

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

LEANDRO DATOLA TULLIO

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA CAPACIDADE DE
TOLERÂNCIA AO ESTRESSE ÁCIDO DE *Rhizobium freirei***

PONTA GROSSA

2016

LEANDRO DATOLA TULLIO

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA CAPACIDADE DE
TOLERÂNCIA AO ESTRESSE ÁCIDO DE *Rhizobium freirei***

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (área de concentração de Biologia Evolutiva).

Orientadora: Prof^a. Dra. Jesiane S. da Silva Batista

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi

**Ponta Grossa
2016**

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Tullio, Leandro Datola

T918 Mecanismos moleculares envolvidos na
capacidade de tolerância ao estresse ácido
de *Rhizobium freirei*/ Leandro Datola
Tullio. Ponta Grossa, 2016.
68f.

Dissertação (Mestrado em Ciências
Biológicas - Área de Concentração:
Biologia Evolutiva), Universidade Estadual
de Ponta Grossa.

Orientadora: Profª Drª Jesiane S. da
Silva Batista.

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi.

1.Fixação biológica de nitrogênio.
2.Metabolismo. 3.Estresse abiótico.
I.Batista, Jesiane S. da Silva. II.
Pileggi, Marcos. III. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Ciências Biológicas. IV. T.

CDD: 631.46



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



PARANÁ

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta
Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e
Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste
(Departamento de Ciências Biológicas).



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 05/2016

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo candidato **Leandro Datola Tullio**.

Aos vinte e seis dias do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, na sala 01 do NUTEAD Central de salas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência da Dr^a Jesiane Stefania da Silva Batista em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Leandro Datola Tullio**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr^a Jesiane Stefania da Silva Batista (Orientadora UEPG), Dr^a Mariangela Hungria da Cunha (EMBRAPA) e Dr. Rafael Mazer Etto (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir o candidato passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Mecanismos moleculares envolvidos na capacidade de tolerância ao estresse ácido de *Rhizobium freirei***". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADO**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 90 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 26 de fevereiro de dois mil e dezesseis.

Prof^a Dr^a Jesiane Stefania da Silva Batista (UEPG) _____

Prof^a Dr^a Mariangela Hungria da Cunha (EMBRAPA) _____

Prof. Dr. Rafael Mazer Etto (UEPG) _____

[Handwritten signatures of Prof. Dr. Jesiane Stefania da Silva Batista, Prof. Dr. Mariangela Hungria da Cunha, and Prof. Dr. Rafael Mazer Etto]

Agradecimentos

À Capes e ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

À minha família, Mauro, Maria, Lorena e Maysa, por terem me ajudado a seguir sempre trabalhando e por me ensinarem que o caminho certo nem sempre é o mais fácil, mas que nunca devo desistir. Agradeço também pelo apoio incondicional, financeiro, moral, até mesmo quando estávamos distantes e passávamos semanas sem nos ver!

À minha avó Jacira, que cansou todos os santos com suas orações durante minhas avaliações, e que hoje não deve ser diferente!

À minha Mãe na ciência, Dr^a Jesiane Batista, orientadora e companheira de luta, agradeço pela dedicação, pelos dias mal dormidos corrigindo trabalhos, pelos milagres que operou, pelo conhecimento que transmitiu a mim, por me ensinar valores pessoais e morais, pelos momentos de descontração, e por ser um exemplo a ser seguido!

Ao meu pai na ciência, Dr. Marcos Pileggi, por ter me criado neste mundo e ter sido meu co-orientador durante o curso do mestrado, pela dedicação, pelos ensinamentos, pelo companheirismo, empenho e paciência durante minha vida acadêmica.

À Dr^a Mariângela Hungria, por me fazer sentir da família, mesmo recém chegado, doar seu conhecimento, estrutura física do laboratório, seus companheiros de trabalho e por ter aceitado participar da banca de defesa desta dissertação.

Ao PPG em Biologia Evolutiva, pela oportunidade de cursar o mestrado, pelo conhecimento transmitido pelos professores e pela estrutura concedida para a realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Rafael Etto e Dr^a Carolina Galvão, pelas incríveis contribuições como membros de banca examinadora, principalmente pela visão diferenciada dos resultados, que foi fundamental para a elaboração desta versão final.

Ao amigo Dr. Douglas Gomes, pelo companheirismo e paciência em ensinar e auxiliar nos experimentos.

Ao Dr. Luciano Paulino (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), pelo auxílio nos experimentos.

Aos amigos irmãos de longa data Ricardo, Géssica, Pablo, Fabiane, Milena, Vanessa, Fernanda, Rafael, Tatiane e Alyne, pelo companheirismo de sempre, pelos conselhos, ajudas sempre que possível, e pelos momentos de descontração.

A todos os demais que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho ou formação científica e pessoal!

À UEPG, pela estrutura concedida.

À Embrapa Soja, pela estrutura concedida.

"Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente "

Roger Von Oech

Resumo

O pH é o principal determinante da diversidade microbiana do solo. *Rhizobium freirei* é um notável endossimbionte de feijão e reconhecido por sua elevada capacidade de tolerância a estresses ambientais, como o pH ácido. O objetivo deste trabalho foi analisar alterações na expressão gênica, em nível transcricional e traducional, de *R. freirei* cultivada em pH ácido. A bactéria foi cultivada em caldo TY até alcançar a fase exponencial em pH 6,8 e pH 4,8 e, submetida à extração de proteínas totais. As proteínas foram separadas por eletroforese bidimensional e os perfis proteicos obtidos foram analisados em imagens de alta resolução. Os *spots* diferencialmente expressos ($p \leq 0,05$) foram selecionados para análise em espectrometria de massa e identificação *in silico*. A expressão diferencial dos genes *gshB*, *gstA* e *ropB* foi analisada após 0, 30 e 60 min de exposição de *R. freirei* ao pH ácido. De acordo com os resultados, o principal mecanismo de tolerância de *R. freirei* ao pH ácido parece estar associado à alteração de vias metabólicas centrais, devido ao aumento na expressão de proteínas envolvidas com vias oxidativas (ZwF, KDPG e PckA), relacionadas ao Ciclo do Ácido Tricarboxílico. A maior expressão destas enzimas sugere um aumento no consumo de carboidratos e consequente formação de NADH, que pode ser corroborado pelo aumento na expressão da subunidade NuoC do Complexo 1 da cadeia respiratória, que cataliza a conversão de NADH em NAD^+ acoplada ao transporte de prótons para o periplasma, reduzindo a acidificação citosólica. O Complexo 1 é considerado o principal formador de radical superóxido, além disso a maior expressão das enzimas antioxidativas AhpC e GstA em nível traducional, bem como a maior expressão de *gstA* em nível transcricional, sugere fortemente que o pH ácido induz ao estresse oxidativo em *R. freirei*. Por outro lado, a menor expressão da proteína AccC pode estar relacionada a um direcionamento do metabolismo central ao consumo de ácidos em detrimento à biossíntese de ácidos graxos, processo em que AccC é fundamental. A menor expressão da subunidade β do Complexo ATPase (AtpD) pode estar direcionada à redução na acidificação do pH interno, por meio da diminuição na entrada de prótons. Tal abrangência de vias metabólicas envolvidas sugere que a resposta adaptativa ao pH ácido possui caráter multigênico, cuja predominância de proteínas citoplasmáticas reforça a importância do metabolismo central para sua capacidade de tolerar pH acidificado. Ao contrário de trabalhos que enfocam genes ou mecanismos específicos de tolerância, nossos resultados mostraram, pela primeira vez, que o metabolismo central parece ser o principal mecanismo de tolerância ao pH ácido em *R. freirei* e que há fortes indícios da correlação entre estresse ácido e oxidativo.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio, metabolismo, estresse abiótico.

Abstract

The pH is the main controller of microbial diversity of soil. *Rhizobium freirei* is a remarkable bean endosymbiont and recognized by its ability to tolerate environmental stresses, such as acidic pH. The aim of this study was to analyze changes in gene expression at transcriptional and translational level of *R. freirei* grown in acidic pH. Bacteria was grown in TY medium until exponential phase in two treatments: pH 6,8 and pH 4,8. The protein extraction was performed and the extract was separated by two-dimensional electrophoresis. High-resolution images of the profiles were analyzed and the spots that showed statistical difference in the relative volume (%vol) between treatments were selected for identification by mass spectrometry (MS) and *in silico* identification. Differential expression of *R. freirei* was assessed by analysis of *gshB*, *gstA* and *ropB* genes after 0, 30 and 60 min of exposure in acidic pH. According to the results, the changing of central metabolic pathways seems to be the main mechanism of tolerance to acid stress in *R. freirei*, due to the increased expression of proteins involved in oxidative pathways (Zwf, aldolase KDPG and PckA) related to the Tricarboxylic Acid cycle (TCA). The increased expression of these proteins suggests higher carbohydrate consumption and NADH formation, reinforced by elevated expression of NuoC subunit of respiratory chain Complex 1, that converts NADH into NAD⁺ coupled to proton transport to periplasm and consequent decreases the cytosolic acidification. The Complex 1 of the respiratory chain is the main superoxide former; moreover the higher expression of the antioxidative enzymes AhpC and GstA at translational level, and the higher expression of *gstA* at transcriptional level, strongly suggests an oxidative stress induced by acid pH condition. On the other hand, the decreased AccC protein expression supports the trend of the central metabolism to acid-consuming reactions, in contrast to fatty acids biosynthesis pathways, where AccC is essential. Down-regulation of the β subunit of ATPase Complex can be related to regulation of cytosolic acidity by reduction of proton entry through ATPase Complex. Such broad range of pathways involved in the response to acid conditions suggests an adaptive response of multigenic character mainly involving cytoplasmic proteins, and reinforces the importance of the central metabolism for *R. freirei* ability to tolerate acidic pH conditions. In contrast to studies focused in few genes or specific mechanisms of tolerance, our results shows by the first time that the central metabolism appears to be the main mechanism of acid tolerance in *R. freirei* and suggests a correlation between acid and oxidative stress responses.

Keywords: biological nitrogen fixation, metabolism, abiotic stress.

Lista de abreviaturas e siglas

2DE - Eletroforese bidimensional

ATP - Adenosina Trifosfato

cDNA - DNA complementar produzido com base na sequência do RNAm

COG - Categorização de grupos ortólogos, do inglês *Cluster of Orthologous Group*

D.O. - Densidade ótica (absorbância)

FBN - Fixação Biológica de Nitrogênio

FDR - Taxa de falsa descoberta, do inglês *False Discovery Rate*

IF - Focalização isoeétrica, do inglês *Isoelectric Focusing*

IPG - Gradiente de pH imobilizado, do inglês *immobilized pH gradient*

MS - Espectrometria de massa, do inglês *mass spectrometry*

MALDI-TOF - Matriz assistida por ionização a laser acoplada a um analisador de massa do tipo Tempo de voo, do inglês Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight

MOWSE - busca por massa molecular, do inglês *Molecular Weight Search*

N - Nitrogênio

NCBI^{nr} - *National Center for Biotechnology Information non redundant*

PCR - Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

pH 30 - Tratamento com exposição de *R. freirei* ao pH ácido por 30 min.

pH 60 - Tratamento com exposição de *R. freirei* ao pH ácido por 60 min.

Pi - fosfato inorgânico

pI - Ponto isoeétrico

PMF - *Fingerprint* da massa do peptídeo, do inglês *Peptide Mass Fingerprinting*

RT-qPCR - PCR quantitativo em tempo real, do inglês *Real Time - quantitative PCR*

SDS - Dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, do inglês *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

TCA - Ciclo do Ácido Tricarboxílico, do inglês *Tricarboxylic Acid Cycle*

TE - Tampão de Equilíbrio

TY - Meio Triptona-Extrato de levedura, do inglês *Tryptone Yeast*

%vol - Volume percentual

Vh - Volt/hora total

Lista de figuras

- Figura 1 - Título:** Organogênese do nódulo em plantas leguminosas.....15
- Figura 2 - Título:** Perfis de géis bidimensionais, com faixa de pH 4-7, de proteínas totais de *Rhizobium freirei* em crescimento em pH 6,8 (A) e pH 4,8 (B). Números indicados nos géis correspondem aos spots descritos na Tabela 2.42
- Figura 3 - Título:** Representação esquemática da biossíntese de Glutathione (GSH) e destoxificação de H_2O_2 . Os nomes em negrito representam enzimas, os demais são metabólitos e cofatores. As enzimas γ -Glutamylcisteine sintase (GshA), Glutathione Sintase (GshB) e Serina Hidroximetiltransferase (SHMT) atuam na biossíntese de GSH, enquanto Glutathione S Transferase (GstA) e Glutathione Redutase (GR) estão envolvidas com a destoxificação de H_2O_2 e reciclagem do complexo GSSG formado, respectivamente. As enzimas GshB, SHMT e GstA foram identificadas no proteoma de *R. freirei*, cujo destaque em vermelho indica menor expressão em pH acidificado e azul indica maior expressão na mesma condição. Gly corresponde ao aminoácido glicina e GSSG ao complexo formado pela conjugação de 2 GSH.46
- Figura 4 - Título:** Representação gráfica dos valores de %vol de algumas proteínas identificadas de *R. freirei* em condição controle (brancos) e em pH ácido (azuis). Os números das proteínas correspondem à ordem apresentada na Tabela 2.....48
- Figura 5 - Título:** Representação esquemática parcial de vias metabólicas centrais, com ênfase nas etapas catalizadas por proteínas identificadas no proteoma de *R. freirei* sob estresse ácido. Direção das setas indica o sentido do fluxo metabólico; retângulos azuis correspondem às proteínas identificadas neste trabalho com maior expressão em pH ácido, retângulos vermelhos correspondem às proteínas identificadas neste trabalho com menor expressão em pH ácido, enumeradas de acordo com a Tabela 2; quadros nomeados correspondem a substratos ou produtos de enzimas identificadas, quadrados pretos indicam outros metabólitos. Coloração das setas correspondem a reações pertencentes às vias: ED (marrom), TCA (verde), Gliconeogênese (roxo) e Biossíntese de ácidos graxos (laranja).48

Lista de tabelas

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para análise transcricional por RT-qPCR dos genes <i>gshB</i> , <i>gstA</i> e <i>ropB</i>	31
Tabela 2 - Proteínas diferencialmente expressas por <i>R. freirei</i> identificadas por espectrometria de massa e informações complementares.....	43

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1. Fixação biológica de nitrogênio	13
1.2. Interação simbiótica entre rizóbios e plantas hospedeiras	14
1.3. Diversidade do gênero <i>Rhizobium</i> e o grupo <i>Rhizobium tropici</i>	16
1.3.1. A espécie <i>Rhizobium freirei</i>	17
1.4. Estresses abióticos e a FBN.....	18
1.4.1. Efeitos celulares e moleculares do pH ácido e respostas adaptativas	18
1.5. A genômica funcional e o estudo das respostas moleculares ao estresse ambiental	20
1.5.1. Proteômica: uma abordagem funcional	21
1.5.2. Eletroforese bidimensional	22
1.5.3. Espectrometria de massa	23
1.5.4. Ferramentas de bioinformática aplicadas à Proteômica	24
2. Objetivos	25
2.1. Objetivos específicos.....	25
3. Material e métodos	26
3.1. Condições de crescimento bacteriano	26
3.2. Extração de proteínas totais	26
3.3. Separação de proteínas totais e análise dos perfis proteicos	27
3.4. Análise das imagens do gel e seleção dos spots	27
3.5. Preparação das amostras e espectrometria de massa	28
3.6. Identificação das proteínas	28
3.7. Caracterização das proteínas	29
3.8. Análise transcricional dos genes <i>gshB</i> , <i>gstA</i> e <i>ropB</i> por RT-qPCR	29
3.8.1. Extração de RNA e síntese do cDNA	29
3.8.2. Desenho dos iniciadores e avaliação por RT-qPCR.....	30
4. Capítulo 1: Mecanismos moleculares envolvidos na capacidade de tolerância ao estresse ácido de <i>Rhizobium freirei</i>	32
4.1. Resumo	32
4.2. Introdução.....	33
4.3. Material e métodos	34
4.3.1. Condições de crescimento bacteriano.....	34
4.3.2. Extração de proteínas totais	35
4.3.3. Separação de proteínas totais e análise dos perfis proteicos	35

4.3.4. Análise das imagens do gel e seleção dos <i>spots</i>	36
4.3.5. Preparação das amostras e espectrometria de massa	36
4.3.6. Identificação das proteínas	37
4.3.7. Caracterização das proteínas	37
4.3.8. Análise transcricional dos genes <i>gshB</i> , <i>gstA</i> e <i>ropB</i> por RT-qPCR	37
4.3.8.1. Extração de RNA e síntese do cDNA.....	37
4.3.8.2. Desenho dos iniciadores e avaliação por RT-qPCR.....	38
4.4. Resultados e discussão.....	39
4.4.1. Crescimento de <i>R. freirei</i> em condição de estresse ácido.....	39
4.4.2. O efeito do pH nos perfis bidimensionais de proteínas totais de <i>R. freirei</i>	40
4.4.3. Panorama da resposta adaptativa de <i>R. freirei</i> frente ao pH acidificado.....	41
4.4.4. Indução da síntese proteica.....	46
4.4.5. Envolvimento da glutatona na resposta ao pH ácido	46
4.4.6. Vias metabólicas centrais e a tolerância ao estresse ácido	47
4.4.7. Manutenção do pH interno	50
4.4.8. Formação de ERO e defesa enzimática correspondente.....	51
4.5. Considerações finais	53
4.6. Referências bibliográficas	55
5. Anexos	67
Anexo 1.	68
Anexo 2.	69

1. Introdução

1.1. Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio (N) é um nutriente essencial a todas as formas de vida, sendo frequentemente limitante à produção primária e à manutenção dos ecossistemas. Apesar de ser o nutriente mais abundante da atmosfera terrestre, sua forma molecular (N_2) é inerte para grande parte dos organismos. Portanto, estes organismos dependem da disponibilidade de formas passíveis de assimilação para suas necessidades nutricionais (HAAG et al., 2012).

O N é o elemento que mais limita o desenvolvimento das plantas, principalmente nos solos pouco férteis das regiões tropicais. As plantas obtêm N do solo essencialmente na forma orgânica (98 %), mas também nas formas inorgânicas amônia (NH_3 , convertida em NH_4^+ em contato com H_2O), nitratos (NO_3^-) e nitritos (NO_2^-) (MORGANTE & SALAMINI, 2003; ALFAIA, 2006); dos fertilizantes nitrogenados; de processos de fixação não-biológica, decorrentes de descargas elétricas (promovem a oxidação do N_2 em NO_3), combustão e vulcanismo (liberação de NH_3); do processo de fixação biológica de N atmosférico (FBN) (MALAVOLTA, 2006).

A FBN é um processo realizado apenas por bactérias e arqueas, filogeneticamente diversas, denominadas coletivamente de diazotróficas. Este processo consiste na redução enzimática do N_2 a amônia, que pode ser assimilada por outros organismos, e é responsável por cerca de 97 % de todo o N assimilável incorporado aos ecossistemas terrestres (HAAG et al., 2012; REED et al., 2011).

O complexo enzimático nitrogenase, que possui subunidades proteicas capazes de transportar elétrons para que a redução do N_2 ocorra, possui um papel chave no processo de FBN. As subunidades deste complexo correspondem à Ferro-proteína (Fe-proteína) e à Ferro-Molibdênio-proteína (FeMo-proteína). A redução do N_2 se dá por várias transferências de elétrons, e requer alta quantidade de Adenosina Trifosfato (ATP). A subunidade Fe-proteína recebe elétrons de uma terceira molécula, que também auxilia esse processo, a ferredoxina. Após recebê-lo, a Fe-proteína doa elétrons para a FeMo-proteína, que os acumula até concentrar oito elétrons. Somente com os oito elétrons é que a redução completa do N_2 a NH_3 ocorre, resultando na reação: $N_2 + 16 ATP + 8e^- + 8H^+ \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 Pi$ (MALAVOLTA, 2006). Outros três sistemas alternativos são conhecidos, contendo vanádio ou ferro em substituição ao molibdênio (VFe-proteína e FeFe-proteína, respectivamente), e um raro sistema dependente de monóxido de carbono (ZEHR et al., 2003; HU & RIBBE, 2015).

Devido à elevada estabilidade da tripla ligação entre os dois átomos de N, a FBN torna-se um processo energeticamente custoso. Por exemplo, estima-se que a espécie *Azotobacter vinelandii*, que possui três dos sistemas da nitrogenase descritos acima, gasta 16 moléculas de ATP por molécula de N₂ fixado, e mais de 100 g de glicose para fixar 1 g de N₂ (REED et al., 2011). Ou seja, para que o N seja incorporado de forma eficiente à biosfera, é necessário um grande aporte de fontes energéticas.

Os microrganismos diazotróficos podem estabelecer diferentes tipos de associação com diferentes espécies vegetais, podendo habitar a região da rizosfera (solo próximo à raiz), superfície de órgãos e tecidos (epifíticos), espaços intercelulares de tecidos vegetais (endofíticos), e o interior de células vegetais (simbiontes), em estruturas especializadas denominadas nódulos. Quando tais microrganismos promovem o crescimento de plantas, seja de forma direta (ex. disponibilizando nutrientes), ou indireta (ex. inibindo patógenos), são categorizados como “bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), e somente os que são capazes de estabelecer simbiose com plantas são coletivamente denominados rizóbios (GOPALAKRISHNAN et al., 2015).

1.2. Interação simbiótica entre rizóbios e plantas hospedeiras

Dentre as formas de associação planta-microrganismo, a associação simbiótica é a que fornece o maior aporte de N para o hospedeiro, possuindo, por isso, uma grande importância ecológica em diversos ecossistemas (HUNGRIA & CAMPO, 2007).

Os rizóbios possuem a capacidade de estabelecer uma relação com elevado grau de especificidade com o hospedeiro, majoritariamente da família Fabaceae, e levar à formação de novos órgãos, usualmente nas raízes, denominados nódulos. No interior desses órgãos, mediante processo de infecção, formas diferenciadas de rizóbios fixam N, utilizando energia dos fotossintatos fornecidos pela planta hospedeira e disponibilizam a amônia produzida diretamente aos tecidos vegetais (JONES et al., 2007).

A interação inicia-se com a liberação de exsudatos das raízes ou sementes da planta hospedeira, contendo uma específica variedade de moléculas, dentre as quais os compostos flavonóides (Figura 1A). Os flavonóides atuam como sinais moleculares, e são detectados por rizóbios compatíveis presentes no solo, agindo como substâncias quimiotáticas, estimuladoras da multiplicação dos rizóbios e indutoras de genes bacterianos responsáveis pela síntese dos fatores de nodulação (fatores Nod), oligossacarídeos lipoquitínicos secretados pelos rizóbios (Figura 1A). Os fatores Nod, mediante reconhecimento pela planta, induzem a alterações

morfológicas, como o curvamento dos pelos radiculares, invaginação da parede celular e formação de um pré-cordão de infecção no interior do pêlo radicular (Figura 1B). O cordão de infecção prolonga-se até atingir o primórdio do nódulo, que é desenvolvido devido à reativação da divisão de células diferenciadas do córtex da raiz (Figura 1C). Os rizóbios são liberados na extremidade interna do cordão de infecção por endocitose em uma célula cortical, circundados por uma membrana, no interior da qual serão diferenciados em bacteróides, formas capazes de fixar N_2 , determinando a formação do nódulo maduro e ativo (Figura 1D) (SCHULTZE & KONDOROSI, 1998; JONES et al., 2007; MASSON-BOIVIN et al., 2009).

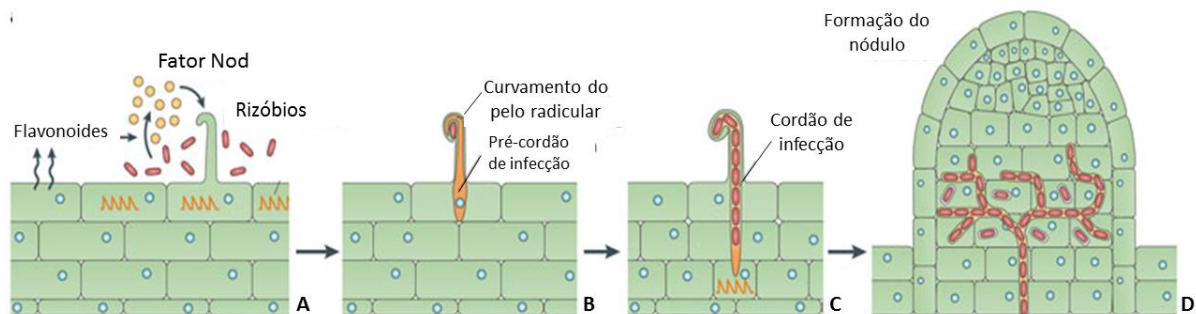


Figura 1: Organogênese do nódulo em plantas leguminosas

Fonte: OLDROYD, 2013.

Essa interação simbiótica requer um alto grau de compatibilidade entre o rizóbio e a planta hospedeira, pois a sinalização molecular, mediada especialmente pelos flavonóides e fatores Nod, é altamente específica e coordenada (MASSON-BOIVIN et al., 2009; BARRET & PARKER, 2006).

Assim, o processo de FBN promove um benefício mútuo entre planta hospedeira, que fornece fontes de energia e carbono, e rizóbio, que supre a necessidade da planta por N em formas assimiláveis (HUNGRIA & CAMPO, 2007). Outros benefícios ao desenvolvimento vegetal pelos rizóbios já foram descritos, como produção de hormônios vegetais, proteção contra fitopatógenos e estresses ambientais (AHEMAD & KHAN, 2011; HAAG et al., 2012). A simbiose de plantas com rizóbios equivale a uma fertilização interna e natural, e é a principal razão pela qual plantas da família Fabaceae são mais ricas em teor proteico do que as demais (BROUGHTON et al., 2003).

Algumas espécies de rizóbios são especialmente estudadas por sua versatilidade metabólica e capacidade adaptativa frente a condições ambientais hostis, características cruciais para aumentar a incorporação de N₂ nos ecossistemas.

1.3. Diversidade do gênero *Rhizobium* e o grupo *Rhizobium tropici*

O gênero *Rhizobium* foi descrito pela primeira vez em 1896 por Kirchner, e representava o único grupo de bactérias fixadoras de nitrogênio que se associavam a certas espécies de leguminosas, formando nódulos (DELAMUTA et al., 2015). Os rizóbios encontram-se classificados pela taxonomia atual como pertencentes a: Domínio: Bacteria; Filo: Proteobacteria; Classe: Alphaproteobacteria; Ordem: Rhizobiales; distribuídos nas Famílias Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Bradyrhizobiaceae, Methylobacteriaceae e Hiphomicrobiaceae; compreendendo dez gêneros: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Blastobacter*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (MOULIN et al, 2001). No entanto, bactérias capazes de nodular leguminosas também foram identificadas como pertencentes às classes Betaproteobacteria (*Burkholderia* e *Cupriavidus*) e Gammaproteobacteria (*Pseudomonas*) (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2013). Dentre as espécies microssimbiontes de feijoeiro encontram-se *R. leguminosarum*, *R. tropici*, *R. giardinii*, *R. galicum*, *R. lusitanum*, *R. multihospitum*, *R. leucaenae*, *R. freirei*, dentre outras.

Alguns autores sugerem que o gênero *Bradyrhizobium* é o ancestral dos alfa-rizóbios, cuja origem provavelmente ocorreu nos trópicos. Isto explicaria, em parte, a maior diversidade de rizóbios nas regiões tropicais, onde o “grupo *Rhizobium tropici*” parece ter sido originado (DELAMUTA et al., 2012; 2013; MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991). Entretanto, os resultados obtidos até o presente indicam que essa diversidade ainda é pouco conhecida, mesmo sabendo que este grupo representa um componente-chave para a sustentabilidade de solos tropicais (DELAMUTA et al., 2012).

Estirpes do “grupo *Rhizobium tropici*” dominam a nodulação do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em solos ácidos do Quênia (ANYANGO et al., 1995), cuja espécie *R. tropici* é uma das mais tolerantes a ambientes que apresentam condições ácidas (ANDRADE et al., 2002).

Um estudo comparativo de estirpes desse grupo avaliou características fenotípicas, como crescimento em condições estressantes, meios de cultura, fontes de carbono, resistência a antimicrobianos, entre outras e, os resultados indicaram uma grande diversidade metabólica. Portanto, a capacidade de ocupar ambientes nutricionalmente diferentes, além de serem capazes de tolerar condições adversas e resistir a determinados antimicrobianos

(DALL'AGNOL et al., 2014) deve contribuir para tal dominância na nodulação de *P. vulgaris*, relatada por ANDRADE et al. (2002).

Ainda dentro do “grupo *Rhizobium tropici*”, as estirpes CIAT 899 e PRF 81 se destacam por serem efetivas fixadoras de N₂, geneticamente estáveis, adaptadas aos estresses ambientais de regiões tropicais e competitivas contra populações de rizóbios indígenas, características desejáveis para utilização em inoculantes agrícolas (HUNGRIA et al., 2000; 2003). Quando estas estirpes são comparadas, a PRF 81 é considerada a mais eficiente e competitiva (MOSTASSO et al., 2002), provavelmente pela capacidade de sintetizar biotina e uma enzima protetora contra óxido nítrico, dentre outras proteínas codificadas por genes exclusivamente presentes no genoma da PRF 81 (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2012).

1.3.1. A espécie *Rhizobium freirei*

A estirpe PRF 81 foi isolada de solo da cidade de Irati, no estado do Paraná em 1992, pela equipe da Dra. Diva Andrade, do Instituto Agrônomo do Paraná. Inicialmente, foi classificada como pertencente à espécie *R. tropici*, apesar de possuir diferenças contrastantes em relação às estirpes já identificadas da espécie (RIBEIRO et al., 2009).

No ano de 2000, já havia relatos da maior eficiência da PRF 81 em relação à CIAT 899, já utilizada como inoculante. Os resultados obtidos mostraram uma ótima capacidade de ocupação de nódulos (infecção e formação) na planta hospedeira, peso seco da parte aérea e dos nódulos, bem como quantidade de N assimilado pela planta, entre outros (HUNGRIA et al., 2000; MOSTASSO et al. 2002).

Devido às características apresentadas pela PRF 81, esta foi recomendada por HUNGRIA et al. (2000) para utilização em inoculantes comerciais para o feijoeiro e ainda foi proposto que, apesar de não haver conhecimento acerca das bases genética e bioquímica para tal competitividade, esta estirpe poderia ser utilizada em estudos futuros para aumentar o conhecimento sobre os aspectos básicos da competitividade.

A proposta da estirpe PRF 81 como um modelo impulsionou a condução dos demais estudos: RIBEIRO et al. (2009) foram os primeiros a evidenciar que, apesar de serem estritamente relacionadas pela sequência do gene ribossomal 16S, PRF 81 e CIAT 899 eram consideravelmente diferentes, e a primeira representava uma potencial espécie nova.

Em 2012, a publicação do mapa de referência proteômico da PRF 81 revelou diversos determinantes simbióticos e forte semelhança com agrobactérias (GOMES et al., 2012a).

O sequenciamento completo do genoma da PRF 81 permitiu a identificação de vários genes potencialmente envolvidos em sua notável habilidade simbiótica e saprofítica, além de

um amplo repertório de genes relacionados à comprovada versatilidade metabólica dessa espécie, incluindo sistemas de regulação e de resposta a diversos tipos de estresses, permitindo uma grande interação com o ambiente (ORMEÑO-ORILLO et al., 2012).

De fato, recentemente DALL'AGNOL et al. (2013) analisaram características morfofisiológicas e genéticas da PRF 81, e encontraram diferenças suficientes para reclassificar a estirpe na espécie *Rhizobium freirei*, em homenagem ao Professor João Ruy Jardim Freire, um grande rizobiologista brasileiro, passando a ser a estirpe tipo da nova espécie.

Atualmente *R. freirei* é também utilizada em inoculantes comerciais para a cultura do feijoeiro no Brasil (HUNGRIA et al., 2003). A estirpe ainda é capaz de nodular outras leguminosas, como *Leucaena leucocephala*, *L. esculenta*, *Crotalaria juncea* e *Macroptilium atropurpureum* (DALL'AGNOL et al., 2013), indicando que seu papel ecológico não se restringe a agroecossistemas.

1.4. Estresses abióticos e a FBN

O território brasileiro é formado por um mosaico de biomas, porém alguns ocupam parcelas maiores que outros. Os cerrados brasileiros, por exemplo, correspondem a cerca de 25 % do território nacional, e são áreas muito distintas das demais, sendo caracterizadas pelas condições climáticas hostis, como longos períodos de seca, elevadas temperaturas e baixo pH do solo (<5,0) (MOSTASSO et al., 2002). Esses tipos de estresses prejudicam tanto a planta quanto o microssimbionte e podem prejudicar processos biológicos importantes como o estabelecimento da simbiose, a taxa de nodulação e a FBN, sendo que relativamente poucos rizóbios são capazes de crescer em pH inferior a 5, dentre os quais está a *R. freirei* (HUNGRIA & VARGAS, 2000; HELLWEG et al., 2009).

Algumas espécies e estirpes de rizóbios que dispõem de mecanismos para desenvolver-se em condições desfavoráveis e, mesmo sob tais condições são capazes de estabelecer simbiose efetiva com a planta hospedeira, são potenciais candidatos a possuírem maior eficiência no processo de FBN (AHEMAD & KHAN, 2011). No entanto, desempenhar suas respectivas funções ecológicas em condições ambientais adversas requer um rápido e eficiente controle da expressão gênica e de suas respostas metabólicas, bem como de sua plasticidade genômica (BATISTA et al., 2007).

1.4.1. Efeitos celulares e moleculares do pH ácido e respostas adaptativas

O crescimento em pH ácido pode causar inúmeros danos celulares, dentre eles podemos destacar: (I) alterações na atividade enzimática, por estar abaixo da faixa ótima de atividade de muitas enzimas metabólicas, provocando desnaturação; (II) danos ao DNA, por depurinação, que pode causar perda de informação genética; (III) danos à membrana citoplasmática, que apesar de ser uma eficiente barreira contra a entrada de prótons, pode ser danificada pelos mesmos e sofrer rompimento (FOSTER, 2004).

A acidificação pode ser mais severa em alguns compartimentos celulares do que em outros. Por exemplo, a membrana externa não é considerada uma barreira à entrada de prótons, pois o diâmetro das porinas é grande o suficiente para permitir a passagem dos mesmos para o compartimento periplasmático. Portanto, o periplasma é incapaz de resistir a mudanças no pH externo (pH_e) e provavelmente é o compartimento mais suscetível a danos (LUND et al., 2014). O ambiente citoplasmático é mais protegido, tanto por ser uma barreira eficiente contra a passagem de prótons, quanto pela ação de componentes celulares tamponantes ou alterações no fluxo de outros íons, se a acidificação não for tão drástica (FOSTER, 2004; SLONCZEWSKI et al., 2009).

Mesmo quando bactérias são submetidas a diferentes graus de acidificação do pH_e , o pH interno (pH_i) é mantido relativamente constante (SLONCZEWSKI et al., 2009). Se tal acidificação for suficiente para alterar o pH_i da célula, este é rapidamente corrigido (<4 min.) por componentes tamponantes do citoplasma, porém, se a acidificação for severa, uma resposta via regulação na expressão de genes específicos torna-se necessária para a manutenção do pH_i (KRULWICH et al., 2011; (WILKS & SLONCZEWSKI, 2007).

Existem diversos mecanismos de tolerância ao pH ácido, dentre eles: (I) bombeamento ativo de prótons para o meio externo, por meio da atividade do complexo ATPase (KRULWICH et al., 2011); (II) sequestro de prótons intracelulares, por meio da descarboxilação de determinados aminoácidos e, produção de amônia que atua como um tamponante (WADDINGTON et al., 2010); (III) prevenção e reparo de danos em macromoléculas, como chaperonas, que garantem a estabilidade de proteínas, enquanto proteases do complexo Clp removem proteínas danificadas (SLONCZEWSKI et al., 2009; IVY et al., 2012); (IV) e por fim, a redução da permeabilidade da membrana citoplasmática à passagem de prótons, por meio da conversão de ácidos graxos insaturados em ciclopropanos (KIM et al., 2005).

Tais mecanismos são fundamentais para lidar com as flutuações na concentração de prótons, às quais são expostas no ambiente natural (LUND et al., 2014). Diversos trabalhos relatam cepas e estirpes bacterianas capazes de tolerar condições de pH acidificado em

ambientes naturais, tanto no interior do trato gastrointestinal, quanto na forma saprofítica no solo, assim como no interior de células hospedeiras de plantas (simbiose) e células do sistema imunológico. Alguns destes exemplos são: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., (FOSTER, 2004); *Bacillus* (KRULWICH et al., 2011; SLONCZEWSKI et al., 2009); *Agrobacterium tumefaciens* (OLSON, 1993); *Bifidobacterium* spp. (WADDINGTON et al., 2010); *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp. (LUND et al., 2014); e por fim, alguns rizóbios: *Sinorhizobium* spp. (DRAGHI et al., 2010), *Bradyrhizobium japonicum* (CARVALHO et al., 2012), *R. tropici* (RICILLO et al., 2000; VINUESA et al., 2003; MUGLIA et al., 2007) e *R. freirei* (HUNGRIA et al., 2000), dentre outros.

Para obter sucesso no estabelecimento da simbiose, rizóbios devem ser capazes de tolerar as condições ambientais também da rizosfera, região acidificada por estar constantemente recebendo descargas de exsudatos da planta, que contém ácido tricarbóxico e outros ácidos orgânicos, assim como prótons H^+ , quando amônia é utilizada como fonte de N (JONES et al., 2007; LUND et al., 2014).

1.5. A genômica funcional e o estudo das respostas moleculares ao estresse ambiental

Rizóbios são capazes de ocupar o solo (forma saprofítica) e a planta hospedeira (forma simbiótica). A capacidade de ocupar diferentes habitats aparentemente influenciou o tamanho, complexidade e conteúdo de seus genomas, sendo proposto que genomas de rizóbios tenham evoluído via expansão, primariamente por transferência lateral de genes e duplicações, a fim de se ajustar às condições ambientais adversas (BOUSSAU et al., 2004). Segundo tal ponto de vista, a maximização da sobrevivência dos rizóbios, quando em vida livre, representa o principal impulso na evolução dos genomas desse grupo de microrganismos (YOUNG et al., 2006; BATISTA et al., 2007).

O conteúdo gênico é diferencialmente expresso de acordo com os estímulos ambientais aos quais o organismo encontra-se submetido (CORDWELL et al., 2001). Assim, a análise dos produtos funcionais do genoma torna-se fundamental.

Os estudos utilizando metodologias clássicas são denominados de “ciência dirigida pela hipótese” e, geralmente promovem a caracterização detalhada de um pequeno número de biomoléculas, com a finalidade de elucidar hipóteses pontuais. Apesar de todo o conhecimento produzido por meio destas metodologias, uma compreensão do sistema biológico como um todo não é possível (KITANO, 2002).

Com a necessidade de uma compreensão mais ampla e integrada, a genômica surgiu como uma abordagem científica alternativa na biologia molecular, iniciando a chamada “ciência dirigida pela descoberta”, pois não necessita de hipóteses ou dados prévios. Deste modo, uma grande quantidade de dados é gerada de forma não seletiva, fornecendo uma visão do sistema biológico em sua totalidade, além de representar uma fonte importante de dados para estudos dirigidos por hipóteses (KELL & OLIVER, 2003).

Entretanto, apesar da grande quantidade de sequências de DNA depositadas em bancos de dados, questões biológicas não poderiam ser respondidas. Com isso, a necessidade de compreender a relação entre os estímulos ambientais e a resposta funcional do organismo, impulsionou o desenvolvimento de novas tecnologias focadas na análise dos produtos dos genomas, ou seja, o estudo da funcionalidade do genoma em nível transcricional e traducional.

1.5.1. Proteômica: uma abordagem funcional

Os estudos em proteômica têm por objetivo obter uma visão global e integrada do maior número de proteínas expressas em uma determinada condição, ao invés de estudar proteínas individualmente (SANTUCCI et al., 2015).

O termo “proteoma” foi sugerido em 1993, para designar a identificação sistemática das proteínas totais expressas por um genoma em uma dada condição, com o objetivo de se obter a visão mais integrada do sistema biológico em questão (LOPEZ, 1999; CORDWELL et al., 2001).

Ao contrário do genoma, os proteomas de um organismo são ilimitados e extremamente dinâmicos, pois são alterados diferencialmente em resposta a uma variável, como condições abióticas adversas, condições patológicas, diferenciação entre cepas/estirpes, alguma substância presente no meio, estágio do ciclo de crescimento, entre outros. Através de uma abordagem comparativa, é possível identificar proteínas diferencialmente expressas na condição estudada, permitindo a elucidação de questões relevantes sobre os mecanismos genéticos e bioquímicos das quais são participantes (CORDWELL et al., 2001).

Para estudos em proteômica é fundamental obter amostras de qualidade, portanto o processo de extração deve ser padronizado e otimizado para obter alta reprodutibilidade dos resultados, evitar perdas de parcelas de amostras, entre outros. Considerando que um proteoma deve refletir as condições fisiológicas, é essencial que todos os parâmetros experimentais sejam rigorosamente controlados e cada variável seja analisada em separado (GÖRG et al., 2004).

A proteômica obteve sucesso com o desenvolvimento de tecnologias capazes de realizar a análise de misturas complexas, como extratos de proteínas totais de um organismo (RABILLOUD, 2002). A eletroforese bidimensional (*two-dimensional electrophoresis*, 2DE) acoplada à identificação por espectrometria de massa (*mass spectrometry*, MS) é um dos procedimentos mais adotados atualmente (MACHADO et al., 2013; RAO et al., 2014)

1.5.2. Eletroforese Bidimensional

A 2DE é uma metodologia eficiente de separação de misturas complexas que permite a separação e visualização de centenas de proteínas simultaneamente, permitindo assim a análise de misturas complexas. O resultado deste processo é um mapa bidimensional da amostra, obtido pela separação das proteínas em dois eixos perpendiculares de acordo com: seus pontos isoelétricos (pI), por meio de focalização isoelétrica (*isoelectric focusing*, IF) (primeira dimensão), e suas massas moleculares, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (segunda dimensão) (WESTERMEIER & NAVEN, 2004)

A IF consiste na submissão das proteínas a um campo elétrico, que as impulsiona a migrar através de uma matriz de poliacrilamida ao longo de uma fita de gradiente imobilizado de pH (*immobilized pH gradient*, IPG) em direção ao eletrodo de carga oposta à sua carga líquida. O pI de cada proteína corresponde ao pH exato em que sua carga líquida torna-se nula, portanto a migração é interrompida e as proteínas ficam posicionadas até o segundo método de separação (segunda dimensão). A produção industrial destas fitas foi crucial para a maior reprodutibilidade do procedimento (LOPEZ, 2007).

Na segunda dimensão, as fitas de IPG, previamente submetidas à IF, são colocadas sobre um gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). Assim, a separação das proteínas no SDS-PAGE depende unicamente da massa molecular relativa individual (LOPEZ et al., 2007; GÖRG et al., 2004).

Uma vez terminada a eletroforese, as proteínas são detectadas através de coloração. Um gel de alta resolução e qualidade deve apresentar quantidade significativa de pontos bem definidos, denominados *spots*. Dentre as metodologias desenvolvidas, o *Coomasie Brilliant Blue Colloidal* (CBB-C) tem sido utilizado por ser uma metodologia eficiente de detecção colorimétrica, pois permite uma análise quantitativa confiável, alta sensibilidade e é totalmente compatível com a MS. De fato, um *spot* que é detectado por essa coloração tem geralmente a quantidade ideal de proteína necessária à identificação por MS (PATTON, 2002; MILLER et al., 2006).

Desta forma, os géis 2DE são usados com duas finalidades gerais: separação para identificação do conjunto de proteínas de um genoma específico, estabelecendo um mapa de referência proteômico para o tipo celular ou espécie de organismo em questão e, também, para comparar duas ou mais amostras, verificando as diferenças qualitativas e quantitativas de sua expressão global de proteínas (BLACKSTOCK & WEIR, 1999).

Entretanto a 2DE também possui limitações. Atualmente, não existe um protocolo padrão capaz de separar todos os tipos de proteínas. Proteínas altamente hidrofóbicas ou hidrofílicas, com valores muito altos ou baixos de massa molecular relativa e cujo pI é extremo, são excluídas pelas metodologias padrão, sendo necessário o desenvolvimento de metodologias específicas (HAYNES & YATES, 2000).

1.5.3. Espectrometria de massa

O desenvolvimento da MS tornou a identificação de proteínas mais rápida, precisa e sensível. Em vista do número elevado de proteínas a serem identificadas em um estudo de proteômica, uma técnica com maior rendimento de processamento é imprescindível, porém, sem perder a precisão (GEVAERT & VANDEKERCKHOVE, 2000).

Os espectrômetros de massa são equipamentos analíticos que determinam a massa molecular de compostos químicos através da ionização e separação dos íons moleculares de acordo com a sua razão massa/carga (m/z). Esses equipamentos são constituídos por uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector. A ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz (*matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI) é uma das tecnologias dominantes de ionização. MALDI acoplada a um ou mais analisadores de massa do tipo tempo de voo (*time of flight*, TOF) é considerada a mais adequada para a análise em larga escala de proteínas separadas por meio de 2DE (GEVAERT & VANDEKERCKHOVE, 2000).

O analisador de massas utiliza uma propriedade física para separar moléculas de acordo com sua razão massa-carga (m/z). No caso do analisador TOF, a propriedade é o tempo de voo dos íons. Os íons são acelerados da sua fonte para um tubo de voo, percorrendo um espaço livre, sob vácuo, até atingirem o detector de íons. Fixando a voltagem de aceleração, íons de m/z diferentes serão separados ao longo do tubo de voo devido às suas diferentes velocidades e, assim, requerem tempos diferentes para percorrer a distância existente entre a fonte e o detector. Os íons são desviados por um refletor que contrabalança pequenos desvios na energia cinética inicial dos íons, aumenta a resolução do equipamento e os direciona para um detector. O tempo de voo requerido para as moléculas ionizadas atingirem o detector é

determinado e os valores de m/z são calculados em função desse tempo, sendo que as moléculas ionizadas mais leves atingem o detector em um tempo menor. O espectro de MS gerado é de interpretação relativamente simples, pois cada pico de massa gerado corresponde a um íon molecular monoprotonado e o conjunto dos mesmos é o PMF do peptídeo (ASHCROFT et al, 2003).

No entanto, em alguns casos o PMF não é suficiente para identificar o peptídeo digerido. Nesse caso, a utilização de analisadores sequenciais do tipo TOF-TOF pode resolver esse problema, pois é possível selecionar, isolar e sequenciar uma das moléculas ionizadas presente na mistura da amostra. Utilizando os picos de massa gerados em uma análise TOF, um valor de m/z é selecionado. O íon selecionado passa para uma câmara de colisão, enquanto os outros são desviados do tubo de vôo. Nessa câmara ocorre a dissociação induzida por colisão, onde o íon selecionado sofre uma colisão com um gás inerte, causando fragmentação do íon, cujo espectro é denominado MS/MS. A m/z do íon fragmentado (ou parental), gerada pelo primeiro analisador, é considerada na identificação, bem como os valores de m/z dos fragmentos gerados pelo segundo analisador, que são interpretados em termos de sequência de aminoácidos (CANTÚ et al., 2008).

1.5.4. Ferramentas de bioinformática aplicadas à Proteômica

A identificação de proteínas através de espectros de PMF ou MS/MS é altamente dependente de sequências de DNA depositadas em bancos de dados, como o *NCBIInr* (*National Center for Biotechnology Information non redundant*) e o Swiss Prot. O crescimento desses bancos quanto ao número de sequências depositadas possibilitou um aumento significativo na precisão da identificação de proteínas e um grande avanço para a espectrometria de massa (VIHINEN et al, 2001). Alguns algoritmos foram desenvolvidos para a utilização de dados de espectrometria de massa, permitindo identificar proteínas a partir de bancos de dados de sequências primárias, sendo o Mascot um dos mais adotados (PERKINS et al., 1999).

Uma das interfaces do Mascot é adotada para a busca com base no PMF. São selecionados o banco de dados de escolha e a enzima utilizada para a obtenção do PMF, gerando uma clivagem *in silico* de todas as proteínas contidas no banco. Assim, é feita uma comparação entre as massas obtidas experimentalmente com os dados teóricos (PERKINS et al., 1999).

Outra interface permite a busca por fragmentos iônicos, que são os dados de MS/MS. O Mascot utiliza o método de busca por íons, que não leva em consideração qualquer

informação da sequência, apenas a massa do peptídeo parental. A informação de massa do espectro é comparada com os dados teóricos contidos no banco de dados selecionado, que contém um espectro calculado de MS/MS de todos os peptídeos gerados mediante clivagem com a enzima adotada no experimento (THIEDE et al., 2005).

O Mascot utiliza um algoritmo baseado em probabilidade, sendo que os resultados fornecem uma nota que informa o quanto os valores teóricos correlacionam-se estatisticamente com os valores experimentais. Essa nota é o MOWSE score (*Molecular Weight Search*) (THIEDE et al., 2005).

A partir da identificação de um *spot*, várias outras ferramentas de bioinformática permitem prever características diversas da proteína, como domínios, motivos, localização celular, predição de sinais peptídicos, interação com outras proteínas, propriedades físico-químicas, dentre outros.

2. Objetivos

Analisar alterações na expressão gênica, em nível traducional e transcricional, de *R. freirei* PFR 81 durante crescimento em condição de pH ácido

2.1. Objetivos específicos

- Obter proteínas totais de *R. freirei* mediante crescimento em pH neutro (controle) e pH ácido;
- Promover a separação das proteínas totais obtidas, de ambas as condições analisadas, por 2DE;
- Analisar comparativamente os perfis obtidos;
- Identificar as proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massa;
- Analisar a expressão, em nível transcricional, dos genes *gshB*, *gstA* e *ropB* por RT-qPCR;
- Propor um mecanismo de resposta metabólica de *R. tropici* frente ao estresse ácido.

3. Material e métodos

3.1. Condições de crescimento bacteriano

A estirpe PRF 81 (=SEMIA 4080, =CNPSO 122) de *R. freirei*, isolada de nódulos de feijoeiro no Brasil, está depositada na “Coleção de microrganismos multifuncionais da Embrapa Soja: bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas”. O pré-cultivo foi realizado em 10 mL de Meio Triptona-Extrato de levedura (TY) contendo: 5 g/L de Triptona; 3 g/L de Extrato de levedura e 1,3 g/L de CaCl_2 , sob agitação de 80 rpm a 28°C por 18-20 h, sendo posteriormente transferido para frascos do tipo Erlenmeyer contendo 200 mL de TY em duas condições de tratamento: Controle (pH 6,8) e com pH acidificado (pH 4,8). A estirpe foi incubada até alcançar a fase exponencial de crescimento (densidade ótica de 0,6 a 600 nm), aproximadamente após 18 h, com baixa rotação (80 rpm) para minimizar a produção de exopolissacarídeos, que podem interferir na 2DE.

3.2. Extração de proteínas totais

Os cultivos foram centrifugados a 5000 *g* a 4°C e, as células foram lavadas cuidadosamente com solução contendo: 3 mM de KCl; 1,5 mM de KH_2PO_4 ; 68 mM de NaCl e 9 mM de NaH_2PO_4 . Às células lavadas, foram adicionados 600 µL de tampão de resuspensão (10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 1,5 mM de MgCl_2 ; 10 mM de KCl; 0,5 mM de DTT; 0,5 mM de fenil-metil-sulfonil fluorado - PMSF). Aliquotas de 150 µL foram transferidas para microtubos e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C).

As alíquotas foram ressuspensas em tampão de lise (9,5 M de Uréia, 2 % de CHAPS, 0,8 % v/v de Farmalito 4-7, 1 % de DTT) e submetidas a 40 ciclos de congelamento em N líquido e descongelamento, conforme descrito por BATISTA et al. (2010). O sobrenadante foi separado do material particulado por meio de centrifugação a 14000 *g* a 4 °C durante 90 min.

Aliquotas de 500 µL do sobrenadante foram homogeneizadas com uma solução contendo: 0,8 mL de tampão fenol pH 8,0 e 0,8 mL de tampão SDS (0,1 M de Tris-HCl pH 8,0, 2 % de SDS; 5 % de β -mercaptoetanol; 30 % de sacarose; 1 mM de PMSF). As amostras foram homogeneizadas por 5 min e centrifugadas a 16000 *g* a 4°C durante 15 min, cuja camada superior de fenol (cerca de 500 µL) foi transferida para um novo tubo. O extrato foi precipitado durante 1 h a -20°C, na proporção de 1:3 de proteína e acetato de amônia 0,1 M previamente resfriado em metanol absoluto e, centrifugado a 16000 *g* a 4°C durante 15 min. O precipitado foi lavado 1 vez com metanol resfriado e uma segunda com acetona (80 % v/v)

resfriada, seguida por secagem. O precipitado foi ressuspenso com o tampão de lise e, a concentração foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.3. Separação de proteínas totais e análise dos perfis proteicos

Para a FI, os precipitados foram dissolvidos em *DeStreak buffer* (GE Healthcare) a uma concentração final de 300 µg de proteína e 2 % de *IPGphor* v/v em 250 µL de solução. As fitas de pH fixado (*IPG-strips* – GE Healthcare) de 4-7, com 13 cm, foram reidratadas com a solução de proteínas e cobertas com *Cover fluid* (GE Healthcare). As fitas foram submetidas à FI (*Ettan IPGphor IEF system*, GE Healthcare) iniciando com 200 V por 1 h; depois 500 V por 1 h; seguida por uma etapa de gradiente até 1000 V, por 1 h; um segundo gradiente até 8000 V, por 2,5 h; e fixado em 8000 V durante 1,5 h. A Vh final foi fixada em 24800.

Após a focalização, as fitas foram equilibradas durante 20 min em 5 mL de Tampão de Equilíbrio (TE: 50 mM de Tris-HCl pH 8,8; 6 M de uréia; 30 % v/v de glicerol; 2 % de SDS; 0,2 % v/v de solução 1 % de azul de bromofenol) com adição de 50 mg de DTT e, posteriormente, em TE com 175 mg de iodoacetamina por 20 min.

A 2DE foi realizada em gel de poliacrilamida 12 % (18 x 16 cm) em um sistema de eletroforese *Ruby SE 600 vertical electrophoresis system* (GE Healthcare). A corrida consistiu em 30 min a 15 mA/gel e 240 min a 30 mA/gel, usando o marcador de peso molecular *Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (Amersham Biosciences). Os procedimentos de extração e eletroforese em gel foram realizados em triplicata.

Os géis foram fixados por 18-20h com solução de etanol e ácido acético, antes de serem corados com *Comassie Blue PhastGelTMR-350* (GE Healthcare) e escaneados utilizando o software *ImageScanner LabScan v.5.0*.

3.4. Análise das imagens do gel e seleção dos spots

A densidade do *pixel* pode ser traduzida, mediante calibração, em intensidade do *spot* e a delimitação é traduzida em valor de área.. Assim, *softwares* são capazes de calcular o volume de cada *spot*. O percentual de volume de cada *spot* (%vol), que é a razão do volume do mesmo pela somatória de todos os *spots*, é o padrão de análise comumente adotado. Como os géis são feitos em triplicata, os valores dados são resultantes de uma média entre os valores de %vol de *spots* correspondentes.

Os *spots* foram rigorosamente identificados nas imagens digitalizadas em alta resolução dos géis e analisadas utilizando o software *Image Master 2D Platinum v. 7.0.6 DIGE* (GE

Healthcare). Foram determinados os %vol de cada spot, os quais foram utilizados na comparação entre os tratamentos controle e com pH ácido. Somente os *spots* detectados nas três repetições de cada tratamento foram considerados no presente estudo e avaliados estatisticamente ($p \leq 0,05$) pelo teste T de Student (*XLSTAT, Addinsoft, France, add-in to Microsoft Excel*).

3.5. Preparação das amostras e espectrometria de massa

Os *spots* que apresentaram diferença significativa no %vol entre os tratamentos foram selecionados e recortados do gel bidimensional, extraídos e purificados da matriz de poliacrilamida de acordo com CHAVES et al., (2009). A digestão das proteínas foi realizada utilizando tripsina (*Gold Mass Spectrometry Grade, Promega, Madison, WI*) a 37 °C por 18-20 h.

A tripsina cliva especificamente a porção C-terminal adjacente aos resíduos de arginina e lisina, gerando um conjunto de peptídeos únicos. Os peptídeos trípticos (1 µL) foram homogeneizados com solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico em acetonitrila 50 % e 0,1 % de ácido trifluoracético. A mistura foi aplicada em uma placa de amostras MALDI e cristalizada à temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi empregado para o *Standard peptide calibration mix (Bruker Daltonics)*. Para a obtenção do espectro de massa, um MALDI-TOF-MS Ultraflex Spectrometer (*Bruker Daltonics*) foi operado com o refletor para MALDI-TOF para PMF no modo automático, usando o *software FlexControl (Bruker Daltonics)*.

3.6. Identificação das proteínas

Os espectros de PMF gerados foram confrontados com a base de dados do *NCBI nr* (*National Center for Biotechnology Information - non-redundant*)/Proteobacteria, usando o *software Mascot v. 2.4 (Matrix Science)*. Foram utilizadas massas monoisotópicas, considerando uma tolerância de peptídeo de 100 ou 150 ppm e falha em 1 clivagem. Carbamidometilação de cisteína e oxidação de metionina foram consideradas como modificação fixa e variável, respectivamente. As identificações foram validadas somente quando o valor do índice *Mowse* do *Mascot* foi estatisticamente significativo. Buscas na base de dados *Decoy* foram feitas no modo automático do *Mascot*, utilizando a base de dados *NCBI nr*/Proteobacteria. Tanto os dados do *Decoy* quanto a taxa de falsa descoberta (FDR igual ou menor que 1 %) foram considerados para a validação dos dados de MS e determinação da qualidade dos *matches* ($p \leq 0,05$).

3.7. Caracterização das proteínas

Um conjunto de ferramentas de bioinformática foi utilizado para melhorar a caracterização das proteínas identificadas. As proteínas foram classificadas nas categorias do COG (*Clusters of Orthologous Groups*) de acordo com sua inferência funcional, utilizando o software eggNOG 3.0 (POWELL et al., 2012). A localização celular das proteínas foi determinada utilizando o software PSORTb 3.0.2 (YU et al., 2010).

3.8. Análise transcricional dos genes *gshB*, *gstA* e *ropB* por RT-qPCR

3.8.1. Extração de RNA e síntese do cDNA

A bactéria foi pré-cultivada em 15 mL de caldo TY, sob agitação de 80 rpm a 28°C por 18-20 h. Este foi transferido para frascos com 100 mL de caldo TY, sob agitação de 150 rpm a 28°C até alcançar D.O $\pm$ 0,830. As células foram concentradas em centrífuga a 4500 *g* a 4°C por 12 min, lavadas com solução salina (0,85 % NaCl) e transferidas de maneira uniforme para frascos do tipo Erlenmeyer, contendo 100 mL de caldo TY nas condições controle (TY pH 6,8) e com pH acidificado (pH 30: TY pH 4,8) e (pH 60: TY pH 4,8), em triplicata, cujo RNA total foi extraído dos cultivos após 0, 30 e 60 min, respectivamente.

Os tempos de extração foram definidos de acordo com MUGLIA et al. (2007), em que a expressão gênica de *gshB* por *R. tropici* CIAT 899 aumentou significativamente após 30 min de exposição ao pH ácido, além do conteúdo celular de GSH alcançar a maior concentração após 60 min de exposição ao pH ácido.

Para a extração do RNA total, as células foram centrifugadas a 10000 *g* a 4°C por 10 min e, o precipitado ressuspendido em 1 mL de solução salina. A amostra foi submetida a uma nova centrifugação a 14000 *g* a 4°C por 5 min e o precipitado foi ressuspendido em 280 μ L de Solução de Lise (250 μ L de Tris-EDTA 10:1 pH 8,0; 10 μ L de lisozima 5 mg/mL e 20 μ L de SDS 10 %) e incubado em banho maria a 37°C durante 5 min. Após isso, foi adicionada uma alíquota de 1 mL de reagente TRIzol® (*Life Technologies*), agitado vigorosamente com as amostras, incubado à temperatura ambiente por 5 min, seguido de centrifugação a 14000 *g* a 4°C por 10 min.

A fase superior da amostra (aproximadamente 800 μ L) foi transferida para um novo microtubo. Uma alíquota de 250 μ L de clorofórmio foi adicionada, e homogeneizada vigorosamente por 15 s, sendo mantido à temperatura ambiente por 5 min para posterior centrifugação a 14.000 *g* a 4°C por 15 min.

A fase aquosa (aproximadamente 400 μL) foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, onde foi adicionado 500 μL de isopropanol para precipitação do RNA. Os tubos foram invertidos 20 vezes e incubados em gelo durante 10 min. O material foi centrifugado a 14000 g a 4°C durante 15 min, sendo o precipitado ressuspensionado em 100 μL de água deionizada (Milli-Q) estéril, e adicionados 10 μL de acetato de sódio 3M e 250 μL de etanol 100 % resfriado. Em seguida, os tubos foram invertidos 20 vezes e, mantidos no gelo por 20 min para assegurar uma precipitação eficiente.

O material foi centrifugado a 14000 g a 4°C por 15 min, o sobrenadante foi descartado e adicionado etanol 75 % resfriado e centrifugado nas mesmas condições. A secagem do precipitado foi feita à temperatura ambiente por 20 min, seguido de resuspensão em 35 μL de água Milli-Q estéril.

A concentração do RNA total foi avaliada no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*) e a integridade do material por eletroforese em gel de agarose 1 %.

Para a purificação do RNA, o tratamento com DNase foi realizado utilizando 5 μg de RNA de cada réplica biológica e o volume completado para 15,5 μL com água Milli-Q estéril, 2,5 μL de DNase (Invitrogen/Life Technologies, Grand Island, NY, USA) e 2 μL de tampão da enzima. Os tubos de reação foram incubados por 10 min à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) e por 7 min a 65°C. A verificação da concentração e integridade foi realizada como descrito no parágrafo anterior.

Para a síntese do cDNA, a solução 1, contendo: 1 μL de iniciadores randômicos de 6 nucleotídeos; 1 μL de dNTP e 8 μL da amostra de RNA tratado com DNase, foi incubada por 5 min a 65°C. Após isso, procedeu-se incubação por 2 min no gelo e adição de 10 μL da solução 2, contendo: 2 μL de *RT buffer* 10x; 4 μL de MgCl_2 25 mM; 2 μL de DTT 0,1 M; 1 μL de *RNase OUT*; 1 μL da enzima Transcriptase Reversa (*Superscript III™*, *Invitrogen™*) por reação. Os microtubos foram incubados em termociclador, seguindo o seguinte ciclo: 25 °C por 10 min, 50 °C por 50 min, 85 °C por 5 min. Foi adicionado 1 μL de *RNase H* (*Invitrogen™*) e novamente incubado, a 37 °C por 20 min.

3.8.2. Desenho dos iniciadores e avaliação por RT-qPCR

Para a análise de expressão diferencial por RT-qPCR, foram selecionados genes codificadores de proteínas diferencialmente expressas identificadas no proteoma de *R. freirei*: *gshB* e *gstA*, por estarem relacionados à síntese e consumo de glutatona, um tiol intracelular envolvido na capacidade de tolerância ao pH ácido de *R. tropici* CIAT 899 (RICILLO et al.,

2000), estirpe que compartilha grandes semelhanças genotípicas e morfológicas com *R. freirei* (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2012; DALL'AGNOL et al., 2013); e *ropB*, que codifica uma proteína localizada na membrana periplasmática previamente relacionada à capacidade de tolerância ao pH ácido em rizóbios, porém com poucas informações na literatura (FOREMAN et al., 2010). Os iniciadores foram desenhados utilizando a ferramenta Primer3plus (UNTERGASSER et al., 2007) e são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Iniciadores utilizados para análise transcricional por RT-qPCR dos genes *gshB*, *gstA* e *ropB*

Gene	Iniciador	Sequência	Tamanho do <i>amplicon</i>
<i>gshB</i>	gshBF	5' CAAGGTCTATGCCTCCGTCG 3'	161 pb
	gshBR	5' GCAGATGCGTCGAGGTGATA 3'	
<i>gstA</i>	gstAF	5' AGCCGCATCTGGTCTCATTC 3'	178 pb
	gstAR	5' ATGAGCTTGCCGGTCTTCTC 3'	
<i>ropB</i>	ropBF	5' TTCTACATCGGTGGCGAAGG 3'	124 pb
	ropBR	5' CACCGTATACGATCTGGCCC 3'	
16S rRNA	16S rRNAF	5' ACACACGTGCTACAATGGTG 3'	129 pb
	16S rRNAR	5' GCGATTACTAGCGATTCCAA 3'	

Fonte: o autor

Para evitar alinhamentos inespecíficos, os iniciadores foram confrontados com o genoma de *R. freirei* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_AQHN01000084.1). O gene ribossomal 16S foi utilizado como normalizador da expressão relativa dos genes alvo.

As reações do RT-qPCR foram realizadas no termociclador *RTqPCR Thermocycler 7500* (Applied Biosystems/Life Technologies), em triplicata técnica para cada uma das três repetições biológicas. As soluções utilizadas foram provenientes do kit *Platinum SYBRGreen Master Mix* (Applied Biosystems), e seguindo as instruções do fabricante, cada reação foi montada com: 1 µL de cDNA (diluído 10x); 4,5 µL de água ultrapurificada; 6,25 µL de *SYBR green*; 0,25 µL de ROX (diluído 10x); 0,25 µL (5 pmol) de cada iniciador correspondente aos genes selecionados para o estudo. Os ciclos foram os seguintes: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 45 ciclos a 95 °C por 2 min, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s. O software *Rest2009* foi utilizado para avaliar os resultados por meio de análise estatística ($p \leq 0,05$).

4. Capítulo 1: Mecanismos moleculares envolvidos na capacidade de tolerância ao estresse ácido de *Rhizobium freirei*

4.1. RESUMO

O pH é o principal determinante da diversidade microbiana do solo. *Rhizobium freirei* é um notável endossimbionte de feijão e reconhecido por sua elevada capacidade de tolerância a estresses ambientais, como o pH ácido. O objetivo deste trabalho foi analisar alterações na expressão gênica, em nível transcricional e traducional, de *R. freirei* cultivada em pH ácido. A bactéria foi cultivada em caldo TY até alcançar a fase exponencial em pH 6,8 e pH 4,8, e submetida à extração de proteínas totais. As proteínas foram separadas por eletroforese bidimensional e os perfis proteicos obtidos foram analisados em imagens de alta resolução. Os *spots* diferencialmente expressos ($p \leq 0,05$) foram selecionados para análise em espectrometria de massa e identificação *in silico*. A expressão diferencial dos genes *gshB*, *gstA* e *ropB* foi analisada após 0, 30 e 60 min de exposição de *R. freirei* ao pH ácido. De acordo com os resultados, o principal mecanismo de tolerância de *R. freirei* ao pH ácido parece estar associado à alteração de vias metabólicas centrais, devido ao aumento na expressão de proteínas envolvidas com vias oxidativas (ZwF, KDPG e PckA), relacionadas ao Ciclo do Ácido Tricarboxílico. A maior expressão destas enzimas sugere um aumento no consumo de carboidratos e consequente formação de NADH, que pode ser corroborado pelo aumento na expressão da subunidade NuoC do Complexo 1 da cadeia respiratória, que cataliza a conversão de NADH em NAD^+ acoplada ao transporte de prótons para o periplasma, reduzindo a acidificação citosólica. O Complexo 1 é considerado o principal formador de radical superóxido, além disso a maior expressão das enzimas antioxidativas AhpC e GstA em nível traducional, bem como a maior expressão de *gstA* em nível transcricional, sugere fortemente que o pH ácido induz ao estresse oxidativo em *R. freirei*. Por outro lado, a menor expressão da proteína AccC pode estar relacionada a um direcionamento do metabolismo central ao consumo de ácidos em detrimento à biossíntese de ácidos graxos, processo em que AccC é fundamental. A menor expressão da subunidade β do Complexo ATPase (AtpD) pode estar direcionada à redução na acidificação do pH interno, por meio da diminuição na entrada de prótons. Tal abrangência de vias metabólicas envolvidas sugere que a resposta adaptativa ao pH ácido possui caráter multigênico, cuja predominância de proteínas citoplasmáticas reforça a importância do metabolismo central para sua capacidade de tolerar

pH acidificado. Ao contrário de trabalhos que enfocam genes ou mecanismos específicos de tolerância, nossos resultados mostraram, pela primeira vez, que o metabolismo central parece ser o principal mecanismo de tolerância ao pH ácido em *R. freirei* e que há fortes indícios da correlação entre estresse ácido e oxidativo.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio, metabolismo, estresse abiótico.

4.2. Introdução

A comunidade microbiana do solo é composta por vários grupos, cuja diversidade é determinada por fatores bióticos e abióticos, aos quais são constantemente expostos (BUCKLEY & SCHMIDT, 2002). Estudos recentes têm mostrado que o conteúdo nutritivo liberado pela planta é capaz de dirigir a diversidade microbiana da rizosfera, promovendo uma seleção tanto em nível taxonômico quanto funcional (MENDES et al., 2013; 2014). A temperatura é outro fator determinante para a diversidade microbiana do solo, cujo aquecimento, mesmo de curta duração, promove benefícios a grupos termotolerantes, que podem aumentar significativamente sua abundância relativa (VAN DER VOORT et al., 2016). No entanto, isso difere entre fungos e bactérias, cujo fator mais expressivo na composição da comunidade fúngica do solo é o conteúdo de nutrientes, enquanto para a comunidade bacteriana o pH do solo é o maior determinante (LAUBER et al., 2008).

A influência do pH tem sido relatada como o principal fator que determina a diversidade microbiana no solo (FIERER & JACKSON, 2006; LAUBER et al., 2008; NICOL et al., 2008). Apesar disso, há poucos trabalhos sobre o assunto, sendo a maior parte das pesquisas relacionadas a modelos clínicos ou industriais, como *Lactobacillus* spp., *Streptococcus mutans* (LUND et al., 2014), *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., *E. coli* (FOSTER, 2004) e *Bifidobacterium* spp. (WADDINGTON et al., 2010).

Dentre os microrganismos do solo há uma grande diversidade metabólica até mesmo entre espécies do mesmo gênero, acompanhada por diferentes capacidades de tolerância ao pH acidificado, como mostrado em uma comparação entre 12 espécies de *Rhizobium* (DALL'AGNOL et al., 2014). O pH acidificado pode prejudicar o estabelecimento da simbiose, a taxa de nodulação e a FBN em determinados casos; além disso, relativamente poucos rizóbios são capazes de crescer em pHs inferiores a 5,0 e dentre os quais está a espécie *Rhizobium freirei* (HUNGRIA & VARGAS, 2000; HELLWEG et al., 2009).

Esta espécie se destaca por ser uma efetiva fixadora de N₂ em associação simbiótica com o feijoeiro, geneticamente estável, adaptada a estresses ambientais, competitiva contra rizóbios indígenas, além de promover diversos benefícios à planta hospedeira, características

apreciáveis que levaram à utilização de *R. freirei* em inoculantes agrícolas (HUNGRIA et al., 2000; 2003; MOSTASSO et al., 2002).

O sequenciamento completo do genoma de *R. freirei* (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2012) permitiu a identificação de diversos genes potencialmente envolvidos com sua habilidade simbiótica e saprofítica, além da versatilidade metabólica e sistemas de resposta a diversos tipos de estresse, posteriormente corroboradas por análises morfofisiológicas (DALL'AGNOL et al., 2013) e estudos utilizando uma abordagem proteômica (GOMES et al., 2012a; 2012b).

Atualmente, estudos têm empregado a análise proteômica diferencial para identificar proteínas responsivas a diferentes estados fisiológicos da célula em resposta a estímulos ambientais (GOMES et al., 2012b; BATISTA & HUNGRIA, 2012; RAO et al., 2014), devido à abrangência da análise, pois permite analisar um grande número de proteínas simultaneamente, além de permitir a avaliação de expressão diferencial de proteínas entre condições distintas (SANTUCCI et al., 2015).

Considerando que a espécie *R. freirei* é considerada um modelo de estudo devido à sua notável tolerância a estresses ambientais (HUNGRIA et al., 2000) e sua tolerância ao estresse térmico ter sido avaliada em nível traducional (GOMES et al., 2012b), o estudo da resposta adaptativa de *R. freirei* ao pH acidificado, por meio de análise proteômica diferencial, deve contribuir para uma melhor elucidação dos mecanismos moleculares potencialmente envolvidos em estratégias de bactérias ambientais ao estresse causado pelo pH acidificado. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi analisar alterações na expressão gênica, em nível traducional e transcricional, de *R. freirei* durante o crescimento em condição de pH ácido.

4.3. Material e métodos

4.3.1. Condições de crescimento bacteriano

A estirpe PRF 81 (=SEMIA 4080, =CNPSO 122) de *R. freirei*, isolada de nódulos de feijoeiro no Brasil, está depositada na “Coleção de microrganismos multifuncionais da Embrapa Soja: bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas”. O pré-cultivo foi realizado em 10 mL de Meio Triptona-Extrato de levedura (TY) contendo: 5 g/L de Triptona; 3 g/L de Extrato de levedura e 1,3 g/L de CaCl₂, sob agitação de 80 rpm a 28°C por 18-20 h. O pré-cultivo foi transferido para frascos do tipo Erlenmeyer contendo 200 mL de TY em duas condições de tratamento: controle (pH 6,8) e com pH acidificado (pH 4,8). As

células foram incubadas sob agitação de 80 rpm a 28°C até alcançar a fase exponencial de crescimento (D.O.₆₀₀ 0,6).

4.3.2. Extração de proteínas totais

Os cultivos foram centrifugados a 5000 *g* a 4°C, e as células foram lavadas em solução contendo: 3 mM de KCl; 1,5 mM de KH₂PO₄; 68 mM de NaCl; 9 mM de NaH₂PO₄. Às células lavadas, foram adicionados 600 µL de tampão de ressuspensão (10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 1,5 mM de MgCl₂; 10 mM de KCl; 0,5 mM de DTT; 0,5 mM de fenil-metil-sulfonil fluorado - PMSF). Alíquotas de 150 µL foram transferidas para microtubos e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C), até a realização das análises.

As alíquotas foram ressuspensas em tampão de lise (9,5 M de Uréia; 2 % de CHAPS; 0,8 % v/v de Farmalito 4-7; 1 % de DTT) e submetidas a 40 ciclos de congelamento em N líquido e descongelamento, conforme descrito por BATISTA et al. (2010). O sobrenadante foi separado do material particulado por meio de centrifugação a 14000 *g* a 4 °C durante 90 min.

Alíquotas de 500 µL do sobrenadante foram homogeneizadas com uma solução contendo 0,8 mL de fenol tamponado pH 8,0 e 0,8 mL de tampão SDS (0,1 M de Tris-HCl pH 8,0; 2 % de SDS; 5 % de β-mercaptoetanol; 30 % de sacarose; 1 mM de PMSF). As amostras foram homogeneizadas por 5 min e centrifugadas a 16000 *g* a 4°C durante 15 min e, a camada superior de fenol (cerca de 500 µL) foi transferida para um novo tubo. O extrato foi precipitado a -20°C durante 1 h, na proporção de 1:3 de proteína e acetato de amônia 0,1 M, em metanol absoluto previamente resfriado, e centrifugado a 16000 *g* a 4°C durante 15 min. O precipitado foi lavado 1 vez com metanol resfriado e uma segunda com acetona (80 % v/v) resfriada, seguida por secagem. O precipitado foi ressuspensionado com o tampão de lise e a concentração foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

4.3.3. Separação de proteínas totais e análise dos perfis proteicos

Para a FI, os sobrenadantes foram ajustados para uma concentração final de 300 µg de proteína e 2 % de *IPGphor* v/v em 250 µL de Tampão *DeStreak* (GE Healthcare). As fitas de pH fixado (*IPG-strips* – GE Healthcare) de pI 4-7 - 13 cm, foram reidratadas com a solução de proteínas e cobertas com *Cover fluid* (GE Healthcare). As fitas foram submetidas à FI (*Ettan IPGphor IEF system*, GE Healthcare) iniciando com 200 V por 1 h; depois 500 V por 1 h; seguida por uma etapa de gradiente até 1000 V, por 1 h; um segundo gradiente até 8000 V, por 2,5 h; e fixado em 8000 V durante 1,5 h. A Vh final foi fixada em 24800.

Após a focalização, as fitas foram equilibradas durante 20 min em 5 mL de TE (50 mM de Tris-HCl pH 8,8; 6 M de uréia; 30 % v/v de glicerol; 2 % de SDS; 0,2 % v/v de solução 1 % de azul de bromofenol) com adição de 50 mg de DTT e, posteriormente, em TE com 175 mg de iodoacetamina por 20 min.

A 2DE foi realizada em gel de poliacrilamida 12 % (18 x 16 cm) em um sistema de eletroforese *Ruby SE 600 vertical electrophoresis system (GE Healthcare)*. A corrida consistiu em 30 min a 15 mA/gel e 240 min a 30 mA/gel, usando o marcador de peso molecular *Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (Amersham Biosciences)*. Os procedimentos de extração e eletroforese em gel foram realizados em triplicata.

Os géis foram fixados com solução de etanol e ácido acético, antes de serem corados com *Comassie Blue PhastGel™R-350 (GE Healthcare)* e escaneados utilizando o *software ImageScanner LabScan v.5.0*.

4.3.4. Análise das imagens do gel e seleção dos spots

Os spots foram rigorosamente identificados nas imagens do gel, digitalizadas em alta resolução, e analisadas pelo software *Image Master 2D Platinum v. 7.0.6 DIGE (GE Healthcare)*. Foram determinados os %vol de cada spot, os quais foram utilizados na comparação entre os tratamentos controle e com pH ácido. Somente os spots detectados nas três repetições de cada tratamento foram considerados no presente estudo e, avaliados estatisticamente ($p \leq 0,05$) através do teste T de Student, utilizando *XLSTAT (Addinsoft, France, add-in to Microsoft Excel)*.

4.3.5. Preparação das amostras e espectrometria de massa

Os spots que apresentaram diferença significativa no %vol entre os tratamentos foram selecionados e recortados do gel bidimensional, extraídos da matriz de poliacrilamida e processados de acordo com CHAVES et al., (2009). A digestão das proteínas foi realizada utilizando tripsina (*Gold Mass Spectrometry Grade, Promega, Madison, WI*) a 37 °C por 18-20 h.

Os peptídeos trípticos (1 µL) foram homogeneizados com solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico em acetonitrila 50 % e 0,1 % de ácido trifluoracético. A mistura foi aplicada em uma placa de amostras MALDI (Matriz assistida por dessorção e ionização a laser) e cristalizada à temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi empregado utilizando a solução de calibração padrão de peptídeos (*Bruker Daltonics*). Para a obtenção do espectro

de massa, um MALDI-TOF-MS (MALDI-time-of-flight in tandem) *Ultraflex Spectrometer* (Bruker Daltonics) foi operado com o refletor MALDI-TOF no modo automático para PMF (*Peptide Mass Fingerprint*), utilizando o software *FlexControl*.

4.3.6. Identificação das proteínas

Os espectros de PMF e MS/MS gerados foram confrontados com a base de dados do *NCBI*nr (*National Center for Biotechnology Information - non-redundant*)/Proteobacteria, usando o software *Mascot* v. 2.4 (*Matrix Science*). Foram utilizadas massas monoisotópicas, considerando uma tolerância de peptídeo de 100 ou 150 ppm e falha em 1 clivagem. Carbamidometilação de cisteína e oxidação de metionina foram consideradas como modificação fixa e variável, respectivamente. As identificações foram validadas somente quando o valor do índice *Mowse* do *Mascot* foi estatisticamente significativo. Buscas na base de dados *Decoy* foram feitas no modo automático do *Mascot*, utilizando a base de dados *NCBI*nr/Proteobacteria. Tanto os dados do *Decoy* quanto da taxa de falsa descoberta (FDR igual ou menor que 1 %) foram considerados para a validação dos dados de MS e determinação da qualidade dos *matches* ($p \leq 0,05$).

4.3.7. Caracterização das proteínas

Um conjunto de ferramentas de bioinformática foi utilizado para melhorar a caracterização das proteínas identificadas. As proteínas foram classificadas nas categorias do COG (*Clusters of Orthologous Groups*) (GALPERIN et al., 2015) de acordo com sua inferência funcional, utilizando o software eggNOG versão 3.0 (POWELL et al., 2012). A localização celular das proteínas foi determinada utilizando o software PSORTb 3.0 (YU et al., 2010).

4.3.8. Análise transcricional dos genes *gshB*, *gstA* e *ropB* por RT-qPCR

4.3.8.1. Extração de RNA e síntese do cDNA

A bactéria foi pré-cultivada em 15 mL de caldo TY, sob agitação de 80 rpm a 28°C por 18-20 h. O cultivo foi transferido para frascos com 100 mL de caldo TY, sob agitação de 150 rpm a 28°C até alcançar $D.O \pm 0,830$. As células foram concentradas em centrífuga a 4500 *g* a 4 °C por 12 min, lavadas com solução salina (0,85 % NaCl) e transferidos de maneira uniforme para frascos do tipo Erlenmeyer, contendo 100 mL de caldo TY nas condições

controle (C: TY pH 6,8) e com pH acidificado (pH30: TY pH 4,8) e (pH60: TY pH 4,8), em triplicata, cujo RNA total foi extraído dos cultivos após 0, 30 e 60 min, respectivamente.

Os tempos de extração foram definidos de acordo com MUGLIA et al., (2007), em que a expressão gênica de *gshB* por *R. tropici* CIAT 899 aumentou significativamente após 30 min de exposição ao pH ácido, além do conteúdo celular de GSH alcançar a maior concentração após 60 min de exposição ao pH ácido.

Para a extração do RNA total, foi utilizado o reagente Trizol (*Life Technologies*), de acordo com GOMES et al. (2014). A concentração das amostras de RNA total obtidas foi avaliada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*) e a integridade do material por eletroforese em gel de agarose 1 %.

Para a purificação do RNA, 3,5 µg de RNA de cada réplica biológica foi tratada com DNase (Invitrogen/Life Technologies, Grand Island, NY, USA), segundo recomendações do fabricante. A verificação da concentração e integridade foi realizada como descrito no parágrafo anterior.

Para a síntese da primeira fita de cDNA foram utilizadas as amostras de RNA purificado, além de iniciadores randômicos de 6 nucleotídeos e a enzima Transcriptase Reversa (*Superscript III™, Invitrogen™*), seguindo as instruções do fabricante.

4.3.8.2. Desenho dos iniciadores e avaliação por RT-qPCR

Para a análise de expressão diferencial por RT-qPCR, foram selecionados genes codificadores de proteínas diferencialmente expressas identificadas no proteoma de *R. freirei*: *gshB* e *gstA*, por estarem relacionados à síntese e consumo de glutatona, um tiol intracelular envolvido na capacidade de tolerância ao pH ácido de *R. tropici* CIAT 899 (RICILLO et al., 2000), estirpe que compartilha grandes semelhanças genotípicas e morfológicas com *R. freirei* (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2012; DALL'AGNOL et al., 2013); e *ropB*, que codifica uma proteína localizada na membrana periplasmática previamente relacionada à capacidade de tolerância ao pH ácido em rizóbios, porém com poucas informações na literatura (FOREMAN et al., 2010).

Os pares de iniciadores *gshB*F (5' - CAAGGTCTATGCCTCCGTCG)/*gshB*R (5' - GCAGATGCGTCGAGGTGATA), *gstA*F (5' - AGCCGCATCTGGTCTCATTC)/*gstA*R (5' - ATGAGCTTGCCGGTCTTCTC), *ropB*F (5' - TTCTACATCGGTGGCGAAGG)/*ropB*R (5' - CACCGTATACGATCTGGCCC) e 16S rRNA F (5' - ACACACGTGCTACAATGGTG)/16S rRNA R (5' - GCGATTACTAGCGATTCCAA), foram desenhados utilizando a ferramenta Primer3plus (UNTERGASSER et al., 2007). Para

evitar alinhamentos inespecíficos, os iniciadores foram confrontados com o genoma de *R. freirei* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_AQHN01000084.1). O gene ribossomal 16S foi utilizado como normalizador da expressão relativa dos genes alvo.

As reações do RT-qPCR foram realizadas em um *RTqPCR Thermocycler 7500* (*Applied Biosystems/Life Technologies*), em triplicata para cada uma das três réplicas biológicas, utilizando o kit *Platinum SYBRGreen Master Mix* (*Applied Biosystems*), de acordo com as instruções do fabricante. Os ciclos foram os seguintes: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 45 ciclos a 95 °C por 2 min, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s. O software *Rest2009* (PFAFFL et al., 2002) foi utilizado para avaliar os resultados por meio de análise estatística ($p \leq 0,05$). A normalização do limiar de amplificação (Ct) foi realizada com base nos dados do gene ribossomal 16S.

4.4. Resultados e discussão

4.4.1. Crescimento de *R. freirei* em condição de estresse ácido.

A diversidade de espécies e estirpes de rizóbios simbiossiontes do feijoeiro e a taxa de nodulação variam significativamente de acordo com o pH do solo (ANYANGO et al., 1995; VERÁSTEGUI-VALDÉS, 2014), visto que existe uma grande variação na tolerância a estresses abióticos entre esses microssimbiontes. A espécie *R. freirei* é notória por sua habilidade de crescimento e nodulação mesmo em condições hostis, como elevadas temperaturas, baixo pH e elevada concentração de metais pesados (MOSTASSO et al., 2002; DALL'AGNOL et al., 2013, 2014). De fato, sua habilidade simbiótica deve-se, em parte, à tal capacidade de tolerância a estresses abióticos, resultando na recomendação da estirpe para inoculação da cultura do feijoeiro no Brasil (HUNGRIA et al., 2003).

A estirpe *R. freirei* PRF 81 cresce até mesmo em pH 4,0 (DALL'AGNOL et al., 2013), porém foi cultivada neste trabalho em pH 4,8 por ser uma condição que não altera significativamente a cinética de crescimento da estirpe (dados não apresentados).

Um estudo realizado com a estirpe *R. tropici* CIAT 899, que compartilha semelhanças genéticas (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2012) e morfológicas (DALL'AGNOL et al., 2013) com a *R. freirei*, reforça a nossa opção pelo pH 4,8, pois mostra que o tempo de crescimento necessário para formar colônias visíveis em pH 7,0, 4,75 e 4,0 foi de 2, 3 e 6 dias, respectivamente (GRAHAM et al., 1994; DALL'AGNOL et al., 2013), portanto pHs inferiores a 4,8 provavelmente afetariam significativamente a cinética de crescimento de *R. freirei*.

Em estudos proteômicos, é imprescindível que apenas um fator seja alterado entre diferentes testes, permitindo atribuir a alteração da expressão de proteínas pela célula à condição testada.

4.4.2. O efeito do pH nos perfis bidimensionais de proteínas totais de *R. freirei*

Os extratos proteicos foram submetidos à IF, a princípio utilizando fita de pH 3-10. No entanto, os *spots* ficaram mais concentrados na faixa de pH 5-7 e com baixa resolução na porção de pH básico (dados não apresentados), provavelmente devido à separação insatisfatória de proteínas alcalinas (PENNINGTON et al., 2004). O mesmo já havia sido observado por outros autores (BATISTA et al., 2010; BATISTA & HUNGRIA, 2012; GOMES et al., 2012b; 2014). Portanto, para uma melhor resolução dos géis, foi utilizada a faixa de pH 4-7, que proporcionou uma eficiente separação dos *spots* (Anexo 1).

A maior parte dos *spots* possui massa molecular variando entre 17-95 kDa (Anexo 1), semelhante ao perfil da mesma estirpe sob estresse térmico (GOMES et al., 2012b) que variou de 14-97 kDa. O mesmo foi observado por outros autores, em estudos de proteômica de rizóbios (BATISTA et al., 2010; BATISTA & HUNGRIA, 2012; GOMES et al., 2014).

O método de extração de proteínas de BATISTA et al. (2010) mostrou-se apropriado ao estudo de proteínas cito e periplasmáticas, com a obtenção de perfis proteicos com *spots* bem separados e definidos (Anexo 1), além de não haver estrias (*streaking*) e manchas nos géis, indicando que a degradação de proteínas foi insignificante e que a remoção de compostos contaminantes foi suficiente.

Assim como a alta resolução dos géis, a reprodutibilidade dos resultados é um requisito essencial para análises proteômicas, portanto a perda de proteínas por degradação pode comprometer os resultados (RODRIGUES et al., 2012). A semelhança entre réplicas dos géis do tratamento com pH ácido indica a alta reprodutibilidade dos perfis (Anexo 1).

Os *spots* dos tratamentos foram identificados em triplicata. O volume absoluto de cada *spot* foi normalizado como um percentual do somatório de todos os *spots* detectados em cada gel e, este volume percentual foi utilizado para comparação dos *spots* correspondentes entre os tratamentos com pH 6,8 e 4,8. Somente os *spots* presentes nas três réplicas de cada tratamento e que apresentaram diferença estatística ($p \leq 0,05$), foram selecionados para análise. Os géis mais representativos de cada tratamento foram escolhidos como gel padrão para análise utilizando o *software* ImageMaster Platinum, e encontram-se representados na Figura 3.

Aproximadamente seiscentos *spots* foram detectados em cada gel analisado de ambos os tratamentos (Figura 2). Segundo os rigorosos critérios de avaliação quanto à diferença significativa no percentual de volume relativo e representação em todas as repetições, trinta e nove *spots* foram selecionados para identificação por espectrometria de massa, os quais estão numerados na Figura 3.

4.4.3. Panorama da resposta adaptativa de *R. freirei* frente ao pH acidificado

As proteínas diferencialmente expressas foram classificadas de acordo com os grupos funcionais do COG (*Cluster of Orthologous Group*) (GALPERIN et al., 2014) e encontram-se apresentadas na Tabela 2. As proteínas foram distribuídas em 12 grupos funcionais, sendo que o grupo E (“Transporte e metabolismo de aminoácidos”) foi o mais representativo. Além disso, duas proteínas foram classificadas no grupo R (“Predição geral de função”), duas no grupo S (“Função desconhecida”) e uma sem classificação no COG.

O *software* PsortB não foi capaz de prever a localização celular das proteínas correspondentes aos *spots* 8, 11 e 33 (Tabela 2). Com exceção das proteínas correspondentes aos *spots* 24 e 38, proteínas de membrana externa e periplasma, respectivamente, as demais proteínas foram identificadas como proteínas citoplasmáticas.

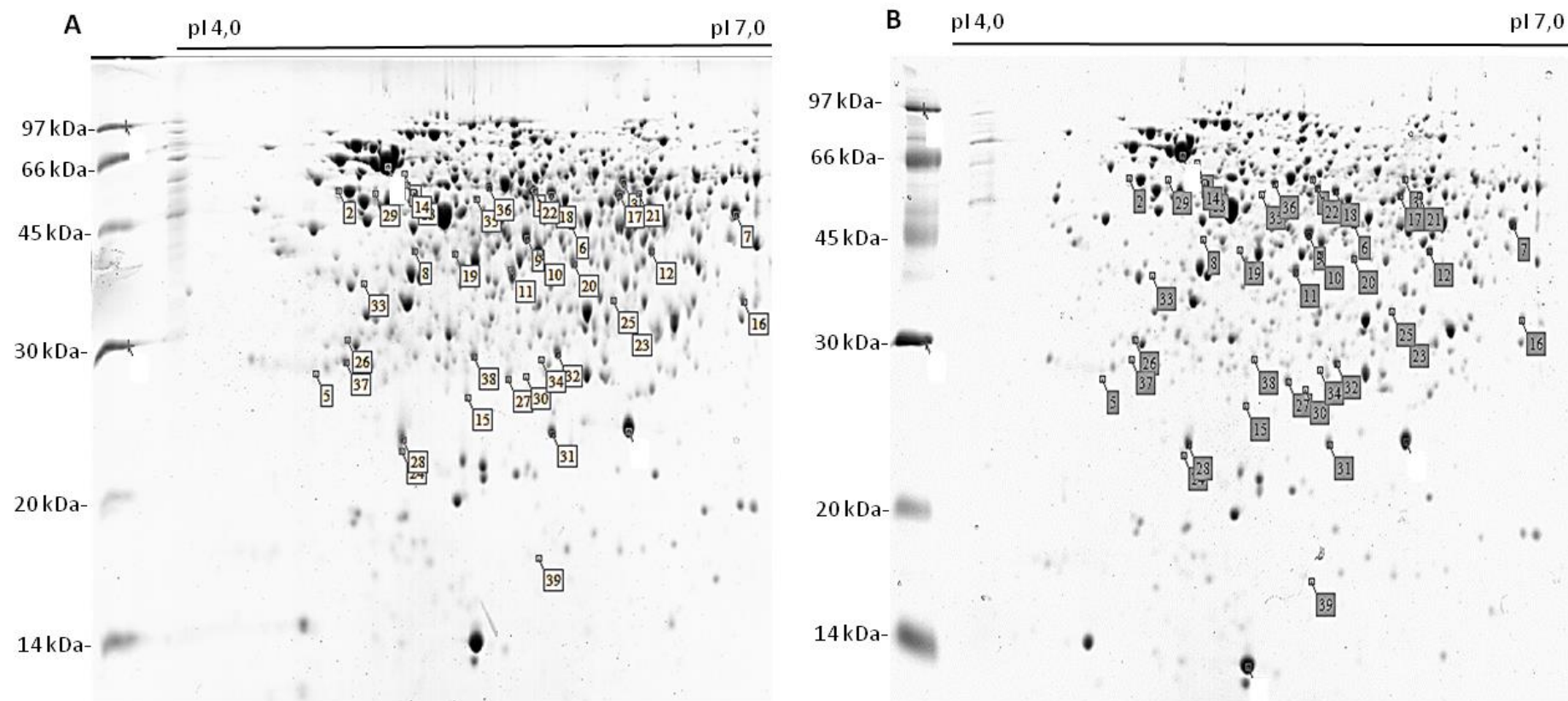


Figura 2: Perfis de géis bidimensionais com faixa de pH 4-7 de proteínas totais de *Rhizobium freirei* em crescimento em pH 6,8 (A) e pH 4,8 (B). Números indicados nos géis correspondem aos spots descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Proteínas diferencialmente expressas por *R. freirei* identificadas por espectrometria de massa e informações complementares.

Spot	Caracterização da proteína (cobertura de sequência ¹) - Gene	Expressão diferencial ²	Controle ³	pH ácido ³	pI T/E ⁴ .	Massa T/E ⁴ .	p-value	Locus
C - Produção e conversão de energia								
1	<i>Putative aldehyde dehydrogenase</i> (28 %) - <i>ssdH</i>	↑ 1.58	0.77539 ± 0.075	1.22461 ± 0.112	5.47/5.79	54474/53500	0,004	ENN87781
2	<i>ATP synthase subunit beta</i> (51 %) - <i>atpD</i>	↓ 1.29	1.12627 ± 0.073	0.87374 ± 0.128	4.93/4.88	50442/51333	0,041	ENN89575
3	<i>Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase</i> (19 %) - <i>mmsA</i>	↓ 1.76	1.27442 ± 0.148	0.72558 ± 0.085	5.86/6.25	53819/54167	0,005	ENN88882
4	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i> (33 %) - <i>pckA</i>	↑ 1.60	0.77009 ± 0.047	1.22991 ± 0.207	5.12/5.21	58789/56333	0,020	ENN84348
5	<i>NADH dehydrogenase subunit C</i> (36 %) - <i>nuoC</i>	↑ 1.51	0.79663 ± 0.154	1.20337 ± 0.164	4.84/4.74	23021/27333	0,035	ENN85931
6	<i>Ferredoxin oxidoreductase</i> (29 %)	↓ 1.68	1.25314 ± 0.035	0.74686 ± 0.122	5.67/6.01	40474/43167	0,002	WP_004109967
E - Transporte e metabolismo de aminoácidos								
7	<i>Serine hydroxymethyltransferase</i> (46 %) - <i>glyA1</i>	↓ 1.34	1.14436 ± 0.074	0.85564 ± 0.080	6.39/6.79	46753/44333	0,010	WP_037153464
8	<i>Spermidine/putrescine ABC transporter</i> (27 %)	↓ 1.32	1.13657 ± 0.105	0.86342 ± 0.013	5.61/5.25	43004/40000	0,011	WP_037154141
9	<i>Aspartate-semialdehyde dehydrogenase</i> (40 %) - <i>asd</i>	↑ 1.26	0.88641 ± 0.102	1.11360 ± 0.041	5.49/5.78	37818/41333	0,023	ENN84282
10	<i>Histidinol-phosphate aminotransferase</i> (46 %) - <i>hisC</i>	↓ 3.56	1.56135 ± 0.221	0.43865 ± 0.016	5.87/5.84	39838/39333	0,001	WP_037148873
11	<i>Amino acid ABC transporter substrate-binding protein</i> (24 %)	↑ 1.61	0.76501 ± 0.175	1.23499 ± 0.077	6.01/5.72	37971/37167	0,013	WP_004124903
12	<i>Branched-chain amino acid aminotransferase</i> (41 %)	↑ 1.28	0.87784 ± 0.050	1.12217 ± 0.095	6.03/6.39	39959/40000	0,017	ENN87364
13	<i>Dihydropyrimidine dehydrogenase</i> (18 %)	↓ 1.23	1.10426 ± 0.117	0.89574 ± 0.112	5.17/5.25	48408/50667	0,089	WP_037148631
G - Transporte e metabolismo de carboidratos								
14	<i>Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase</i> (17 %) - <i>zwf</i>	↑ 1.28	0.87594 ± 0.048	1.12406 ± 0.096	5.12/5.22	56131/52667	0,016	ENN86157
15	<i>KHG-KDPG bifunctional aldolase</i> (68 %) - <i>kdgA</i>	↑ 1.84	0.70449 ± 0.210	1.29551 ± 0.230	5.27/5.48	21653/25667	0,030	ENN87464
16	<i>Fructose-bisphosphate aldolase</i> Classe I (28 %)	↓ 1.30	1.13196 ± 0.067	0.86804 ± 0.078	6.26/6.83	32244/33333	0,011	WP_004111239
I - Transporte e metabolismo de lipídios								
17	<i>Acetyl-CoA carboxylase</i> (56 %)	↓ 1.88	1.30584 ± 0.051	0.69416 ± 0.122	5.78/6.23	49424/49833	0,001	WP_037153663
H - Transporte e metabolismo de coenzimas								
18	<i>Hypothetical protein RHSP_82341</i> (22 %)	↓ 1.31	1.13414 ± 0.043	0.86586 ± 0.036	5.58/5.91	51028/49833	0,001	ENN84342
19	<i>Delta-aminolevulinic acid dehydratase</i> (26 %) - <i>hemaA</i>	↓ 1.21	1.09488 ± 0.029	0.90512 ± 0.039	5.29/5.44	36761/39333	0,002	WP_037153452
20	<i>Glutathione synthetase</i> (31 %) - <i>gshB</i>	↓ 1.35	1.14761 ± 0.058	0.85239 ± 0.061	5.70/6.01	35381/38500	0,004	ENN89444

Classificação funcional do COG

Spot	Caracterização da proteína (cobertura de sequência ¹)	Expressão diferencial ²	Controle ³	pH ácido ³	pI T/E ⁴ .	Massa T/E ⁴ .	Gene	Locus
21	<i>Nitrilotriacetate monooxygenase component A</i> (20 %) - <i>ntaA</i>	↓ 1.92	1.31606 ± 0.273	0.68394 ± 0.101	5.86/6.33	49414/50167	0,020	WP_037151540
P - Transporte e metabolismo de íons inorgânicos								
22	<i>(2Fe-2S)-Binding protein</i> (30 %)	↓ 1.54	1.21173 ± 0.118	0.78827 ± 0.087	5.53/5.82	47921/50667	0,008	WP_037149655
M - Biogênese de envelope, membrana e parede celular								
23	<i>UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase</i> (60 %) - <i>exoN</i>	↓ 1.23	1.10184 ± 0.077	0.89816 ± 0.086	5.87/6.27	32723/31167	0,038	ENN87393
24	<i>Outer membrane protein Omp 31</i> (23 %) - <i>ropB</i>	↑ 1.46	0.81340 ± 0.038	1.18661 ± 0.049	5.68/5.16	22343/22000	0,000	ENN85833
25	<i>UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase</i> (22 %)	↓ 1.22	1.09852 ± 0.051	0.90148 ± 0.102	5.67/6.20	33389/33667	0,041	WP_004124627
K – Transcrição								
26	<i>Transcriptional regulator</i> (37 %)	↑ 1.48	0.80793 ± 0.039	1.19207 ± 0.011	4.83/4.92	26809/30000	0,000	WP_037151600
J - Tradução, estrutura ribossomal e biogênese								
27	<i>Elongation factor P</i> (24 %) - <i>efp</i>	↑ 1.55	0.78581 ± 0.108	1.21419 ± 0.045	5.26/5.68	21096/27167	0,003	ENN84149
28	<i>50S ribosomal protein L9</i> (36 %) - <i>rplI</i>	↑ 1.38	0.83891 ± 0.066	1.16109 ± 0.134	4.99/5.18	20881/23000	0,020	ENN85796
29	<i>Peptide chain release factor 2</i> (14 %)	↓ 1.55	1.21705 ± 0.125	0.78295 ± 0.076	4.77/5.07	38256/50667	0,007	WP_036238453
30	<i>Glutathione S-transferase</i> (25 %) - <i>gstA</i>	↑ 1.65	0.75530 ± 0.078	1.24470 ± 0.170	5.55/5.77	26205/26667	0,011	ENN88947
31	<i>ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit</i> (25 %) - <i>clpP</i>	↓ 1.15	1.06938 ± 0.040	0.93062 ± 0.073	5.57/5.89	22662/23000	0,045	AHK44001
T - Mecanismos de transdução de sinal								
32	<i>Hypothetical protein RHSP_68990</i> (58 %)	↓ 1.34	1.14602 ± 0.032	0.85397 ± 0.015	5.66/5.93	24670/28667	0,000	ENN84667
33	<i>Universal stress protein (UspA family)</i> (16 %)	↓ 1.68	1.25296 ± 0.241	0.74704 ± 0.052	4.88/5.00	29654/36000	0,024	WP_037154385
V - Mecanismos de defesa								
34	<i>Alkyl hydroperoxide reductase subunit</i> (28 %) - <i>ahpC</i>	↑ 2.17	0.63131 ± 0.074	1.36869 ± 0.144	5.60/5.84	24034/28167	0,001	ENN85212
R - Predição geral de função								
35	<i>Zinc-dependent protease</i> (19 %) - <i>tldD</i>	↓ 1.49	1.19710 ± 0.029	0.80290 ± 0.166	5.50/5.54	49955/48500	0,016	ENN89061
36	<i>Cobalamin biosynthesis protein</i> (21 %) - <i>cobW</i>	↓ 1.56	1.21741 ± 0.074	0.78259 ± 0.056	5.41/5.61	41599/51667	0,001	WP_037151703
S - Função desconhecida								
37	<i>Hypothetical protein RHSP_28418 (DUF533 family)</i> (46 %)	↓ 2.26	1.38591 ± 0.136	0.61409 ± 0.050	4.93/4.90	25137/28333	0,001	ENN87463
38	<i>Outer membrane protein (Uncharacterized YggE protein)</i> (36 %)	↓ 1.34	1.14387 ± 0.149	0.85613 ± 0.058	5.83/5.52	25854/28833	0,036	ENN87849
Sem grupo								
39	<i>Cyclase</i> (21 %)	↓ 1.82	1.28959 ± 0.163	0.71041 ± 0.060	5.75/5.82	37986/16000	0,004	WP_025514000

Fonte: o autor

¹ Percentual de cobertura da sequência completa de cada proteína identificada na plataforma Mascot (Matrix Science).

² Taxa de expressão diferencial em pH ácido (maior %vol médio/menor %vol médio)

³ Média dos volumes absolutos do *spot* no gel e seu respectivo desvio padrão.

⁴ Ponto isoelétrico ou Massa molecular Teórica e Experimental.

4.4.4. Indução da síntese proteica

A proteína ribossomal L9 (RplI, *spot* 28) e o Fator de alongação P (EF-P, *spot* 27) são proteínas associadas a ribossomos, cujas funções estão relacionadas ao processo de tradução, sendo a RplI envolvida na manutenção da fidelidade traducional, e o EF-P responsável pela liberação de ribossomos emperrados (KEILER; NAGANATHAN et al., 2015).

A importância destas proteínas foi recentemente reforçada por NAGANATHAN et al. (2015), cujos resultados indicam que *E. coli* deficiente na produção destas proteínas apresentou fenótipo quase inviável. Uma consequência da exposição a estresses ambientais é o aumento de erros nos processos de transcrição e tradução, levando à acumulação de proteínas anormais (LEMOS & BURNE, 2008). Sendo assim, a maior expressão das proteínas RplI e EF-P pode estar relacionada à uma resposta adaptativa de *R. freirei* para garantir a fidelidade do processo traducional, bem como reduzir o número de ribossomos emperrados sob condição de estresse ácido (KEILER; NAGANATHAN et al., 2015).

4.4.5. Envolvimento da glutatona na resposta ao pH ácido

A glutatona (GSH) (Figura 3) é um tiol intracelular abundante em todas as células vivas, e está envolvida em muitos processos biológicos, como síntese de DNA e proteínas, modulação de atividade enzimática, metabolismo celular, destoxificação de compostos tóxicos, entre outros. A síntese de GSH consiste em duas etapas: na primeira a enzima γ -glutamilcisteína sintase (GshA, codificada pelo gene *gshA*) (Figura 3) forma γ -glutamilcisteína (γ -GC) e, na segunda, γ -GC é convertida em GSH com a adição de uma glicina (Gly) pela glutatona sintase (GshB *spot* 20) (Figura 3), (SOBREVALS et al., 2006).

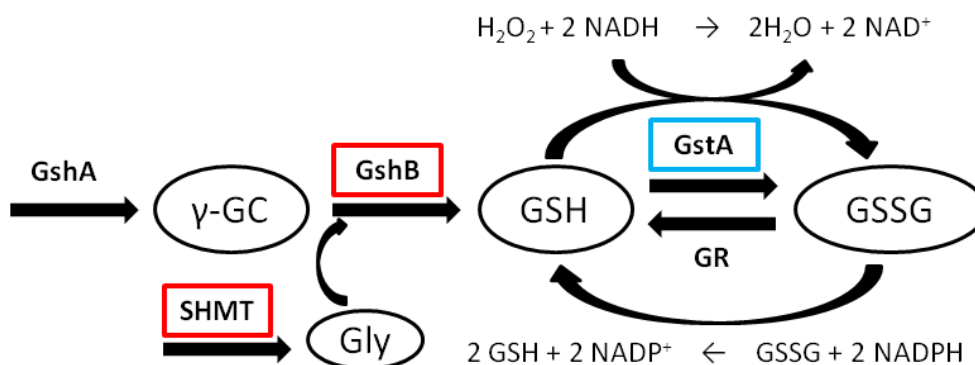


Figura 3: Representação esquemática da biossíntese de Glutatona (GSH) e destoxificação de H_2O_2 . Os nomes em negrito representam enzimas, os demais são metabólitos e cofatores. As enzimas γ -Glutamilcisteína sintase (GshA), Glutatona Sintase (GshB) e Serina Hidroximetiltransferase (SHMT) atuam na biossíntese de GSH, enquanto Glutatona S Transferase (GstA) e Glutatona Redutase (GR) estão envolvidas com a destoxificação de H_2O_2 e reciclagem do complexo GSSG formado, respectivamente. As enzimas GshB, SHMT e GstA foram identificadas no proteoma de *R. freirei*, cujo destaque em

vermelho indica menor expressão em pH acidificado e azul indica maior expressão na mesma condição. Gly corresponde ao aminoácido glicina e GSSG ao complexo formado pela conjugação de 2 GSH.

Fonte: o autor.

RICILLO et al. (2000) demonstraram que a produção metabólica de GSH é essencial para a proteção de *R. tropici* CIAT 899 contra estresses ambientais, frequentemente enfrentados na natureza, como pH ácido, estresse osmótico e oxidativo, assim como observado com *Bradyrhizobium* sp. mutada no gene *gshA* SOBREVALS et al. (2006). No entanto, a proteína GshB foi menos expressa em pH acidificado, apesar de *R. freirei* e CIAT 899 possuírem grandes semelhanças genotípicas (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2012). Além disso, a enzima Serina hidroximetiltransferase, que produz e fornece glicina à GshB, também foi menos expressa em pH ácido (MASIP et al., 2006; WADITEE-SIRISATTHA et al., 2012).

No entanto, o meio de cultivo TY pode estar parcialmente suprimindo a necessidade de GSH, reduzindo a necessidade de sua biossíntese (SOBREVALS et al., 2006). A taxa de expressão diferencial do gene codificador da enzima GshB (*gshB*) também foi analisada por meio de RT-qPCR, cujos resultados indicam que não houve diferença significativa na expressão gênica de *gshB* nos tratamentos pH 30 e pH 60 em relação ao controle (Anexo 2).

Diversos exemplos têm corroborado a hipótese de que γ -GC pode atuar de forma similar à GSH quando esta não pode ser sintetizada (JIN et al., 2012). Em *S. meliloti*, duas estirpes mutantes para os genes *gshA* e *gshB* apresentaram fenótipos de crescimento diferencialmente sensíveis, cuja mutante para o gene *gshA* apresentou sintomas mais severos, sendo incapaz de crescer em condições normais (HARRISON et al., 2004). O gene *gshA* foi mais expresso por *Bifidobacterium longus* sob estresse ácido, cujo fato deste organismo não possuir gene codificador de nenhuma proteína homóloga à GshB pode sugerir que a γ -GC atua de forma semelhante à GSH (JIN et al., 2012).

4.4.6. Vias metabólicas centrais e a tolerância ao estresse ácido

A versatilidade metabólica de rizóbios é reconhecida e consistente com sua capacidade de adaptação a diferentes ambientes. Inclusive, genomas de rizóbios possuem um número consideravelmente maior de genes relacionados ao metabolismo e transporte de carboidratos em comparação com outros microrganismos (PINI et al., 2011).

As enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (*Zwf spot 14*) e 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolase (*KDPG aldolase spot 15*), cuja expressão foi significativamente

superior em pH ácido (Figura 4), atuam na conversão sequencial de glicose-6-fosfato em piruvato por meio da via metabólica Entner-Doudoroff (Figura 5) (GEDDES & ORESNIK, 2014).

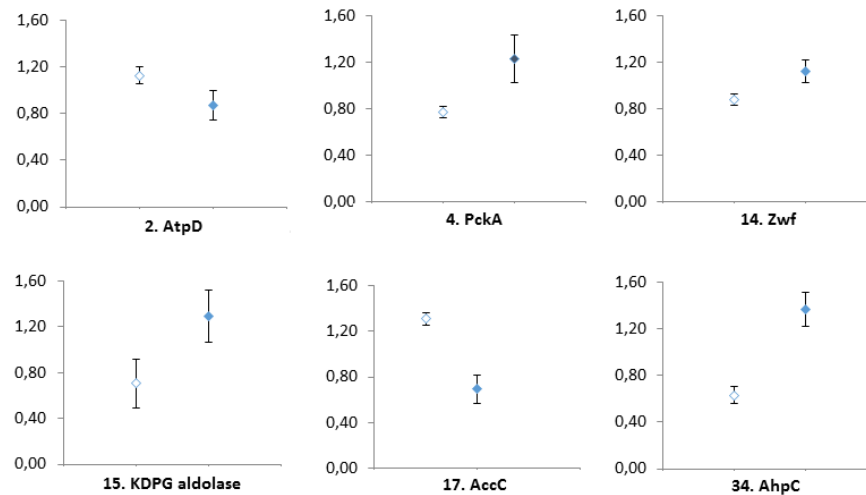


Figura 4: Representação gráfica do %vol de proteínas identificadas, que possuem papel chave para a discussão dos mecanismos moleculares de *R. freirei* envolvidos na capacidade de tolerância ao estresse ácido. Os números das proteínas correspondem à ordem apresentada na Tabela 2, as quais foram avaliadas na condição controle (brancos) e em pH ácido (azuis).

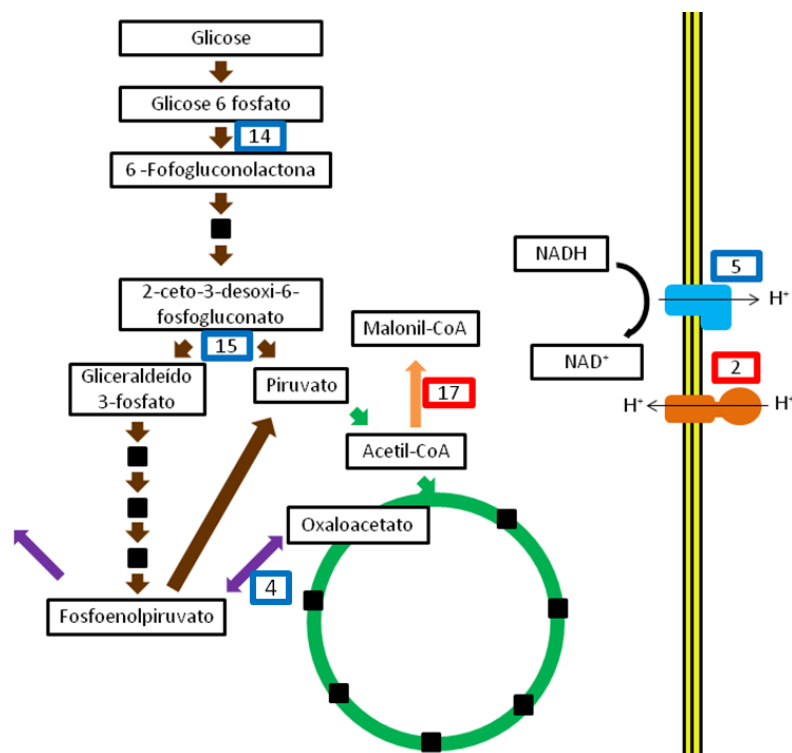


Figura 5: Representação esquemática parcial de vias metabólicas centrais, com ênfase nas etapas catalizadas por proteínas identificadas no proteoma de *R. freirei* sob estresse ácido. Direção das setas indica o sentido do fluxo metabólico; retângulos azuis correspondem às proteínas identificadas neste trabalho com maior expressão em pH ácido, enquanto retângulos vermelhos correspondem a proteínas com menor expressão em pH ácido, enumeradas de acordo com a Tabela 2; quadros nomeados correspondem a substratos ou produtos de enzimas identificadas, quadros pretos indicam outros metabólitos. Coloração das setas correspondem a reações pertencentes às vias: ED (marrom), TCA (verde), Gliconeogênese (roxo) e Biossíntese de ácidos graxos (laranja).

Fonte: o autor.

Em condições aeróbias, existem três vias metabólicas principais para obtenção de energia por meio da oxidação de carboidratos: Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Glicólise), Entner-Doudoroff (ED) e Via das Pentoses Fosfato (PF). Estas vias basicamente convertem carboidratos em precursores de substratos passíveis de incorporação no Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA), também de caráter oxidativo em aerobiose (FUHRER et al., 2005).

Segundo FUHRER et al. (2005), o metabolismo de glicose pelas bactérias *Agrobacterium tumefaciens*, que possui fortes semelhanças genotípicas com *R. freirei* (GOMES et al., 2012a), e *S. meliloti*, é realizado basicamente pela via ED (Figura 5) e a via PF utilizada apenas para produção de precursores de biomassa, não sendo detectada atividade da via glicolítica (FUHRER et al., 2005). Deste modo, o aumento significativo na expressão das enzimas Zwf e KDPG aldolase (Figura 4) pode estar relacionado ao metabolismo de carboidratos via ED (Figura 5).

A fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PckA, *spot 4*) é uma enzima chave no metabolismo central de carbono, pois cataliza a conversão reversível de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato (Figura 5), ligando vias de catabolismo (TCA) e anabolismo (gliconeogênese); portanto a determinação do direcionamento do metabolismo central depende diretamente da regulação de sua atividade. Tal regulação é complexa e está atualmente sendo elucidada, porém sabe-se que esta proteína é regulada por pelo menos 4 reguladores transcricionais em *Corynebacterium glutamicum* (KLÄFFL et al., 2013) e pelo sistema regulador ChvG-ChvI em *A. tumefaciens*, que está relacionado à regulação de outros diversos genes ácido induzidos (LIU et al., 2005). Além disso, a regulação da atividade da PckA foi recentemente relacionada à sobrevivência intracelular de *Mycobacterium tuberculosis*, cuja tendência é converter fosfoenolpiruvato em oxaloacetato somente em condições fortemente redutoras; porém a termodinâmica da reação e a concentração de metabólitos associados favorece a reação em direção ao anabolismo (MACHOVÁ et al., 2014).

A expressão da enzima PckA foi significativamente maior em pH acidificado (Figura 4), assim como o gene *pckA* foi mais expresso por *A. tumefaciens* em condições semelhantes (LIU et al., 2003; YUAN et al., 2008). Sendo assim, os resultados obtidos sugerem uma relação entre a maior expressão de PckA por rizóbios em condição de pH acidificado.

O complexo Acetil-CoA carboxilase (ACCase *spot 17*) é formado por 4 subunidades, codificadas pelos genes *accABCD*. A enzima identificada no proteoma de *R. freirei* foi a

biotina carboxilase (AccC). O complexo ACCase é um conjunto de enzimas chave no processo de biossíntese de ácidos graxos, pois cataliza a primeira etapa desta via, convertendo Acetil-CoA em Malonil-CoA (Figura 5) (RATHNASINGH et al., 2012).

A proteína AccC foi menos expressa sob estresse ácido (Figura 4), e resultados semelhantes foram observados com *Helicobacter pylori* exposta a um gradiente de pH acidificado, cuja subunidade carboxiltransferase (*accA*) apresentou tendência a uma menor expressão em pHs inferiores a 6,0 (SHAO et al., 2008). Diversos operons que codificam enzimas da EMP e TCA foram mais expressos por *E. coli* em pH ácido, indicando que, de uma forma geral, sistemas que consomem ácidos são mais expressos em pH acidificado (MAURER et al., 2005). Considerando o aumento na expressão de proteínas envolvidas em vias de oxidação de carboidratos (Zwf e KDPG aldolase) e a redução na expressão da AccC, o metabolismo de *R. freirei* pode estar direcionado para o aumento no consumo de carboidratos em detrimento da biossíntese de ácidos graxos (RATHNASINGH et al., 2012).

4.4.7. Manutenção do pH interno

A membrana externa é a primeira linha de contato de bactérias Gram negativas com o ambiente, portanto sua estabilidade é crucial e as proteínas desta estrutura estão diretamente relacionadas com sua estabilidade. Uma das proteínas localizadas na membrana externa é a RopB (*spot 24*), cujas estirpes mutantes para seu gene codificador *ropB* apresentaram maior sensibilidade a estresses abióticos, como o estresse ácido (FOREMAN et al., 2010). Deste modo, o aumento na expressão da proteína RopB em pH ácido reforça a importância desta proteína para a capacidade de tolerância de *R. freirei* a esta condição.

Entretanto, os resultados de RT-qPCR indicam que não houve diferença estatística na expressão do gene *ropB* entre os tratamentos com pH ácido (pH 30 e pH 60) e Controle (Anexo 2). A expressão do gene *ropB* é mediada pelo sistema de dois componentes ChvG/ChvI, também envolvido na regulação de outros genes ácido induzíveis, como *pckA*, descrito neste trabalho (FOREMAN et al., 2010; LIU et al., 2005).

Para manter o funcionamento adequado das vias metabólicas centrais é necessário um aporte constante de substratos e carreadores de elétrons, pois muitas reações são dependentes de coenzimas (GEDDES & ORESNIK, 2014).

No proteoma de *R. freirei* foram identificadas duas proteínas pertencentes a dois complexos diretamente relacionados ao transporte de prótons através da membrana: NADH

quinona oxidoredutase subunidade C (NuoC *spot* 5) e ATP sintetase subunidade β (AtpD *spot* 2) (Figura 4) (DUARY et al., 2010; SPERO et al., 2015).

A NuoC é uma subunidade do Complexo I: NADH quinona oxirredutase, o primeiro complexo enzimático da cadeia respiratória aeróbica, que cataliza o transporte de H^+ para o meio extracelular acoplado à reciclagem de NADH em NAD^+ (Figura 5). Tal carregamento de H^+ gera força próton motora, que posteriormente pode ser utilizada para a formação de ATP via F_1F_0 -ATPase (BRANDT, 2006; DUARY et al., 2010; SPERO et al., 2015). A AtpD, por sua vez, é uma subunidade fundamental do complexo F_1F_0 -ATPase (DUARY et al., 2010), que fica localizado na membrana citoplasmática e é capaz de sintetizar ATP utilizando a força próton motora (Figura 5), ou promover a extrusão de prótons utilizando energia de ATP (LUND et al., 2014).

A expressão da proteína NuoC foi maior em pH ácido, bem como a expressão de genes que codificam o Complexo 1 foi observada com cepas de *E. coli* (MAURER et al., 2005; KANNAN et al., 2008) e *Staphylococcus aureus* (BORE et al., 2007), corroborando os resultados deste trabalho.

A proteína AtpD foi menos expressa em pH ácido (Figura 4) e, apesar da maior parte dos trabalhos mostrar a proteína AtpD ou o gene *atpD* sendo majoritariamente mais expresso em condições acidificadas (FOSTER; LEN et al., 2004), *S. aureus* apresentou redução na expressão dos genes codificadores de todas as subunidades do Complexo F_1F_0 -ATPase em pH acidificado (BORE et al., 2007).

Deste modo, a maior expressão da proteína NuoC, somada à redução na expressão de AtpD, ambos codificados em operons no genoma de *R. freirei*, pode sugerir um mecanismo pelo qual *R. freirei* pode estar reduzindo a entrada de prótons através do Complexo F_1F_0 -ATPase e aumentando a extrusão de prótons através do Complexo 1 da cadeia transportadora de elétrons (Figura 5), permitindo uma redução na acidificação do citoplasma (COTTER & HILL, 2003). Um mecanismo inverso foi sugerido para *E. coli* K12 submetida ao pH alcalino, em que genes do Complexo F_1F_0 -ATPase foram mais expressos, enquanto genes que codificam proteínas da cadeia respiratória foram menos expressos. Deste modo, o resultado poderia ser uma redução da alcalinização do citoplasma por meio do aumento na captação de prótons, através do Complexo F_1F_0 -ATPase e, redução na perda dos mesmos, através da cadeia transportadora de elétrons.

4.4.8. Formação de ERO e defesa enzimática correspondente

Apesar de pouco compreendida, a correlação entre o estresse ácido e oxidativo já foi levantada por alguns autores (BRUNO-BÁRCENA et al., 2010). Muitas enzimas do sistema antioxidante também atuam na resposta de tolerância ao estresse ácido, térmico ou osmótico, permitindo uma proteção celular cruzada contra diferentes condições abióticas limitantes (RANGEL, 2011). A espécie *R. freirei* foi submetida ao estresse térmico e analisada por meio de abordagem proteômica e, diversas proteínas responsivas à essa condição foram relacionadas à proteção contra o estresse oxidativo (GOMES et al., 2012b), reforçando a ligação entre respostas adaptativas a diferentes estresses ambientais.

Durante a transferência de elétrons na cadeia respiratória pode ocorrer a formação de ERO, cujo Complexo 1 é considerado o principal gerador do radical superóxido (O_2^-) endógeno, o qual pode ser convertido enzimaticamente em H_2O_2 , também tóxico à célula (BRAND et al., 2004; IMLAY, 2013).

A alquil hidroperóxido redutase (AhpC *spot* 34) é uma enzima que cataliza a transferência de elétrons de NADH para o H_2O_2 (Figura 4), convertendo-o em H_2O e NAD^+ . Ao contrário das catalases, em baixas concentrações de H_2O_2 não ocorre a formação de intermediários oxidantes durante a reação catalizada pela AhpC, portanto é considerada a enzima destoxificadora mais eficaz em baixas concentrações de H_2O_2 . Porém a atividade da enzima AhpC torna-se saturada quando a concentração de H_2O_2 intracelular excede 20 μM ou quando o suprimento de NADH é insuficiente (SEAVER & IMLAY, 2001; IMLAY, 2013).

A AhpC foi a proteína mais expressa sob estresse ácido (Figura 4). Resultado semelhante já foi descrito em *E. coli* (STANCIK et al., 2002) e *Lactococcus lactis* (BUDIN-VERNEUIL et al., 2005).

Outra enzima envolvida com ERO é a Glutathione S- transferase (GST *spot* 30), que pertence a uma superfamília de proteínas que atuam na destoxificação celular. Estas enzimas atuam em diversos processos, mas principalmente na defesa contra estresse oxidativo e degradação de xenobióticos (Figura 3) (ALLOCATI et al., 2008), podendo formar conjugados de glutathione (GSH) com moléculas danificadas pelo estresse oxidativo, como lipídios, proteínas e DNA oxidados, além de serem capazes de conjugar glutathione com xenobióticos, o que aumenta a solubilidade destes e permite sua excreção (TODOROVA et al., 2007; RONCALLI et al., 2015).

Assim como a enzima AhpC, a expressão de GST foi maior na condição de pH ácido. A taxa de expressão diferencial do gene *gstA* também foi maior após 60 minutos de exposição ao pH ácido, corroborando os resultados obtidos em proteômica e reforçando a importância da enzima GstA na resposta adaptativa de *R. freirei* ao pH ácido (Anexo 2).

Segundo MAURER et al. (2005), um grande número de genes de estresse oxidativo mostraram expressão dependente de pH, sendo induzidos por ácido ou reprimidos por base. Estes resultados confirmam a hipótese de que há uma forte conexão entre o estresse ácido e estresse oxidativo, uma vez que a respiração aeróbica é intensificada em pH 5,0 junto à indução de componentes da cadeia respiratória, que provavelmente acelera a produção de ERO e induz respostas ao estresse oxidativo.

4.5. Considerações finais

A abrangência de vias metabólicas alteradas em função do pH acidificado corrobora a resposta adaptativa frente a estresses ambientais como sendo de caráter multigênico. Baseando-se nas proteínas diferencialmente expressas identificadas, nota-se que a resposta adaptativa de *R. freirei* ao cultivo em pH acidificado envolve: I-indução da síntese proteica e consequente aumento na demanda energética geral; II-aumento do metabolismo energético, por indução de vias catabólicas; III-aumento da formação de espécies reativas de oxigênio; V-redução da suscetibilidade celular ao ataque de prótons e do influxo dos mesmos ao ambiente intracelular.

Deste modo, a alteração de vias metabólicas centrais parece ser o principal mecanismo de tolerância ao estresse ácido de *R. freirei*. A expressão diferencial de proteínas identificadas em função do pH reforça cada vez mais que o metabolismo é regulado de modo a minimizar a acidificação e alcalinização excessivas, enquanto mobiliza fontes de carbono.

A predominância de proteínas citoplasmáticas envolvidas na resposta ao pH acidificado reforça a importância do metabolismo central para a capacidade de tolerância de *R. freirei*, diferente do que foi observado por outros autores, em que o percentual de proteínas periplasmáticas e de membrana foi superior (BATISTA et al., 2010; GOMES et al., 2012b).

Os resultados indicam que a indução do metabolismo catabólico e consequente aumento na respiração aeróbica constituem fortes indícios de que o pH acidificado induz estresse oxidativo em *R. freirei*, por meio de aumento na formação de ERO.

A capacidade de tolerar condições de estresse causadas pelo pH ácido não somente é relevante à capacidade saprofítica de rizóbios como também é determinante para a interação com a planta hospedeira. A versatilidade fisiológica e metabólica de rizóbios frente a diferentes condições de estresse abiótico é reconhecida, porém ainda pouco compreendida devido ao seu caráter multifatorial. Utilizando metodologias de análise global, como a proteômica, podemos observar o quão abrangente e variadas são as respostas metabólicas de

R. freirei frente ao estresse ácido, assim como já foi observado para condições de altas temperaturas (GOMES et al., 2012).

O envolvimento de vias metabólicas centrais em resposta ao estresse ácido pode estar relacionado à resistência cruzada entre diferentes estresses ambientais, como observado por RANGEL (2011). No entanto, a maior parte dos trabalhos em microbiologia utiliza como modelos bactérias de importância clínica e industrial que muitas vezes apresentam grandes diferenças em relação a bactérias de solo, sendo assim pouco representativos dos demais grupos bacterianos, reforçando a importância de estudos com bactérias ambientais. Considerando que outros trabalhos com bactérias de solo têm resultados semelhantes, esta pode ser uma resposta generalizada entre rizóbios.

4.6. Referências bibliográficas

1. AHMED, M.; KHAN, M. S. Insecticide-tolerant and plant-growth-promoting *Rhizobium* improves the growth of lentil (*Lens esculentus*) in insecticide-stressed soils. *Pest Manag Sci.* 67:423-429, 2011.
2. ALFAIA, S. S. Caracterização e distribuição das formas do nitrogênio orgânico em três solos da Amazônia Central. *Acta Amazônica.* 36:135-140, 2006.
3. ALLOCATI, N.; FEDERICI, L.; MASULLI, M.; DI LLIO, C. Glutathione transferase in bacteria. *FEBS J.* 276:58-75, 2008.
4. ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 68:4025-4034, 2002.
5. ANYANGO, B.; WILSON, K. L.; BEYNON, J. L.; GILLER, K. E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. *Appl Environ Microbiol.* 61:4016-4021, 1995.
6. ASHCROFT, A. E. Protein and peptide identification: the role of mass spectrometry in proteomics. *Nat Prod Rep.* 20:202-215, 2003.
7. BARRET, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. *App Environ Microbiol.* 72:1198-1206, 2006.
8. BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; FERREIRA, M. C.; MENDES, I. C. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados soil. *Microbial Ecol.* 53:270-284, 2007.
9. BATISTA, J. S. S. ; TORRES, A. R.; HUNGRIA, M. Towards a two dimensional proteomic reference map of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15: spotlighting “hypothetical proteins”. *Proteomics.* 10:3176-3189, 2010.
10. BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA, M. Proteomics reveals differential expression of proteins related to a variety of metabolic pathways by genistein-induced *Bradyrhizobium japonicum* strains. *J Proteomics.* 75:1211-1219, 2012.
11. BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 17:121-127, 1999.

12. BORE, E.; LANGSRUD, S.; LANGSRUD, Ø.; RODE, T. M.; HOLCK, A. Acid-shock responses in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis. *Microbiology*. 153:2289-2303, 2007.
13. BOUSSAU, B.; KARLBERG, E. O.; FRANK, A. C.; LEGAULT, B.; ANDERSSON, S. G. E. Computational inference of scenarios for α -proteobacterial genome evolution. *Proc Natl Acad Sci*. 101:9722-9727, 2004.
14. BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-254, 1976.
15. BRAND, M. D.; AFFOURTIT, C.; ESTEVES, T. C.; GREEN, K.; LAMBERT, A. J.; MIWA, S.; PAKAY, J. L.; PARKER, N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med*. 37:755-767, 2004.
16. BRANDT, U. Energy Converting NADH:Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annu Rev Biochem*. 75:69-92, 2006.
17. BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant and Soil*. 252: 55-128, 2003.
18. BUCKLEY, D. H.; SCHMIDT, T. M. Exploring the biodiversity of soil-a microbial rain forest. *Biodiversity of Microbial Life*. Wiley-Liss, Inc, 2002.
19. BUDIN-VERNEUIL, A.; PICHEREAU, V.; AUFRAY, Y.; EHRLICH, D.; MAGUIN, E. Proteomic characterization of the acid tolerance response in *Lactococcus lactis* MG1363. *Proteomics*. 5:0000-0000, 2005.
20. CANTÚ, M. D.; EMANUEL, C.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Química Nova*. 31:669-675, 2008
21. CARVALHO, G. A. B.; BATISTA, J. S. S.; MARCELINO-QUIMARÃES, F. C.; NASCIMENTO, L. C.; HUNGRIA, M. Transcriptional analysis of genes involved in nodulation in soybean roots inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* strain CPAC 15. *BMC Genomics*. 14:153, 2012.
22. CHAVES, D. F. S.; SOUZA, E. M.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O. A two-dimensional electrophoretic profile of the proteins secreted by *Herbaspirillum seropedicae* strain. *J Proteomics*. 73:50-56, 2009.

23. CORDWELL, S. J.; NOUWENS, A. S.; WALSH, B. J. Comparative proteomics of bacterial pathogens. *Proteomics*. 1:461-472, 2001.
24. COTTER, P. D.; HILL, C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev*. 67:429-453, 2003.
25. DALL'AGNOL, R. F.; RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M. A.; DELAMUTA, J. R. M.; ANDRADE, D. S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium freirei* sp nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. *Int J Syst Evol Micr*. 63:4167-4173, 2013.
26. DALL'AGNOL, R. F.; RIBEIRO, R. A.; DELAMUTA, J. R. M.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M. A.; ANDRADE, D. S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium paranaense* sp. nov., an effective N₂-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 64:3222-3229, 2014.
27. DELAMUTA, J. R.; RIBEIRO, R. A.; MENNA, P.; BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. *Braz J Microbiol*. 43:698-710, 2012.
28. DELAMUTA, J. R.; RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MELO, I. S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 63:3342-3351, 2013.
29. DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; GOMES, D. F.; SOUZA, R. C.; CHUEIRE, L. M. O.; HUNGRIA, M. Genome sequence of *Bradyrhizobium pachyrrhizi* strain PAC48T, a nitrogen-fixing symbiont of *Pachyrhizus erosus* (L.) Urb. *Genome Announc*. 3:e01074-15, 2015.
30. DRAGHI, W. O.; DEL PAPA, M. F.; PISTORIO, M.; LOZANO, M.; GIUSTI, M. A.; TEJERIZO, G. A. T.; JOFRÉ, E.; BOIARDI, J. L.; LAGARES, A. Cultural conditions required for the induction of an adaptive acid tolerance response (ATR) in *Sinorhizobium meliloti* and the question as to whether or not the ATR helps rhizobia improve their symbiosis with alfalfa at low pH. *FEMS Microbiol Lett*. 302:123-130, 2010.
31. DUARY, R. K.; BATISH, V. K.; GROVER, S. Expression of the *atpD* gene in probiotic *Lactobacillus plantarum* strains under *in vitro* acidic conditions using RT-qPCR. *Res Microbiol*. 161:399-405, 2010.

32. FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. PNAS. 103:626-631, 2006
33. FOREMAN, D. L.; VANDERLINDE, E. M.; BAY, D. C.; YOST, C. K. Characterization of a gene family of outer membrane proteins (*ropB*) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39SM and the role of the sensor kinase ChvG in their regulation. J Bacteriol. 192:975-983, 2010.
34. FOSTER, J. W. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. Nat Rev Microbiol. 2:898-907, 2004.
35. FUHRER, T.; FISCHER, E.; SAUER, U. Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. J BACTERIOL. 187:1581-1590, 2005.
36. GALPERIN, M. Y.; MAKAROVA, K. S.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. Nucleic Acids Res. 43:261-269, 2015.
37. GEDDES, B. A.; ORESNIK, I. J. Physiology, genetics, and biochemistry of carbon metabolism in the alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. Can. J. Microbiol. 60: 491-507, 2014.
38. GEVAERT, K.; VANDEKERCKHOVE, J. Protein identification methods in proteomics. Electrophoresis, 21:1145-1154, 2000.
39. GOMES, D. F.; BATISTA, J. S. S.; TORRES, A. R.; ANDRADE, D. S.; GALLI-TERASAWA, L. V.; HUNGRIA, M. Two-dimensional proteome reference map of *Rhizobium tropici* PRF 81 reveals several symbiotic determinants and strong resemblance with agrobacteria. Proteomics. 12:859-863, 2012a.
40. GOMES, D. F.; BATISTA, J. S. S.; SCHIAVON, A. L.; ANDRADE, D. S.; HUNGRIA, M. Proteomic profiling of *Rhizobium tropici* PRF 81: identification of conserved and specific responses to heat stress. BMC Microbiol. 12:84, 2012b.
41. GOMES, D. F.; BATISTA, J. S. S.; ROLLA, A. A. P.; SILVA, L. P. BLOCH, C.; GALLÍ-TERASAWA, L. V.; HUNGRIA, M. Proteomic analysis of free-living *Bradyrhizobium diazoefficiens*: highlighting potential determinants of a successful symbiosis. BMC Genomics. 15:643, 2014.
42. GOPALAKRISHNAN, S.; SATHYA, A.; VIJAYABHARATHI, R.; VARSHNEY, R. K.; GOWDA, C. L. L.; KRISHNAMURTHY, L. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. Biotech. 5:355-377, 2015.

43. GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 4:3665-3685, 2004.
44. GRAHAM, P. H.; DRAEGER, K. J.; FERREY, M. L.; CONROY, M. J.; HAMMER, B. E.; MARTINEZ, E.; AARONS, S. R.; QUITO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR 1899. *Can J Microbiol*. 40:198-207, 1994.
45. HAAG, A. F.; ARNOLD, M. F. F.; MYKA, K. K.; KERSCHER, B.; DALL'ANGELO, S.; ZANDA, M.; MERGAERT, P.; FERGUSON, G. P. Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. *FEMS Microbiol Rev*. 37:364-383, 2012.
46. HARRISON, J.; JAMET, A.; MUGLIA, C. I.; SYPE, G. VAN DE.; AGUILAR, M.; PUPPO, A.; FREND, P. Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*. 187:168-174, 2005.
47. HAYNES, P. A.; YATES, J. R. Proteome profiling - pitfalls and progress. *Yeast*. 17:81-87, 2000.
48. HELLWEG, C.; PÜHLER, A.; WEIDNER, S. The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. *BMC Microbiol*. 9:37, 2009.
49. HU, Y.; RIBBE, M. W. Nitrogenase and homologs. *J Biol Inorg Chem*. 20:435-445, 2015.
50. HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA A, GUTIERREZ-MANEIRO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol Biochem*. 32:1515-1528, 2000.
51. HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crop Res*. 65:151-164, 2000.
52. HUNGRIA, M. CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; Benefits of inoculation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biol Fertil Soil*. 39:88-93, 2003.
53. HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. Inoculantes microbianos: situação no Brasil. In: BIOFAG, org. *Uso y perspectivas de los biofertilizantes en iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial*. Biofag. 1-16, 2007.

54. IMLAY, J. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature Rev Microbiol.* 11:443-454, 2013.
55. IVY, R. A.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. *Listeria monocytogenes* grown at 7 degrees C shows reduced acid survival and an altered transcriptional response to acid shock compared to *L. monocytogenes* grown at 37 degrees C. *Appl Environ Microbiol.* 78:3824-3836, 2012.
56. JIN, J.; ZHANG, B.; GUO, H.; CUI, J.; JIANG, L.; SONG, S.; SUN, M.; REN, F. Mechanism Analysis of Acid Tolerance Response of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN 68 by Gene Expression Profile Using RNA-Sequencing. *Plos ONE.* 7: e50777, 2012.
57. JONES, K. M.; KOBAYASHI, H.; DAVIES, B. W.; TAGA, M. E.; WALKER, G. C. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. *Nature Rev.* 5:619-633, 2007.
58. KANNAN, G.; WILKS, J.; FITZGERALD, D. M.; JONES, B. D.; BONDURANT, S. S.; SLONCZEWSKI, J. L. Rapid acid treatment of *Escherichia coli*: transcriptomic response and recovery. *BMC Microbiology.* 8:37, 2008.
59. KEILER, K. C. Mechanisms of ribosome rescue in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 13:285-297, 2015.
60. KELL, D. B.; OLIVER, S. G. Here is the evidence, now what is the hypothesis? The complementary roles of inductive and hypothesis-driven science in the post-genomic era. *Bioessays.* 26:99-105, 2003.
61. KIM, B. H.; KIM, S.; KIM, H. G.; LEE, J.; LEE, I. S.; PARK, Y. K. The formation of cyclopropane fatty acids in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiol.* 151:209-218, 2005.
62. KITANO, H. Systems biology: A brief overview. *Science.* 295:1662-1664, 2002.
63. KLAFFL, S.; BROCKER, M.; KALINOWSKI, J.; EIKMANN, B. J.; BOTT, M. Complex Regulation of the Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Gene *pck* and Characterization of Its GntR-Type Regulator *IolR* as a Repressor of myo-Inositol Utilization Genes in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* 195:4283-4296, 2013.
64. KRULWICH, T. A.; SACHS, G.; PADAN, E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 9:330-343, 2011.
65. LAUBER, C. L.; STRICKLAND, M. S.; BRADFORD, M. A.; FIERER, N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology & Biochemistry.* 40:2407-2415, 2008.

66. LEMOS, J. A.; BURNE, R. A. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. Microbiology. 154:3247-3255, 2008.
67. LEN, A. C.; HARTY, D. W. S.; JACQUES, N. A. Proteome analysis of *Streptococcus mutans* metabolic phenotype during acid tolerance. Microbiology. 150:1353-1366, 2004.
68. LIU, K.; YU, J.; RUSSEL, D. G. *pckA*-deficient *Mycobacterium bovis* BCG shows attenuated virulence in mice and in macrophages. Microbiology. 149:1829-1835, 2003.
69. LIU, P.; WOOD, D.; NESTER, E. W. Phosphoenolpyruvate carboxykinase is an acid-induced, chromosomally encoded virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol. 6039-6045, 2005.
70. LOPEZ, J. L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. J Chromatography B. 849:190-202, 2007.
71. LOPEZ, M. F. Proteome analysis I. Gene products are where the biological action is. J Chromatography B. 722:191-202, 1999.
72. LUND, P.; TRAMONTI, A.; BIASE, D. D. Coping with low pH: molecular strategies in neutrophilic bacteria. FEMS Microbiol Rev. 38:1091-1125, 2014.
73. MACHADO, I.; COQUETB, L.; JOUENNEB, T.; PEREIRA, M. O. Proteomic approach to *Pseudomonas aeruginosa* adaptive resistance to benzalkonium chloride. J. Proteomics. 89:273-279, 2013.
74. MACHOVÁ, I.; SNÁSEL, J.; ZIMMERMANN, M.; LAUBITZ, D.; PLOCINSKI, P.; OEHLMANN, W.; SINGH, M.; DOSTÁL, J.; SAUER, U.; PICHOVÁ, I. *Mycobacterium tuberculosis* Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Is Regulated by Redox Mechanisms and Interaction with Thioredoxin. Chem. Journal of biological. 289:13066-13078, 2014.
75. MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Agronômica Ceres. 126-192, 2006.
76. MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. Int J Syst Bacteriol. 41:417-26, 1991.
77. MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Novel *Rhizobium* lineages isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodules in Andean and Mesoamerican areas. Res Microbiol. 164:740-748, 2013.
78. MASIP, L.; VEERAVALLI, K.; GEORGIOU, G. The many faces of glutathione in bacteria. Antioxid Redox Signal. 8:753-762, 2006.

79. MASSON-BOIVIN, C.; GIRAUD, E.; PERRET, X.; BATUT, J. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *rhizobium* recipes? Trends Microbiol. 17: 458-466, 2009.
80. MAURER, L. M.; YOHANNES, E.; BONDURANT, S. S.; RADMACHER, M.; SLONCZEWSKI, J. L. pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol. 187:304-319, 2005.
81. MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. FEMS Microbiol Rev. 37:634-663, 2013.
82. MENDES, L. W.; KURAMAE, E. E.; NAVARRETE, A. A.; VEEN, J. A. V.; TSAIS, S. M. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. ISME Journal. 8:1577-1587, 2014.
83. MILLER, I.; CRAWFORD, J.; GIANAZZA, E. Protein stains for proteomic applications: Which, when, why? Proteomics. 6:5385-5408, 2006.
84. MORGANTE, M.; SALAMINI, F. From plant genomics to breeding practice. Curr Opin Biotech. 14:214-219, 2003.
85. MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F. L.; DIAS, B. G.; VARGAS, M. A.; HUNGRIA, M. Selection of bean *Phaseolus vulgaris* rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. Field Crop Res. 73:121-132, 2002.
86. MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of proteobacteria. Nature. 411:948-950, 2001.
87. MUGLIA, C. I.; GRASSO, D. H.; AGUILAR, O. M. *Rhizobium tropici* response to acidity involves activation of glutathione synthesis. Microbiology. 153:1286-1296, 2007.
88. NAGANATHAN, A.; WOOD, M. P.; MOORE, S. D. The large ribosomal subunit protein L9 enables the growth of EF-P deficient cells and enhances small subunit maturation. Plos ONE. 10:e0120060, 2015.
89. NICOL, G. W.; LEININGER, S.; SCHLEPER, C.; PROSSER, J. L. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. Environ Microbiol. 10:2966-2978, 2008.
90. OLDROYD, G. E. D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. Nature Rev Microbiol. 11: 252-263, 2013.
91. OLSON, E. R. Influence of pH on bacterial gene expression. Mol Microbiol. 8:5-14, 1993.

92. ORMEÑO-ORRILLO, E.; MENNA, P.; ALMEIDA, L. G. P.; OLLERO, F. J.; NICOLÁS, M. F.; RODRIGUES, E. P.; NAKATANI, A. S.; BATISTA, J. S. S.; CHUEIRE, L. M. O.; SOUZA, R. C.; VASCONCELOS, A. T. R.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). BMC genomics. 13:735, 2012.
93. ORMEÑO-ORRILLO, E.; HUNGRIA, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: ROSENBERG, E.; DE LONG, E.F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (Eds.). Capítulo 11. The Prokaryotes - prokaryotic physiology and biochemistry. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 427-451, 2013.
94. PATTON, W. F. Detection technologies in proteome analysis. J Chromatography B. 771:3-31, 2002.
95. PENNINGTON, K.; MCGREGOR, E.; BEASLEY, C. L.; EVERALL, I.; COTTER, D.; DUNN, M. J. Optimization of the first dimension for separation by two-dimensional gel electrophoresis of basic proteins from human brain tissue. Proteomics. 4:27-30, 2004.
96. PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J. C.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis. 20:3551-3567, 1999.
97. PINI, F.; GALARDINI, M.; BAZZICALUPO, M.; MENGONI, A. Plant-Bacteria Association and Symbiosis: Are There Common Genomic Traits in Alphaproteobacteria? Genes. 2:1017-1032, 2011.
98. PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res. 30:e36, 2002.
99. POWELL, S.; SZKLARCZYK, D.; TRACHANA, K.; ROTH, A.; KUHN, M.; MULLER, J.; ARNOLD, R.; RATTEI, T.; LETUNIC, I.; DOERKS, T.; JENSEN, L. J.; von MERING, C.; BORK, P. eggNOG v3.0: orthologous groups covering 1133 organisms at 41 different taxonomic ranges. Nucleic Acids Res. 40:284-289, 2012.
100. RABILLOUD, T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. Proteomics. 2:3-10, 2002.

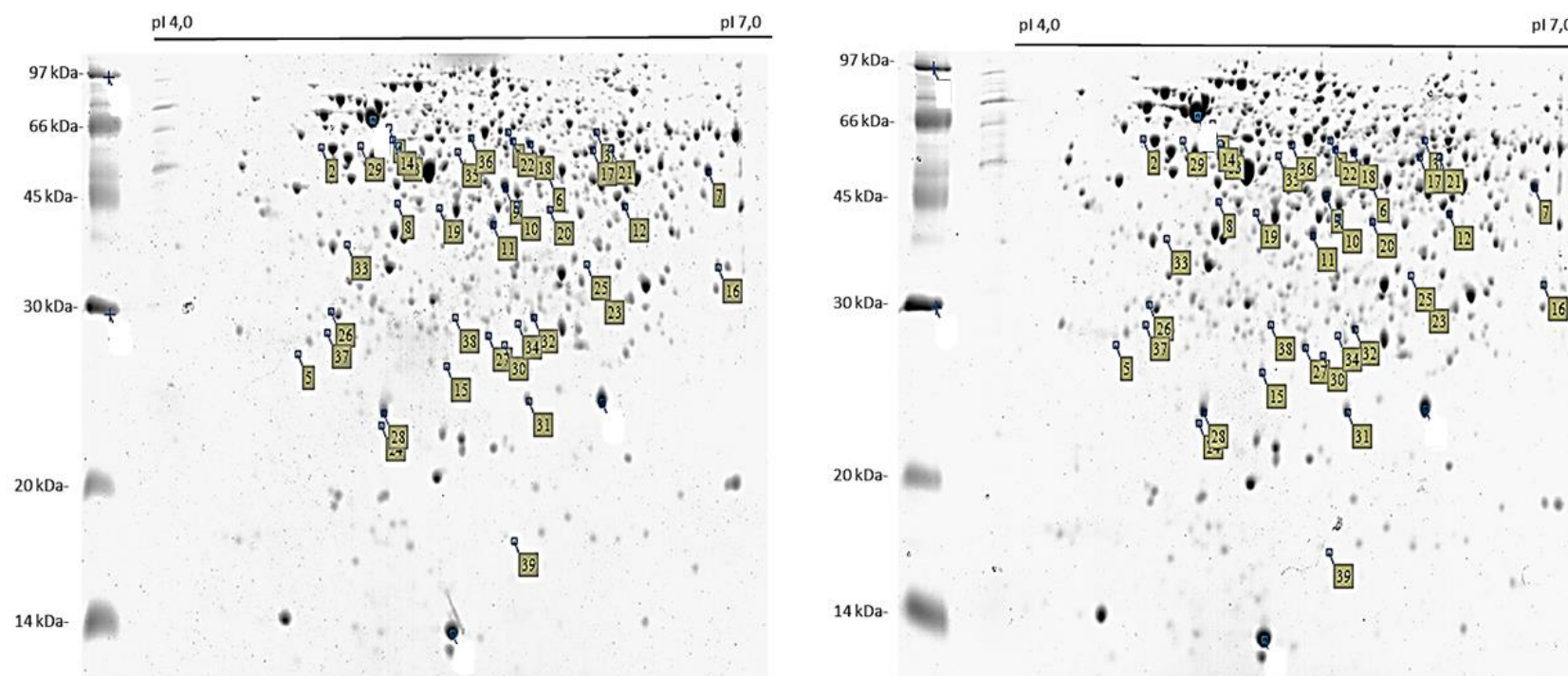
101. RANGEL, D. E. N. Stress induced cross-protection against environmental challenges on prokaryotic and eukaryotic microbes. *World J Microbiol Biotechnol.* 27:1281-1296, 2011.
102. RAO, A. A.; PATKARI, M.; REDDY, P. J.; SRIVASTAVA, R.; PENDHARKAR, N.; RAPOLE, S.; MEHRA, S.; SRIVASTAVA, S. Proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor* in response to Ciprofloxacin challenge. *J Proteomics.* 97: 222-234, 2014.
103. RATHNASINGH, C.; RAJA, M. A.; LEEA, Y.; CATHERINEA, C.; ASHOKA, S.; PARK, S. Production of 3-hydroxypropionic acid via malonyl-CoA pathway using recombinant *Escherichia coli* strains. *J Biotechnol.* 157:633-640, 2012.
104. REED, S. C.; CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R. Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation. *Ann Rev.* 42:489-512, 2011.
105. RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; FUZINATTO, R.; DALL'AGNOL; GRAHAM, P. H.; RIBEIRO, R. A.; BARCELLOS, F. G.; THOMPSON, F. L.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. *Res in Microbiol.* 160:297-306, 2009.
106. RICILLO, P. M.; MUGLIA, C. I.; BRUIJN, F. J.; ROE, A. J.; BOOTH, I. R.; AGUILAR, O. M. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *J Bacteriol.* 182:1748-1753, 2000.
107. RODRIGUES, E. P.; TORRES, A. R.; BATISTA, J. S. S.; HUERGO, L.; HUNGRIA, M. A simple, economical and reproducible protein extraction protocol for proteomics studies of soybean roots. *Genetics and Mol Biol.* 35:348-352, 2012.
108. RONCALLI, V.; CIESLAK, M. C.; PASSAMANECK, Y.; CHRISTIE, A. E.; LENZ, P. H. Glutathione S-Transferase (GST) Gene Diversity in the Crustacean *Calanus finmarchicus* - Contributors to Cellular Detoxification. *Plos ONE.* 10: e0123322, 2015.
109. SANTUCCI, L.; BRUSCHI, M.; GHIGGERI, G. M.; CANDIANO, G. The latest advancements in proteomic two-dimensional gel electrophoresis analysis applied to biological samples. *Clinical Proteomics: Methods and Protocols.* 103-125, 2015.
110. SCHULTZE, M.; KONDOROSI, A. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet.* 32:33-57, 1998.
111. SEAVER, L. C.; IMLAY, J. A. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 183:7173-7181, 2001.

112. SHAO, C.; ZHANG, Q.; TANG, W.; WEIQU; ZHOU, Y.; SUN, Y.; YU, H.; JIA, J. The changes of proteomes components of *Helicobacter pylori* in response to acid stress without urea. J Microbiol. 46:331-337, 2008.
113. SLONCZEWSKI, J. L.; FUJISAWA, M.; DOPSON, M.; KRULWICH, T. A. Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. Adv Microb Physiol. 55:1-79, 2009.
114. SOBREVALLS, L.; MÜLLER, P.; FABRA, A.; CASTRO, S. Role of glutathione in the growth of *Bradyrhizobium* sp. (peanut microsymbiont) under different environmental stresses and in symbiosis with the host plant. Can J Microbiol. 52:609-616, 2006.
115. SPERO, M. A.; AYLWARD, F. O.; CURRIE, C. R.; DONOHUE, T. J. Phylogenomic analysis and predicted physiological role of the proton-translocating NADH:quinone oxidoreductase (complex I) across bacteria. mBio. 6:00389-15, 2015.
116. STANCIK, L. M.; STANCIK, D. M.; SCHMIDT, B.; BARNHART, D. M.; YONCHEVA, Y. N.; SLONCZEWSKI, J. L. pH-Dependent Expression of Periplasmic Proteins and Amino Acid Catabolism in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 184:4246-4258, 2002.
117. THIEDE, B.; HÖHENWARTER, W.; KRAH, A.; MATTOW, J.; SCHMID, M.; SCHMIDT, F.; JUNGBLUT, P. R. Peptide mass fingerprinting. Methods. 35:237-247, 2005.
118. TODOROVA, T.; VUILLEUMIER, S.; KUJUMDZIEVA, A. Role of glutathione s-transferases and glutathione in arsenic and peroxide resistance in *Saccharomyces Cerevisiae*: a reverse genetic analysis approach. Biotechnol & Biotechnol Equip. 21:348-352, 2007.
119. UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. A. M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Res. 35:71-74, 2007.
120. VERÁSTEGUI-VALDÉS, M.; ZHANGB, Y. J.; RIVERA-ORDUÑA, F. N.; CHENG, H.; SUIB, X. H.; WANGA, E. T. Microsymbionts of *Phaseolus vulgaris* in acid and alkaline soils of Mexico. Syst Appl Microbiol. 37:605-612, 2014.
121. VIHINEN, M. Bioinformatics in proteomics. Biomol Eng. 18:241-248, 2001.
122. VINUESA, P.; NEUMANN-SILKOW, F.; PACIOS-BRAS, C.; SPAINK, H. P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; WERNER, D. Genetic analysis of a pH-regulated operon from *Rhizobium tropici* CIAT899 involved in acid tolerance and nodulation competitiveness. Mol Plant Microbe Interact. 16:159-168, 2003.

123. VOORT, M. V. D.; KEMPENAAR, M.; DRIEL, M. V.; RAAIJMAKERS, J. M.; MENDES, R. Impact of soil heat on reassembly of bacterial communities in the rhizosphere microbiome and plant disease suppression. *Ecology letters*. 2016.
124. WADDINGTON, L.; CYR, T.; HEFFORD, M.; HANSEN, L. T.; KALMOKOFF, M. Understanding the acid tolerance response of bifidobacteria. *J Appl Microbiol*. 108:1408-1420, 2010.
125. WADITEE-SIRISATTHA, R.; SITTIPOL, D.; TANAKA, Y.; TAKABE, T. Overexpression of serine hydroxymethyltransferase from halotolerant cyanobacterium in *Escherichia coli* results in increased accumulation of choline precursors and enhanced salinity tolerance. *FEMS Microbiol Lett*. 333:46-53, 2012.
126. WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Part III: Course Manual, Step 9: In-gel digestion. (In: WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Ed) *Proteomics in practice. A laboratory Manual of Proteome Analysis*. Wiley-VCH. 261, 2004.
127. WILKS, J. C.; SLONCZEWSKI, J. L. pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *J Bacteriol*. 189:5601-5607, 2007.
128. YOUNG, J. P. W.; CROSSMAN, L. C.; JOHNSTON, A. W. B.; THOMSON, N. R.; GHAZOU, Z. F.; HULL, K. H. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biology*. 7:R34, 2006.
129. YU, N. Y.; WAGNER, J. R.; LAIRD, M. R.; MELLI, G.; REY, S.; LO, R.; DAO, P.; SAPHINAL, S. C.; ESTER, M.; FOSTER, L. J.; BRINKMAN, S. L. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*. 26:1608-1615, 2010.
130. YUAN, Z.; LIU, P.; SAENKHAM, P.; KERR, K.; NESTER, E. W. Transcriptome Profiling and Functional Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* Reveals a General Conserved Response to Acidic Conditions (pH 5.5) and a Complex Acid-Mediated Signaling Involved in *Agrobacterium*-Plant Interactions. *J Bacteriol*. 190:494-507, 2008.
131. ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol*. 5:539-554, 2003.

ANEXOS

Anexo 1: Perfis de géis bidimensionais com faixa de pH 4-7 de proteínas totais de *R. freirei*, ambos em condição ácida, demonstrando a reprodutibilidade dos géis.



Anexo 2: Análise da expressão gênica em nível transcricional de *gshB*, *gstA* e *ropB* por *R. freirei*, comparando a os tratamentos pH 30 e pH 60 com o controle, utilizando Análise de Variância como parâmetro estatístico.

Tratamento	Gene	Tipo	Eficiência dos iniciadores	Expressão	Desvio padrão	<i>p value</i>	Resultado
pH 30	<i>16S</i>	Normalizador	0,99	1,000			
	<i>ropB</i>	Alvo	0,95	0,707	0,263 - 2,049	0,307	
	<i>gstA</i>	Alvo	0,89	1,179	0,226 - 4,593	0,733	
	<i>gshB</i>	Alvo	0,93	2,023	0,396 - 14,057	0,282	
pH 60	<i>16S</i>	Normalizador	0,99	1,000			
	<i>ropB</i>	Alvo	0,95	1,766	0,195 - 26,055	0,445	
	<i>gstA</i>	Alvo	0,89	3,969,264	502,019 - 35,629,643	0,000	UP
	<i>gshB</i>	Alvo	0,93	2,098	0,308 - 22,863	0,273	