



Papel da glutatona reduzida (GSH) na resistência de *G. diazotrophicus*, através da reversão de fenótipo sensibilidade nos mutantes $\Delta gshB$ e Δggt

Kariny Marley de Castro Martins, Julia Rosa Moreira, Gonçalo Apolinário de Souza Filho

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria endofítica, promotora do crescimento vegetal capaz de colonizar espécies vegetais economicamente relevantes. O sucesso da colonização depende da sua capacidade de resistência a estresses ambientais. Através de mutagênese reversa em *G. diazotrophicus* foi constatado que os genes de biossíntese (*glutathione sintetase - gshB*) e degradação (*gamma-glutamyl-transferase - ggt*) de glutatona (GSH) são essenciais na resistência da bactéria a espécies reativas a oxigênio (ROS) e a metais pesados. A glutatona encontra-se em altas concentrações na célula bacteriana, e é a principal proteção contra estresse oxidativo, pois remove metabólitos da célula através da sua conjugação com formas reativas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da glutatona na resistência de *G. diazotrophicus* através da reversão de fenótipo dos mutantes *gshB* e *ggt* pela adição de GSH exógena. Para tanto, a estirpe selvagem e os mutantes $\Delta gshB$ e Δggt foram crescidos em meio líquido LGI-m sob agitação constante (250 rpm e 30 °C) até a DO_{600nm} 1,0 (1×10^8 UFC/mL⁻¹). Em seguida, 10 mL de cada cultura bacteriana, foi inoculada em placas de Petri contendo meio LGI-m sólido sem (controle), com a suplementação de CdCl₂ (0,03 mM); CoCl₂ (3 mM), ZnCl₂ (1,5 mM) e com adição destes agentes tóxicos mais 200uL de solução de GSH a 150mM. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por 72 horas. Para avaliar a sensibilidade das estirpes, foi feito o registro fotográfico das placas. Em seguida, as imagens foram processadas no Software ImageJ, para a quantificação do crescimento das colônias. Os resultados mostraram que o mutante $\Delta gshB$ apresentou resistência aos estresses provocados pelos metais tóxicos. O mutante Δggt foi sensível em 60% em cobalto e seu fenótipo foi revertido em 100% quando acrescido GSH ao meio; Em zinco, Δggt teve seu crescimento afetado em 90%, obtendo 97% de reversão no tratamento com GSH; E, em cádmio, o mutante foi afetado em 67%, o qual foi recuperado em 100% com a adição de GSH. A maior resistência de $\Delta gshB$ pode ser derivada da proteína intermediária, gamma-glutamyl-cisteína, presente nesse mutante, da via de síntese da glutatona que é capaz de proteger a célula contra o estresse provocado pelos metais tóxicos. O *ggt* é responsável por recuperar e reciclar a glutatona oxidada exsudada para o interior celular, promovendo uma fonte adicional de glutatona que reage novamente com as EROs protegendo a célula. A reversão do fenótipo do mutante *ggt* ter ocorrido com adição de GSH evidencia que a glutatona está diretamente envolvida na resistência de *G. diazotrophicus* quando exposta ao estresse por cobalto, cádmio e zinco.

Instituição do Programa de IC, IT ou PG: Iniciação científica
Fomento da bolsa (quando aplicável): Faperj