

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXOPOLISSACARÍDEO
BACTERIANO EXTRAÍDO DE *Gluconacetobacter diazotrophicus***

TALYTA THEREZA GONÇALVES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

**CAMPINA GRANDE-PB
FEVEREIRO DE 2014**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXOPOLISSACARÍDEO
BACTERIANO EXTRAÍDO DE *Gluconacetobacter diazotrophicus***

TALYTA THEREZA GONÇALVES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Biotecnologia e Melhoramento Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses

**CAMPINA GRANDE-PB
FEVEREIRO DE 2014**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL-UEPB

G635a Gonçalves, Talyta Thereza.
Atividade antioxidante do exopolissacarídeo bacteriano extraído de *Gluconacetobacter diazotrophicus* [manuscrito] / Talyta Thereza Gonçalves. – 2014.
63 f. : il. color.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Centro de Ciências Humanas e Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba, 2014.

“Orientação: Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses, Departamento de Ciências Agrárias”.

1. Bactéria endofítica. 2. Fixação biológica de nitrogênio. 3. Bioquímica. 4. Exopolímero. I. Título.

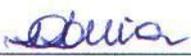
21. ed. CDD 572

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO EXTRAÍDO DE *Gluconacetobacter diazotrophicus*

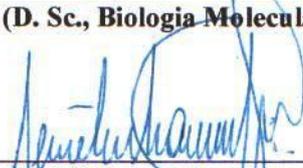
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Biotecnologia e Melhoramento Vegetal.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2014.

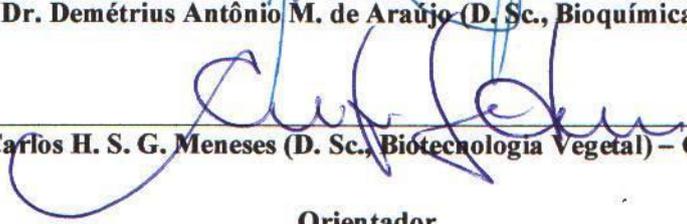
Banca Examinadora:



Prof.ª. Liziane Maria de Lima (D. Sc., Biologia Molecular) - Embrapa Algodão



Prof. Dr. Demétrius Antônio M. de Araújo (D. Sc., Bioquímica) - UFPB



Prof. Dr. Carlos H. S. G. Meneses (D. Sc., Biotecnologia Vegetal) – CCAA – UEPB

Orientador

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / EMBRAPA Algodão pelo acolhimento e oportunidade da realização do mestrado e deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Gadelha S. Gadelha Meneses pela orientação e apoio durante a realização deste trabalho;

Aos professores Liziane Maria de Lima e Demétrius Antônio Machado de Araújo, por participarem da banca examinadora deste trabalho, por meio de colaborações com críticas construtivas e sugestões que engrandeceram este trabalho final;

A todos os professores do programa pelo conhecimento transmitido;

Aos colegas de turma pela amizade construída durante esse tempo;

À minha família e amigos pelo apoio incondicional;

À Embrapa Algodão pela disponibilização das instalações para aulas e estágio;

À Embrapa Agrobiologia pelas estirpes disponibilizadas para a realização deste trabalho;

À Capes pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 . Importância da Fixação biológica de nitrogênio (FBN) em gramíneas	4
2.2. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	7
2.3. Processos de infecção e colonização por bactérias endofíticas	9
2.4. Exopolissacarídeos	12
2.5. Ligação entre o sistema respiratório e ROS	13
2.6. A influência de ROS na FBN	13
2.7. Sistema de defesa contra radicais livres	14
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo geral	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Bactérias e estirpes	17

4.2. Purificação e quantificação do EPS de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5.....	18
4.3. Ensaio de sensibilidade à Peróxido de Hidrogênio	19
4.4. Ensaio para detecção da atividade antioxidante do EPS de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5.....	20
4.4.1. Capacidade antioxidante total	20
4.4.2. Sequestro de radicais superóxido	20
4.4.3. Radicais Hidroxilas	20
4.4.4. Peroxidação lipídica	20
4.4.5. Poder redutor	21
4.4.6. Cálculo do IC ₅₀	21
4.4.7. Análise estatística	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1. Extração aquosa dos polissacarídeos de <i>G. diazotrophicus</i>	22
5.2. Sensibilidade à Peróxido de Hidrogênio	22
5.3. Capacidade Antioxidante Total	26
5.4. Sequestro de Radicais Superóxido	28
5.5. Radicais Hidroxila	29
5.6. Peroxidação Lipídica	30
5.7. Poder Redutor	32
5.8. IC ₅₀	33
6. CONCLUSÕES	35
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS	37

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Modelo esquemático do processo de adesão bacteriano por duas etapas, em contraste com o de uma etapa. A. Primeira fase (fase reversível); B. Segunda fase (fase irreversível) Fonte: HORI e MATSUMOTO (2010)10
- FIGURA 2 - Avaliação da sobrevivência das estirpes PAL5, MGD e CMGD, após exposição à H₂O₂. As células foram expostas a diferentes concentrações de H₂O₂ por 1 h. Porcentagem de células que sobreviveram ao tratamento, em comparação com as células não tratadas foi determinada por diluição em série, em placas e contagem de UFC. Barras representam o erro padrão. (*) representa a diferença estatística (Teste de Tukey, p <0,05)23
- FIGURA 3 - Avaliação da sobrevivência das estirpes PAL5, MGD e CMGD, após exposição à H₂O₂. As células foram expostas a diferentes concentrações de H₂O₂ por 1 h. Porcentagem de células que sobreviveram ao tratamento, em comparação com as células não tratadas foi determinada por diluição em série, em placas e contagem de UFC. Barras representam o erro padrão. Níveis obtidos para sobrevivência de PAL5, MGD e CMGD co-inoculados com 100 µg.ml⁻¹ de EPS de *G. diazotrophicus*. Barras representam o erro padrão. Diferentes letras indicam diferença estatística (Teste de Tukey, p <0,05)25
- FIGURA 4 - Relação entre as diferentes massas do exopolissacarídeos de *G. diazotrophicus* com a massa de ácido ascórbico com efeito semelhante no ensaio de avaliação da capacidade antioxidante total. Barras representam o erro padrão27

FIGURA 5 - Efeito inibitório de radicais superóxido pelo exopolissacarídeos de <i>G. diazotrophicus</i> em diferentes concentrações. Os dados foram expressos em Média \pm DP. Barras representam o erro padrão	29
FIGURA 6 - Efeito inibitório dos radicais hidroxilas pelo exopolissacarídeos de <i>G. diazotrophicus</i> em diferentes concentrações. Barras representam o erro padrão	30
FIGURA 7 - Inibição da peroxidação lipídica da gema de ovo pelos exopolissacarídeos da bactéria <i>G. diazotrophicus</i> em diferentes concentrações. Os dados foram expressos em Média \pm DP. Barras representam o erro padrão	31
FIGURA 8 - Poder redutor do exopolissacarídeos de <i>G. diazotrophicus</i> . Os dados são expressos como média. A atividade de poder redutor das amostras é expresso como percentual de atividade encontrada para 0,2 mg.mL ⁻¹ de ácido ascórbico. Os dados foram expressos em Média \pm DP. Barras representam o erro padrão	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação de estirpes bacterianas utilizadas no presente trabalho	17
----------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

^{15}N - Nitrogênio protonado

Abs - Absorbância

Amp^R – Estirpe Resistente à ampicilina

Amp^S – Estirpe Sensível à ampicilina

CAT - Catalase

CMGD – Mutante defectivo na síntese de exopolissacarídeos complementado geneticamente

CPS – Polissacarídeos capsulares

D.O. – Densidade Óptica

EPS - Exopolissacarídeos

EPS⁻ - Estirpe bacteriana defectiva na síntese de exopolissacarídeos

EPS⁺ - Estirpe bacteriana que produz exopolissacarídeos

ERMOS – Espécies reativas do metabolismo do oxigênio

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio

GSH - Glutathiona Reduzida

GSH-Px - Glutathiona Peroxidase

GSH-Rd - Glutathiona Redutase

GSSG - Glutathiona Oxidada

gumD⁻ - Estirpe bacteriana que não possui o gene *gumD* (Glicosiltransferase)

gumD::Tn5 - o gene *gumD* interrompido por um elemento de transposição

gumD⁺ - Estirpe bacteriana que possui o gene *gumD* (Glicosiltransferase)

IC₅₀ - concentração de amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais livres

Km^R - Resistente à Kanamicina

Km^S – Sensível à Kanamicina

LPS - Lipopolissacarídeos

MDA - Malonildialdeído

MGD - Mutante defectivo na síntese de exopolissacarídeos

MPBS - Ligand binding to mannan-binding proteins

N₂ – Nitrogênio atmosférico

NADH - Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADPH - Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato hidreto

NBT - Nitroazul de tetrazólio

PAL5 – Estirpe Selvagem de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

R² – Coeficiente de correlação

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SOD – Superóxido dismutase

SPCPs - Substâncias promotoras de crescimento das plantas

TBA - Ácido Tiobarbitúrico

Tc^S – Sensível à tetraciclina

UFCs – Unidades formadoras de colônia

RESUMO

Gonçalves, Talyta Thereza. Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, fevereiro, 2014. **ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO EXTRAÍDO DE *Gluconacetobacter diazotrophicus***. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo de alta demanda energética dependente de fatores ambientais, tais como baixas tensões de oxigênio e nitrogênio fixado, que são detectados por proteínas que fazem parte de sistemas de transdução de sinal. A necessidade de responder as concentrações de nitrogênio fixado e oxigênio externo e de prover energia suficiente para sustentar a FBN, impõe diferentes mecanismos regulatórios aos organismos fixadores de nitrogênio que dependem da sua fisiologia e estilo de vida. Apesar de vários estudos já terem sido realizados sobre a fisiologia e FBN da bactéria *G. diazotrophicus*, ainda não foi possível fazer uma caracterização ampla de aspectos fisiológicos importantes para a associação com plantas. *G. diazotrophicus* requer exopolissacarídeos a fim de formar uma interação endofítica, fixadora de nitrogênio, de sucesso com cana-de-açúcar e outras poáceas. Além disso, durante os estágios iniciais de interação, *G. diazotrophicus* se depara com uma explosão oxidativa, provocada pela planta, a qual deve ser superada. Neste estudo, níveis de exopolissacarídeos foram correlacionados positivamente com a sobrevivência em peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Danos provocados por H₂O₂ foram mitigados, quando o EPS foi co-cultivado as com as células deficientes na produção de EPS. O EPS purificado é capaz de diminuir *in vitro* os níveis de H₂O₂. Isto sugere uma potencial protetor como função adicional do exopolissacarídeo contra H₂O₂ durante o início da interação da bactéria com a planta.

Palavras-chaves: Fixação Biológica de Nitrogênio; Bactéria endofítica; Exopolímero; Tolerância à H₂O₂; Sequestro de radicais livres

ABSTRACT

Gonçalves, Talyta Thereza. Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, fevereiro, 2014. **ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE EXTRACTED BACTERIAL EXOPOLYSACCHARIDE OF *Gluconacetobacter diazotrophicus***. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses.

The Biological Nitrogen Fixation (BNF) is a process of high energy demand dependent on environmental factors such as oxygen and fixed nitrogen levels, which are detected by proteins that are part of signal transduction systems. The need to monitor the concentrations of fixed nitrogen and external oxygen and provide enough energy to sustain the BNF imposed regulatory principles that differ between diazotrophic organisms and depend on the physiology of the plant host. Although several studies have been conducted on the physiology and BNF of *G. diazotrophicus*, it has not been possible to make a broad physiological characterization for the plant-microbe association. *G. diazotrophicus* requires exopolysaccharides to form an endophytic interaction, nitrogen fixing, success with sugar cane and other grasses. In addition, during the initial stages of interaction, *G. diazotrophicus* is faced with an oxidative burst, caused by the plant, which should be overcome. In this study, levels of exopolysaccharides were positively correlated with survival in hydrogen peroxide (H₂O₂). Damage caused by H₂O₂ were mitigated when the EPS was co-cultured with cells deficient in EPS production. The purified EPS is able to reduce in vitro the levels of H₂O₂. This suggests a potential as an additional protective function against H₂O₂ exopolysaccharide during the early interaction of bacteria with the plant.

Keywords: Biological Nitrogen Fixation; endophytic bacteria, exopolymer; tolerance to H₂O₂, scavenging free radicals

1. INTRODUÇÃO

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria diazotrófica endofítica encontrada colonizando o apoplasto de um grande número de plantas como cana-de-açúcar (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988), coloniza também batata-doce (*Ipomoea batatas*), café (*Coffea arabica*), abacaxi (*Ananas comosus*) (BALDANI e BALDANI, 2005) e arroz (*Oryza sativa*) (MUTHUKUMARASAMY et al., 2007). Além da capacidade de fixar nitrogênio em associação com plantas de cana (SEVILLA et al., 2001), foi demonstrado que esta bactéria tem outras capacidades fisiológicas interessantes tais como a produção de hormônios vegetais, solubilização de fosfato e zinco e controle de fitopatógenos (SARAVANAN et al., 2007).

Os processos de infecção e colonização de raízes por *G. diazotrophicus* foram inicialmente estudados em plantas micropropagadas de cana (JAMES et al., 1994; JAMES et al., 2001) e mais tarde em *Arabidopsis* (COCKING et al., 2006) e mais recentemente em plântulas de arroz (MENESES et al., 2011). Apesar da grande quantidade de informações obtidas, os fatores genéticos da bactéria envolvidos no processo de colonização ainda permanecem desconhecidos.

A sequência completa do genoma de *G. diazotrophicus* foi publicada por Bertalan et al. (2009), facilitando assim o estudo funcional de genes envolvidos no processo de infecção e colonização de *G. diazotrophicus* em plantas hospedeiras, como por exemplo, os genes com provável função na biossíntese de polissacarídeos capsulares (CPS), lipo-polissacarídeos (LPS),

proteínas de superfície envolvidas na motilidade e adesão (pili e flagelos) e exopolissacarídeos (EPS) os quais foram identificados no genoma de *G. diazotrophicus*.

Todos os organismos que crescem aerobicamente estão expostos a espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pela redução univalente do oxigênio dentro da célula. A auto-oxidação de enzimas e a fuga da cadeia de transporte de elétrons são duas fontes de produção interna de ROS (IMLAY, 2002). Fontes extracelulares de ROS, que podem entrar nas células bacterianas incluem a oxidação de compostos extracelulares e a secreção de compostos do ciclo oxido-redutivo por organismos vizinhos (IMLAY, 2008). Em particular, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem elevada permeabilidade sobre a membrana plasmática, em *Escherichia coli*, por exemplo, o nível intracelular de H_2O_2 é equivalente ao nível do ambiente extracelular, na maioria das condições de cultura (IMLAY, 2002).

Os principais danos provocados por ROS em biomoléculas celulares são: ação do superóxido sobre agrupamentos ferro-enxofre, inativando as proteínas que possuam esse agrupamento; radicais hidroxila que danificam o DNA, causando a morte celular; e H_2O_2 , em altas concentrações, podendo danificar as membranas lipídicas (IMLAY, 2002). A produção natural de ROS em organismos aeróbicos e a exposição ambiental a ROS exigem a produção de antioxidantes. A enzima superóxido dismutase, que converte o superóxido à H_2O_2 , e as catalases, que convertem H_2O_2 em água e oxigênio, são exemplos de enzimas que compõem vários complexos enzimáticos antioxidantes. Além disso, os antioxidantes de cadeia molecular pequena, tais como o ácido ascórbico e a glutatona, podem eliminar as ROS (HALLIWELL, 2006).

Como um aeróbio obrigatório, a FBN do endofítico *G. diazotrophicus* deve codificar mecanismos de prevenção à danos relacionados a ROS. Estes mecanismos incluem catalases e superóxido dismutases como proteção, bem como pequenas moléculas (BERTALAN et al., 2009).

Células de *G. diazotrophicus* podem encontrar ROS não só no solo, mas também durante o estabelecimento da interação com seus hospedeiros vegetais, como cana-de-açúcar e arroz (MENESES, 2011). Esta interação começa com trocas de sinal complexas entre plantas e parceiros bacterianos. Flavonóides produzidos em plantas iniciam a transcrição dos genes bacterianos e a consequente produção bacteriana de exopolissacarídeos, que estimulam a adesão das bactérias sobre a raiz. Além disso, o exopolissacarídeo produzido por *G. diazotrophicus*, é

necessário para a colonização bacteriana bem sucedida de tecido do hospedeiro por meio de processos de infecção sobre as plantas.

O superóxido e H_2O_2 estão presentes em processos de infecção e no desenvolvimento pleno da interação bactéria-planta desde o início do processo de colonização (SANTOS et al., 2001). Estas ROS são provavelmente formadas principalmente pela NADPH oxidase vegetal (RUBIO et al., 2004). O H_2O_2 pode ser prejudicial, mas parece ser necessário para o desenvolvimento do processo de infecção, por outro lado, a redução dos níveis de H_2O_2 por superexpressão da biossíntese de catalases pode levar a efeitos negativos sobre a formação de processos de infecção (JAMET et al., 2007) .

ROS podem atuar em de algumas maneiras durante a colonização bacteriana. Nos dois primeiros minutos da interação bactéria-planta, os níveis de ROS na planta aumentam rapidamente e de forma transiente (CÁRDENAS et al, 2008) . No entanto, depois de 5 minutos, a presença de bactérias ou exopolissacarídeos tem um efeito inibitório sobre o fluxo de ROS (SHAW e LONG, 2003). Alterações transitórias nos níveis de ROS (induzida por inibidores químicos da planta, por exemplo, NADPH oxidase) são capazes de transcrever a perda inicial (LOHAR et al., 2007). Todas estas evidências apontam para alguns papéis positivos das ROS na interação bactéria-planta.

Exopolissacarídeos têm sido associados à proteção contra H_2O_2 . As células de *Pseudomonas syringae* desprovidas de exopolissacarídeos são sensíveis a ROS (KIRÁLY et al., 1997). Em um estudo com *Sinorhizobium meliloti*, Davies e Walker (2007) realizaram um ensaio em duas partes, para verificar a susceptibilidade de mutantes sensíveis ao H_2O_2 , que também estavam com defeito na formação de nódulos fixadores de nitrogênio em alfafa (*Medicago sativa*). Entre os mutantes, que eram ambos aptos a realizar simbiose e deficientes à exposição à H_2O_2 , um terço dos genes mutados (3 em 9) estavam envolvidos na produção de exopolissacarídeos; adicionalmente, um mutante defeituoso na produção de exopolissacarídeos (mutante *exoY*) foi sensível a H_2O_2 (DAVIES e WALKER, 2007) . Estes estudos apontam para uma possível conexão entre ROS e exopolissacarídeos.

Objetivou-se com esse trabalho investigar o papel do exopolissacarídeo na proteção de *G. diazotrophicus* contra ROS. Nós avaliamos a capacidade dos exopolissacarídeos para fornecer proteção antioxidante contra a morte dependente de ROS e os prováveis mecanismos dessa proteção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância da FBN em gramíneas

O nitrogênio é um dos elementos mais importantes para a produtividade de diversas culturas (GUIMARÃES, 2003), por ser constituinte de diversas moléculas como os ácidos nucleicos, aminoácidos, bases nitrogenadas, clorofila, dentre outras (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; FERREIRA, 2008). A maior parte do nitrogênio do planeta está presente na crosta terrestre (93,8%) e o restante se encontra na atmosfera na forma de N_2 . Entretanto, essa forma química não é acessível nutricionalmente para os seres eucariotos e para a maioria dos procariotos. Para que este macro elemento esteja disponível para os seres vivos é necessária a atuação de microrganismos que possuam a enzima nitrogenase, capaz de reduzir nitrogênio à amônia que pode ser assimilada pelos vegetais e outros seres vivos. Estes seres são denominadas fixadores de N_2 ou diazotróficos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

As bactérias associativas podem contribuir para o aumento do rendimento de diversas culturas. Glick (1995) considerou que a promoção do crescimento vegetal por estas bactérias pode ser resultado tanto de ações indiretas quanto diretas. Em relação às ações indiretas, foram citados o controle biológico por competição por nutrientes, a produção de sideróforos, a antibiose e a indução de resistência sistêmica no hospedeiro. Como ações diretas estão a disponibilização de nutrientes às plantas, a FBN e a produção de substâncias promotoras de crescimento das plantas (SPCPs).

O aumento do rendimento de cereais devido à incorporação de nitrogênio atmosférico via FBN já foi comprovado (DÖBEREINER et al., 1993). Para plantas não leguminosas o processo

de FBN não é tão eficiente como para as leguminosas. Resultados controversos observados em diversos trabalhos apontam que tal tecnologia ainda precisa ser melhor avaliada, principalmente quanto à baixa sobrevivência dos microrganismos no solo e à necessidade de reinoculação das plantas após a germinação (FERREIRA, 2008). Estudos recentes têm evidenciado a FBN em algumas das principais culturas de interesse agrônomo. Por meio de técnicas, como a diluição do isótopo ^{15}N e abundância natural de ^{15}N , têm-se detectado aumento no conteúdo de N através da fixação do N_2 , demonstrado pela presença do isótopo em baixas concentrações no interior do tecido das plantas (JAMES, 2000).

A habilidade das bactérias diazotróficas em produzir SPCPs é considerada como um fator de grande importância para a fertilidade do solo. A maioria dos microrganismos diazotróficos associados a gramíneas pode sintetizar e excretar SPCPs, que são compostos orgânicos que influenciam os processos fisiológicos das plantas em baixas concentrações. Entre as principais SPCPs sintetizadas pelas bactérias diazotróficas destacam-se as auxinas, que são hormônios responsáveis pelo aumento da área de absorção radicular e pelo desenvolvimento da planta pelo alongamento e proliferação das raízes secundárias. Entre as bactérias diazotróficas produtoras de SPCPs destacam-se *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* e *Azotobacter* spp. (ASGHAR et al., 2002).

Nos mais variados habitats, livres ou associados, todos os microrganismos diazotróficos utilizam um sistema básico de fixação de nitrogênio. Em muitos organismos ocorre apenas uma forma de nitrogenase, a Mo-nitrogenase, ou nitrogenase dependente do molibdênio, ou ainda nitrogenase 1. Duas outras formas foram identificadas inicialmente em *Azotobacter*: nitrogenase 2 ou dependente de vanádio (V-nitrogenase) e nitrogenase 3 ou dependente de ferro (Fe-nitrogenase) (PREMAKUMAR et al., 1992).

A FBN pode ser inibida pelo suprimento de nitrogênio quando combinado. Em diazotróficos de vida livre, isto ocorre pela inibição da síntese de nitrogenase ou inativação temporária da nitrogenase por meio de modificações covalentes da enzima. Um processo complexo como a FBN requer a expressão de um conjunto de genes denominados *nif* (*nitrogen fixation*), que codificam proteínas envolvidas diretamente neste processo. Além dos genes *nif*, diversos autores têm descrito em bactérias diazotróficas outros genes, como *ntrA*, *ntrB*, *fix*, *fdx*, *rnf* e *nod* codificando proteínas com funções como: regulação em nível de metabolismo geral de compostos nitrogenados, sensoriamento e sinalização dos níveis de nitrogênio celular, transporte de elétrons para a nitrogenase e até mesmo o estabelecimento da interação planta-bactéria. O

atual quadro de caracterização genética das bactérias diazotróficas demonstra que a complexidade do processo de fixação biológica de nitrogênio transcorre a bioquímica do processo e supõe a existência de mais genes que elucidariam processos ainda não compreendidos (BERTALAN et al., 2009).

A riqueza de compostos orgânicos na rizosfera produz intensas atividades e interações microbianas. A movimentação dos microrganismos em direção às raízes ocorre quando existe um reconhecimento químico, denominado quimiotaxia. Estudos indicam que a quimiotaxia aos exudatos da rizosfera é responsável pela chegada dos microrganismos. Em *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense* verificou-se grande atividade quimiotática a diversos açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, compostos aromáticos e exudatos radiculares (TARRAND et al., 1978). Observam-se também respostas aerotáticas a diferentes fontes de carbono e concentração de oxigênio, que variam conforme as espécies de *Azospirillum*, (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

A colonização radicular ocorre em duas etapas: Inicialmente ocorre uma adsorção reversível, e em seguida um ancoramento irreversível, controlado por proteínas extracelulares de origem bacteriana. Esta etapa é comandada por sinais moleculares emitidos pelas raízes da planta hospedeira, e a sobrevivência do microrganismo depende de fatores bióticos e abióticos (DOBBELAERE et al., 2003).

Na cultura da cana-de-açúcar, os principais trabalhos com bactérias endofíticas surgiram na década de 1950, com a microbiologista Johanna Döbereiner e sua equipe, que pesquisaram principalmente as bactérias fixadoras de nitrogênio. As bactérias diazotróficas do gênero *Beijerinckia* foram encontradas em diversos campos de cana-de-açúcar (DÖBEREINER, 1961) e uma nova espécie de *Beijerinckia* foi descoberta, *B. fluminense* (DÖBEREINER e RUSCHEL, 1958). Outras bactérias diazotróficas de cana-de-açúcar foram isoladas, como: *Erwinia*, *Azotobacter*, *Derrxia*, *Azospirillum*, *Enterobacter* e bactérias anaeróbicas, como *Clostridium* e *Klebsiella* spp. (PURCHASE, 1980; GRACIOLLI et al., 1983). Magnani et al. (2010) estudando a diversidade bacteriana endofítica em cana-de-açúcar cultivadas no Brasil conseguiram identificar bactérias da família Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, *Bacillus*, *Curtobacterium* sp., baseados em sequências de 16S rRNA.

Verificou-se ainda que um grande número de bactérias fixadoras de nitrogênio colonizava naturalmente o interior do tecido de plantas de cana-de-açúcar, sendo designadas como bactérias diazotróficas endofíticas (DÖBEREINER et al., 1993). A primeira bactéria endofítica de cana-

de-açúcar caracterizada como diazotrófica foi *Acetobacter diazotrophicus* (posteriormente denominada *G. diazotrophicus*), isolada de cana-de-açúcar, em meio semi-sólido com caldo de cana (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988). *G. diazotrophicus* tem sido encontrada no interior de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil, Uruguai, Austrália e México (LI e MACRAE, 1991; FUENTES-RAMIREZ et al., 2001).

2.2. *G. diazotrophicus*

A família *Acetobacteraceae* inclui quatro gêneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* e *Acidomonas* (YAMADA et al., 1997). Subsequentemente, baseados em análises de 16S rRNA, *A. diazotrophicus* foi renomeada como *G. diazotrophicus* (KOJIMA et al., 1998); foram também acrescentadas mais duas espécies fixadoras de nitrogênio à lista: *G. johannae* e *G. azotocaptans* (FUENTES-RAMIREZ et al., 2001).

G. diazotrophicus pertence ao grupo das Proteobactéria, classe α -proteobacteria, família *Acetobacteraceae* do gênero *Gluconacetobacter*. É uma bactéria Gram-negativa, não apresenta movimento espiralado, com pH ótimo de crescimento na faixa de 4,5-5,8 e com células variando entre (0,7 a 0,8) x (2 a 4) μm . Esta bactéria pode ser isolada em meio semi-sólido LGI-P (REIS et al., 1994) e, após o período de sete a dez dias, apresenta uma película alaranjada, sendo que, abaixo da película, o meio fica incolor devido à assimilação do azul de bromotimol (DÖBEREINER et al., 1993).

Esta bactéria cresce em alta concentração de sacarose (até 30%) e pH muito baixo (3,0) e tem a habilidade de fixar nitrogênio em condições microaerofílicas (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988). Como a sacarose não pode ser transportada ou respirada, *G. diazotrophicus* cresce secretando uma enzima extracelular denominada levansacarase que hidrolisa sacarose em frutose e glicose (ARRIETA et al., 1996). Outras boas fontes de carbono incluem gluconato, glicose, frutose, manitol, arabinose, meso-inositol, i-inositol, sorbitol, glicerol, galactose e gluconato de sódio (MUTHUKUMARASAMY et al., 1999). Aminoácidos como glutamato, serina, alanina e histidina podem ser eficazmente usados como fonte de carbono e de nitrogênio por *G. diazotrophicus* (ATTWOOD et al., 1991). Porém, celobiose, amido, meso-eritritol e metanol (1%) não favorecem o seu crescimento. Nenhum dos ácidos orgânicos comuns (succinato e outros ácidos dicarboxílicos) promove o crescimento de *G. diazotrophicus*, exceto o ácido 2-ceto glucônico presente em plantas de cana-de-açúcar (ASHBOLT e INKERMAN, 1990). Foi relatado que esta bactéria utiliza ácido 2-ceto glucônico como uma fonte de carbono, o que favorece a fixação de nitrogênio. O pH ótimo para

crescimento está ao redor de 5,5, embora os valores de pH e taxa de respiração possam variar consideravelmente de acordo com as fontes de carbono (STEPHAN et al., 1991).

G. diazotrophicus tem alta tolerância a tratamentos de calor e concentrações de sais no meio de cultura (TEJERA et al., 2003). O tratamento térmico (50°C por 2 a 3 h), usualmente empregado para controle de patógenos causadores de doenças na cana-de-açúcar, não mata (ORTEGA et al., 2001).

Dentre as propriedades fisiológicas características dessa espécie de bactéria destacam-se a tolerância a altas concentrações de sacarose; acidez e habilidade de excretar o nitrogênio fixado, conforme demonstrado por Cojho et al. (1993). A infecção e colonização da cana-de-açúcar pela *G. diazotrophicus* foi demonstrada por meio de microscopia eletrônica e ótica (JAMES et al., 1994; OLIVARES et al., 1996). Na superfície da raiz, a bactéria se concentra nas regiões de junção de raízes laterais (JAMES et al., 1994). Dentro da raiz, pode ser vista nos espaços intercelulares do parênquima, bem como, dentro de vasos do xilema, através dos quais a bactéria parece migrar para a parte aérea da cana-de-açúcar (DONG et al., 1994).

A associação de *G. diazotrophicus* com cana-de-açúcar representa um novo tipo de associação entre um diazotrófico e uma monocotiledônea. Considerando a associação de *G. diazotrophicus* com cana-de-açúcar, esta é endofítica obrigatória (porém cultivável), visto que esta bactéria não pode ser isolada de solos livres de raízes e só pôde ser isolada, até o momento, de plantas, fungos, insetos, etc. Porém, baseado na singularidade da associação, Reinhold-Hurek e Hurek (1998) propuseram o termo “endofítico oportunista”, visto que elas não colonizam o citoplasma da planta viva ou células do hospedeiro ou formam qualquer organela como observado em fungos micorrízicos ou rizóbios.

A fixação endofítica de nitrogênio depende da capacidade do microrganismo estabelecer-se endofiticamente na planta e, para que isso ocorra, o microrganismo deve ser capaz de invadir e proliferar nos tecidos da planta hospedeira, ultrapassando as barreiras físicas e químicas que a mesma estabelece, instituindo vias de infecção e sítios de colonização. O estabelecimento desta relação depende de uma sequência de etapas e de uma relação específica entre planta e bactéria. Vários compostos de origem bacteriana estão envolvidos no sucesso do processo de infecção e colonização destas bactérias e, dentre estas substâncias, encontram-se os exopolissacarídeos microbianos que possuem um papel importante tanto na sobrevivência da bactéria quanto na associação desta com a planta, auxiliando na adesão da célula à superfícies, na concentração de

nutrientes, evitam a dessecação, evitam o contato direto com o hospedeiro e na proteção contra moléculas tóxicas (SUTHERLAND, 2001).

2.3. Processos de infecção e colonização por bactérias endofíticas

O processo de infecção e colonização de plantas por bactérias é caracterizado por um processo dinâmico, onde está envolvido todo um aparato de reconhecimento de sinais moleculares, seguido de movimentos da bactéria em direção à planta hospedeira, sua posterior adesão à superfície vegetal e finalmente a sua penetração e multiplicação nos tecidos internos da planta.

O primeiro passo no processo de colonização é o encontro físico entre a bactéria e a planta hospedeira, que pode ocorrer de forma passiva (transporte pela solução do solo) ou ativa (via mecanismos de motilidade do microrganismo ou crescimento das raízes). O movimento dos microrganismos ocorre por quimiotaxia, resultante de um reconhecimento químico do gradiente de fonte de carbono, exsudado pelas raízes, existente entre o solo e a rizosfera.

Logo após essa fase inicial, as bactérias tendem a se ligar à sítios específicos na planta, onde sua habilidade para resistir à remoção constitui-se em uma vantagem seletiva. Além disso, para que rizobactérias promotoras ou deletérias ao crescimento exerçam um efeito fisiológico significativo sobre a planta hospedeira, a bactéria deve colonizar efetivamente a superfície radicular.

De modo geral, a adesão de bactérias à superfície da planta é caracterizada por uma fase inicial reversível e inespecífica (Figura 1.A) que envolve interações de carga ao nível de superfície, e uma segunda fase, caracterizada como tempo-dependente e irreversível (Figura 1.B), sendo mediada por propriedades físicas dos polímeros extracelulares, como: interações entre cargas, hidrofílicas e hidrofóbicas, em certos casos altamente específicas (ROMANTSCHUK, 1992). A atração específica deve ser enfatizada porque a adesão resulta do encaixe perfeito entre o ligante e o receptor, que se encontram na superfície das estruturas envolvidas. A complementaridade entre ligantes (adesinas) e receptores é tão específica quanto a interação enzima-substrato ou a interação antígeno-anticorpo. O produto dessa interação ativa uma complexa cascata de transdução de sinais que é mobilizada no processo de reconhecimento entre patógeno e hospedeiro (SOTO e HULTGREN, 1999).

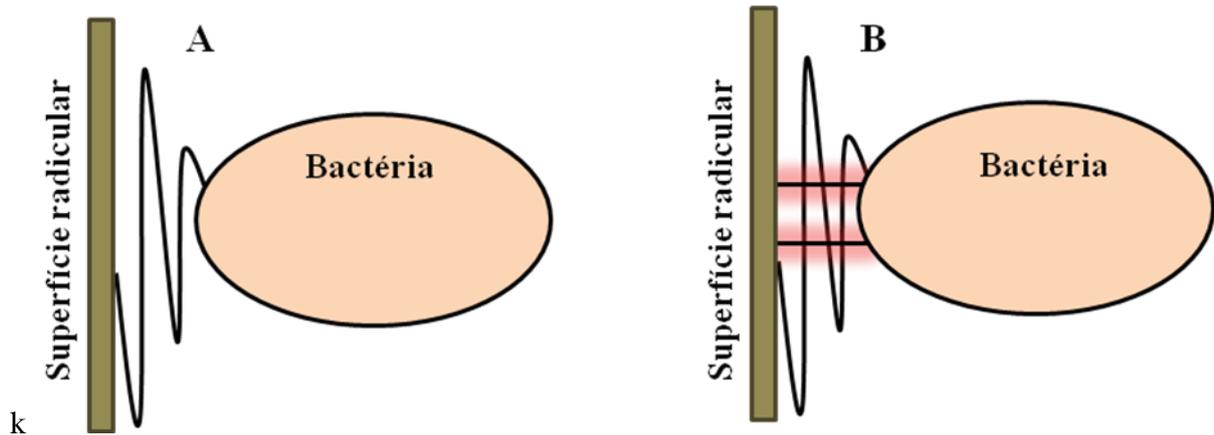


Figura 1. Modelo esquemático do processo de adesão bacteriano por duas etapas, em contraste com o de uma etapa. A. Primeira fase (fase reversível, presença de flagelo e pílus); B. Segunda fase (fase irreversível, presença de flagelo, pílus e exopolissacarídeos) Fonte: HORI e MATSUMOTO (2010).

Hori e Matsumoto (2010) conduziram estudos sobre a capacidade de adesão de bactérias benéficas e sua relevância. O maior volume de informação concentra-se no estudo da interação entre bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* e *Alcaligenes* e plantas da família das gramíneas. Michiels et al. (1991) e You et al. (1995) demonstraram que a adesão de *A. brasilense* e *A. faecalis* às raízes de trigo e arroz, respectivamente, ocorre em duas fases características, a primeira (fase de adsorção), consiste de uma ligação rápida e reversível, enquanto que na segunda fase (fase de ancoragem), onde as bactérias tornam-se irreversivelmente ligadas à superfície radicular, processo que envolve polissacarídeos. Nesta etapa, as bactérias tornam-se firmemente aderidas e outras bactérias em suspensão, aderem-se a esta formando agregados de bactérias no sítio de adesão.

Por não possuírem uma capacidade de exercer força mecânica ou física capaz de vencer as barreiras impostas pela planta, como a parede celular e a pressão de turgor, e por consequência penetrar em células epidérmicas intactas (GOODMAN e DEKOCK, 1982), a grande maioria das bactérias penetra nas plantas hospedeiras passivamente através de aberturas naturais ou injúrias (exceção para bactérias do gênero *Rhizobium* e correlatas).

Os modos mais conhecidos de entrada de organismos fixadores de nitrogênio em raízes são através de fissuras, geralmente presentes nos locais de emergência de raízes laterais e adventícias, e através dos pêlos radiculares.

Ao crescerem em direção ao córtex da raiz parental, as raízes laterais e as adventícias, acabam rompendo a camada celular da epiderme e emergindo para o exterior, onde provocam a formação de uma abertura que se constitui em local propício para infecção bacteriana, incluindo bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* spp. (PATRIQUIN et al., 1983), *G. diazotrophicus* (JAMES et al., 1994) e *Azoarcus* sp. (REINHOLD e HUREK, 1988). Schmit e Robert (1984) ao investigarem o processo de infecção de *Pseudomonas solanacearum* em plântulas de tomate em um cultivo *in vitro* verificaram que três dias após a inoculação, as bactérias localizaram-se predominantemente nos pontos de emergência de raízes secundárias com raízes primárias, dispendo-se como micro-colônias.

As injúrias na superfície das raízes, devido à abrasão com o solo durante o processo de crescimento radicular ou na parte aérea devido à ação de chuvas e ventos, constituem as principais entradas dos microrganismos no vegetal. Dentre as bactérias fitopatogênicas, *Agrobacterium tumefaciens* é aparentemente a única que requer feridas para infectar a planta hospedeira e induzir a formação de tumores (LIPPINCO e LIPPINCO, 1969). James et al. (1994) verificaram que feridas se constituem numa porta de entrada para *G. diazotrophicus* em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, notando que grande número de bactérias acumulavam-se nas regiões de ruptura de células da epiderme.

A propagação subsequente de endófitos pode ser através dos espaços intercelulares, ou atravessando paredes, quando as bactérias ficam confinadas pelas paredes celulares do hospedeiro, formando cordões de infecção (SPRENT et al., 1987). Os pêlos radiculares, que se desenvolvem como extensões de células epidérmicas da raiz perto do ápice são colonizadas extensivamente por microrganismos do solo, incluindo bactérias fixadoras de nitrogênio. Na rizosfera (nicho de interface entre solo e raízes), os pêlos radiculares em desenvolvimento têm um papel importante na interação com o microrganismo.

A dinâmica de infecção e colonização parece ser dependente de sinais específicos trocados pelas células envolvidas. Existem produtos extracelulares que podem atuar como mediadores dessa dinâmica, ora atuando como fatores de adesão, ora promovendo a própria colonização interna da bactéria, dentre os quais podemos citar os EPS, lipopolissacarídeos, flagelos e pilus.

2.4. Exopolissacarídeos

Muitos microrganismos produzem polissacarídeos que são excretados para o meio permanecendo bem aderidos à célula sob a forma de cápsula. A expressão EPS tem sido amplamente usada para aqueles polissacarídeos localizados na superfície externa das células microbianas. Entre eles podem ser encontrados vários polímeros de diversas composições químicas e propriedades físicas. Para designar este tipo de substância tem-se utilizado a terminação “EPS” para fazer referência aos exopolissacarídeos ou exopolímeros (WINGENDER et al., 1999).

A presença de EPS associados a células bacterianas é reconhecida pela formação de colônias mucosas em meio de cultura sólido, e aumento significativo da viscosidade e em algumas vezes a formação de um gel em meios líquidos (COSTERTON, 1992; SUTHERLAND, 1999). Geralmente, os EPS são secretados pelas células bacterianas formando uma camada protetora que possui papel importante tanto na sua sobrevivência quanto na sua virulência. Essa camada pode auxiliar na adesão da célula à superfícies, concentrar nutrientes, evitar a dessecação, evitar o contato com o hospedeiro e proteger contra moléculas tóxicas (DENNY, 1995). Quando essas bactérias crescem associadas a um substrato, os EPS, outras moléculas e estruturas, como fímbrias e adesinas, formam o esqueleto de uma complexa, organizada e eficiente comunidade bacteriana denominada biofilme.

Os biofilmes bacterianos são uma comunidade estruturada de células, aderidas a um substrato biótico ou não, inseridas em uma matriz polimérica produzida pelas próprias bactérias (COSTERTON, 1999). O processo de formação dos biofilmes, como citado anteriormente, envolve a adesão da bactéria ao substrato e a agregação das células umas às outras. Na adesão há a participação das fímbrias, adesinas (DAVEY e O'TOOLE, 2000) e de moléculas de DNA que são excretadas para o meio (WHITCHURCH et al., 2002). A agregação e maturação do biofilme envolvem o aumento do número de células e a deposição de grande quantidade de matriz extracelular (EPS, proteínas e outras substâncias) para formar o esqueleto do biofilme (DAVEY e O'TOOLE, 2000). Em contrapartida, a manutenção da arquitetura normal desses biofilmes se mostrou totalmente dependente da presença dessas moléculas (DENNY, 1995).

Para a detecção e visualização dos EPS, têm sido utilizadas várias técnicas. Mediante microscopia óptica é possível distinguir estas estruturas utilizando corantes apropriados. Em outros casos são realizadas tensões negativas que oferecem a oportunidade de poder distinguir os polissacarídeos capsulares daqueles mais dispersos. Outras técnicas utilizadas com êxito são as

de microscopia eletrônica de varredura e a de microscopia eletrônica de transmissão. As metodologias empregadas para detectar EPS microbianos por qualquer uma das técnicas citadas têm que levar em conta o problema ocasionado pelo alto conteúdo de água destes compostos (até 99%) o qual dificulta a preparação das amostras (SUTHERLAND, 1999).

2.5 Ligação entre o sistema respiratório e ROS

O aumento da taxa de respiração celular consegue evitar a inibição da nitrogenase, pois liga o oxigênio a átomos de hidrogênio formando água. Esses átomos de hidrogênio são provenientes da quebra da glicose (ou outros polissacarídeos) que foram transferidos através de uma série de proteínas de membrana, chamadas de cadeia transportadora de elétrons, até chegar ao oxigênio. Durante esse processo alguns elétrons podem escapar da cadeia transportadora e se combinar diretamente com um átomo de oxigênio gerando uma forma parcialmente reduzida de oxigênio, comumente chamada de espécie reativa de oxigênio ou ROS (do inglês Reactive Oxygen Species) (KOWALTOWSKI et al., 2009).

Todos os organismos expostos ao oxigênio produzem espécies reativas de oxigênio no seu metabolismo normal. Mais do que simples subprodutos do metabolismo oxidativo, as espécies reativas de oxigênio também podem agir de forma benéfica ao organismo, quando usadas pelo sistema de defesa para atacar agentes patogênicos ou quando atuam como moléculas mensageiras em vias de sinalização celular (também designada sinalização redox).

Algumas condições biológicas favorecem a formação de um desequilíbrio entre a produção de ROS e sua desintoxicação através de sistemas biológicos que as removam ou reparem os danos por elas causados. Esse desequilíbrio é chamado de estresse oxidativo que resulta num ambiente celular mais oxidante (SCHAFER e BUETTNER, 2001). Os efeitos do estresse oxidativo dependem da dimensão de tais variações. Uma célula é normalmente capaz de superar os efeitos do estresse oxidativo se as perturbações no equilíbrio redox forem pequenas, mas perturbações de maior escala podem lesar biomoléculas que, se não puderem ser reparadas pelos sistemas de reparo, levam ao dano celular e tecidual (SANTOS et al., 2009).

2.6. A influência de ROS na FBN

A deficiência na capacidade de FBN de cepas de *S. meliloti* mutadas em genes envolvidos na homeostase redox indica também o seu papel crucial no metabolismo de FBN: os mutantes afetados na defesa antioxidante (catalase e glutathione redutase) não foram afetados apenas na sua capacidade de infectar a planta, mas também na eficiência da FBN (JAMET et al., 2003; HARRISON et al., 2005). Da mesma forma, um duplo mutante de *Rhizobium etli* para as

enzimas peroxirredoxina (prxS) e catalase-peroxidase bifuncional (katG) teve sua capacidade de fixação de nitrogênio significativamente reduzida (DOMBRECHT et al., 2005). Além disso, estirpes de *S. meliloti* mutadas para uma variedade de processos celulares (tais como produção de exopolissacarídeos), mas não diretamente envolvidos na defesa antioxidante, também foram afetados em processos de proteção ao estresse oxidativo e estabelecimento da simbiose (DAVIES e WALKER 2007).

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). Finalmente, células de *Rhizobium leguminosarum* deficientes na produção de uma tioredoxina-like (cycY) foram incapazes de formar nódulos fixadores de nitrogênio em ervilha, já que o mutante estava com defeito na maturação de todos os citocromos tipo C (VARGAS et al., 1994).

Uma das características específicas dos nódulos é a baixa pressão de oxigênio na zona de fixação para permitir a fixação de nitrogênio eficiente. A regulação da respiração e da eficiência da barreira difusão do oxigênio desempenha um papel fundamental na proteção do metabolismo do nódulo. Essa regulação parece ser um processo controlado pela planta (WEI e LAYZELL, 2006). A diminuição da atividade de FBN induzida por estresse é geralmente associada a uma modificação na pressão de oxigênio no nódulo. Em soja, o estresse salino e hídrico causam uma diminuição na atividade da nitrogenase que pode ser correlacionado com uma diminuição da permeabilidade do nódulo (DEL CASTILLO et al., 1994; SERRAJ et al., 1994). Em contraste, a sensibilidade à salinidade parece estar associada com um aumento na condutância nodular e um aumento da respiração dos nódulos em *Medicago truncatula* (AYDI et al., 2004). Em conjunto, estes resultados mostram que a eficiência do nódulo é fortemente afetada pela regulação da disponibilidade de oxigênio que pode estar ligadas à presença de ROS (CHANG et al, 2009).

2.7. Sistema de defesa contra radicais livres em plantas

Os radicais livres são muito agressivos, mas as células têm mecanismos de defesa capazes de inativar, bloquear esses agentes reativos. Em sistemas aeróbicos é essencial o equilíbrio entre os agentes óxido-redutores (como as ERMOS) e o sistema de defesa antioxidante. Para se proteger dos agentes óxido-redutores a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas.

Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão e é constituída pela glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona

peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros. A maior parte destes agentes antioxidantes está no meio intracelular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). A SOD catalisa a dismutação do superóxido e a catalase, a conversão do peróxido de hidrogênio a H_2O e O_2 , enquanto a GSH peroxidase transfere elétrons da GSH para reduzir o peróxido à água e GSSG. A glutathiona oxidada produzida (GSSG) é reduzida posteriormente a GSH pela glutathiona redutase utilizando NADPH como cofator.

S. meliloti requer a produção de exopolissacarídeos, a fim de formar uma simbiose de fixação de nitrogênio com sucesso em *Medicago*. Além disso, durante os estágios iniciais de simbiose, *S. meliloti* é exposta a uma explosão oxidativa que deve ser superada. Os níveis de produção dos exopolissacarídeos succinoglicano (EPS-I) e galactoglucano (EPS-II) foram encontrados para correlacionar positivamente com a sobrevivência na presença de peróxido de hidrogênio. Quando purificados, o EPS-I é capaz de diminuir os níveis de H_2O_2 *in vitro*, e esta atividade é específica. Isto sugere uma função potencialmente protetora dos exopolissacarídeos contra H_2O_2 durante o processo de simbiose (LEHMAN e LONG, 2013).

Em *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*, mutantes defeituosos para produção de polissacarídeos extracelulares foram criados por rompimento alvo do gene *gumD*, onde a patogenicidade de mutantes foi severamente atenuada. O EPS desta bactéria conferiu resistência significativa ao H_2O_2 , em 1 h de exposição ao peróxido de hidrogênio na concentração de 1 mM, a estirpe mutante atingiu apenas 3% de sobrevivência quando comparado com 48% de células de tipo selvagem que sobreviveram (KEMP et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar o potencial antioxidante do exopolissacarídeo de *G. diazotrophicus*.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar o papel do exopolissacarídeo de *G. diazotrophicus* sobre a resistência bacteriana ao peróxido de hidrogênio.
- Avaliar *in vitro* a atividade antioxidante total dos polissacarídeos de *G. diazotrophicus* bem como seus efeitos sobre o “sequestro” de radical superóxido e potencial redutor.
- Determinar *in vitro* da taxa de inibição da peroxidação lipídica proporcionada pelos exopolissacarídeos de *G. diazotrophicus*;
- Analisar o efeito *in vitro* dos exopolissacarídeos de *G. diazotrophicus* sobre a geração de radicais livres.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Bactérias e estirpes

As estirpes de *G. diazotrophicus* utilizadas no presente trabalho estão relacionadas na Tabela 1.

Tabela 1. Relação de estirpes bacterianas utilizadas no presente trabalho.

Estirpes	Características	Referência
<i>G. diazotrophicus</i>		
PAL5	Selvagem, Amp ^S , Km ^S , Tc ^S , EPS ⁺	Cavalcante e Döbereiner, 1988
MGD	<i>gumD</i> ::Tn5, Km ^R , <i>gumD</i> ⁻ , EPS ⁻	Meneses et al., 2011
CMGD	<i>gumD</i> ::Tn5, Km ^R , Amp ^R , <i>gumD</i> ⁺ , EPS ⁺	Meneses et al., 2011

4.2. Purificação e quantificação do EPS de *G. diazotrophicus* PAL5

A estirpe selvagem PAL5 foi cultivada em 5 mL de meio DYGS (composição por litro: 2 g de glicose; 1,5 g de peptona; 2 g de extrato de levedura; 0,5 g de K_2HPO_4 e 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 6,0) (RODRIGUES NETO et al., 1986).

Após três dias de cultivo, as células bacterianas foram recolhidas por centrifugação a 18.000 x g por 5 minutos, lavadas e ressuspendidas em 1 mL de solução salina. Após isso, frascos do tipo Erlemmeyers de 2000 mL contendo 250 mL de meio LGI modificado (composição por litro: 5 g de sacarose, 0,2 g de solução de K_2HPO_4 ; 0,6 g de solução KH_2PO_4 ; 0,2 g de solução $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,02 g de solução $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,065 g de FeEDTA e 0,02 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, pH5,5), com 1 mM de ácido glutâmico (ROUWS et al., 2008) e suplementado com 20 g.l⁻¹ de manitol como fonte de carbono, foram inoculados com 1mL de uma suspensão bacteriana de aproximadamente 1×10^6 células e cultivados sob agitação de 200 rpm a 30°C por 48 horas, até atingirem o final da fase *log*, com aproximadamente 0,7 de densidade óptica (D.O._{600nm}).

A cultura foi então centrifugada a 20.000 x g por 15 minutos numa temperatura de 4°C e o sobrenadante coletado. Paralelamente, numa proveta, foi adicionado um volume de 150 mL de etanol absoluto gelado equivalente a 3X o volume do sobrenadante (50 mL). O sobrenadante da cultura foi despejado em cima do etanol absoluto gelado e agitado vigorosamente para precipitação do EPS que está presente no sobrenadante. Após isso, a solução foi colocada em freezer a -20°C por um período 24 h, para aumentar o tempo de precipitação do material. Após esse período de incubação a -20°C, as soluções foram centrifugadas a 10.000 x g por 15 minutos à 4°C e, em seguida, o sobrenadante descartado. O EPS precipitado foi resolubilizado pela adição de água MilliQ™ (o mínimo de volume possível para solubilizar o EPS). Para a purificação do EPS coletado, todas as amostras foram submetidas ao processo de precipitação etanólica no mínimo três vezes. Após a última precipitação, o EPS foi dissolvido no mínimo de água MilliQ™ possível, quantificado e congelado a -20 °C. O material resolubilizado obtido do processo de purificação foi submetido à quantificação pelo método fenol-sulfúrico conforme Dubois et al. (1956). Uma alíquota de 0,5 mL das soluções a serem analisadas foi transferida para tubos de ensaio de vidro, adicionado 0,5 mL de solução de fenol 5% e agitado levemente. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de H_2SO_4 concentrado diretamente sobre a amostra e homogeneizado levemente. Após esse processo a amostra foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente para o resfriamento da solução.

Uma curva de calibração foi obtida utilizando glicose como padrão para posterior estimativa da quantidade de açúcares totais obtido. Soluções padrão de glicose foram preparadas através de diluições seriadas (a partir de uma solução de 10 mg.mL^{-1}) nas seguintes concentrações: 10, 20, 40, 60, 80, 100 e $200 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após o preparo de todos os padrões e amostras, foram realizadas leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 485nm, em cubetas de vidro, o branco constituiu em 0,5 ml de água destilada como amostra.

A partir da análise de regressão linear pôde-se considerar que este modelo para curva de calibração teve um bom ajuste, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,99. Para quantificação de açúcares totais, obteve-se então a equação: $A_{485} = 100,53 \cdot [\text{açúcares totais}] + 5,1052$.

4.3. Ensaios de sensibilidade à Peróxido de Hidrogênio

A estirpe PAL5 e as estirpes mutantes MGD e CMGD de *G. diazotrophicus* foram cultivadas de um dia para o outro em tubos de ensaio com meio de cultura DYGS líquido. As células de cerca de 1 mL desta cultura foram sedimentadas por meio de centrifugação (5 minutos, $1500 \times g$, 4°C), resuspendidas em solução salina estéril e diluídas até uma $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 0,6. Para sensibilidade ao H_2O_2 as estirpes foram incubadas em concentrações crescentes de H_2O_2 (0, 25, 100, 500 e $1000 \text{ } \mu\text{M}$) a 150 rpm, 30°C por 1 h, respectivamente. Após isso suas suspensões foram diluídas de 10^{-1} a 10^{-8} em solução salina e plaqueadas em meio LGI-P (acrescido de fosfato), onde a porcentagem de sobrevivência Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) foi calculada contra a viabilidade na ausência de H_2O_2 .

Para os experimentos posteriores (sensibilidade à H_2O_2), a complementação bioquímica pela adição de EPS purificado, os tratamentos foram co-inoculados com EPS de *G. diazotrophicus* PAL5, junto com a solução salina estéril, utilizada na diluição seriada das amostras, em uma concentração final de $100 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, antes das amostras serem diluídas até uma $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 0,6. Após isso suas suspensões foram diluídas de 10^{-1} a 10^{-8} em solução salina e plaqueadas em meio LGI-P, onde a porcentagem de sobrevivência (UFCs) foi calculada contra a viabilidade na ausência de H_2O_2 .

4.4. Ensaio para detecção da atividade antioxidante do EPS de *G. diazotrophicus* PAL5

4.4.1. Capacidade antioxidante total

Uma alíquota de 0,1 mL de cada solução amostra, contendo EPS em diferentes concentrações (10, 50, 100, 150, 200, e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi misturada em um microtubo com 1 mL da solução reagente (0,6 M de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio 4 mM de molibdato de amônio. Os tubos foram incubados a 95 °C por 90 minutos. Após o resfriamento das amostras à temperatura ambiente, a absorbância foi mensurada em 695 nm (PRIETO et al., 1999). Os resultados foram expressos a partir da equação da reta obtida da curva de calibração do ácido ascórbico.

4.4.2. Sequestro de radicais superóxido

Os radicais superóxidos (ZHOU e ZHENG, 1991; LIU et al., 1997; ZHANG et al., 2003) foram gerados em 3 mL de tris-HCl (16mM, pH 8,0), que continham 78 M de NADH (forma reduzida), 50 M de Nitroblue Tetrazolium, 10 M de Phenazin Methosulfate e concentrações variadas de EPS (10, 50, 100, 150, 200, e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A reação de cor dos radicais superóxidos e Nitroblue Tetrazolium foi detectada por monitoramento da absorbância a 560 nm. O controle não tinha NADH, e ele foi substituído pelo tris-HCl.

4.4.3. Radicais Hidroxilas

Os radicais hidroxilas (ZHANG et al., 2003) foram gerados por um método modificado de Smirnov e Cumner (1989) em 3 mL de fosfato de sódio (150 mM, pH 7,4), que continha 10 mM de FeSO_4 , 10 mM de EDTA, 2 mM de salicilato de sódio, 200 μL de H_2O_2 a 30 % e concentrações variadas de exopolissacarídeos (10, 50, 100, 150, 200, e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A solução foi incubada a 37°C por 1 h, e a atividade detectada por monitoramento da absorbância à 510 nm. No tubo controle o H_2O_2 foi substituído pelo tampão fosfato.

4.4.4. Peroxidação lipídica

A inibição da peroxidação lipídica foi determinada pela quantificação do produto de decomposição de peróxido lipídico MDA baseada na reação ao ácido tiobarbitúrico com gema de ovo como substrato oxidável. Resumidamente, 0,5 mL de homogeneizado de ovo (10% em 0,2 MPBS (pH 7,4), v/v) e 0,5 mL de amostra em diferentes concentrações foram misturadas, em seguida, 0,05 mL de sulfato de ferro (0,07 M) foi adicionado para iniciar a peroxidação lipídica.

Após a incubação a 37 ° por 30 min, 1,5 mL de tricloroacético ácido (20%) (w/v) e 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,8% (p/v) foram adicionados para estabilizar a reação. A mistura resultante foi agitada e aquecida a 100°C por 15 minutos, e em seguida, centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. A absorbância da camada superior foi medida em 532 nm (ZHANG e YU, 1997). A inibição da peroxidação lipídica foi calculada da seguinte forma: taxa de inibição (%) = $[1 - (A_{\text{Amostra}} - \text{Branco Amostra}) / A_{\text{Controle}}] \times 100$. O α -tocoferol foi utilizado com padrão.

4.4.5. Poder redutor

A avaliação do poder de redução do EPS foi realizada de acordo com a metodologia citada por YEN e CHEN (1995), com modificações. Foi utilizado 1 mL da amostra em diferentes concentrações de EPS (10, 50, 100, 150, 200, e 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). A esta alíquota foram adicionados: 2,5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 mL de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a 1% (p/v). A mistura foi incubada a 50 °C por 20 minutos. Foram adicionados 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (p/v) à solução no tubo de ensaio, com posterior agitação. Um volume de 2,5 mL da mistura foi transferido para outro tubo de ensaio, no qual foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de FeCl_3 a 0,1% (p/v). A leitura da absorbância foi realizada a 700 nm. A elevada absorbância indica grande poder redutor.

4.4.6. Cálculo do IC_{50}

O IC_{50} , ou seja, a quantidade em $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ da amostra necessária para inibir em 50% os radicais antioxidantes foi determinado para sequestro dos radicais superóxido e hidroxila, bem como para inibição da peroxidação lipídica. O cálculo do IC_{50} de cada atividade foi realizado por regressões não lineares.

4.4.7. Análise estatística

Todos os dados foram expressos com média \pm desvio padrão de triplicatas, e o teste ANOVA foi usado para a análise estatística no software SIGMAPLOT 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Os valores foram considerados significativamente diferentes quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração aquosa dos polissacarídeos de *G. diazotrophicus*

A extração dos exopolissacarídeos da bactéria *G. diazotrophicus* foi realizada com eficiência e utilizada para os experimentos que seguem. A partir de 1 L de cultura bacteriana, foi obtida do composto cerca de 1800 mg de EPS.

5.2. Sensibilidade à Peróxido de Hidrogênio

A produção de EPS está envolvida em algumas funções relacionadas à defesa da bactéria a estresses ambientais, tais como espécies reativas de oxigênio (ROS), radiação UV-C e estresse salino. Em outros organismos, mutantes defeituosos na produção de EPS apresentam um fenótipo hipersensível ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (KEMP et al., 2004). Por isso, foi especulado que a estirpe mutante MGD possivelmente tivesse uma suscetibilidade a estes tipos de estresse. Para testar esta hipótese, células da estirpe selvagem PAL5 e dos mutantes MGD e CMGD foram expostas a diferentes concentrações de H₂O₂, nas quais a sua sobrevivência foi avaliada. Em comparação com a estirpe selvagem PAL5 e CMGD, o mutante MGD apresentou um fenótipo hipersensível em todos os ensaios (Figura 2). A capacidade das estirpes para sobreviver à exposição ao H₂O₂ foi determinada para estabelecer se o EPS exerce um papel de agente protetor contra estresses abióticos.

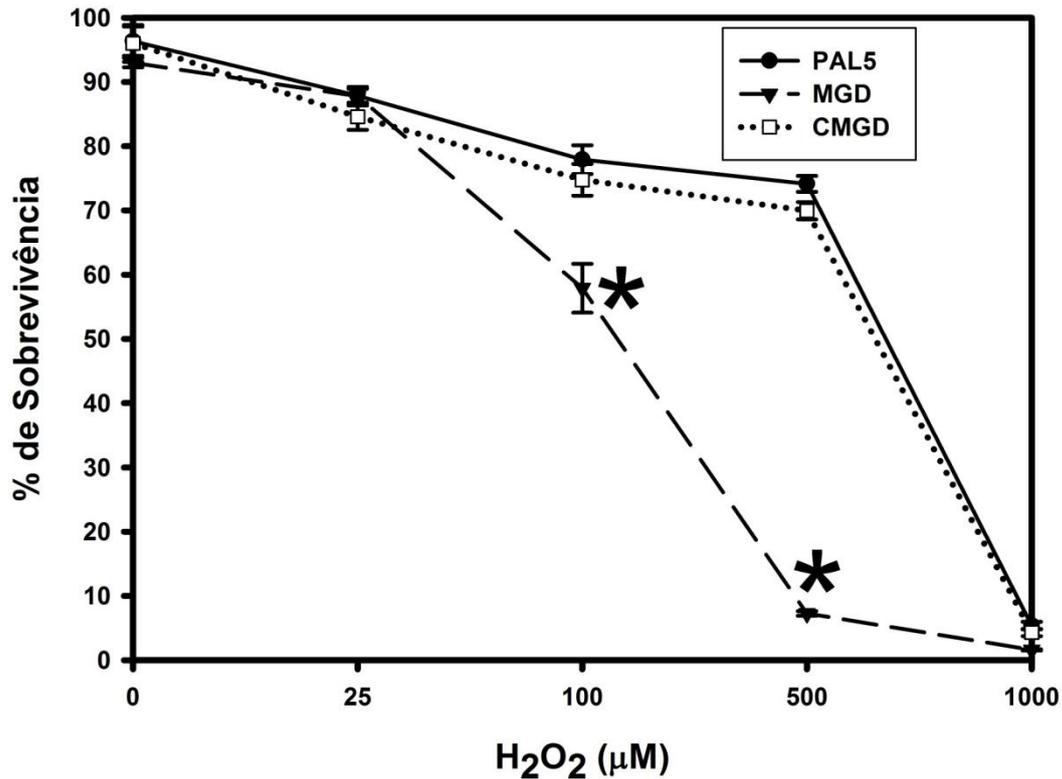


Figura 2. Avaliação da sobrevivência das estirpes PAL5, MGD e CMGD, após exposição à H₂O₂. As células foram expostas a diferentes concentrações de H₂O₂ por 1 h. Porcentagem de células que sobreviveram ao tratamento, em comparação com as células não tratadas foi determinada por diluição em série, em placas e contagem de UFC. Barras representam o erro padrão. (*) representa a diferença estatística (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Não houve diferença significativa na sobrevivência das estirpes de *G. diazotrophicus* na presença de 0, 25 e 1000 μM de H₂O₂. A estirpe mutante MGD apresentou-se mais suscetível do que a PAL5 e CMGD nas concentrações de 100 e 0500 μM de H₂O₂ (Figura 2). Grande percentual das células de PAL5 (78%) e da CMGD (76%) foram capazes de suportar a exposição a 100 mM de H₂O₂ por 1 h, apenas 58% do mutante MGD sobreviveu nas mesmas condições. Em 500 mM de H₂O₂ apenas 8% do mutante MGD, contra 73% de PAL5 e 71% de CMGD, resistiu ao tratamento.

Os resultados indicam que o EPS de *G. diazotrophicus* parece estar intrinsecamente correlacionado à capacidade para suportar estresse oxidativo induzido por H₂O₂. Várias respostas

de defesa são induzidas quando bactérias entram em contato com a superfície radicular, muitas relacionadas à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Em contraste com o ataque a patógenos, a maioria destas reações de defesa são transitórias e locais, sugerindo uma modulação da resposta do hospedeiro para ajudar o estabelecimento da interação. O contato físico direto entre a superfície da raiz e as células bacterianas pode ser mediada por EPS, que formam uma estrutura complexa de macromoléculas na interface planta-bactéria, podendo funcionar com ROS (SILIPO et al., 2009).

A resistência de PAL5 e CMGD à H_2O_2 indica que o EPS de *G. diazotrophicus* pode funcionar de forma semelhante durante o estabelecimento da bactéria na planta, onde esta produz uma concentração elevada de ROS como resposta a fatores bióticos, como acontece em arroz e *Arabidopsis* (KOJO et al., 2006; TANAKA et al., 2006).

Em resposta aos invasores microbianos, as plantas podem gerar reações de defesa complexas que resultam, entre outras coisas, na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que é tóxico para o microrganismo invasor (DONG, 1998). Foi mostrado que EPS estão envolvidos na proteção contra estresse oxidativo e radiação UV em algumas bactérias (ELASRI e MILLER, 1999; KEMP et al., 2004; WANG e YU, 2007; SILIPO et al., 2009). Da mesma forma, os resultados aqui obtidos indicam que o EPS de *G. diazotrophicus* também aumenta a tolerância ao estresse oxidativo causado por H_2O_2 . Portanto, pode-se sugerir que, o EPS de *G. diazotrophicus* também pode ser de grande importância para proteger as bactérias colonizadoras contra a resposta de defesa das plantas durante o processo de colonização.

Evidências sugerem que EPS de rizóbio podem atuar como sinais de supressão à respostas de defesa vegetal (SPAINK, 2000). Mutantes de *R. meliloti* defectivos para síntese de EPS não conseguem invadir nódulos, isso por causa do bloqueio no desenvolvimento do segmento de infecção sugerindo uma existência de um reconhecimento específico do EPS pela planta. Talvez este sistema de reconhecimento esteja envolvido na supressão de respostas de defesa (NIEHAUS et al., 1993; PARNISKE et al., 1994).

Para investigar o efeito do EPS na proteção de *G. diazotrophicus* contra H_2O_2 , as estirpes na presença de H_2O_2 foram co-inoculadas com $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de EPS de *G. diazotrophicus* de PAL5 purificado (Figura 3). Curiosamente, foi possível verificar o aumento da proteção do mutante MGD na presença do EPS mais H_2O_2 . Surpreendentemente, a co-inoculação de EPS com o mutante MGD foi suficiente para permitir a adesão do mutante às raízes de arroz (MENESES et al., 2011).

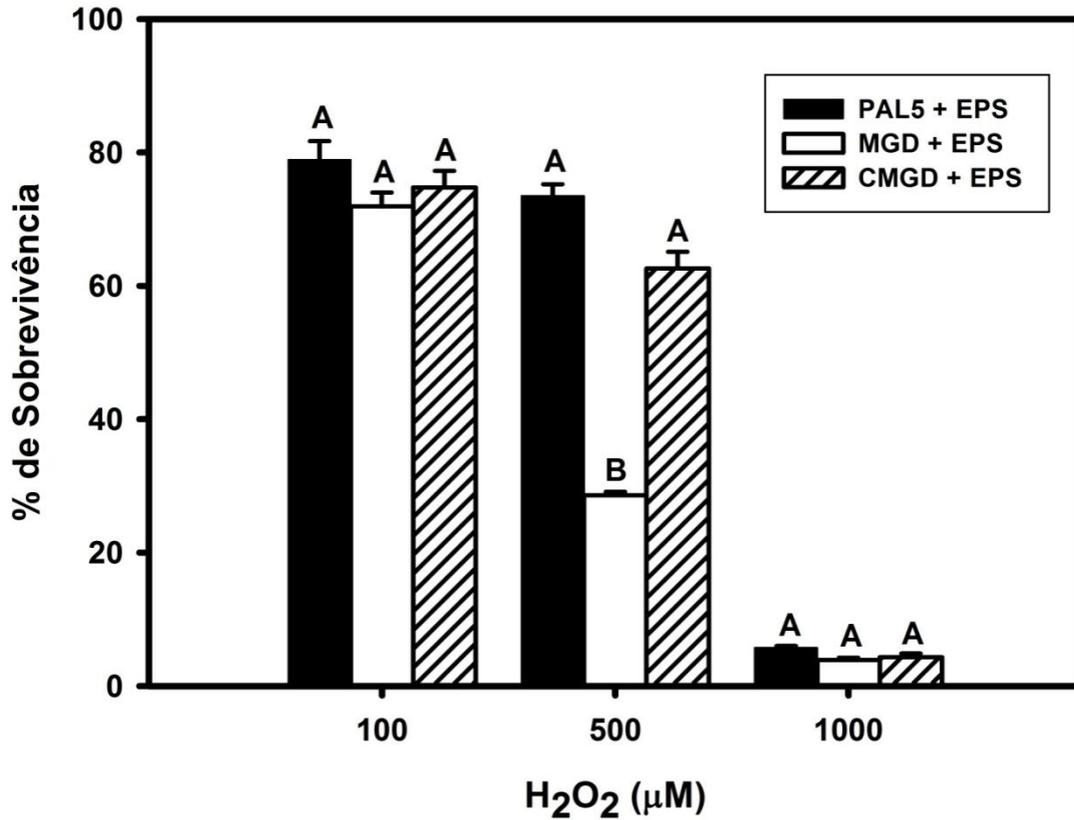


Figura 3. Avaliação da sobrevivência das estirpes PAL5, MGD e CMGD, após exposição à H₂O₂. As células na presença de EPS foram expostas a diferentes concentrações de H₂O₂ por 1 h. Porcentagem de células que sobreviveram ao tratamento, em comparação com as células não tratadas foi determinada por diluição em série, em placas e contagem de UFC. Barras representam o erro padrão. Níveis obtidos para sobrevivência de PAL5, MGD e CMGD co-inoculados com 100 µg.ml⁻¹ de EPS de *G. diazotrophicus*. Barras representam o erro padrão. Diferentes letras indicam diferença estatística (Teste de Tukey, p < 0,05).

Também foi observado o efeito dose dependente do H₂O₂, na qual a concentração mínima de H₂O₂ necessária para o restabelecimento da ligação estirpe MGD foi de 100 µM.

Os organismos aeróbios, tais como *G. diazotrophicus*, estão expostos à fontes internas e externas de ROS. Danos provocados por H₂O₂ podem ser evitados se o H₂O₂ externo for impedido de entrar na célula ou, se o H₂O₂ interno for detoxificado. Aqui, mostramos que os níveis de exopolissacarídeos externo produzidos por *G. diazotrophicus*, correlacionam-se com a sobrevivência na presença de H₂O₂.

A proteção contra o H_2O_2 é independente de mecanismos genéticos capazes de alterar os níveis de exopolissacarídeos. Estirpes de *S. meliloti* com superexpressão de fatores Nod e deficientes na produção de EPS não parecem ter uma vantagem de sobrevivência semelhante à das estirpes que produzem EPS. Isto pode ser em função das diferentes níveis de produção de EPS, ou, possivelmente, pelo excesso de estresse sobre as células, em consequência da superprodução e exportação de fator Nod (MULLIGAN e LONG, 1989).

Mostramos que a estirpe de *G. diazotrophicus* deficiente na produção de EPS (MGD) diminuiu a porcentagem de sobrevivência na presença de H_2O_2 em comparação com as estirpes do tipo selvagem e a estirpe mutante complementada geneticamente. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro relato de proteção EPS contra danos relacionados com ROS em bactérias endofíticas. Em co-cultura com EPS, o mutante (MGD) defectivo na produção de EPS foi capaz de se proteger contra o H_2O_2 . Isto é interessante, dado que a co-cultura de MGD com EPS permite a colonização endofítica (MENESES et al., 2011). Isto pode resultar, em parte, em uma co-proteção contra H_2O_2 , mas essa explicação não descarta a possibilidade do exopolissacarídeo agir como sinalizador específico.

O EPS de *G. diazotrophicus* PAL5 parece ser eficaz na diminuição dos níveis de H_2O_2 , como detectado em todos os ensaios. As concentrações de EPS utilizadas nestes ensaios estão dentro do intervalo necessário para complementar bioquimicamente a deficiência na produção de EPS (MENESES et al., 2011). Não foram investigados os mecanismos químicos pelos quais os exopolissacarídeos de *G. diazotrophicus* PAL5 podem diminuir os níveis de H_2O_2 .

Porém, não podemos descartar a possibilidade de que a atividade antioxidante deste exopolissacarídeo pode ser em função de um íon ou uma pequena molécula, que quando co-precipitados com o EPS podem exercer esse papel (CHO et al., 2013).

5.3. Capacidade Antioxidante Total

O método de capacidade antioxidante total, descrito por Prieto et al., (1999), fundamenta-se na redução do complexo fosfomolibdênico, que consiste na redução do Mo^{+6} para Mo^{+5} e posterior formação do complexo fosfato- Mo^{+5} , o qual pode ser verificado por sua coloração verde em pH ácido e absorção máxima em 695 nm. Esse se destaca por ser um método sensível, de simples execução e de baixo custo.

Neste ensaio, foi construída uma curva de calibração com relação à atividade de diferentes massas de ácido ascórbico. As absorbâncias obtidas das amostras de EPS foram

aplicadas à equação da reta encontrada para a curva de calibração e os resultados foram expressos na forma de concentração relativa ao ácido ascórbico. De acordo com os resultados obtidos, foi verificado que a atividade antioxidante do EPS de *G. diazotrophicus* em relação ao ácido ascórbico é massa-dependente. Assim, na Figura 4 estão relacionadas as diferentes massas utilizadas do EPS com a massa de ácido ascórbico com efeito semelhante.

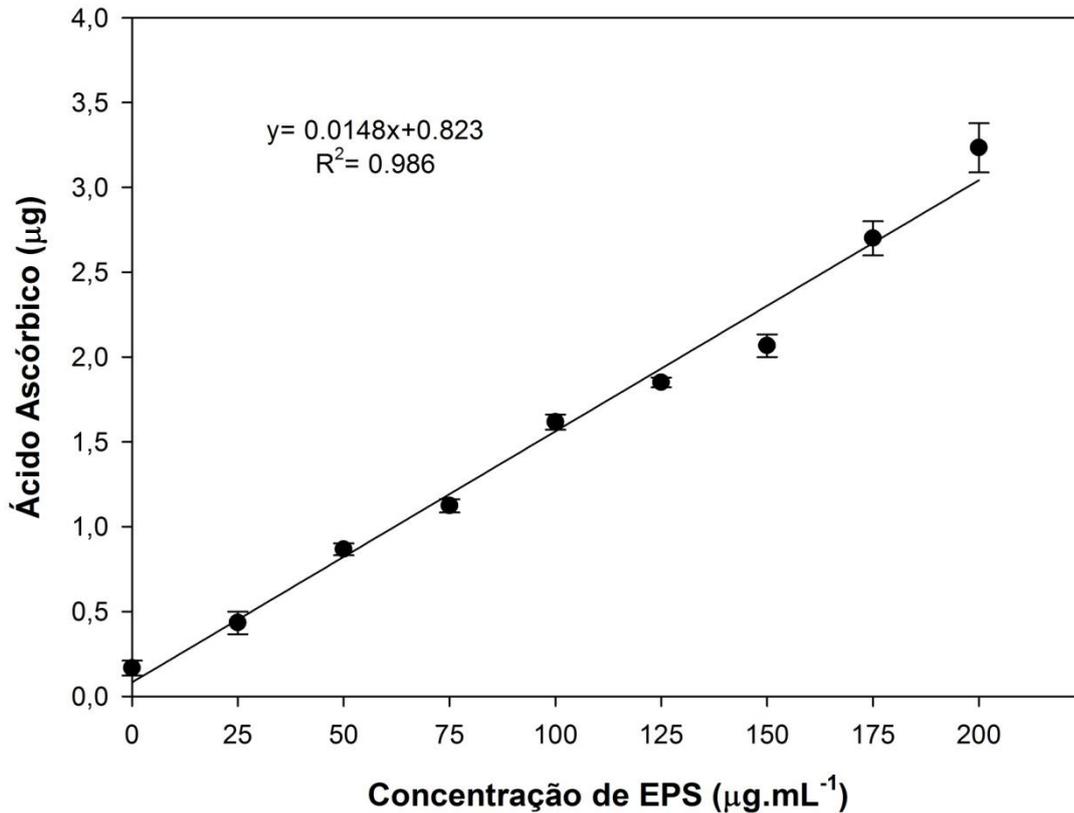


Figura 4. Relação entre as diferentes massas do exopolissacarídeos de *G. diazotrophicus* com a massa de ácido ascórbico com efeito semelhante no ensaio de avaliação da capacidade antioxidante total. Barras representam o erro padrão.

Os antioxidantes podem agir nos organismos vivos por diferentes mecanismos como o sequestro de radicais livres, a complexação de íons metálicos, a decomposição de peróxidos, a inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a modulação de vias de sinalização celulares (VASCONCELOS et al., 2006).

O exopolissacarídeo de *G. diazotrophicus* mostrou atividade antioxidante total com uma atividade relativa ao ácido ascórbico massa-dependente. Neste estudo, foi mostrado que o

potencial redutor dos polissacarídeos de *G. diazotrophicus* também se mostrou concentração-dependente.

Estudos anteriores com *S. meliloti*, elucidaram que a adição exógena de exopolissacarídeos de outras espécies de rizóbio não é competente para restaurar os defeitos fisiológicos de mutantes defectivos na síntese de EPS (BATTISTI et al., 1992).

A exigência de EPS durante o processo de interação (MENESES et al., 2011) pode ser devido em parte à sua capacidade de proteger as bactérias de ROS. Isso poderia explicar como o exopolissacarídeo pode funcionar para permitir uma interação produtiva, uma vez que este tem a capacidade de diminuir os níveis de H_2O_2 *in vitro*.

Os antioxidantes podem agir nos organismos vivos por diferentes mecanismos como ao sequestro de radicais livres, a complexação de íons metálicos, a decomposição de peróxidos, a inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a modulação de vias de sinalização celulares (VASCONCELOS et al., 2006).

O exopolissacarídeo de *G. diazotrophicus* mostrou atividade antioxidante total com uma atividade relativa ao ácido ascórbico massa-dependente. Neste estudo, foi mostrado que o potencial redutor dos polissacarídeos de *G. diazotrophicus* também se mostrou concentração-dependente.

5.4. Sequestro de Radicais Superóxido

Neste ensaio foi utilizado o sistema fenazina-metassulfato-NADH para avaliar o efeito do exopolissacarídeo da bactéria *G. diazotrophicus* PAL5 no sequestro de radicais superóxido. A adição de NADH à mistura composta por fenazina metassulfato e nitroblue tetrazolium (NBT) culmina na formação do ânion radical superóxido. Os radicais superóxido formados são capazes de doar elétrons para o NBT que se reduz a formazan, cromóforo com absorvância máxima em 560 nm.

Neste estudo, o exopolissacarídeo da bactéria *G. diazotrophicus* PAL5 conseguiu sequestrar em até 38% os radicais superóxido formados e o IC_{50} foi estimado em $13,50 \text{ mg.mL}^{-1}$. (Figura 5).

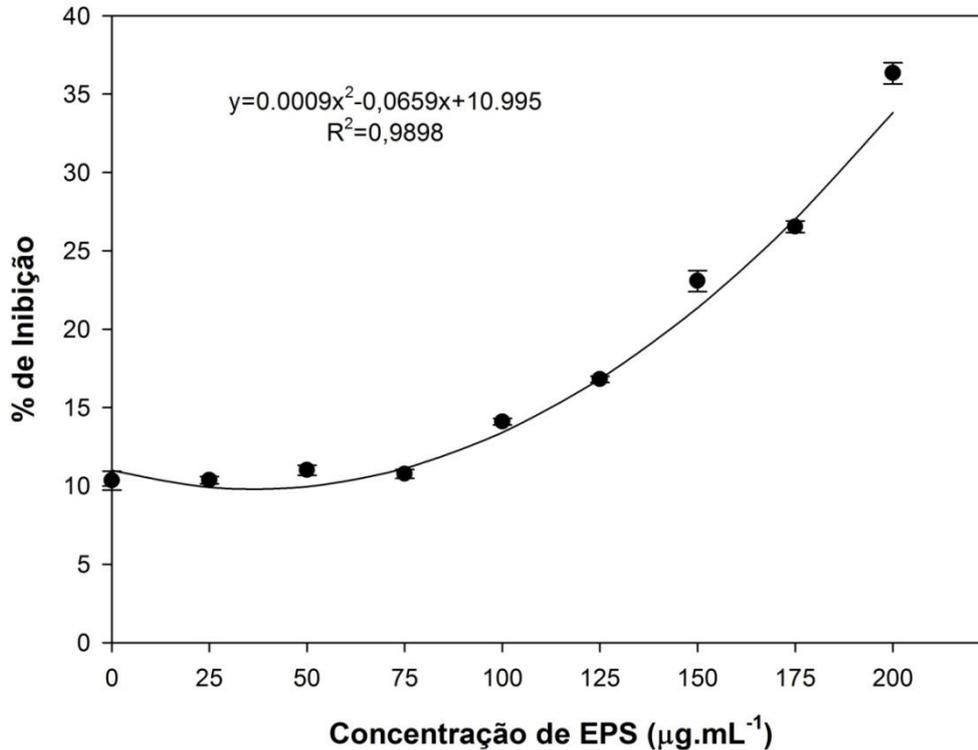


Figura 5. Efeito inibitório de radicais superóxido pelo exopolissacarídeo de *G. diazotrophicus* em diferentes concentrações. Os dados foram expressos em Média \pm DP. Barras representam o erro padrão.

O ânion superóxido é produzido pela redução da molécula de oxigênio (SALVEMINI et al., 2003). Além disto, o superóxido pode reagir com o óxido nítrico culminando na formação do peroxinitrito, que é um oxidante altamente reativo que pode danificar biomoléculas e matar células (ALVAREZ e RADÍ, 2003; NATHAN e SHILOH, 2000).

O exopolissacarídeo de *G. diazotrophicus* inibiu em cerca de 38% a geração de radicais superóxido (IC_{50} 13,5 mg.mL⁻¹). Essa atividade inibitória do radical superóxido pode ser importante contra o envio de geração excessiva de peroxinitrito, que poderia acarretar danos maiores.

5.5. Radicais Hidroxila

Os radicais hidroxila são considerados um oxidante muito potente que pode reagir com a maioria das biomacromoléculas e provocar graves danos às biomoléculas adjacentes. Assim, a

remoção do radical hidroxila é importante para a defesa antioxidante da célula (ARUOMA, 1998). O sequestro dos radicais hidroxilas pelo exopolissacarídeo isolado de *G. diazotrophicus* encontra-se demonstrado na Figura 6. Observamos que este exopolissacarídeo apresentou no início uma atividade mais discreta e depois mais potencializada na concentração 125 mg.mL⁻¹, atingindo inibição máxima em torno de 60% (p<0.001). A capacidade dos exopolissacarídeos no sequestro de radicais hidroxilas foi em concentração dose-dependente.

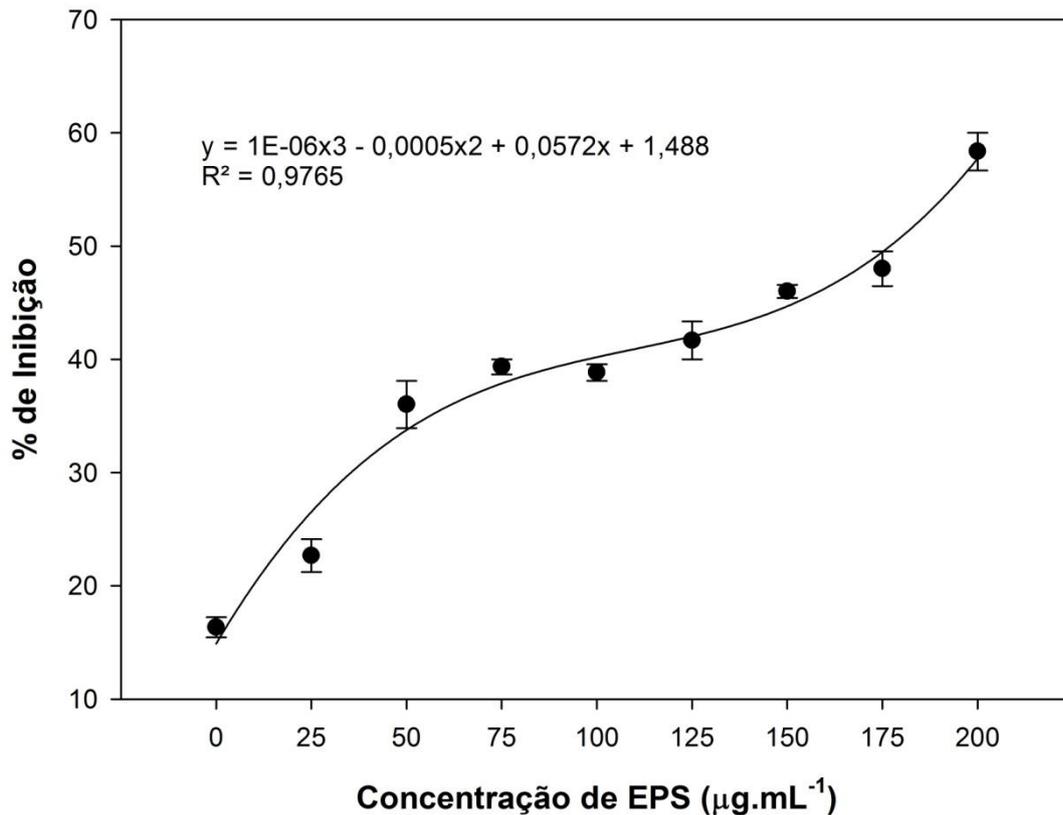


Figura 6. Efeito inibitório dos radicais hidroxilas pelo exopolissacarídeos de *G. diazotrophicus* em diferentes concentrações. Barras representam o erro padrão.

5.6. Peroxidação Lipídica

Em humanos, os radicais livres podem induzir a peroxidação lipídica promovendo dano celular, arterosclerose, câncer ou envelhecimento precoce (NAGUESWARI; BANERJEE; MENON, 1999). Neste processo estão envolvidos a formação e propagação de lipoperóxidos e a possível destruição das membranas lipídicas, com a produção de metabólitos secundários como o

malonildialdeído. A reação de condensação ocorrida entre o MDA e o TBA produz um composto de coloração rosa, que tem forte absorção a 532 nm (ZHANG et al., 2003; WEI et al., 2003).

No modelo aqui empregado, foi utilizado um sistema que continha uma suspensão de gema de ovo, substrato rico em lipídeos, para avaliar a atividade inibitória da peroxidação lipídica.

Neste estudo, os exopolissacarídeos da bactéria *G. diazotrophicus* conseguiram inibir em até 38% a lipoperoxidação e exibiram um IC_{50} de $13,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 07).

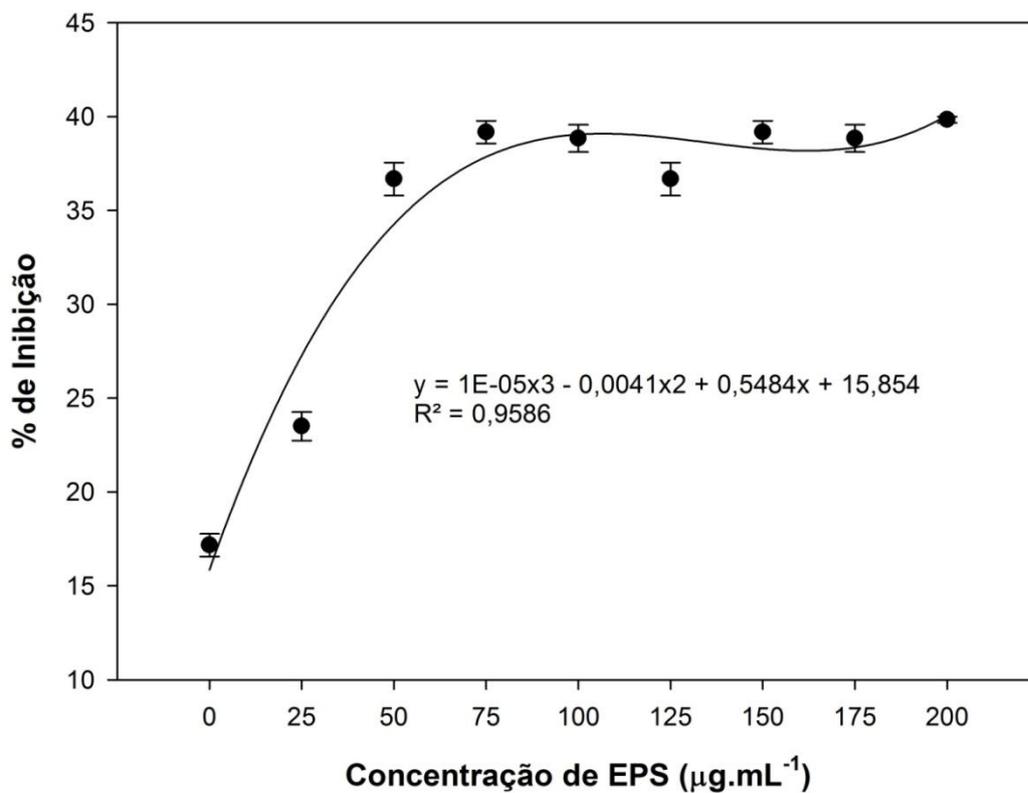


Figura 7. Inibição da peroxidação lipídica da gema de ovo pelos exopolissacarídeos da bactéria *G. diazotrophicus* em diferentes concentrações. Os dados foram expressos em Média \pm DP. Barras representam o erro padrão.

Todos os componentes celulares, em princípio, são suscetíveis à ação das ROS. No entanto, a membrana é um dos componentes mais atingidos num processo conhecido como peroxidação lipídica. Neste processo, ocorre alterações na estrutura da membrana e na

permeabilidade culminando na formação de produtos citotóxicos como o malonaldeído, por exemplo, e morte celular (NIKI et al., 2005).

Extratos aquosos e metanólicos de diversas espécies microbianas já tiveram seu efeito na inibição da peroxidação lipídica comprovados (PUTTARAJU et al., 2006).

O exopolissacarídeo alvo deste estudo também foi efetivo na inibição da peroxidação lipídica exibindo taxas de até 36% de inibição (IC_{50} 13,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

5.7. Poder Redutor

Alguns compostos antioxidantes apresentam capacidade redutora do íon ferro, transformando Fe^{3+} em Fe^{2+} . *In vitro*, essa capacidade redutora é avaliada pela formação de um complexo entre o Fe^{2+} e o cloreto de ferro, sendo a atividade mensurada pelo aumento da absorbância gerada pela formação desse complexo. Na figura 08 observam-se os dados das análises do poder redutor para o exopolissacarídeos de *G. diazotrophicus*. Os resultados são expressos como percentual de atividade observado para 0,2 mg.mL^{-1} de ácido ascórbico. O EPS mostrou uma atividade dose-dependente, não foi observada uma estabilização dos valores do poder redutor de EPS mesmo quando se utilizou a concentração mais elevada (200 mg.mL^{-1}). Vale a pena salientar que nessa concentração foi encontrada uma atividade de aproximadamente 21%.

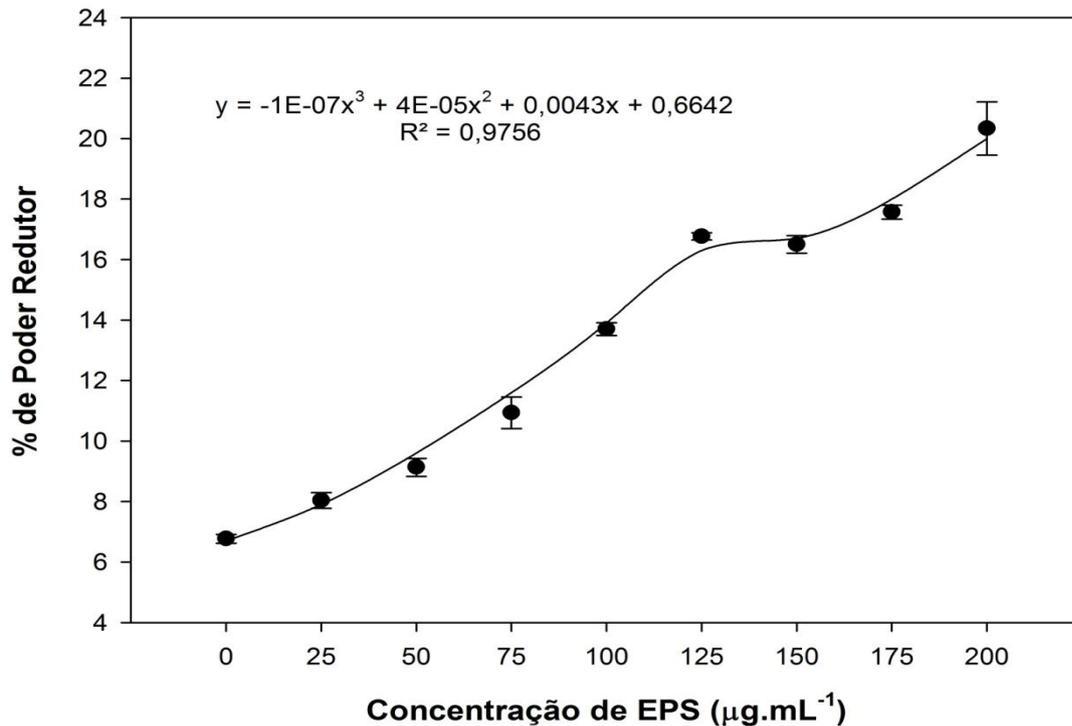


Figura 8. Poder redutor do exopolissacarídeos de *G. diazotrophicus*. Os dados são expressos como média. Os dados foram expressos em Média \pm DP. Barras representam o erro padrão.

Assim, pode ser observado que o exopolissacarídeo extraído de *G. diazotrophicus* demonstrou padrões semelhantes para sua atividade antioxidante total e potencial redutor. Na literatura pode ser observada a correlação entre atividade antioxidante e potencial redutor de compostos (WONG e CHYE, 2009; JAYAKUMAR et al., 2009; LEE et al., 2008).

5.8. IC₅₀

O IC₅₀ representa a concentração da amostra necessária para proporcionar 50% da atividade inibitória (sequestro) de radicais livres. Este parâmetro foi calculado a partir das concentrações dos compostos analisados e da taxa de inibição de cada amostra. A formação de radicais livres nestes sistemas foi inibida pelo exopolissacarídeo de *G. diazotrophicus* o qual mostrou valores de IC₅₀ de 12,8, 13,5 e 13,4 mg.mL⁻¹, para os testes de radicais hidroxila, superóxido e peroxidação lipídica, respectivamente.

Os resultados obtidos para a atividade antioxidante, inibição de radicais superóxidos, hidroxilas e peroxidação lipídica, estão de acordo com os encontrados na literatura (MATSUKAWA et al., 1997, ZHANG et al., 2003, WEI et al., 2003, QI et al, 2005).

Nós mostramos que o EPS de *G. diazotrophicus* serve como agente protetor contra a morte dependente de H₂O₂. Nosso trabalho sugere que os exopolissacarídeos podem fornecer essa proteção, diminuindo a quantidade de H₂O₂ no ambiente circundante.

6. CONCLUSÕES

A análise fenotípica da estirpe mutante MGD de *G. diazotrophicus* sugere um papel do EPS na tolerância a estresses ambientais como H₂O₂ (estresse oxidativo);

O exopolissacarídeo de *G. diazotrophicus* demonstrou potencial antioxidante com atividade relativa ao ácido ascórbico massa-dependente;

O exopolissacarídeo de *G. diazotrophicus* atua sobre o sequestro de radicais superóxido e radicais hidroxila com uma taxa de inibição concentração-dependente;

A atividade antioxidante deste exopolissacarídeo foi confirmada pela presença de potencial redutor dos polissacarídeos concentração-dependente e pela inibição da peroxidação lipídica;

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foi empregada uma abordagem genética e bioquímica para avaliação do papel dos EPS de *G. diazotrophicus* em relação à sobrevivência na presença de ROS, empregando um mutante deficiente na biossíntese do mesmo. É relatada a caracterização funcional contra estresse oxidativo do EPS em *G. diazotrophicus* PAL5 e, os resultados sugerem que o EPS de *G. diazotrophicus* PAL5 suprime estresses abióticos *in vitro*.

O papel do EPS sobre a atividade antioxidante indica a necessidade de estudos adicionais envolvendo microscopia eletrônica de varredura visando esclarecer possíveis modificações a nível estrutural *in vivo*.

Contudo, estudos adicionais para uma avaliação espaço-temporal, empregando as estirpes marcadas com GFP co-inoculadas com EPS de *G. diazotrophicus*, contribuirá na elucidação de algumas questões como, por exemplo:

- 1- O EPS de *G. diazotrophicus* é essencial na sobrevivência da bactéria, contra ROS, nas etapas iniciais da colonização endofítica?
- 2- A utilização desses compostos como agentes antioxidantes podem representar uma possibilidade na busca de compostos aplicados na indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos, já que estes podem inibir danos provocados pelo excesso de radicais livres no organismo?

8. REFERÊNCIAS

ALVAREZ, B.; RADI, R. Peroxynitrite reactivity with aminoacids and proteins. **Amino Acids**, v. 25, p. 295-311, 2003.

ARRIETA, J.; HERNANDEZ, L.; COEGO, A.; SUAREZ, V.; BALMORI, E.; MENENDEZ, C.; PETITGLATRON, M. F.; CHAMBERT, R.; SELMANHOUSEIN, G. Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. **Microbiology**, v. 142, p. 1077-1085, 1996.

ARUOMA O I. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemist's Society**. v. 75, n. 2, p. 199-212, 1998.

ASGHAR, H. N.; ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, n. 4, p. 231-237, 2002.

ASHBOLT, N. J.; INKERMAN, P. A. Acetic-acid bacterial biota of the pink sugar-cane, *Saccharococcus sacchari*, and its environs. **Applied and environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 707-712, 1990.

ATTWOOD, M. M.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 72, n. 2, p. 101-105, 1991.

AYDI, S.; DREVON, J. J.; ABDELLY, C. Effect of salinity on root-nodule conductance to the oxygen diffusion in the *Medicago truncatula* - *Sinorhizobium meliloti* symbiosis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p. 833-840, 2004.

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 Ciencias**, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

BALDANI, J. I.; REIS, V. R. S.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, V. L. D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Biociencia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p. 433.

BATTISTI, L.; LARA, J. C.; LEIGH, J. A. Specific oligosaccharide form of the *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 5625-5629, 1992.

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

CÁRDENAS, L.; MARTÍNEZ, A.; SÁNCHEZ, F.; QUINTO, C. Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). **Plant Journal**, v. 56, p. 802-813, 2008.

CASTRO-SOWINSKI, S.; MATAN, O.; BONAFEDE, P.; OKON, Y. A thioredoxin of *Sinorhizobium meliloti* CE52G is required for melanin production and symbiotic nitrogen fixation. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 20, p. 986-993, 2007.

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

CHANG, C.; DAMIANI, I.; PUPPO, A.; FRENO, P. Redox changes during the Legume - Rhizobium symbiosis. **Molecular Plant**, v. 2, p. 370-377, 2009.

CHO, E.; CHOI, J. M.; KIM, H.; TAHIR, M. N.; CHOI, Y.; JUNG, S. Ferrous iron chelating property of low-molecular weight succinoglycans isolated from *Sinorhizobium meliloti*. **Biometals**, v. 26, p. 321-328, 2013.

COCKING, E. C.; STONE, P. J.; DAVEY, M. R. Intracellular colonization of roots of *Arabidopsis* and crop plants by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 42, n. 1, p. 74-82, 2006.

COJHO, E. H.; REIS, V. M.; SCHENBERG, A. C. G.; DOBEREINER, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amyolytic yeast in nitrogen-free batch culture. **FEMS Microbiology Letters**, v. 106, n. 3, p. 341-346, 1993.

COSTERTON, J. W. Pivotal role of biofilms in the focused attack of bacteria on insoluble substrates. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 30, n. 2-3, p. 123-133, 1992.

COSTERTON, J. W. The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 22, n. 4-5, p. 551-563, 1999.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DAVIES, B.; WALKER, G. Identification of novel *Sinorhizobium meliloti* mutants compromised for oxidative stress protection and symbiosis. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 2110-2113, 2007.

DEL CASTILLO, L. D.; HUNT, S.; LAYZELL, D. B. The role of oxygen in the regulation of nitrogenase activity in drought stressed soybean nodules. **Plant Physiology**, v. 106, p.949-955, 1994.

DENNY, T. P. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 173-97, 1995.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia Tropical**, v. 1, p. 261-272, 1958.

DÖBEREINER. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia derx* in the rhizosphere of sugar cane. **Plant and Soil**, v. 15, p. 211-216, 1961.

DÖBEREINER; V.L.D., B.; OLIVARES, F.L.; REIS, V. M. Endophytic diazotrophs: the key to BNF in gramineous plants. In: HEGAZI, N. A.; FAYEZ, M.; MONIB, M. (Ed.). **Nitrogen Fixation with Non-Legumes**. Giza, Egypt: Faculty of Agriculture, Cairo University, 1993. p. 395-408.

DOMBRECHT, B.; HEUSDENS, C.; BEULLENS, S.; VERRETH, C.; MULKERS, E.; PROOST, P.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Defence of *Rhizobium etli* bacteroids against oxidative stress involves a complexly regulated atypical 2-Cys peroxiredoxin. **Molecular Microbiology**, v. 55, p. 1207-1221, 2005.

DONG, X. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, n. 4, p. 316-23, 1998.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; MCCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. R.; FERNANDEZ CABADILLA, C.; ORTEGA, E.; RODES, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. **Plant Physiology**, v. 105, n. 4, p. 1139-1147, 1994.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

ELASRI, M. O.; MILLER, R. V. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 2025-31, 1999.

FERREIRA, A. L.; 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.

FERREIRA, J. S. **Qualidade de inoculante, inoculação e reinoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em duas variedades de arroz irrigado**. (2008). 83 f. (Doutorado) - Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

FUENTES-RAMIREZ, L. E.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; TAPIA-HERNANDEZ, A.; JIMENEZ-SALGADO, T.; WANG, E. T.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johanna* sp nov and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp nov, associated with coffee plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1305-1314, 2001.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.109-117, 1995.

GOODMAN, B. A.; DEKOCK, P. C. Mossbauer studies of plant materials .1. Duckweed, stocks, soybean and pea. **Journal of Plant Nutrition**, v. 5, n. 4-7, p. 345-353, 1982.

GRACIOLLI, L. A.; FREITAS, J. R.; RUSCHEL, A. P. Bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). **Revista Microbiologica**, v. 14, p. 191-196, 1983.

GUIMARÃES, S. L. Efeito da inoculação de bactérias diazotrofica endofíticas em arroz de sequeiro. **Agronomia**, v. 37, p. 25-30, 2003.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312–322, 2006.

HARRISON, J.; JAMET, A.; MUGLIA, C. I.; VAN DE SYPE, G.; AGUILAR, O.M.; PUPPO, A.; FRENDO, P. Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 168-174, 2005.

HORI, K.; MATSUMOTO, S. Bacterial adhesion: From mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 424-434, 2010.

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

IMLAY, J. A. How oxygen damages microbes: oxygen tolerance and obligate anaerobiosis. **Advances in Microbial Physiology**, v. 46, p. 111-153, 2002.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2-3, p. 197-209, 2000.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; DE OLIVEIRA, A. L. M.; DOS REIS JR, F. B.; DA SILVA, L. G.; REIS, V. M. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 357, p. 747-760, 2001.

JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Infection of sugar-cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 275, p. 757-766, 1994.

JAMET, A.; MANDON, K.; PUPPO, A.; HÉROUART, D. H₂O₂ is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 8741-8745, 2007.

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

JAYAKUMAR, T.; THOMAS, P.A.; GERALDINE, P. *In-vitro* antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 228-234, 2009.

KEMP, B. P.; HORNE, J.; BRYANT, A.; COOPER, R. M. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis gumD* gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 64, n. 4, p. 209-218, 2004.

KIRÁLY, 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, p. 59-68, 1997.

KOJIMA, Y.; TONOUCI, N.; TSUCHIDA, T.; YOSHINAGA, F.; YAMADA, Y. The characterization of acetic acid bacteria efficiently producing bacterial cellulose from sucrose: The proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. nonacetoxidans subsp. nov. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 185-187, 1998.

KOJO, K.; YAENO, T.; KUSUMI, K.; MATSUMURA, H.; FUJISAWA, S.; TERAUCHI, R.; IBA, K. Regulatory mechanisms of ROI generation are affected by rice spl mutations. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, n. 8, p. 1035-1044, 2006.

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.

LEE, YU-LING; JIAN, SHAO-YU; LIAN, PEI-YING; MAU, JENG-LEUN. Antioxidant properties of extracts from a white mutant of the mushroom *Hypsizigus marmoreus*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 2, p.116-124, 2008.

LEHMAN, A. P.; LONG, S. R. Exopolysaccharides from *Sinorhizobium meliloti* Can Protect against H₂O₂-Dependent Damage. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 23, p. 5362-5369, 2013.

LI, R. P.; MACRAE, I. C. Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 23, n. 10, p. 999-1002, 1991.

LIPPINCO.JA; LIPPINCO.BB. Tumor growth complementation among strains of *Agrobacterium*. **Journal of Bacteriology**, v. 99, n. 2, p. 496-500, 1969.

LIU, F.; OOI, V. C. E.; CHANG, S. T. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. **Life Sciences**, v. 60, n. 10, p.763-771, 1997.

LOHAR, D. P.; HARIDAS, S.; GANTT, J. S.; VANDENBOSCH, K. A. A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. **New Phytologist**, v. 173, p. 39-49, 2007.

MAGNANI, G. S.; DIDONET, C. M.; CRUZ, L. M.; PICHETH, C. F.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 250-258, 2010.

MATSUKAWA, R.; DUBIN, E.; KISHIMOTO, K.; MASAKI, P.; MASUDA, K.; TAKEUCHI, T.; CHIHARA, M.; YAMAMOTO, Y.; NIKI, E.; KARUBE, I. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **Journal Applied of Phycology**, v. 9, p. 29-35, 1997.

MENESES, C. H. S. G.; ROUWS, L. F. M.; SIMOES-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, p.1448–1458, 2011.

MICHIELS, K. W.; CROES, C. L.; VANDERLEYDEN, J. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 2241-2246, 1991.

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.

MULLIGAN, J. T.; LONG, S. R. A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Genetics**, v. 122, p. 7-18, 1989.

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, n. 4, p. 981-991, 2007.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, n. 2, p. 157-164, 1999.

NAGUESWARI, K.; BANERJEE, R.; MENON, V. P. Effect of saturated, n-3 e n-6 polyunsaturated fatty acids on myocardial infaction. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 10, p. 338-344, 1999.

NATHAN, C.; SHILOH, M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 8841-8848, 2000.

NIEHAUS, K.; KAPP, D.; PUHLER, A. Plant defense and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS-I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. **Planta**, v. 190, n. 3, p. 415-425, 1993.

NIKI, E.; YOSHIDA, Y.; SAITO, Y.; NOGUCHI, N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 338, p.668-676, 2005.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp in roots, stems, and leaves, predominantly of *Gramineae*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 3, p. 197-200, 1996.

ORTEGA, E.; RODES, R.; DE LA FUENTE, E.; FERNANDEZ, L. Does the routine heat treatment of sugarcane stem pieces for xylem pathogen control affect the nitrogenase activity of an N₂-fixing endophyte in the cane? **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 907-912, 2001.

PATRIQUIN, D. G.; DOBEREINER, J.; JAIN, D. K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 900-915, 1983.

PREMAKUMAR, R.; JACOBSON, M. R.; LOVELESS, T. M.; BISHOP, P. E. Characterization of transcripts expressed from nitrogenase-3 structural genes of *Azotobacter vinelandii*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 929-936, 1992.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E1. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PURCHASE, B. S. Nitrogen fixation associated with sugar cane. **Proceedings of the South African Sugar Technologist's Association**, n. 32, p. 173-176, 1980.

PUTTARAJU, N.G.; VENKATESHAIAH, S.U.; DHARMESH, S.M.; URS, S.M.; SOMASUNDARAM, R. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. **J Agric Food Chem.**, v. 54, n.26, p. 9764-9772, 2006.

REINHOLD, B.; HUREK, T. Light microscopical visualization of diazotrophs on and in roots by immunogold-silver staining. **Biology and Fertility of Soils**, v. 6, n. 4, p. 298-301, 1988.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 1, p. 29-54, 1998.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; DOBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 401-405, 1994.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR., V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, v. 1-2, n. 12, p. 16-20, 1986.

ROMANTSCHUK, M. Attachment of plant pathogenic bacteria to plant-surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 225-243, 1992.

ROUWS, L. F.; SIMOES-ARAÚJO, J. L.; HEMERLY, A. S.; BALDANI, J. I. Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of a flagellar mutant. **Archives in Microbiology**, v. 189, n. 4, p. 397-405, 2008.

RUBIO, M. C.; JAMES, E. K.; CLEMENTE, M. R.; BUCCIARELLI, B.; FEDOROVA, M.; VANCE, C. P.; BECANA, M. Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 17, p. 1294-1305, 2004.

SALVEMINI, D.; ISCHIROPOULOS, H.; CUZZOCREA, S. Roles of Nitric Oxide and Superoxide in Inflammation. In: WINYARD, PG AND WILLOUGHBY, DA. **Methods in Molecular Biology, Inflammation Protocols**. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 225: p. 291-303, 2003.

SANTOS, C. X.; TANAKA, L. Y.; WOSNIAK, J.; LAURINDO, F. R. M. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of

endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. **Antioxidants & Redox Signalling**, v.11, p.2409-2427, 2009.

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.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Chemosphere**, v. 66, n. 9, p. 1794-1798, 2007.

SCHAFER, F.; BUETTNER, G. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple **Free Radical Biology & Medicine**. v.30, p. 1191-212, 2001.

SCHMIT, J.; ROBERT, M. Effect of clays on survival of a phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. **Comptes Rendus de l'Académie des sciences**, v. 299, n. 11, p. 733-738, 1984.

SERRAJ, R.; ROY, G.; DREVON, J. J. Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and in their permeability to oxygen diffusion. **Physiologia Plantarum**, v. 91, p. 161-168, 1994.

SEVILLA, M.; BURRIS, R. H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N_2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *Nif* mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 3, p. 358-366, 2001.

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

SILIPO, A.; ERBS, G.; SHINYA, T.; DOW, J. M.; PARRILLI, M.; LANZETTA, R.; SHIBUYA, N.; NEWMAN, M. A.; MOLINARO, A. Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. **Glycobiology**, v. 20, n. 4, p. 406-19, 2009.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, n. 4, p. 1057-1060, 1989.

SOTO, G. E.; HULTGREN, S. J. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 4, p. 1059-71, 1999.

SPAINK, H. P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. **The Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 257-88, 2000.

SPRENT, J. I.; SUTHERLAND, J. M.; DEFARIA, S. M. Some aspects of the biology of nitrogen-fixing organisms. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 317, n. 1184, p. 111-129, 1987.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 487-506, 2000.

STEPHAN, M. P.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, K. R. S.; MARTINEZ-DRETS, G.; DOBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 77, n. 1, p. 67-72, 1991.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 663-674, 2001.

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, n. 4, p. 319-328, 1999.

TANAKA, A.; CHRISTENSEN, M. J.; TAKEMOTO, D.; PARK, P.; SCOTT, B. Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic interaction. **Plant Cell**, v. 18, n. 4, p. 1052-1066, 2006.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DOBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n. 8, p. 967-980, 1978.

TEJERA, N. A.; ORTEGA, E.; GONZALEZ-LOPEZ, J.; LLUCH, C. Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 3, p. 528-535, 2003.

VARGAS, C.; WU, G.; DAVIES, A. E.; DOWNIE, J. A. Identification of a gene encoding a thioredoxin-like product necessary for cytochrome c biosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 4117-4123, 1994.

VASCONCELOS, S. M. L.; SILVA, A. M.; GOULART, M. O. F. Pró-antioxidantes e antioxidantes de baixo peso molecular oriundos da dieta: estrutura e função. **Nutrire**, v.31, p.95-118, 2006.

WANG, J.; YU, H. Q. Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) and extracellular polymeric substances (EPS) by *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 in batch cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 4, p. 871-878, 2007.

WEI, H.; LAYZELL, D. B. Adenylate-coupled ion movement: a mechanism for the control of nodule permeability to O₂ diffusion. **Plant Physiology**, v. 141, p. 280-287, 2006.

WEI, Y.; LI, Z.; HU, Y.; XU, Z. Inhibition of mouse liver lipid peroxidation by high molecular weight phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*. **Journal Applied of Phycology**, v. 15, p. 507-511, 2003.

WHITCHURCH, C. B.; TOLKER-NIELSEN, T.; RAGAS, P. C.; MATTICK, J. S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science**, v. 295, n. 5559, p. 1487, 2002.

WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H. C. **Microbial extracellular polymeric substances**. Berlin: Springer Verlag, 1999.

WONG, J.Y.; CHYE, F. Y. Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 22, n. 4, p. 269-277, 2009.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. Taxonomic studies of acetic acid bacteria and allied organisms .11. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 8, p. 1244-1251, 1997.

YEN, G. C.; CHEN, H. Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 415-420, 1995.

YOU, C. B.; LIN, M.; FANG, X. J.; SONG, W. Attachment of *Alcaligenes* to rice roots. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 27, n. 4-5, p. 463-466, 1995.

ZHANG, E. X.; YU, L. J. Studies on polysaccharide from *Sargassum thunberg* for its ability to scavenge active oxygen species. **Chinese Journal of Marine Drugs**, v. 3, p.1-4, 1997.

ZHOU, Y. C.; ZHENG, R. L. Phenolic compounds and analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, n.6, p. 1177-1179, 1991.