



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA

**CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA *SALRCBA* PARA METABOLIZAÇÃO DE
SALICINA EM *AZOSPIRILLUM AMAZONENSE***

Tiago Ebert Fritsch

ORIENTADOR: Irene Silveira Schrank

CO-ORIENTADOR: Ricardo Cecagno

Porto Alegre – Brasil

2011

**CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA *SALRCBA* PARA METABOLIZAÇÃO DE
SALICINA EM *AZOSPIRILLUM AMAZONENSE***

Tiago Ebert Fritsch

Trabalho de conclusão de curso de Biomedicina elaborado no Laboratório de Microrganismos Diazotróficos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação da professora doutora:

Irene Silveira Schrank

Porto Alegre – Brasil

2011

Agradecimento

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao CNPq pela oportunidade que me proporcionou.

Aos meus pais, Neri Fritsch e Solange Ebert Fritsch, a minha irmã, Patricia, meus avós e toda minha família que sempre me incentivaram.

Ao meu tio André pela convivência e aprendizagem.

À professora Irene Silveira Schrank pela oportunidade de trabalhar em seu grupo.

Ao meu co-orientador Ricardo Cecagno pelo auxílio na realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório pela disposição em ajudar no que fosse preciso.

Ao pessoal que mora e frequenta a “laje” pelos momentos de diversão proporcionados.

Índice

1. Resumo	5
2. Introdução	6
Gênero <i>Azospirillum</i>	6
β -glicosidase	7
Salicina	8
3. Artigo Científico	9
Resumo	9
Introdução	10
Materiais e Métodos	12
Resultados e Discussão	13
Referências	19
4. Conclusão geral	21
5. Referências	22
6. Anexo I	24

1. Resumo

A espécie *Azospirillum amazonense* pertence à subclasse α das proteobactérias e tem a capacidade de promover o crescimento vegetal de plantas (PGPR). Esta espécie é encontrada em associação com diversas culturas de importância econômica, sendo encontrada em cultivos de cana-de-açúcar e arroz. O sequenciamento do genoma de *A. amazonense* revelou a presença de um sistema para metabolização da salicina nesta espécie. Este trabalho demonstrou que o sistema *salRCBA* de *A. amazonense* é extremamente conservado entre as espécies que compartilham estes genes. As β -glicosidases SalA e SalB pertencem a família 3 das glicosil-hidrolases, sendo SalA pertencente a subfamília AB e SalB classificada na subfamília AB' por possuir sua região C-terminal truncada. SalC pertence a família FepA/PhuA de receptores de membrana externa (OMR), estando envolvida na captação da salicina em bactérias. Já SalR é um repressor transcricional da família LacI/GalR que modulam a regulação por meio de moléculas efetoras. A presença de atividade de β -glicosidase em *A. amazonense* foi comprovada pelo crescimento da bactéria em meio de cultivo contendo salicina como fonte de carbono.

Palavras chave. *Azospirillum amazonense*, salicina, β -glicosidase

2. Introdução

Gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* pertence à subclasse α das proteobactérias sendo formado por bactérias gram-negativas, flageladas e fixadoras de nitrogênio de vida livre. As bactérias deste gênero possuem uma ampla distribuição na natureza, sendo isoladas da rizosfera de gramíneas e cereais de todo o mundo, tanto de regiões de clima tropical, quanto de climas temperados [Döbereiner *et al.*, 1976].

Este gênero tem como característica espécies que promovem o crescimento vegetal de plantas e cereais de grande importância econômica. Devido a esta habilidade, elas são consideradas rizobactérias promotoras de crescimento vegetal de plantas (PGPR). Vários aspectos da sua fisiologia podem ser apontados como responsáveis por este efeito estimulatório nas plantas, principalmente sua capacidade de sintetizar fitormônios [Bashan *et al.*, 2004].

Os microorganismos pertencentes ao gênero *Azospirillum* possuem um metabolismo de nitrogênio e de carbono versátil, permitindo que, em condições nutricionais adversas, as bactérias possam utilizar de fontes alternativas de carbono [Baldani *et al.*, 2005].

Até hoje, 15 espécies do gênero *Azospirillum* já foram descritas [sendo citadas em Lavrinenko, *et al.*, 2010]. Considerando a ampla diversidade metabólica das diferentes bactérias encontrada neste gênero podemos estar negligenciando o potencial oferecido pelas outras espécies.

A espécie *Azospirillum amazonense*, alvo deste trabalho, foi descrita em 1983 por Magalhães [Magalhães *et al.*, 1983], e isolada de raízes de gramíneas forrageiras dos estados de Amazonas e do Rio de Janeiro sendo posteriormente isolada de raízes de arroz, milho e sorgo. Esta espécie realiza a fixação do nitrogênio associada com diferentes gramíneas de importância econômica e apresenta uma ampla distribuição tendo sido detectada em grandes quantidades inclusive nas raízes de cana-de-açúcar [Baldani *et al.*, 2005].

Comparativamente a outras espécies do gênero *Azospirillum*, *A. amazonense* difere em algumas características importantes. Uma delas está relacionada à enzima nitrogenase que, nesta espécie, apresenta maior sensibilidade ao oxigênio [Magalhães *et al.*, 1983]. *A. amazonense* apresenta também diferenças quanto ao seu crescimento em meio de cultura podendo utilizar sacarose como fonte de carbono, mas não frutose e nem citrato [Magalhães *et al.*, 1983]. Outra peculiaridade de *A. amazonense* é a tolerância a pHs ácidos. Estas duas

últimas características estão relacionadas ao isolamento de *A. amazonense* de solos ácidos e regiões com cultivo de cana de açúcar [Magalhães *et al.*, 1983].

Estas diferenças com as outras espécies do gênero *Azospirillum* sugerem uma maior distância evolutiva entre estas espécies. Estudos filogenéticos utilizando sequência de rDNA 16S, revelaram que *A. amazonense* está mais relacionada com *A. irakense* e *Rhodospirillum centenun* do que com as outras espécies de *Azospirillum*, como *A. brasilense* [Sant'Anna *et al.*, 2011].

β -glicosidases

As β -glicosidases (3.2.1.21) constituem um grupo heterogêneo de enzimas, presentes em organismos eucariotos e procariotos, que realizam a hidrólise de β -glicosídeos, como a celobiose e os aril- β -glicosídeos (salicina e arbutina). Estes dois compostos são resultado da hidrólise incompleta de celulose, sendo que a celobiose é um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose ligadas e os aril- β -glicosídeos são formados por uma molécula de glicose ligada a um composto aromático.

Devido a abundância da celulose na parede celular de plantas, mais β -glicosidases vem sendo estudadas no solo e na microflora digestiva sendo descritas como a última etapa enzimática na conversão biológica de celulose em glicose [Faure, *et al.*, 1999]. Em bactérias a β -glicosidase faz parte do sistema de degradação da celulose, sendo responsável pela hidrólise de oligossacarídeos de cadeia curta e celobiose em glicose. Desse modo, a salicina pode ser utilizada pela bactéria como uma fonte alternativa de carbono.

Dois métodos são utilizados na literatura para classificar as β -glicosidases, tendo como base, (1) a especificidade de substrato e (2) similaridade de sequências de nucleotídeos.

De acordo com o substrato preferencial utilizado pela β -glicosidase ela pode ser agrupada em três diferentes grupos: (1) aril- β -glicosidase, que atuam em glicosídeos aromáticos, (2) celobioses, que hidrolisam celobiose liberando glicose e (3) sem especificidade por um substrato, agindo sobre um amplo espectro de substratos. Esta última categoria abrange a maioria das β -glicosidases caracterizadas [Bhatia, *et al.*, 2002].

Por outra abordagem, uma classificação baseada na sequência e similaridades no dobramento das enzimas (HCA, hydrophobic cluster analysis) foi proposta para as glicosidases por Henrissat [Henrissat *et al.*, 1996]. Por este método as glicosil hidrolases são agrupadas em famílias de acordo com suas características, sendo que as β -glicosidases são alocadas na família 1 e na família 3. A Família 1 compreende as β -glicosidases de arqueas,

plantas e mamíferos que, em sua maioria, possuem especificidade para um amplo espectro de substratos. Já a Família 3 é formada por β -glicosidases de bactérias e fungos. Esta família pode ser dividida ainda em duas classes, AB e AB'. Todas as enzimas deste grupo possuem dois domínios, A e B. Em AB' o domínio B é truncado, mas as sequências consenso são preservadas.

O HCA de uma variedade destas enzimas sugere que as α -hélices e β -folhas estão localizadas em posições similares no seu enovelamento. Além disso, estas enzimas possuem regiões de aminoácidos altamente conservados localizadas perto do sítio ativo [Bhatia, *et al.*, 2002]. É esperado que esta classificação possa relacionar as características estruturais, relações evolutivas e mecanismos catalíticos entre estas enzimas.

Salicina

A salicina é um β -glicosídeo aromático composto por uma molécula de glicose ligada a uma aglicona, resultante da hidrólise incompleta da celulose. Muitas bactérias gram-positivas e gram-negativas do solo são capazes de utilizar salicina como fonte de carbono.

Em *Escherichia coli* K12 o principal mecanismo para o crescimento em salicina é codificado pelo operon *bgl* [Reynolds *et al.* 1981]. Este operon de *E. coli* é composto por três genes essenciais que codificam um fator transcricional (BglG), uma β -glicosídeo permease (BglF) e uma β -glicosidase (BglB). Neste mecanismo a salicina é importada para o citoplasma via um transportador específico da família PTS (BglF) e clivado por uma fosfo- β -glicosidase (BglB) em uma molécula de aglicona e glicose-6-P que pode ser então utilizada pela bactéria como fonte alternativa de carbono.

Em outras bactérias gram-positivas e gram-negativas que naturalmente metabolizam a salicina, o operon correspondente é bastante similar ao sistema *bgl* de *E. coli* [Brown e Thomson, *et al.*, 1998]. Portanto, o operon *bgl* pode ser considerado o paradigma para compreender a organização e a regulação de genes relacionados à assimilação de salicina em bactérias.

Um sistema alternativo de metabolização de salicina foi descoberto em *Azospirillum irakense* [Somers *et al.*, 2000]. Este sistema é formado pelo operon *sal* que é composto por quatro genes que codificam um regulador transcricional da família LacI/GalR (SalR), um transportador de membrana da família FepA/FhuA (SalC) e duas β -glicosidases da Família 3 (SalA e SalB). O sistema de funcionamento deste modelo foi proposto por Faure [Faure *et al.*, 2001]. Na ausência de salicina no ambiente o regulador SalR vai atuar sobre o operon *salCAB*

impedindo que estes genes sejam transcritos. Ocorrendo a presença de salicina no meio extracelular, esta vai se ligar ao seu receptor específico e sinalizar essa informação para a membrana interna da bactéria, resultando na inativação do repressor SalR e permitindo a ativação do operon *salCAB*. Existem evidências sugerindo que a transdução deste sinal seja feita por SalC. Após a ativação do operon, o receptor SalC deve transportar a salicina para dentro do espaço periplasmático onde então poderia ser clivada pelas β -glicosidases SalA e SalB em seus constituintes aglicona e glicose. Posteriormente, a glicose pode ser importada para o citoplasma através de um transportador da família PTS-Glc.

Através do sequenciamento do genoma de *A. amazonense* [Sant'Anna, *et al.*, 2011] foi identificada a presença de genes relacionados ao metabolismo de salicina. O objetivo deste trabalho é realizar a caracterização dos genes e seus produtos para fazer uma análise evolutiva destes genes nesta espécie e descobrir se esta espécie é capaz de desenvolver em um meio contendo salicina como fonte de carbono.

3. Artigo Científico

O artigo foi redigido seguindo as normas do Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.

Caracterização do sistema *salRCBA* para metabolização de salicina em *Azospirillum amazonense*

Tiago E. Fritsch¹, Ricardo Cecagno², Irene S. Sharank^{2,3}

¹Estudante do Curso de Biomedicina/UFRGS. E-mail: tefritsch@msn.com

²Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM/UFRGS;

³Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, UFRGS.

Resumo

A espécie *Azospirillum amazonense* pertence à subclasse α das proteobactérias e tem a capacidade de promover o crescimento vegetal de plantas (PGPR). Esta espécie é encontrada em associação com diversas culturas de importância econômica, sendo encontrada em cultivos de cana-de-açúcar e arroz. O sequenciamento do genoma de *A. amazonense* revelou a presença de um sistema para metabolização da salicina nesta espécie. Este trabalho demonstrou que o sistema *salRCBA* de *A. amazonense* é extremamente conservado entre as espécies que compartilham estes genes. As β -glicosidases SalA e SalB pertencem a família 3 das glicosil-hidrolases, sendo SalA pertencente a subfamília AB e SalB classificada na subfamília AB' por possuir sua região C-terminal truncada. SalC pertence a família FepA/PhuA de receptores de membrana externa (OMR), estando envolvida na captação da salicina em bactérias. Já SalR é um repressor transcricional da família LacI/GalR que modulam a regulação por meio de moléculas efetoras. A presença de atividade de β -glicosidase em *A. amazonense* foi comprovada pelo crescimento da bactéria em meio de cultivo contendo salicina como fonte de carbono.

Palavras chave. *Azospirillum amazonense*, salicina, β -glicosidase

Introdução

As β -glicosidases (3.2.1.21) são um grupo heterogêneo de enzimas, presentes em organismos eucariotos e procariotos, que realizam a hidrólise de β -glicosídeos, como a celobiose e os aril- β -glicosídeos (salicina e arbutina), sendo responsável pela hidrólise de oligossacarídeos de cadeia curta e celobiose em glicose. Desse modo, a salicina pode ser utilizada pela bactéria como uma fonte alternativa de carbono. A salicina é um β -glicosídeo aromático composto por uma molécula de glicose ligada a uma aglicona, resultante da hidrólise incompleta da celulose. Muitas bactérias gram-positivas e gram-negativas do solo são capazes de utilizar salicina como fonte de carbono.

Em *Escherichia coli* K12 o principal mecanismo para o crescimento em salicina é codificado pelo operon *bgl* [Reynolds *et al.* 1981]. Este sistema é bastante similar em outras bactérias o que o torna um paradigma para compreender a organização e a regulação de genes relacionados à assimilação de salicina em bactérias. Um sistema alternativo de metabolização de salicina foi descoberto em *Azospirillum irakense* [Somers *et al.*, 2000]. Este sistema é formado pelo sistema *salRCAB* que é composto por quatro genes que codificam um regulador transcricional da família LacI/GalR (SalR), um transportador de membrana da família FepA/FhuA (SalC) e duas β -glicosidases da Família 3 (SalA e SalB). Através do sequenciamento do genoma de *Azospirillum amazonense* [Sant'Anna *et al.*, 2011] foi identificada a presença de genes relacionados ao metabolismo de salicina em seu genoma.

A. amazonense é uma α -proteobactéria fixadora de nitrogênio de vida livre, que promove o crescimento vegetal de plantas (PGPR), sendo encontrada na rizosfera de plantações de cana-de-açúcar, arroz, e outras gramíneas [Magalhães *et al.*, 1983]. Comparativamente a outras espécies do gênero *Azospirillum*, *A. amazonense* difere em algumas características importantes. Uma delas esta relacionada à enzima nitrogenase que, nesta espécie, apresenta menor sensibilidade ao oxigênio. *A. amazonense* apresenta também apresenta um metabolismo de carbono versátil, podendo utilizar sacarose como fonte de carbono, mas não frutose e nem citrato. Outra peculiaridade de *A. amazonense* é a tolerância a pHs ácidos.

Até hoje, 15 espécies do gênero *Azospirillum* já foram descritas [sendo citadas em Lavrinenko 2010]. Estas diferenças com as outras espécies do gênero *Azospirillum* sugerem uma maior distancia evolutiva entre estas espécies. Estudos filogenéticos utilizando sequência de rDNA 16S, revelaram que *A. amazonense* está mais relacionada com *A. irakense* e *Rhodospirillum centenun* do que com as outras espécies de *Azospirillum*, como *A. brasilense*

[Sant'Anna *et al.*, 2011]. O objetivo deste trabalho é realizar a caracterização gênica e de seus produtos e fazer uma análise evolutiva deste grupo de genes em *A. amazonense*.

Materiais e Métodos

Meio de cultivo e bactéria.

A bactéria *A. amazonense* Y2 (ATCC 35120) foi cultivada em meio rico M79 (10 g/L de sacarose como fonte de carbono, 0.1 g/L de K₂HPO₄, 0.4 g/L de KH₂PO₄, 0.2 g/L de MgCl₂.7H₂O, 0.1 g/L de NaCl, 0.4 g/L de extrato de levedura pH 6.5) [Fred *et al.*, 1928] a 35°C sob agitação de 150 rpm.

Análise de sequências proteínicas

As sequências de nucleotídeos relacionadas ao metabolismo da salicina anotadas no sequenciamento do genoma de *A. amazonense* [Sant'Anna, *et al.*, 2011] foram analisadas através do programa “System for Automated Bacterial Integrated Annotation (SABIA)” [Almeida, *et al.*, 2004]. A caracterização do *cluster* da salicina das bactérias *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum irakense* e *Caulobacter segnis* foi realizada com o auxílio do programa *Artemis Release 2.0* [Rutherford, *et al.*, 2000].

Para a análise da conservação dos genes *sal* foi realizado alinhamento das sequências de aminoácidos. Neste alinhamento foram utilizadas as sequências que tiveram o menor valor E no Blastp contra *A. amazonense*. Para o alinhamento das sequências analisadas foi utilizado o programa ClustawX [Larkin, *et al.*, 2007]. Posteriormente, foi utilizado o programa BioEdit [Hall, 1999] para visualizar os motivos protéicos conservados em SalC e SalR. Para SalA e SalB foi construída a uma árvore filogenética pelo método de Neighbor-Joining de alguns membros da família 3 das glicosil-hidrolases por meio do programa Mega 5 [Tamura, *et al.*, 2011].

Curva de crescimento

Para a realização das curvas de crescimento foram utilizados três diferentes meios de cultivo. Um meio rico M79, já descrito anteriormente, o meio mínimo AMM (com sacarose como fonte de carbono em uma concentração de 0,03M, 2 g/L de K₂HPO₄, 6 g/L de KH₂PO₄, 0.2 g/L de MgCl₂.7H₂O, 0.1 g/L de NaCl, 0,026g/L de CaCl₂.2H₂O, 0,002g/L de Na₂MoO₄.2H₂O, 0,01g/L de FeCl₃, e 1 g/L de NH₄Cl ajustado para o pH 6) descrito por

Martinez-Drets [Martinez-Drets *et al.*, 1985], ou o meio mínimo AMM* (suplementado com salicina como fonte de carbono em uma concentração de 0,03M). Para a realização do experimento foi utilizado um pré-inoculo de *A. amazonense* se multiplicando em meio AMM* a fim de esgotar as fontes de carbono armazenadas pela bactéria. O experimento foi realizado em triplicata utilizando uma temperatura de 35°C e agitação de 200rpm. As leituras da absorbância a 600nm foram realizadas a partir de 11 horas de cultivo em intervalos de 1 hora.

Sequências de Nucleotídeos

As sequências de nucleotídeos utilizadas neste trabalho estão disponíveis no GenBank e são listadas no Anexo 1.

Resultados e Discussão

Organização do sistema *salRCBA*

No sequenciamento do genoma de *Azospirillum amazonense* foi identificado a presença dos genes *salA* e *salB* que codificam β -glicosidasas que hidrolisam salicina [Sant'Anna, *et al.*, 2011]. Estes genes estão organizados no sistema denominado *salRCBA* formado por quatro genes (Fig. 1). Este sistema de metabolização é similar ao descrito em *A. irakense* [Sommers, *et al.* 2010]. Os genes *salA*, *salB* e *salC* têm suas *orf* dispostas em uma única unidade de transcrição, formando o *operonCBA*, enquanto a *orf* do gene *salR* está organizada na direção oposta indicando uma transcrição divergente.

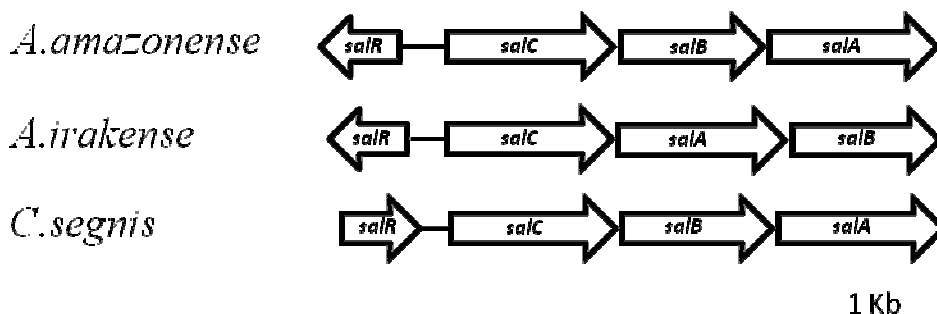


Figura 1- Comparação da organização dos genes do sistema *salRCBA* nas bactérias *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum irakense* e *Caulobacter segnis*. As setas indicam o sentido de transcrição.

A organização do sistema *salRCBA* de *A. amazonense* se mostrou conservada entre as espécies analisadas. Este sistema está organizado em duas unidades de transcrição, uma formada pelo gene *salR* e outra em sentido oposto composta pelos genes *salC*, *salB* e *salA* formando o operon *salCBA*. Esta distribuição destes genes possui diferença entre as espécies estudadas. Em *A. amazonense* o gene *salB* está localizado anteriormente ao gene *salA* assim como ocorre em *Caulobacter segnis*, divergindo da organização encontrada em *Azospirillum irakense*. Já o gene *salR* está disposto no sentido oposto do operon *salCBA* em *A. amazonense* e *A. irakensei*, enquanto que em *C. segnis* o gene *salR* tem seu sentido invertido. No entanto, estas diferenças de organização gênica muito possivelmente não são significativas para alterar a função deste sistema.

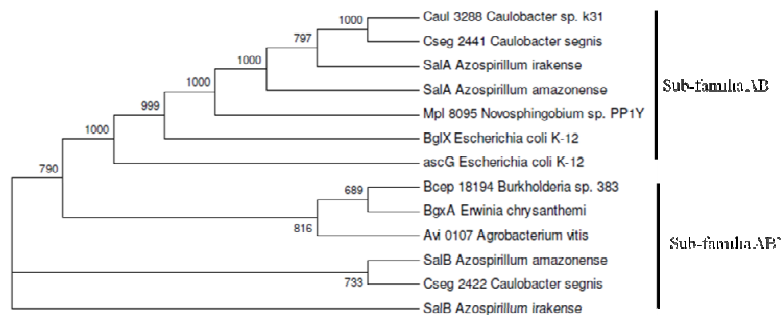
Os microorganismos do gênero *Azospirillum* apresentam diferenças quanto às fontes de carbono que podem utilizar. A presença dos genes para utilização da salicina no gênero *Azospirillum* foi observada em *A. amazonense* e *A. irakense*, mas não nas outras espécies do gênero que já tem seu genoma sequenciado como, *Azospirillum basilense* e *Azospirillum sp. B510*. Estas diferenças que ocorrem quanto as fontes de carbono utilizadas por cada bactéria podem ser um reflexo do distanciamento evolutivo que elas apresentam, já que pela análise da região 16SrDNA [Sant'Anna, *et al.*, 2011] foi demonstrado que *A. amazonense* e *A. irakense* tem uma relação evolutiva mais próxima.

Análise de sequências e proteínas

Baseado na sequência de aminoácidos as β -glicosidases SalA e SalB foram classificadas na família 3 das glicosil-hidrolases. Todas as β -glicosidases desta família são compostas por dois domínios, um domínio catalítico A e um domínio não-catalítico B. De acordo com a composição destes domínios esta família pode ser dividida em duas subfamílias, AB e AB'. A maior parte das β -glicosidases faz parte da subfamília AB em que sua estrutura é formada por um domínio catalítico N-terminal (domínio A) e um domínio C-terminal (domínio B), sendo considerada a estrutura usual desta família. Em contraste, a organização da subfamília AB' é incomum, uma vez que apresenta o domínio B mais curto devido a sua região C-terminal ser truncada. Para classificar as duas β -glicosidases de *A. amazonense* foi construída uma árvore filogenética com os membros desta família (Fig. 2). Esta filogenia permite diferenciar claramente as duas subfamílias. SalA de *A. amazonense* pertence a subfamília AB juntamente com SalA de *A. irakense* e BglX de *E. coli K12*. No entanto, SalB de *A. amazonense* esta

inserida na subfamília AB', grupo que tem SalB de *A. irakense* e BglX de *E. chrysanthemi* como modelos.

Figura 2- Árvore filogenética de vários membros da família 3 das glicosil-hidrolases. A árvore foi construída utilizando o método de neighbor-joining. As β -glicosidases foram divididas nas subfamílias AB e AB'.



Por esta análise filogenética podemos verificar que SalA possui uma maior relação evolutiva com β -glicosidase de *A. irakense*, enquanto que SalB possui uma menor distância evolutiva com a *orf Cseg_2422* de *Caulobacter segnis*. Também é interessante verificar que a relação filogenética entre as β -glicosidases é maior dentro da subfamília AB', sugerindo que a sequência de aminoácidos é mais conservada dentro deste grupo. Em conclusão, a análise dos aminoácidos das duas β -glicosidases indicam que os dois genes adjacentes *salB* e *salA* codificam glicosil-transferases da família AB' e AB respectivamente.

SalC foi classificada por meio da sua sequência de aminoácidos na família FepA/PhuA de receptores de membrana externa (OMR). Esta família de receptores está envolvida com o transporte de várias moléculas, como sideróforos e vitamina B12. SalC, assim como todos os membros desta família, apresenta uma região de interação com proteínas TonB altamente conservada denominada TonB-box (Fig. 3). Além disso, a região C-terminal de SalC possui características de proteínas de membrana externa. O alinhamento das proteínas SalC de *A. amazonense*, *A. irakense* e *C. segnis* mostrou alto grau de conservação entre estas espécies (Fig. 3). Estas características de SalC sugerem que ela esteja envolvida num sistema para a captação da salicina em bactérias.

A proteína SalR apresentou altos níveis de similaridade com membros da família LacI/GalR de repressores transcricionais. Esta família de repressores transcricionais requer a presença de moléculas efetoras para modular a sua atividade de regulação negativa. Na ausência da molécula efetora membros da família LacI/GalR se ligam a sequências operadora

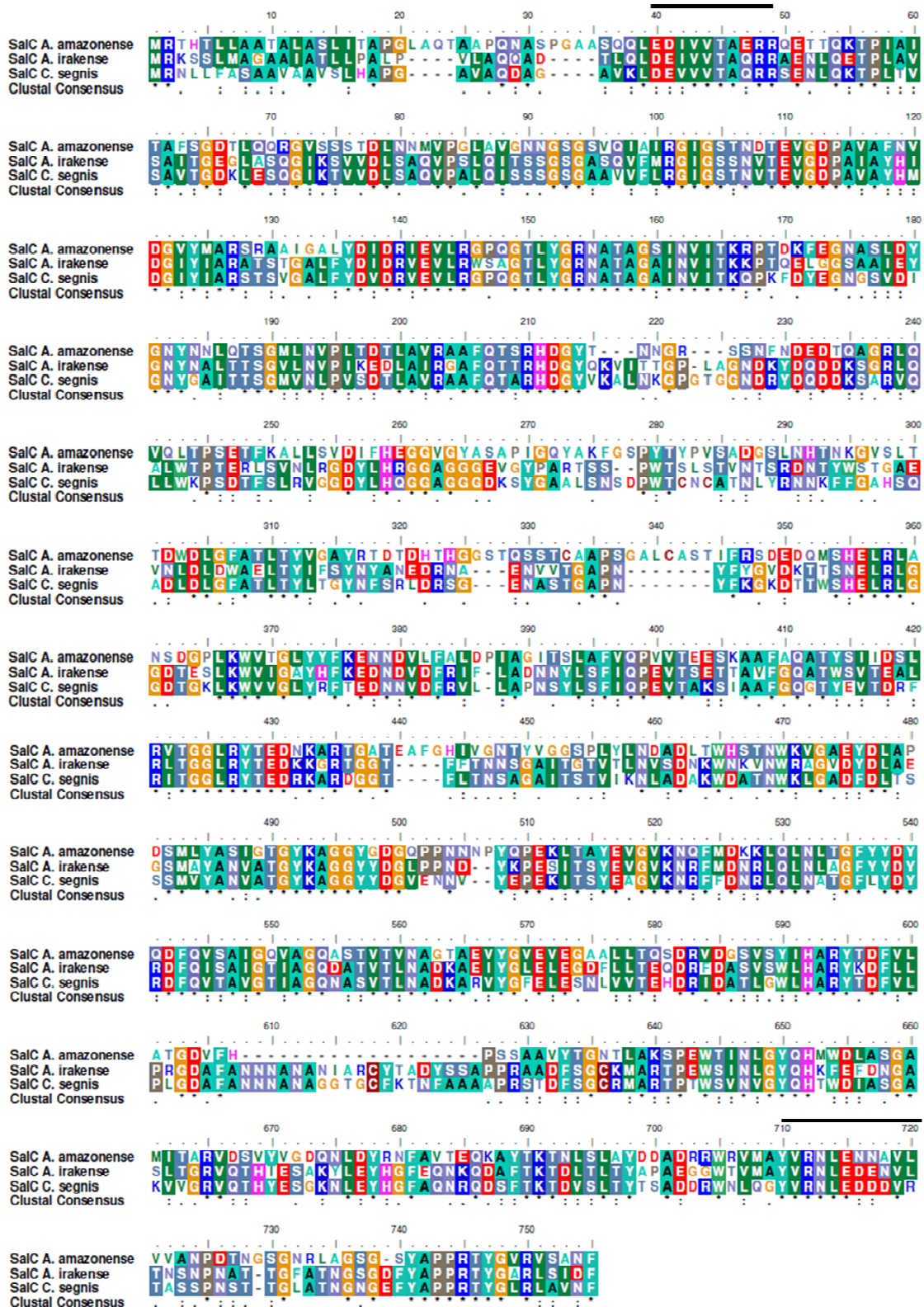


Figura 3- Alinhamento de proteínas SalC de *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum irakense* e *Caulobacter segnis*. Os pontos marcados com (*) representam resíduos de aminoácidos conservados em todas as proteínas. A região N-terminal marcada representa o sítio de ligação a proteínas TonB. Na região C-terminal esta marcada a região conservada característica da família de receptores de membrana externa (OMR).

reprimindo a transcrição. Quando o efetor se liga a porção N-terminal do repressor ele libera o operador permitindo então a transcrição do gene por ele regulado. O alinhamento das seqüências de aminoácidos de proteínas SalR já descritas mostrou uma similaridade particularmente evidente na região N-terminal que contém um motivo hélice-volta-hélice que é responsável por se ligar ao DNA e reprimir a transcrição dos genes *salCBA* (Fig 4).

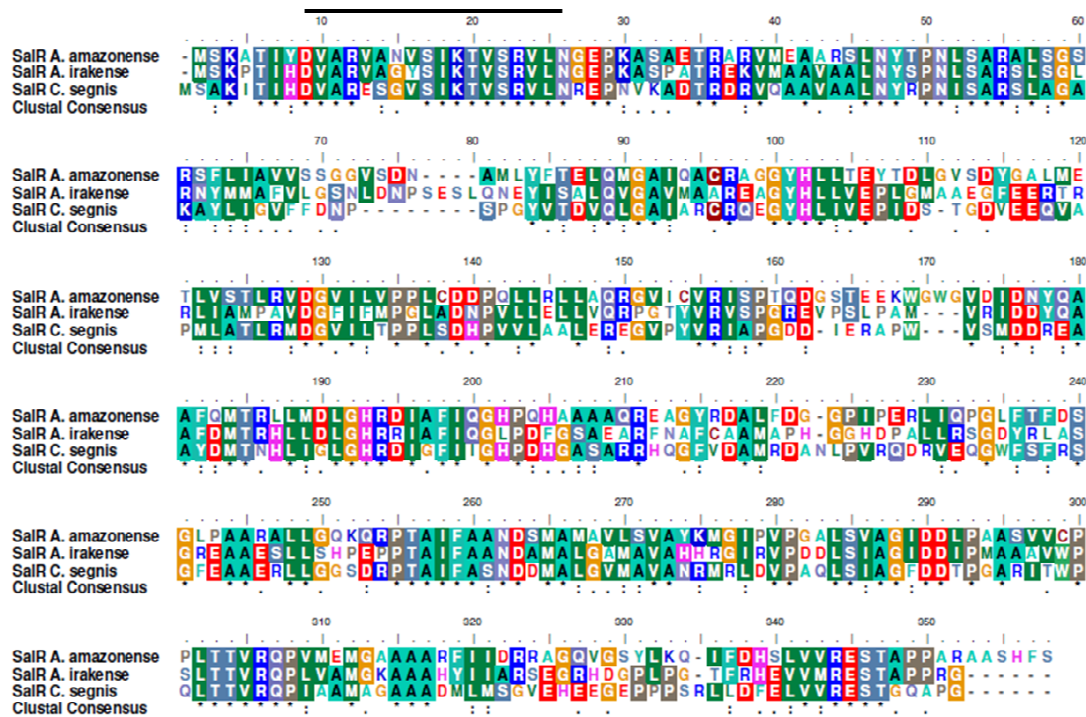


Figura 4- Alinhamento de proteínas SalR de *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum irakense* e *Caulobacter segnis*. Os pontos marcados com (*) representam resíduos de aminoácidos conservados em todos os aminoácidos. A região N-terminal sublinhada contém o motivo hélice-volta-hélice responsável por se ligar ao DNA.

A análise do sistema de metabolização de salicina *salRCBA* presente em *A. amazonense* apresentou um alto grau de conservação com o sistema encontrado em *A. irakense* e *C. segnis*, apesar da inversão na ordem de *sala* e *salB* no genoma. O modelo de assimilação de salicina para este sistema foi descrito por Faure e colaboradores [Faure et al., 2001]. Na ausência de salicina no ambiente o regulador SalR vai atuar sobre o operon *salCAB* impedindo que estes genes sejam transcritos. Ocorrendo a presença de salicina no meio extracelular, esta vai se ligar ao seu receptor específico e sinalizar essa informação para a membrana interna da bactéria, resultando na inativação do repressor SalR e permitindo a ativação do operon *salCAB*. Existem evidências sugerindo que a transdução deste sinal seja feita por SalC. Após a ativação do operon, o receptor SalC deve transportar a salicina para dentro do espaço periplasmático onde então poderia ser clivada pelas β -glicosidases SalA e SalB em seus

constituintes aglicona e glicose. Posteriormente, a glicose pode ser importada para o citoplasma através de um transportador da família PTS-Glc e servir com fonte de carbono para a bactéria.

Curva de crescimento

A presença de atividade de β -glicosidase em *A. amazonense* foi comprovada pelo crescimento da bactéria em meio de cultivo contendo salicina como fonte de carbono. Para comparar o crescimento de *A. amazonense* em salicina com o crescimento em sacarose, principal fonte de carbono nesta espécie, foi realizada uma curva de crescimento em três meios diferentes: em meio de cultivo rico com sacarose como fonte de carbono (M79) e em outros dois meios mínimos suplementados com sacarose (AMM) ou salicina (AMM*) como descrito nos métodos. Para a realização do experimento foi realizado o esgotamento das fontes de carbono armazenadas pela bactéria através da multiplicação da bactéria em meio AMM*. Como esperado, *A. amazonense* apresentou uma melhor multiplicação (definida por DO) no meio rico, já que oferece em concentração ideal todos os nutrientes requeridos pela bactéria. Nos meios mínimos suplementados com salicina ou sacarose o início do desenvolvimento bacteriano ocorreu de forma mais lenta. O crescimento em salicina foi ligeiramente superior ao verificado em meio mínimo com sacarose (Fig.5). Este melhor desempenho em meio mínimo com salicina pode ser explicado pelo estresse que a bactéria passou para se readaptar a utilizar sacarose após o pré-inoculo em AMM*.

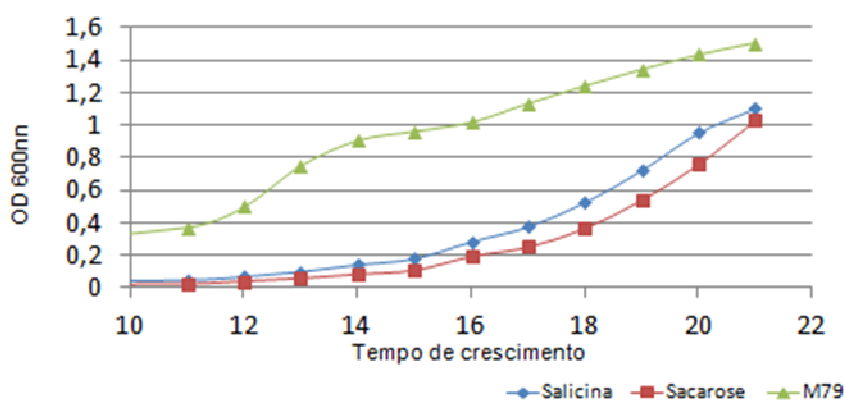


Figura 5. Curva de crescimento de *A. amazonense* em meio rico M79 (triângulo verde), e em dois meios mínimos suplementados com diferentes fontes de carbono, AMM suplementado com sacarose (quadrado vermelho) ou AMM* suplementado com salicina (losango azul) e à 37 °C e 200rpm.

Neste trabalho foi caracterizado o sistema para metabolização da salicina *salRCBA* em *A. amazonense* e comprovado que a bactéria pode crescer em meio com salicina como fonte de carbono. Portanto, podemos indicar esta como mais uma diferença quanto ao metabolismo de carbono dentro do gênero *Azospirillum*. Dentro deste gênero somente *A. irakense* compartilha este sistema para assimilação da salicina, não sendo encontrado nas outras espécies, como *Azospirillum spB510* e *Azospirillum brasilense*. Este resultado demonstra uma maior aproximação filogenética entre *A. amazonense* e *A. irakense* suportando os resultados demonstrados por Sant'Anna e colaboradores [Sant'Anna *et al.*, 2011].

Referencias artigo

Almeida LG, Paixão R, Souza RC, Costa GC, Barrientos FJ, Santos MT, Almeida DF, Vasconcelos AT. A System for Automated Bacterial (genome) Integrated Annotation-SABIA. *Bioinformatics*. 2004, 20:2832-28333.

Faure D, Desair J, Keijers V, Bekri MA, Proost P, Henrissat B, Vanderleyden J: Growth of *azospirillum irakense kbc1* on the aryl beta-glucoside salicin requires either *sala* or *salb*. *J Bacteriol* 1999;181:3003-3009.

Faure D, Saier MH, Vanderleyden J: An evolutionary alternative system for aryl beta-glucosides assimilation in bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001;3:467-470.

Fred EBW, S. A.: Laboratory manual of general microbiology with special reference to de microorganisms of soil. New York, McGraw-Hill Book Company, Inc., 1928.

Hall T: Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt; in., *Nucleic acids symposium series*, 1999, vol 41, pp 95-98.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG: Clustal w and clustal x version 2.0. *Bioinformatics* 2007;23:2947-2948.

Lavrinenko K, Chernousova E, Gridneva E, Dubinina G, Akimov V, Kuever J, Lysenko A, Grabovich M: *Azospirillum thiophilum* sp. Nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010;60:2832-2837.

Magalhães FM, Baldani JJ, Souto SM, Kuykendall JR, Dobereiner J: A new acid-tolerant *azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 1983;55:417-430.

Martínez-Drets G, Fabiano E, Cardona A: Carbohydrate catabolism in *azospirillum amazonense*. *Appl Environ Microbiol* 1985;50:183-185.

Reynolds AE, Felton J, Wright A: Insertion of *dna* activates the cryptic *bgl* operon in *e. coli* k12. *Nature* 1981;293:625-629.

Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA and Barrell B. *Artemis*: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 2000;16:944-945

Sant'Anna FH, Almeida LG, Cecagno R, Reolon LA, Siqueira FM, Machado MR, Vasconcelos AT, Schrank IS: Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *azospirillum amazonense*. *BMC Genomics* 2011;12:409.

Somers E, Keijers V, Ptacek D, Halvorsen Ottoy M, Srinivasan M, Vanderleyden J, Faure D: The *salcab* operon of *azospirillum irakense*, required for growth on salicin, is repressed by *salr*, a transcriptional regulator that belongs to the *lacl/galr* family. *Mol Gen Genet* 2000;263:1038-1046.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: *Mega5*: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731-2739.

4. Conclusão Geral

Neste trabalho foi possível demonstrar a organização dos genes relacionados ao metabolismo de salicina em *A. amazonense* assim como a capacidade desta bactéria em utilizar salicina como fonte de carbono para seu desenvolvimento. A análise do sistema *salRCBA* de *A. amazonense* apresentou um alto grau de conservação com o sistema presente em *A. irakense* e *C. segnis*.

Em *Azospirillum amazonense* sistema responsável pela metabolização da salicina estão organizados no sistema denominado *salRCBA*. Os genes *salA*, *salB* e *salC* tem suas *orf* dispostas na mesma orientação formando uma única unidade de transcrição, enquanto a *orf* do gene *salR* está disposta na direção oposta indicando uma transcrição divergente.

Os genes relacionados a este sistema codificam respectivamente:

- O repressor transcricional SalR da família LacI/GalR, que se liga a sequência operadora do *operon salCBA*, impedindo que estes genes sejam transcritos;
- O receptor de membrana externa SalC da família FepA/PhuA que tem como função o transporte da molécula de salicina através da membrana externa de bactérias;
- E as β -glicosidases SalB e SalA pertencentes a família 3 das glicosil hidrolases. Estas são divididas em duas subfamílias, sendo SalA pertence a subfamília AB e SalB esta inserida na subfamília AB' por possuir sua região C-terminal truncada.

A presença de crescimento de *A. amazonense* em meio de cultivo contendo salicina como fonte de carbono sugere a presença de atividade de β -glicosidase nesta espécie. Este é mais uma dado que comprova o versátil metabolismo de carbono apresentado pelo gênero *Azospirillum*. Dentro deste gênero somente *A. irakense* compartilha este sistema para assimilação da salicina, não sendo encontrado nas outras espécies, como *Azospirillum spB510* e *Azospirillum brasilense*. Isto vai de acordo com a maior aproximação filogenética entre *A. amazonense* e *A. irakense* mostrada por Sant'Anna e colaboradores [Sant'Anna *et al.*, 2011].

5. Referencias

Baldani JI, Baldani VL: History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the brazilian experience. *An Acad Bras Cienc* 2005;77:549-579.

Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE: Azospirillum-plant relationships: Physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol* 2004;50:521-577.

Bhatia Y, Mishra S, Bisaria VS: Microbial beta-glucosidases: Cloning, properties, and applications. *Crit Rev Biotechnol* 2002;22:375-407.

Brown GD, Thomson JA: Isolation and characterisation of an aryl-beta-d-glucoside uptake and utilisation system (abg) from the gram-positive ruminal clostridium species *C. Longisporum*. *Mol Gen Genet* 1998;257:213-218.

Döbereiner J: Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. *Soil Biology and Biochemistry* 1997;29:771-774.

Faure D, Desair J, Keijers V, Bekri MA, Proost P, Henrissat B, Vanderleyden J: Growth of azospirillum irakense kbc1 on the aryl beta-glucoside salicin requires either sala or salb. *J Bacteriol* 1999;181:3003-3009.

Faure D, Saier MH, Vanderleyden J: An evolutionary alternative system for aryl beta-glucosides assimilation in bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001;3:467-470.

Henrissat B, Bairoch A: Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J* 1996;316 (Pt 2):695-696.

Lavrinenko K, Chernousova E, Gridneva E, Dubinina G, Akimov V, Kuever J, Lysenko A, Grabovich M: Azospirillum thiophilum sp. Nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010;60:2832-2837.

Magalhães FM, Baldani JI, Souto SM, Kuykendall JR, Dobereiner J: A new acid-tolerant azospirillum species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 1983;55:417-430.

Reynolds AE, Felton J, Wright A: Insertion of dna activates the cryptic bgl operon in *E. coli* k12. *Nature* 1981;293:625-629.

Sant'Anna FH, Almeida LG, Cecagno R, Reolon LA, Siqueira FM, Machado MR, Vasconcelos AT, Schrank IS: Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium azospirillum amazonense. *BMC Genomics* 2011;12:409.

Somers E, Keijers V, Ptacek D, Halvorsen Ottoy M, Srinivasan M, Vanderleyden J, Faure D: The salcab operon of azospirillum irakense, required for growth on salicin, is

repressed by salr, a transcriptional regulator that belongs to the lacI/galr family. Mol Gen Genet 2000;263:1038-1046.

6. Anexo 1

Proteína	Organismo	Número de acesso
SalA	<i>Azospirillum amazonense</i>	ZP_08868306
SalA	<i>Azospirillum irakense</i>	AAF21798
Cseg 2421	<i>Caulobacter segnis</i>	YP_003593514
Caul 3288	<i>Caulobacter sp. K31</i>	YP_001684913
Mpl 8095	<i>Novosphingobium sp. PP1Y</i>	YP_004538639
BglX	<i>Escherichia coli K-11</i>	NP_416636
AscG	<i>Escherichia coli K-12</i>	AP_003281.1
SalB	<i>Azospirillum amazonense</i>	ZP_08868305
SalB	<i>Azospirillum irakense</i>	AAF21799
Cseg 2422	<i>Caulobacter segnis</i>	YP_003593515
Bcep 18194	<i>Burkholderia sp. 383</i>	YP_366403
Avi_0107	<i>Agrobacterium vitis S4</i>	YP_002548060
BgxA	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Q46684
SalC	<i>Azospirillum amazonense</i>	ZP_08868304
SalC	<i>Azospirillum irakense</i>	AAF66621
SalC	<i>Caulobacter segnis</i>	YP_003593516
SalR	<i>Azospirillum amazonense</i>	ZP_08868303
SalR	<i>Azospirillum irakense</i>	AAF66688
SalR	<i>Caulobacter segnis</i>	YP_003592489

Tabela 1. Lista de proteínas utilizadas neste trabalho e seus respectivo número de acesso no GenBank.