.; ROCHA, S. L.; PERALES, J.; DOMONT, G. B.; TEIXEIRA, K. R.; BERTALAN, M.; FERREIRA, P. C.; BISCH, P. M. Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugarcane endophytic plant growth-promoting bacterium. **Proteomics**. v.8, n.22, p.4833, 2008.

LERY, L. M. S.; HEMERLY, A. S.; NOGUEIRA, E. M.; VON KRÜGER, W. M. A.; BISCH, P. M. Quantitative Proteomic Analysis of the Interaction Between the Endophytic Plant-Growth-Promoting Bacterium and Sugarcane. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, p. 562-576, 2011.

LI, R. P.; MACRAE, I. C. Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. **Soil Biology & Biochemistry**, v.24, p.413-419, 1992.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

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

LUSHCHAK, V. I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, Oxford, v. 153, p. 175-190, 2011.

MANN, M.; HENDRICKSON, R. C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annual review of biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 437-473, 2001.

MACHLIN, L. J., BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **The FASEB Journal**, v. 1, p. 441-445, 1987.

MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? **Critical Care**, v. 10, n. 1, p. 1, 2006.

MARCEAU, A. H. Functions of single-strand DNA-binding proteins in DNA replication, recombination, and repair. **Single-Stranded DNA Binding Proteins: Methods and Protocols**, p. 1-21, 2012.

MASSÉ, E.; GOTTESMAN, S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 7, p. 4620-4625, 2002.

MAZEL, D.; POCHET, S.; MARLIERE, P. Genetic characterization of polypeptide deformylase, a distinctive enzyme of eubacterial translation. **The EMBO journal**, v. 13, n. 4, p. 914, 1994.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

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

MEINNEL, T.; BLANQUET, S. Evidence that peptide deformylase and methionyl-tRNA (fMet) formyltransferase are encoded within the same operon in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 23, p. 7737-7740, 1993.

MENESES, C. H. S. G. **Definição do papel do exopolissacarídeo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 na sobrevivência à estresses abióticos e nas etapas iniciais do processo de colonização de raízes de arroz.** Tese de Doutorado. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010. 212p.

MENESES, C. H.; ROUWS, L. F.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 24, n. 12, p. 1448-1458, 2011.

MICHÁN, C.; MANCHADO, M.; DORADO, G.; PUEYO, C. In vivo transcription of the *Escherichia coli* oxyR regulon as a function of growth phase and in response to oxidative stress. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, p. 2759-2764, 1999.

MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, v.80, p. 808-811, 1990.

MISHRA, S.; IMLAY, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 525, n. 2, p. 145-160, 2012.

MOORE, P. M. Temporal and Spatial Regulation of Sucrose Accumulation in the Sugarcane Stem. **Australian Journal of Plant Physiology**. v. 22, p. 661-679, 1995.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. (Ed.). **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA, 2006. p. 449-542.

M'PIGA, P.; BELANGER, R. R.; PAULILTZ, T. C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic

bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 50, p. 301-320, 1997.

MUÑOZ-ROJAS, J.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, p. 57-66, 2005.

MUTHUKUMARASAMY, R. Antagonistic potential of N<sub>2</sub>-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal organism of red-rot of sugarcane. **Current Science**, v. 78, n. 9, p. 1063-1066, 2000.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; SESHADRI, S.; LAKSHMINARASIMHAN, C. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, v. 83, n. 2, p. 137-145, 2002.

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

NEIL, S. J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R. D.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signal molecules in Planting. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1237-1247, 2002a.

NEIL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, Danvers, v. 5, p. 388-395, 2002b.

NELSON, D. L. e COX, M. M. Lehninger: Princípios de Bioquímica. 3ª edição. Editora Sarvier, São Paulo, SP, Brasil. ISBN: 85-7378-125-4, 2002.

NIE, L.; WU, G.; ZHANG, W. Statistical application and challenges in global gel-free proteomic analysis by mass spectrometry. **Critical reviews in biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 297-307, 2008.

NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. Enzyme nomenclature: EC 3. Hydrolases, 2016. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/intro.html>>. Acesso em: 05 jul. 2016.

NYMAN, T. A. The role of mass spectrometry in proteome studies. **Biomolecular engineering**, v. 18, n. 5, p. 221-227, 2001.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry** v.250, p.4007, 1975.

OCHSNER, U. A.; VASIL, M. L.; ALSABBAGH, E.; PARVATIYAR, K.; HASSETT, D. J. Role of the *Pseudomonas aeruginosa oxyR-recG* operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of *katB-ankB*, *ahpB*, and *ahpC-ahpF*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 16, p. 4533-4544, 2000.

OGA, Z. **Fundamentos de toxicología**. 2.ed. Editora Atheneu, São Paulo, p. 39-44, 2003.

OLIVARES, F. L.; FERREIRA, F. P.; SILVA, L. G.; FAÇANHA, A. R.; RAMOS, A. C., NETTO, A. T.; CAMPOSTRINI, E.; REIS, V. M.; MIGUENS, F. C. Physiological changes induced on the host plant during the endophytic interaction between sugar cane and diazotrophic bacteria. **In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES**, 9., Leuven, 2002. Book of Abstracts, Leuven, p.38-38, 2002.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, v. 1. 40 p. (Embrapa-CNPAB, Documentos), 2003.

OROZCO-CARDENAS, M. L.; NARVAEZ-VASQUEZ, J.; RYAN, C. A. Hydrogen peroxide act as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 179-191, 2001.

PARK, O. K. Proteomic Studies in Plants. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. v.37, p.133-138, 2004.

PAULSEN, I. T.; BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. Proton-dependent multidrug efflux systems. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 4, p. 575-608, 1996.

PELLINEN, R. I.; KORHONEN, M.-S.; TAURIAINEN, A. A.; PALVA, E. T.; KANGASJÄRVI, J. Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 130, p. 549-560, 2002.

PEREZ, G.; DE PRATA, F.; CHINEA, A.; BERNAL, N.; O'RELLY, J. P. Recursos genéticos de la caña de azúcar. **Instituto Nacional de Investigaciones de La Caña de Azúcar** (INICA), 249p, 1997.

PICADA, J. A.; MARIS, A. F.; CKLESS, K.; SALVADOR, M.; SHROMOV-BORISOV, N.; HENRIQUES, J. A. P. Differential mutagenic, antimutagenic and cytotoxic responses induced by apomorfine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in bacteria and yeast. **Mutation Research**. v. 539, p. 29-41, 2003.

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

PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 284-288, 1997.

POOLE, L. B.; in: TORRES, M.; FUKUTO, J. M.; FORMAN, H. J. (Eds.). **Signal Transduction by Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Pathways and Chemical Principles**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 80-101, 2003.

POYNTON, R. A.; HAMPTON, M. B. Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1840, n. 2, p. 906-912, 2014.

RAJAGOPALAN, P. T.; PEI, D. Oxygen-mediated inactivation of peptide deformylase. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 273, p. 22305–22310, 1998.

RAO, M. V.; DAVIS, K. R. The physiology of ozone-induced cell death. **Planta**, Berlin, v. 213, p. 682-690, 2001.

RATLEDGE, C.; DOVER, L. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.54, p.881-942, 2000.

RAUX, E.; LANOIS, A.; RAMBACH, A.; WARREN, M. J.; THERMES, C. Cobalamin (vitamin B12) biosynthesis: functional characterization of the *Bacillus megaterium* cbi genes required to convert uroporphyrinogen III into cobyrinic acid a, c-diamide. **Biochemical Journal**, v. 335, n. 1, p. 167-173, 1998.

RAVEN, P. H.; EVERT R. F.; SUSAN, E. E. **Biologia Vegetal (Biology of Plants)**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 830 p.

REIS, V. M.; LAZARINI, A. C.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de nova bactéria fixadora de N<sub>2</sub> em raízes e colmos de cana-de-açúcar. In: **Congresso e Feira Nacional de Biotecnologia**, 1, Rio de Janeiro. Programa e resumos. Rio de Janeiro, SCTRJ/MCT/ABRABI, 1988.

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

REIS, V. M.; PERIN L.; REIS F. B. Uma nova estratégia para isolar *Gluconacetobacter diazotrophicus* de plantas de cana-de-açúcar. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, **Comunicado técnico** N° 35, p. 1-5, 1999.

RICE-EVANS, C.; BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Progress in lipid research**, v. 32, n. 1, p. 71-110, 1993.

ROBSON, R. L.; POSTGATE, J. R. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. **Annual Review Microbiology** v. 34, p. 183–207, 1980.

ROCHA. L.; COSTA. P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES N. S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. **Comunicado técnico**, Embrapa, Brasília, p.1-12, 2005.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V. A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; LE BIHAN, M. C.; THAYSEN-ANDERSEN, M.; ROEPSTORFF, P. 2D gels still have a niche in proteomics. **Journal of proteomics**, v. 88, p. 4-13, 2013.

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. **Letters in applied microbiology**, v. 51, n. 3, p. 325-330, 2010.

RUDMAN, D.; MEISTER, A. Transamination in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 200, n. 2, p. 591-604, 1953.

SANTOS, R.; HÉROUART, D.; SIGAUD, S.; TOUATI, D.; PUPPO, A. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 14, p. 86-89, 2001.

SALES, J. F.; GITAHY, P. M.; SKOT, L.; BALDANI, J. I. Use of endophytic bacteria as a vector to express the cry3A gene from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p.155-161, 2000.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M.; SA, T. M. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing acetobacteraceae members: their possible role in plant growth promotion. **Microbial Ecology**, v. 55, p. 130-140, 2007.

SCANDALIOS, J. G; GUAN, L.; POLIDOROS, A. N. Regulation and properties of plants catalase. In: FOYER, C. H.; MULIUNEAUX, P. M. (Ed.) **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1994.

SCANDALIOS, J. G; GUAN, L.; POLIDOROS, A. N. Catalases in Plants: gene structure, properties, regulation and expression. In: SCANDALIOS, J.G. (Ed.) **Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

SEAVER, L. C.; IMLAY, J. A. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 24, p. 7173-7181, 2001.

SHAMOO, Y. Single-stranded DNA-binding Proteins. **eLS**, 2001.

SHAW, S.; LONG, S. Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. **Plant Physiology**, v. 132, p. 2196-2204, 2003.

SIBBALD, M. J. J. B.; ZIEBANDT, A. K.; ENGELMANN, S.; HECKER, M.; De JONG, A.; HARMSSEN, H. J. M.; RAANGS, G. C.; STOKROOS, I.; ARENDS, J. P.; DUBOIS, J. Y. F.; VAN DIJL, J. M. Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 3, p. 755-788, 2006.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 215, n. 2, p. 213-219,1993.

SILVA, J. G. da. O Estudo dos complexos Zn (II)-CAT e Cu(II) – CAT utilizando a voltametria cíclica e a de pulso diferencial. **Circular técnica** – Embrapa. Brasília, DF. Dezembro, 2008.

SINGH, S.; BROCKER, C.; KOPPAKA, V.; CHEN, Y.; JACKSON, B. C.; MATSUMOTO, A.; THOMPSON, D. C.; VASILIOU, V. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 56, p. 89-101, 2013.

SOTO, M. J.; SANJUAN, J.; OLIVARES, J. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. **Microbiology**, v. 152, n. 11, p. 3167-3174, 2006.

SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. **Mayo Clinic Proceedings**. Vol. 63. No. 4. Elsevier, 1988.

SPEICHER, D. W. Overview of proteome analysis. In: **Proteome Analysis: Interpreting the Genome** (D. Speicher, ed.). Elsevier, The Netherlands, p. 1-18, 2004.

STADTMAN, E. R.; BERLETT, B. S.; CHOCK, P. B. Manganese-dependent disproportionation of hydrogen peroxide in bicarbonate buffer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 384-388, 1990.

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

STORZ, G.; TARTAGLIA, L. A.; FARR, S. B.; AMES, B. N. Bacterial defenses against oxidative stress. **Elsevier Science**, v. 6, p. 1-6, 1990.

STORZ, G.; IMLAY, J. A. Oxidative stress. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 188-194, 1999.

SUNDIN, G. W.; SHANKAR, S.; CHUGANI, S. A.; CHOPADE, B. A.; KAVANAUGH-BLACK, A.; CHAKRABARTY, A. M. Nucleoside diphosphate kinase from *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of the gene and its role in cellular growth and exopolysaccharide alginate synthesis. **Molecular microbiology**, v. 20, n. 5, p. 965-979, 1996.

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

TARDAT, B.; TOUATI, D. Two global regulators repress the anaerobic expression of MnSOD in *Escherichia coli*: Fur (ferric uptake regulation) and Arc (aerobic respiration control). **Molecular microbiology**, v. 5, n. 2, p. 455-465, 1991.

TEIXEIRA, K. R. S.; STEPHAN, M. P.; DÖBEREINER, J. Physiological studies of *Saccharobacter nitrocaptans*, a new acid tolerant N<sub>2</sub>-fixing bacterium. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN WITH NON-LEGUMES**, 4., Rio de Janeiro. Abstracts. Rio de Janeiro, Embrapa, p.149, 1987.

TSANEVA, I. R.; WEISS, B. *soxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 8, p. 4197-4205, 1990.

TSENG, T.-T., TYLER, B. M., SETUBAL, J. C. Protein secretion systems in bacterial host associations, and their description in the Gene Ontology. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1, 2009.

TOUATI, D. Iron and oxidative stress in bacteria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373(1), p. 1-6, 2000.

VARGAS, C.; DE PÁDUA, V. L. M.; NOGUEIRA, E. M.; VINAGRE, F.; MASUDA, H. P.; DA SILVA, F. R.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. Signaling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic diazotrophic bacteria: a genomic approach. **Symbiosis**, v. 35, p. 159-180, 2003.

VARGAS, L.; SANTA BRÍGIDA, A. B.; MOTA FILHO, J. P.; DE CARVALHO, T. G.; ROJAS, C. A.; VANEECHOUTTE, D.; VAN BEL, M.; FARRINELLI, L.; FERREIRA, P. C. G.; VANDEPOELE, K.; HEMERLY, A. S. Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a transcriptomic view of hormone pathways. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e114744, 2014.

WASINGER, V. C.; CORDWELL, S. J.; CERPAPOLJAK, A.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; WILKINS, M. R.; DUNCAN, M. W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K. L.; HUMPHERYSMITH, I. Progress with gene-product mapping of the mollicutes - *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, n. 1, p. 1090-1094, 1995.

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

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, G.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Bio-Technology**, v.14, n. 1, p. 61-65, 1996a.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, vol. 13, n. 13, p.19-50, 1996b.

XAVIER, R. P. **Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável da cultura de cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado) - UFRRJ, Seropédica – RJ, 2007.

ZHANG, W.; LI, F.; NIE, L. Integrating multiple ‘omics’ analysis for microbial biology: application and methodologies. **Microbiology**, v. 156, n. 2, p. 287-301, 2010.

ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology**, v.12, p.1047-1064, 2005.

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

YAMADA, Y.; HOSHINO, K. I.; ISHIKAWA, T. *Gluconacetobacter* nom.corrig. *Gluconacetobacter* (sic). In: validation of publication of new names and new combinations previously effectively published out side the IJSB. List no. 64. **International Journal Systematic of Bacteriology**, v. 48, p. 327-328, 1998.

YANG, T.; POOVAIAH, B. W. Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 6, p. 4097- 4102, 2002.

YEN, M. R.; TSENG, Y. H.; NGUYEN, E. H.; WU, L. F.; SAIER, M. H. Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. **Archives of Microbiology**, v. 177, n. 6, p. 441–450.

YOUNG, K. D. The selective value of bacterial shape. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 70, n. 3, p. 660-703, 2006.

YOUNG, K. D. Bacterial morphology: why have different shapes? **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 6, p. 596-600, 2007.

YUTING, C.; RONGLIANG, Z.; ZHONGJIAN, J.; YONG, J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, p. 19-21, 1990.

## 8. ANEXOS

**Tabela S1:** Proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 identificadas com abundância aumentada após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 15 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio).

Acesso	Contagem de Peptídeos	Peptídeo Único	Score	Anova (p)	Fold change	Quantificação PI R1	Quantificação PI R2	Quantificação PI R3	Média Quantificação PI	Quantificação PNI R1	Quantificação PNI R2	Quantificação PNI R3	Média Quantificação PNI
A9HA46	21	14	147,7369	0,034808	1,550178	93653,65	75827,37	59820,23	76433,75	48387,01	46654,34	52878	49306,45
A9H932	16	13	114,8323	0,040038	1,58608	60515,08	51290,76	37162	49655,94	33530,14	29691,96	30699,92	31307,34
A9HK34	10	7	85,8221	0,026718	1,668842	68166,5	72854,12	55550,23	65523,61	41144,99	30162,33	46481,45	39262,92
A9HKK6	4	4	27,4608	0,008526	1,833656	74592,03	72580,63	52155,25	66442,64	39358,51	33704,78	35641,91	36235,06
A9HM62	8	8	51,157	0,03931	1,918741	10046,39	17321,2	9208,768	12192,12	5772,818	6645,287	6644,585	6354,23
B5ZGW1	4	4	22,2045	0,042889	1,937526	23911,35	24151,64	16354,05	21472,35	15743,52	8588,488	8915,054	11082,36
A9H438	13	10	83,7837	0,049265	1,962977	25088,51	21109,28	11957,48	19385,09	10347,69	9712,097	9566,269	9875,353
B5ZK38	15	7	95,693	0,02495	2,157401	13241,65	14948,99	7712,376	11967,67	5254,925	6117,477	5269,39	5547,264
A9H338	4	3	32,1248	0,036028	2,238787	14628,13	17515,81	10545,6	14229,84	7942,37	3907,655	7218,132	6356,052
B5ZLB7	8	6	46,2335	0,014612	2,581702	17173,38	10837,44	10784,25	12931,69	6204,902	3492,454	5329,58	5008,979
A9HIT7	3	1	16,9554	0,038201	4,340349	4193,983	4492,03	1422,587	3369,533	1032,3	881,4568	415,2262	776,3277
A9HB30	5	4	30,3569	0,045115	4,690116	17882,49	5308,464	4010,314	9067,088	2017,137	1925,223	1857,34	1933,233
A5YJ12	5	2	28,8136	0,015924	6,147381	3909,632	2562,061	1057,537	2509,744	490,5451	459,9355	274,3062	408,2623
A9HM98	2	2	12,8693	0,020697	15,67262	3063,947	423,2793	539,4162	1342,214	103,9447	84,01556	68,96183	85,64071
A9HIW8	11	1	119,1477	0,047597	399,5455	8710,82	6610,586	50,95372	5124,12	17,15024	5,540063	15,78431	12,82487

**Tabela S2:** Proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 identificadas com abundância diminuída após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 15 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio).

Acesso	Contagem de Peptídeos	Peptídeo Único	Score	Anova (p)	Fold change	Quantificação PI R1	Quantificação PI R2	Quantificação PI R3	Média Quantificação PI	Quantificação PNI R1	Quantificação PNI R2	Quantificação PNI R3	Média Quantificação PNI
A9HRJ1	4	2	30,5863	0,045237	2,606331	762,1343	273,4851	329,1534	454,9243	964,8829	1621,012	971,1552	1185,683

**Tabela S3:** Proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 identificadas com abundância aumentada após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 30 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio).

Acesso	Contagem de Peptídeos	Peptídeo Único	Score	Anova (p)	Fold change	Quantificação PI R1	Quantificação PI R2	Quantificação PI R3	Média Quantificação PI	Quantificação PNI R1	Quantificação PNI R2	Quantificação PNI R3	Média Quantificação PNI
A9HS05	5	4	37,8279	0,017286	6,564385	6829,769	6897,23	2983	5570	1620,662	533,2425	391,6502	848,5182
A9H3R5	12	12	75,8513	0,020898	1,50787	9625,448	10436,06	10932,48	10331,33	8297,366	6506,096	5751,354	6851,605
Q288C7	3	1	15,9003	0,040706	1,725528	784,8202	733,449	567,401	695,2234	512,8972	401,1351	294,6816	402,9046
A9HIU7	3	3	17,4649	0,04391	3,23065	1669,921	3403,602	1211,495	2095,006	755,3141	809,3494	380,7714	648,4783
A9H0R5	3	3	16,7305	0,033305	9,602368	796,494	5267,772	1263,797	2442,688	343,5157	146,7691	272,8669	254,3839
B5ZED2	3	3	16,5401	0,010153	7,421317	1155,115	1239,5	699,8139	1031,476	272,1128	71,38164	73,47042	138,9883
A9HFY5	4	3	24,1471	0,034362	2,213802	1959,017	1785,139	1678,644	1807,6	527,775	633,0124	1288,754	816,5139
A9HRT4	15	12	105,5195	0,008064	2,079288	44972,49	48346,72	32060,76	41793,33	23020,55	19515,37	17763,56	20099,83
A9HJV3	7	5	55,5209	0,03275	4,569866	23457,57	30264,52	7845,007	20522,36	5655,728	3668,803	4147,876	4490,802
A9HEL6	2	1	11,4087	0,04882	21,53781	1311,441	1891,883	383,8775	1195,734	119,8039	45,1988	1,550951	55,51788
A9HPB9	4	1	21,941	0,034789	1,998687	3259,812	3269,389	3499,164	3342,788	1384,252	1132,107	2501,118	1672,492
A9HPI6	6	5	36,7162	0,046757	2,139705	7024,509	5756,252	4107,66	5629,474	3131,015	3168,044	1593,814	2630,958
A9HIE2	4	3	24,8596	0,009695	3,917507	993,041	860,6581	700,2203	851,3064	333,0075	120,7623	198,1548	217,3082
A9H338	4	3	32,1248	0,016827	2,916643	3811,318	5906,157	3346,164	4354,546	2024,748	967,6076	1486,642	1492,999
A9HL14	14	3	155,6088	0,037435	1,802401	13652,35	11067,34	7591,536	10770,41	6616,788	5256,574	6053,411	5975,591
B5ZHS1	4	2	28,5587	0,025522	1,823339	5795,514	6618,106	5261,67	5891,763	3658,345	3777,298	2258,272	3231,305

**Tabela S4:** Proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 identificadas com abundância diminuída após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 30 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio).

Acesso	Contagem de Peptídeos	Peptídeo Único	Score	Anova (p)	Fold change	Quantificação PI R1	Quantificação PI R2	Quantificação PI R3	Média Quantificação PI	Quantificação PNI R1	Quantificação PNI R2	Quantificação PNI R3	Média Quantificação PNI
A9H3R6	11	10	76,1957	0,000815	1,726826	46607,39	57016,2	53471,63	52365,08	89294,76	92484,36	89496,94	90425,35
B5ZJW6	10	1	109,9811	0,049429	4,548066	416,5065	237,797	304,748	319,6838	634,7317	2815,283	911,8147	1453,943
A9H0S9	8	7	44,5524	0,037246	1,792781	2103,32	3428,465	3370,818	2967,534	4489,649	4984,576	6486,193	5320,14
A9H159	3	2	17,4981	0,028646	2,026893	443,7238	828,9255	904,6938	725,7811	1499,645	1427,02	1486,576	1471,08
A9HCQ2	23	5	188,3765	0,038676	1,727881	6040,095	8972,636	11575,08	8862,603	14732,69	16208,04	14999,85	15313,53
A9HID1	6	5	44,2921	0,022192	2,923624	12581,06	17243,38	28779,18	19534,54	38618,87	61926,12	70789,97	57111,65
A9HRU3	8	8	46,6103	0,009556	1,517896	21427,43	26306,97	28527,24	25420,55	40735,04	38486,37	36535,8	38585,74
A9GZP4	9	6	69,4579	0,020967	1,647461	17720,63	18990,76	18009,43	18240,27	23160,08	35947,59	31042,76	30050,14
A9HGS4	2	2	11,1186	0,046752	1,912047	2249,683	3301,338	4904,599	3485,207	6365,173	5770,691	7855,777	6663,88
A9HJC5	5	5	55,5528	0,015664	1,751077	20362,02	30126,6	23461,7	24650,11	46747,6	46301,87	36443,24	43164,24
A9HFP7	16	11	103,1641	0,040726	1,588045	21700,17	27244,2	34090,25	27678,2	38172,49	42001,78	51688,46	43954,24

**Tabela S5:** Proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 identificadas com abundância aumentada após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 60 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio).

Acesso	Contagem de Peptídeos	Peptídeo Único	Score	Anova (p)	Fold change	Quantificação PI R1	Quantificação PI R2	Quantificação PI R3	Média Quantificação PI	Quantificação PNI R1	Quantificação PNI R2	Quantificação PNI R3	Média Quantificação PNI
A9HIG0	4	3	30,9321	0,027739	1,545612	153590,3	112568,5	107936,1	124698,3	90407,49	74773,59	76855,72	80678,93
A9HMW2	2	1	10,9485	0,001385	1,550208	3991,723	4337,033	4185,06	4171,272	2909,611	2715,171	2447,564	2690,782
A9HFP7	17	5	126,5817	0,035351	1,556155	144185,1	137475,6	103093	128251,2	78844,06	70799,07	97603,28	82415,47
A9HED6	15	6	119,8716	0,036062	1,576784	439437,1	419373,1	296927	385245,7	249634,9	271641,4	211695	244323,8
A5YJ43	37	2	244,2097	0,024499	1,612771	7814,862	6899,595	6551,182	7088,546	5178,788	3364,053	4642,938	4395,259
A9HGZ1	14	10	102,7196	0,029466	1,679985	299815,8	248374,1	181016,9	243068,9	144944,7	136956,1	152154,6	144685,1
A9HIQ1	13	4	96,7446	0,04003	1,681315	441857,4	408699,2	270543,9	373700,2	253276,6	213455,4	200067,7	222266,6
B5ZF81	2	1	11,5008	0,020476	1,686275	7652,609	9617,411	6320,385	7863,468	5127,105	4109,502	4753,049	4663,218
B5ZFS0	2	2	12,3796	0,04863	1,721196	13332	10061,46	9072,02	10821,83	7255,089	4451,586	7155,49	6287,388
B5ZLD5	8	4	45,6932	0,027436	1,759012	38991,89	26923,16	29246,44	31720,5	22257,24	14522,55	17319,61	18033,13
B5ZGN1	17	1	112,3355	0,013017	1,791287	3268,547	2078,967	2492,331	2613,282	1484,388	1406,703	1485,565	1458,885
B5ZL89	11	3	71,0591	0,032604	1,804019	21122,59	26155,62	18559,86	21946,03	16240,05	10627,33	9627,842	12165,08
A9HJU5	36	2	236,1086	0,016156	1,823347	8121,518	6207,307	5375,809	6568,211	4043,407	3732,616	3030,823	3602,282
A9HC17	6	3	33,3391	0,048173	1,910843	19712,66	19340,61	13546,82	17533,36	5855,506	10564,02	11107,64	9175,722
A9HIH5	23	13	165,155	0,033005	1,928485	539863	415146,2	310162,5	421723,9	275407,1	185801,1	194836,3	218681,5
A9HN56	1	1	5,4503	0,029383	2,069755	10498,42	6739,57	5869,854	7702,616	4103,132	2873,162	4188,237	3721,511
A9HH12	28	2	186,2256	0,025798	2,117425	26437,01	17207,42	16787	20143,81	11926,84	9715,804	6897,406	9513,35
A9HKV0	60	1	428,5267	0,030931	2,254536	11444,24	11455,7	8029,718	10309,89	2769,425	5965,435	4983,999	4572,953
A9HLH0	2	1	11,1074	0,003722	2,307458	6820,529	9406,187	6455,631	7560,783	3047,173	3038,712	3744,13	3276,672
B5ZF13	4	3	27,8031	0,004218	2,363609	32272,05	30953,46	23851,3	29025,6	15141,74	10478,48	11220,39	12280,2
A9HKQ2	2	1	11,0438	0,002889	2,871454	1636,085	1839,345	1309,779	1595,07	697,3538	520,4172	448,7052	555,4921
A9HP92	2	1	12,3112	0,02936	3,06205	6897,676	7681,22	3642,117	6073,671	3018,821	1313,38	1618,392	1983,531

**Tabela S6:** Proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 identificadas com abundância diminuída após o tratamento com Peróxido de Hidrogênio por 60 minutos em comparação com o tratamento controle (sem a presença do Peróxido de Hidrogênio) (Continua).

Acesso	Contagem de Peptídeos	Peptídeo Único	Score	Anova (p)	Fold change	Quantificação PI R1	Quantificação PI R2	Quantificação PI R3	Média Quantificação PI	Quantificação PNI R1	Quantificação PNI R2	Quantificação PNI R3	Média Quantificação PNI
A9HII9	8	2	50,306	0,121696	1,593931	8490,724	9454,81	6209,105	8051,546	6627,202	3165,076	5361,857	5051,378
B5ZL36	3	1	23,744	0,204777	1,596844	2408,79	3868,584	3564,4	3280,591	3031,689	989,0194	2142,56	2054,423
B5ZH77	4	1	23,0485	0,153253	1,615116	4679,054	4072,709	2857,572	3869,778	3622,785	1473,704	2091,437	2395,975
B5ZLM2	3	2	17,7068	0,228729	1,616552	3791,448	4686,88	2021,711	3500,013	1560,728	1799,766	3134,835	2165,11
A9HEC6	1	1	12,9774	0,134052	1,638359	131337,3	130437,6	81117,71	114297,5	42707,21	78775,01	87808,02	69763,41
A9HIY7	1	1	5,5722	0,179912	1,645485	35403,68	44157,99	43317,25	40959,64	32042,64	32039,13	10594,65	24892,14
B5ZGF9	19	1	144,236	0,148288	1,650492	5415,076	3857,427	2380,611	3884,371	2481,735	1969,619	2609,036	2353,463
A9HDW5	2	1	11,0358	0,207824	1,652218	2642,669	1173,792	1326,11	1714,19	1413,79	753,1543	945,581	1037,509
A9HIT7	2	1	12,2546	0,256431	1,657603	6761,805	6190,948	2906,269	5286,341	4071,094	3778,896	1717,45	3189,147
A9H7W9	1	1	5,5895	0,103114	1,658114	3994,381	4292,145	4223,924	4170,15	3848,451	1488,712	2207,824	2514,996
A9H535	20	1	176,3558	0,131731	1,658478	24305,18	41813	23241,94	29786,71	22794,61	12153,19	18932,99	17960,27
B5ZFU1	4	1	22,3221	0,060624	1,704071	3915,148	3834,366	3758,657	3836,057	3349,52	1745,663	1658,157	2251,113
A9HIM8	11	7	67,1508	0,050254	1,725818	195674	141576,1	103785,4	147011,8	88862,31	80824,08	85865,15	85183,85
A9H2L8	2	2	11,5734	0,072666	1,729642	11669,81	7759,216	5843,401	8424,144	4265,034	5297,256	5049,075	4870,455
B5ZL76	3	2	18,8143	0,05337	1,744024	113358	109263,8	69601,45	97407,73	59031,03	42902,38	65623,43	55852,28
B5ZK43	12	5	99,3957	0,053775	1,755635	68417,1	81265,29	59116,92	69599,77	53071,79	39176,71	26682,46	39643,65
A9HB05	19	9	256,4496	0,092743	1,769801	2716149	2600087	1321031	2212422	1326688	1285548	1138054	1250097
B5ZM29	2	1	11,2336	0,176832	1,791286	5136,823	3272,486	2112,454	3507,254	1820,572	1230,084	2823,202	1957,953
A9H1W7	3	1	17,8257	0,180627	1,806139	18752,82	18829,23	7430,123	15004,06	8617,99	8966,069	7337,712	8307,257
A9H137	12	5	86,8205	0,064615	1,862608	66274,89	59913,15	32329,88	52839,31	29237,13	26094,38	29773,88	28368,46

**Tabela S7:** Continuação

Acesso	Contagem de Peptídeos	Peptídeo Único	Score	Anova (p)	Fold change	Quantificação PI R1	Quantificação PI R2	Quantificação PI R3	Média Quantificação PI	Quantificação PNI R1	Quantificação PNI R2	Quantificação PNI R3	Média Quantificação PNI
A9HM50	2	1	17,5138	0,069377	1,885749	2525,512	1433,018	1369,639	1776,056	716,1878	887,0444	1222,26	941,8308
A9HDE0	6	1	40,9219	0,109701	1,888341	27041,2	26454,09	15102,02	22865,77	13186,67	6817,962	16322,13	12108,92
A9H1G0	13	1	108,5285	0,067085	1,935947	4867,804	4737,462	6111,727	5238,998	3607,131	3054,81	1456,563	2706,168
B5ZHP4	2	2	11,409	0,154189	2,021196	33990,76	20451,38	14758,98	23067,04	5071,009	13580,77	15585,94	11412,57
A9HHH4	4	4	28,2603	0,056222	2,026866	243199,4	172498,7	161684,2	192460,7	140552	85729	58583,51	94954,84
A9H7Q1	21	1	139,5207	0,079682	2,234332	3655,023	8665,25	6886,396	6402,223	2760,19	3968,58	1867,387	2865,386
A9HSP3	2	2	11,6453	0,054792	2,241396	130301,2	129821,4	69627,37	109916,7	70401,03	32959,02	43758,08	49039,38

**Tabela S8:** Proteína de *G. diazotrophicus* PAL5 identificada apenas no tratamento sem Peróxido de Hidrogênio na coleta de 60 minutos.

Acesso	Contagem de Peptídeos	Peptídeo Único	Score	Anova (p)	Fold change	Quantificação PI R1	Quantificação PI R2	Quantificação PI R3	Média Quantificação PI	Quantificação PNI R1	Quantificação PNI R2	Quantificação PNI R3	Média Quantificação PNI
B5ZI48	31	1	232,236	3,89E-06	Infinito	0	0	0	0	2394,147	1910,684	1098,881	1801,237

**Tabela S9:** Proteína de *G. diazotrophicus* PAL5 identificada apenas no tratamento com Peróxido de Hidrogênio na coleta de 30 minutos.

Acesso	Contagem de Peptídeos	Peptídeo Único	Score	Anova (p)	Fold change	Quantificação PI R1	Quantificação PI R2	Quantificação PI R3	Média Quantificação PI	Quantificação PNI R1	Quantificação PNI R2	Quantificação PNI R3
B5ZJX7	10	1	79,5376	0,01874	Infinito	512,1241	612,1475	7,080157	377,1173	0	0	0
A9HIW8	11	1	119,1477	0,026134	Infinito	26,8476	8,07871	1,677292	12,2012	0	0	0