

MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA A COBALTO NA
BACTÉRIA *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15

VÍVIAN RIBEIRO PIMENTEL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO – 2023

MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA A COBALTO NA
BACTÉRIA *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15

VÍVIAN RIBEIRO PIMENTEL

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia Vegetal.”

Orientador: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

P644 Pimentel, Vívian Ribeiro.

Mecanismos moleculares envolvidos na resposta a cobalto na bactéria *Guconacetobacter diazotrophicus* PA15 / Vívian Ribeiro Pimentel. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

97 f. : il.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2023.

Orientador: Goncalo Apolinario de Souza Filho.

1. contaminação ambiental; . 2. resistência a metais; . 3. cobalto; . 4. bactérias promotoras do crescimento vegetal; . 5. sistemas de efluxo. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA A COBALTO NA
BACTÉRIA *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15

VÍVIAN RIBEIRO PIMENTEL

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia Vegetal.”

Situação:



Dr. Fábio Lopes Olivares (D.Sc., Agronomia) - UENF



Dr. Vanildo Silveira (D. Sc., Biotecnologia) - UENF



Dra. Mariana Ramos Leandro (D.Sc., Biotecnologia Vegetal) – Symbiomics



Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho (D.Sc., Biociências-Bioquímica) – UENF
(Orientador)



*Ao meu esposo, William,
meus pais, Roseli e Ronaldo e,
meu irmão Guilherme, dedico.*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe por todo esforço, amizade, conselhos e apoio durante minha jornada, tonando possível cada degrau que alcancei.

Ao meu padrasto por assumir a gigante responsabilidade de me criar e por sempre me receber com extrema alegria.

Ao meu esposo William por todo apoio necessário, emocional e nos bastidores, pela paciência da convivência, companheirismo e carinho.

Ao meu irmão por emprestar seus ouvidos, pelo seu carinho, sua paciência e por se manter próximo mesmo com nossa distância.

À minha avó, Bárbara, por suas orações todos esses anos, sua amizade nas minhas visitas e pela força que me deu na semana de minha qualificação.

Ao meu orientador, professor Gonçalo, pela excelente oportunidade de ser parte da família LBT, pela orientação e por toda compreensão, colaboração e parceria desses anos.

À Tamires, Katherine, Sávio, Frederico e Amanda, pela recepção e apoio na cidade, tornando minha chegada menos solitária.

Aos colegas de bancada, Tamires, Mariana, Júlia, Fabiano, Barbarah, Clara, Danielle, Patrícia, Rafael, Walaci, Daniel, Renato, Kariny e Ana Luiza, pelo companheirismo e amizade. Obrigado por sermos uma equipe de verdade, pelos momentos compartilhados, trocas de conhecimento, apoio emocional. Agradeço especialmente a Mariana, Júlia e Fabiano por todo suporte de pesquisa e de bancada, vocês são pessoas incríveis e colegas de trabalho de alto padrão.

Ao professor Vanildo Silveira e aos membros valiosos de sua equipe, Felipe, Ricardo e Vitor, pelo aprendizado, colaboração e momentos de descontração.

À nossa técnica Telma, por toda sua dedicação e trabalho excelente que nos dá condições de realizarmos nossas pesquisas.

À Dona Carla, pelos conselhos, amizade, risadas e suporte.

Aos membros da minha banca de defesa de doutorado pelas valiosas contribuições e conhecimento.

À atual Coordenadora do Programa de Biotecnologia Vegetal Claudete Santa-Catarina por todo apoio, colaboração e compreensão para que essa etapa seja concluída.

Aos ex-coordenadores, professores Gonçalo Apolinário de Souza Filho, Thiago Venâncio e Fábio Olivares, por todo apoio e consideração em todas as etapas do doutorado.

À secretária do Programa, Margareth Paes, excelente no desempenho das suas funções, dedicação e pela parceria, sendo uma ponte entre os alunos e a coordenação.

À UENF e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, pela estrutura, pelo apoio e pela oportunidade de realização deste curso.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pelos ensinamentos.

A UENF, FAPERJ, CNPq, Capes, Finep e INCT pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho e para o meu desenvolvimento profissional.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Revisão de literatura	3
1.1.2. Aspectos gerais dos metais pesados	3
1.1.3. Fontes de contaminação por metais pesados	3
1.1.4. Toxicidade dos metais e resistência em bactérias	5
1.1.5. Cobalto	8
1.1.6. Aplicações do Co.....	8
1.1.7. Demanda global.....	9
1.1.8. Cobalto: toxicidade e resistência em bactérias	10
1.1.9. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	11
1.1.10. Promoção do Crescimento Vegetal	12
1.1.11. Resposta a estresses abióticos.....	13
2.1. Resumo	17
2.2. Abstract.....	18
2.3. Introdução	19
2.4. Material e métodos	21
2.4.1. Cepas bacterianas, meio e condições de cultivo	21
2.4.2. Ensaio de estresse por cobalto	21
2.4.3. Análise de microscopia.....	22
2.4.4. Extração de proteínas.....	22
2.4.5. Digestão de proteínas e análise por espectrometria de massas.....	22
2.4.6. Análise de dados da proteômica	22
2.4.7. Análise de genética reversa	23
2.5. Resultados.....	24
2.5.1. O crescimento de <i>G. diazotrophicus</i> é inibido por Co	24
2.5.2. O Co causa alterações no perfil proteômico de <i>G. diazotrophicus</i>	26
2.5.3. Proteínas extracitoplasmáticas são reduzidas sob estresse de cobalto	26
2.5.4. Vias funcionais reguladas em <i>G. diazotrophicus</i> em resposta ao Co	27
2.5.4.2. Metabolismo de carboidratos.....	29
2.5.4.3. Metabolismo de aminoácidos	29
2.5.4.4. Controle de qualidade de proteínas	30
2.5.4.5. Efluxo de compostos tóxicos.....	30
2.5.5. Análise de genética reversa revela proteínas essenciais na resistência ao estresse por Co	32

3. Discussão.....	34
4. Referências.....	40
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
6. MATERIAL SUPLEMENTAR	51

RESUMO

A poluição por metais pesados é uma das maiores preocupações ambientais em todo o mundo. O acúmulo de metais no ambiente pode representar sérias ameaças aos organismos vivos por serem tóxicos em altas concentrações. Para sobreviver em condições adversas as bactérias desenvolveram vários mecanismos que auxiliam na tolerância e resistência ao excesso de metais. A compreensão desses processos é relevante para sua aplicação biotecnológica. *Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria promotora do crescimento vegetal resistente a diversos estresses ambientais. No entanto, os mecanismos moleculares relacionados à resistência a metais pesados em bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) precisam ser melhor elucidados. Assim, no capítulo 1 o presente trabalho aborda os aspectos gerais dos metais pesados, com ênfase ao cobalto, a toxicidade e as respostas das bactérias ao seu excesso. Adicionalmente, investigamos os mecanismos de resposta/resistência a cobalto da BPCV *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Para isso, o agente estressor cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foi utilizado na avaliação das respostas celulares de *G. diazotrophicus* por meio de viabilidade celular, proteômica comparativa e mutagênese. A proteômica comparativa foi utilizada para investigar as principais vias funcionais reguladas em *G. diazotrophicus* na presença de 2,5 mM de CoCl_2 . Dentre as 144 proteínas reguladas, as principais vias identificadas foram de absorção de nutrientes, sistema de efluxo, metabolismo de Fe-S, metabolismo de carboidratos, metabolismo de aminoácidos e o controle de qualidade de proteínas. A proteína extracitoplasmática CzcC, do efluxo de metais na membrana externa, foi a única proteína aumentada nesse compartimento e regulada apenas na presença de Co. O papel dessas vias na resposta da bactéria ao Co foi investigado por genética reversa e revelou que o nocaute *czcC* do sistema de efluxo tornou-se extremamente sensível quando o meio foi suplementado com Co. Adicionalmente, *argH* e *zwf* mostraram aumento da sensibilidade conforme a concentração de Co no meio aumentou, indicando a importância do metabolismo de arginina e da via da pentose fosfato na proteção ao excesso de Co. Juntos nossos dados contribuem para a compreensão dos mecanismos de resistência a Co em *G. diazotrophicus*.

Palavras-chave: contaminação ambiental; resistência a metais; cobalto; bactérias promotoras do crescimento vegetal; sistemas de efluxo

ABSTRACT

Heavy metal pollution is one of the biggest environmental concerns around the world. Metals accumulation in the environment can pose serious threats to living organisms because they are toxic in high concentrations. To survive in adverse conditions, bacteria have developed several mechanisms that help in tolerance and resistance to excess metals. Understanding these processes is relevant to their biotechnological application. *Gluconacetobacter diazotrophicus* is a plant growth-promoting bacterium resistant to various environmental stresses. However, the molecular mechanisms related to resistance to heavy metals in plant growth promoting bacteria (PGPB) need to be better elucidated. Thus, in chapter 1, the present work addresses the general aspects of heavy metals, with emphasis on cobalt, toxicity and bacterial responses to its excess. Additionally, we investigated the cobalt response/resistance mechanisms of PGPB *G. diazotrophicus*. For this, the stressor agent cobalt ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) was used in the evaluation of cellular responses of *G. diazotrophicus* through cell viability, comparative proteomics and mutagenesis. Comparative proteomics was used to investigate the main functional pathways regulated in *G. diazotrophicus* in the presence of 2.5 mM CoCl_2 . Among the 144 regulated proteins, the main pathways identified were nutrient absorption, efflux system, Fe-S metabolism, carbohydrate metabolism, amino acid metabolism and protein quality control. The extracytoplasmic protein CzcC, from the efflux of metals in the outer membrane, was the only protein increased in this compartment and regulated only in the presence of Co. The role of these pathways in the bacterial response to Co was investigated by reverse genetics and revealed that the *czcC* knockout of the efflux system became extremely sensitive when the medium was supplemented with Co. Additionally, *argH* and *zwf* showed increased sensitivity as the Co concentration in the medium increased, indicating the importance of arginine metabolism and the pentose phosphate pathway in protecting Co excess. Together our data contribute to the understanding of mechanisms of resistance to Co in *G. diazotrophicus*.

Keywords: environmental contamination; resistance to metals; cobalt; plant growth promoting bacteria; efflux systems

1. INTRODUÇÃO

A disposição de efluentes industriais contendo metais e seu acúmulo no ambiente são uma ameaça grave a vida de plantas, animais, humanos e microrganismos (He et al., 2015). A contaminação dos solos tem se intensificado pelas atividades industriais de mineração, refino, manufaturas, fabricação e descarte de eletrônicos, uso inadequado de fertilizantes e defensivos químicos (Tirry et al., 2018). Metais pesados (MPs) desenvolvem papéis celulares essenciais quando em baixas concentrações, porém se tornam tóxicos em altas concentrações (Nanda et al., 2019).

O Co é um metal estratégico com muitas aplicações industriais (Heider, 2018). A demanda global de cobalto aumentou surpreendentemente desde o ano 2000, passando de 34 kt para 159 kt em 2021, com estimativa que até 2030 ultrapasse 320 kt (H. Fisher, 2022). O acúmulo de Co, proveniente de suas diversas atividades econômicas, causam efeitos nocivos nas bactérias. O Co pode se ligar a sítios ativos de outros metais, competindo com Fe e Ni e inativar numerosas proteínas levando a formação de EROs (Ranquet et al., 2007). Sua alta afinidade por grupos tiol rompe pontes dissulfeto em proteínas, reduz o pool de tiol livre e pode interferir na assimilação do enxofre causando danos generalizados nas células (Barras & Fontecave, 2011). Adicionalmente, o Co pode inativar a atividade de aglomerados de Fe-S que se mostraram essenciais para a resposta de *E. coli* ao excesso de Co (Ranquet et al., 2007).

Para evitar o acúmulo e intoxicação intracelular por MPs, os microrganismos desenvolveram várias respostas adaptativas para manter a homeostase (Nies, 1999). Dentre as respostas é comum observar o controle dos processos de transporte de nutrientes, tráfego intracelular de metais, efluxo do excesso de metais e conservação das proteínas na célula. Esses sistemas garantem a biodisponibilidade dos metais aos processos celulares e previnem danos aos componentes celulares (Ma et al., 2009).

Os MP's afetam a diversidade da comunidade microbiana do solo, os processos mediados por bactérias e a interação solo-bactéria e bactéria-planta (Mahey et al., 2020). O uso de biofertilizantes com inoculantes microbianos são uma alternativa promissora para reduzir a carga de aditivos químicos nos solos. Contudo, o potencial biotecnológico dos microrganismos é afetado pelas condições adversas encontradas no campo que podem influenciar na efetividade do bioinoculante (Ngalimat et al., 2021). Assim, estudar BPCV capazes de crescer em ambientes estressantes é essencial para o sucesso do uso de bioinoculantes em campo.

Gluconacetobacter diazotrophicus PA15 é uma BPCV endofítica, gram-negativa, reconhecida por sua capacidade de fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes e produção de fitohormônios (Cavalcante & Dobereiner, 1988; Reis & Teixeira, 2015). Além disso,

vários estudos demonstraram a resistência de *G. diazotrophicus* a estresses osmóticos e MP's (De Oliveira et al., 2016; Intorne et al., 2012; Leandro et al., 2020, Leandro et al., 2021a; Leandro et al., 2021b). A análise genômica revelou que *G. diazotrophicus* possui uma grande variedade de genes previstos como envolvidos na homeostase ou resistência a estresses abióticos (Bertalan et al., 2009). Embora as respostas bacterianas ao estresse por MP's tenham sido amplamente descritas, as respostas moleculares desta bactéria a Co ainda permanecem pouco compreendidas.

1.1 Revisão de literatura

1.1.2 Aspectos gerais dos metais pesados

Globalmente, mais de 5 milhões de pontos de poluição são contaminados por MP's e metalóides. Até 2015 esses pontos de contaminação levaram a um prejuízo econômico estimado em mais de US\$ 10 bilhões ao ano (He et al., 2015).

Os metais consistiam em elementos com densidade atômica superior a 5 g.cm^{-3} e número atômico acima de 20 (Prabhakaran et al., 2016). Os MP's podem ser definidos por vários critérios, incluindo densidade, peso atômico, número atômico, propriedades químicas e comportamento ácido de Lewis, no entanto, a densidade é o principal aspecto a ser considerado como característica definidora.

São três as principais classes de metais de acordo com seus papéis no sistema biológico: (i) os metais essenciais com papel biológico reconhecido (Na, Ca, K, Mn, Mg, Fe, Cu, Co, Mo, Ni e Zn), (ii) os metais tóxicos (Ag, Sn, Cd, Au, Ti, Hg, Pb, Al e metalóides Ge, Sb, As e Se) e (iii) os não essenciais, não tóxicos e sem efeitos biológicos (Rb, Sr e Cs) (Lou et al., 2011). Alguns dos metais essenciais como Na, Zn, K, Ca, Cu, Co, Mg, Mn e Fe em concentrações acima dos limites causam toxicidade nas células, mesmo desempenhando papéis biológicos importantes (Gadd, 2010). O acúmulo de metais nos solos acima dos níveis limite deve-se principalmente a atividades antropogênicas, incluindo mineração, fabricação de produtos químicos, agricultura, águas residuais hospitalares e lixo eletrônico (Prabhakaran et al., 2016).

1.1.3. Fontes de contaminação por metais pesados

As atividades de mineração ocorrem em quase todas as partes do mundo. Tais atividades geram rejeitos como subproduto da separação de minerais valiosos e compreendem em sua maioria rocha moída, água de processo e reagentes químicos (Owen et al., 2020). O setor de mineração produz bilhões de toneladas de rejeitos de mineração por ano, estima-se que só em 2010 14 bilhões de toneladas de rejeitos foram gerados (Jones; Boger, 2012).

Falhas nas barragens de rejeitos de mineração ocasionam o derramamento de milhares de metros cúbicos de rejeitos. Embora nem todas as tragédias relacionadas às falhas nas barragens tenham resultado em fatalidades, todas elas causaram grandes danos ambientais (Roche et al., 2017). Quando esse material contamina as bacias hidrográficas os danos se tornam muito mais intensos. O Brasil vivenciou duas grandes tragédias ambientais envolvendo barragens de mineração. O primeiro em 2015, é considerado o desastre industrial de

maior impacto ambiental da história do Brasil e o maior do mundo envolvendo barragens de rejeitos. O rompimento da Barragem de Fundão, no município de Mariana - MG, sob gestão da mineradora Samarco, descarregou 55 - 62 milhões de m³ de lama de rejeitos de minério de ferro diretamente na bacia hidrográfica do rio Doce, foram contabilizadas pelo menos 19 fatalidades. A lama da mina preencheu redes hidrológicas ao longo de 663,2 km do rio Doce através dos estados de Minas Gerais (MG) e Espírito Santo (ES) antes de atingir seu estuário, na cidade de Linhares (ES). Os impactos socioeconômicos e ambientes afetaram milhares de pessoas em 41 cidades da bacia do Rio Doce (Fernandes et al., 2016). O segundo desastre ocorreu no município de Brumadinho – MG em 2019, onde o rompimento da barragem da Vale mineradora liberou aproximadamente 12 milhões de metros cúbicos de rejeitos no rio Paraopeba e ocorreram mais de 244 fatalidades (Vergilio et al., 2020).

A contaminação dos solos por MP's é considerada um problema ambiental gravíssimo. Testes toxicológicos demonstraram os efeitos dos rejeitos no rio Paraopeba, em que a água e os sedimentos se mostraram tóxicos para diferentes níveis tróficos, desde algas a microcrustáceos e peixes. Os peixes expostos à água e aos sedimentos contendo minério de mina também acumularam metais no tecido muscular (Vergilio et al., 2020). Os metais são capazes de se infiltrar nos lençóis freáticos e na água superficial e afetar a produção agrícola, a saúde humana e a segurança alimentar (Prabhakaran et al., 2016).

A contaminação ambiental devido a disposição inadequada de resíduos sólidos é um problema global. Nos países em desenvolvimento os lixões, a queima a céu aberto e a má gestão dos lixiviados dos locais de disposição final são os principais problemas detectáveis. Entre os problemas ambientais que podem causar estão a poluição visual, emissão de gases de efeito estufa, vetores de doenças e a poluição de águas superficiais e subterrâneas. O chorume pode degradar a qualidade da água ao redor das áreas de disposição final e conter cádmio (Cd), chumbo (Pb), níquel (Ni), zinco (Zn), cobalto (Co), manganês (Mn) e cromo (Cr) (Ferronato & Torretta, 2019). Cabe ressaltar que a disposição inadequada dos resíduos sólidos do passado e do presente, continuam lançando no ambiente milhares de toneladas de resíduos contendo MP's. As iniciativas de logística reversa ainda não alcançam a totalidade da população nacional, o que é uma realidade e um problema, inerente a todos os países.

A disposição de efluentes industriais contendo metais em níveis tóxicos e seu acúmulo no ambiente são uma ameaça grave a vida de plantas, animais, humanos e microrganismos (He et al., 2015). A poluição dos solos tem se intensificado pelo uso de metais como Cr, Zn, Co, Cu, Cd e Pb em atividades industriais de mineração, refino, manufaturas, peças de eletrônicos, entre outros (Tirry et al., 2018). Os MP's também são usados em diferentes defensivos e fertilizantes químicos nas culturas. A irrigação com águas residuais e lodo de

esgoto, causam a contaminação de recursos hídricos e solos agrícolas por MP's (Akcil et al., 2015).

1.1.4. Toxicidade dos metais e resistência em bactérias

O acúmulo de metais no solo tem se acelerado muito pela utilização de diversos metais essenciais e tóxicos em atividades industriais. O uso desses metais em processos de mineração, refino, manufaturas, além da utilização em compostos de fertilizantes e defensivos químicos, sem o manejo adequado tem levado à sua acumulação nos ambientes terrestres o que resulta na degradação do solo/água e na degradação dos ecossistemas (Gadd, 2010).

Na agricultura, metais como (Ni, Fe, Zn, Mn e Co), quando em baixas concentrações tem papéis essenciais no crescimento e desenvolvimento das plantas, mas em concentrações altas podem levar a toxicidade (Mahey et al., 2020). Sumariamente o efeito tóxico desses metais nas plantas levam a redução do crescimento, cloroses, necroses, inibição de processos biológicos como, fotossíntese, transpiração e danos oxidativos nas células (Hassan et al., 2019; Jain et al., 2020; Lwalaba et al., 2017; Zahra et al., 2021). Embora haja grandes variações entre as diferentes espécies de plantas em termos de capacidade de acumulação de metais, a ingestão oral de alimentos contaminados tem se mostrado uma via importante para a transferência de MP's do ambiente para os humanos (Luo et al., 2011). Adicionalmente, os MP's também afetam a diversidade da comunidade microbiana do solo, os processos mediados por bactérias e a interação solo-bactéria e bactéria-planta (Mahey et al., 2020).

As bactérias também requerem metais para seus diferentes processos metabólicos, isso permite que cresçam mesmo na presença de metais (Nanda et al., 2019). Em alguns casos a intoxicação por metais resulta da inativação de enzimas expostas na superfície celular, que não são protegidas pelos mecanismos homeostáticos que controlam as concentrações intracelulares dos metais. Quando os mecanismos de resposta ao estresse falham as células sofrem intoxicação citosólica (Chandrangsu et al., 2017).

O primeiro compartimento celular a entrar em contato com os íons metálicos é a parede celular. Os diferentes grupos químicos da camada de peptidoglicanos de bactérias gram-positivas e gram-negativas determinam a capacidade de ligação dos MP's e seu acúmulo na parede. Desses grupos, as carboxilas são mais abundantes e fazem com que os cátions metálicos se liguem ativamente (Nanda et al., 2019). Adicionalmente, o excesso de metal causa toxicidade pela competição direta entre metais no ponto de importação ou absorção de nutrientes. O Zn pode se ligar ao PsaA, uma proteína que auxilia na absorção de Mn, levando a célula a uma situação limitante de Mn, o que torna a célula de *S. pneumoniae* hipersensível ao estresse oxidativo pela redução da atividade da MnSOD (McDevitt et al., 2011). Outra

maneira dos metais induzirem uma situação limitante de outros metais é através da sinalização de suficiência de transporte. Como a absorção de nutrientes é regulada de forma alostérica, ao se ligar aos transportadores específicos de outros metais ocorre uma sinalização inadequada de que ocorreu influxo suficiente do metal para a célula (Chandrangsu et al., 2017). Os íons metálicos podem inibir a respiração das bactérias. Metais como Zn^{2+} , Cd^{2+} e Co^{2+} , mesmo na ausência de transportadores, podem inibir a cadeia de transporte de elétrons. Evidências genéticas sugerem que em *E. coli* e *B. subtilis* o Zn em excesso inibe a citocromo oxidase da sua cadeia respiratória (Beard et al., 1995; Chandrangsu & Helmann, 2016).

Prabhakaran et al. (2016) citam cinco mecanismos envolvidos na toxicidade por MP, i) a substituição de metais nos sítios de ligação em biomoléculas, que leva à interrupção da função biológica da molécula-alvo; ii) redução-oxidação pela reação dos íons metálicos com grupos tiol, especificadamente a glutatona, que leva a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs); iii) reações do tipo Fenton, que produzem EROs e em excesso levam a célula a um estado de estresse oxidativo causando inúmeros danos às macromoléculas biológicas; iv) inibição dos processos de transporte de membrana, interrompendo a absorção de substratos essenciais ao funcionamento celular e v) prejuízo ao funcionamento da cadeia respiratória.

Apesar da toxicidade do metal ser influenciada pelas características físico-químicas do ambiente, da espécie metálica e da espécie bacteriana, algumas tendências de resposta são evidentes (Gadd, 2010). Uma vez que os metais não podem ser degradados ou detoxificados como outros componentes tóxicos, as bactérias desenvolveram diversos mecanismos para manter a homeostase celular (Nanda et al., 2019). Alguns desses mecanismos são bombas de efluxo para exportar o excesso de metais, formação de complexos, reações redox e sequestro intra e extracelular (Chandrangsu et al., 2017) (Figura 2).

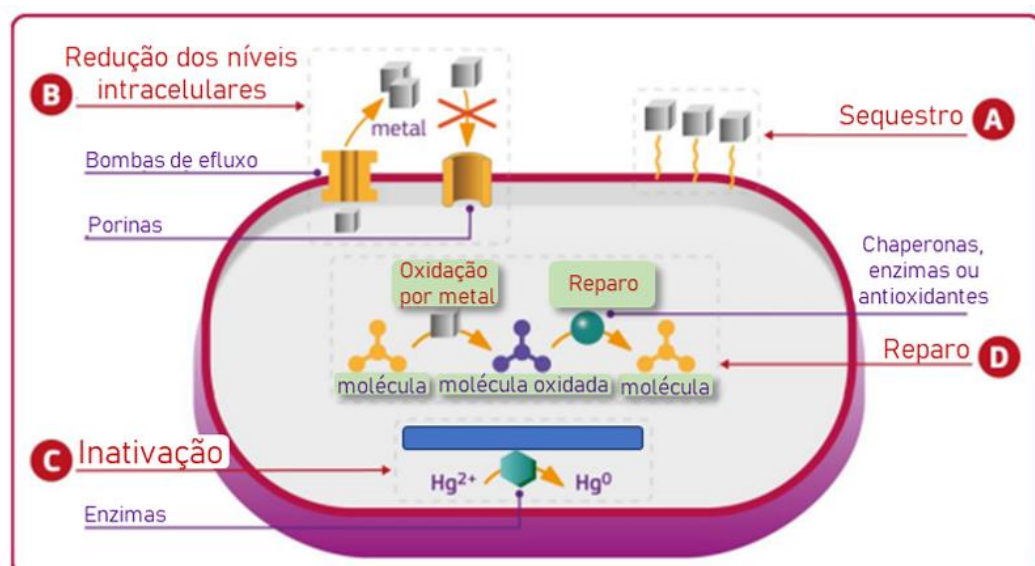


Figura 1. Mecanismos de resistência a metais em bactérias. A) sequestro de metais; B) redução dos níveis intracelulares, por indução do sistema de efluxo e repressão de porinas na membrana; C) inativação enzimática no citoplasma e D) ativação de mecanismos de reparo pelo controle de qualidade de proteínas e enzimas antioxidantes (Adaptado de Sanseverino et al., 2018).

Inicialmente, para proteger os componentes celulares do efeito tóxico dos MPs, as bactérias alteram a composição da sua parede celular ou membrana o que restringe a permeabilidade dos metais (Moreira et al., 2022). As bactérias são capazes de limitar os danos causados por metais através da destoxificação. Consiste em pequenas moléculas antioxidantes e proteínas associadas à regulação de metais essenciais. Em *B. subtilis*, o bacilitiol (BSH) compreende um componente principal desse sistema de resposta na presença de Zn. A glutatona, metalotioneína e a histidina também apresentam atividade de destoxificação no excesso de Zn (Ma et al., 2014; Nairn et al., 2016). A metionina recentemente foi identificada como um possível quelante para cobre (Fung et al., 2013). A destoxificação dos íons metálicos induz a célula a expressar outras proteínas para lidar com excesso de metais. Entre essas proteínas, estão as bombas de efluxo, bem como proteínas envolvidas no armazenamento e sequestro de metais (Chandrangsu et al., 2017).

As bactérias exportam o excesso de metais por meio do efluxo de íons dependente de energia, por meio de ATPase ou antiportadores quimiosmóticos de cátions/ânions e não por desintoxicação química. Três principais classes de transportadores de efluxo em bactérias são P-type ATPase, incorporado na membrana interna e faz transporte do citoplasma para o periplasma; Transportadores ABC presentes em bactérias gram-negativas e são bombas trans-envelope com três componentes que transportam o excesso de metais do citoplasma/periplasma para o meio extracelular, e transportadores facilitadores de difusão catiônica (CDF) que transportam do citoplasma para o periplasma (Prabhakaran et al., 2016).

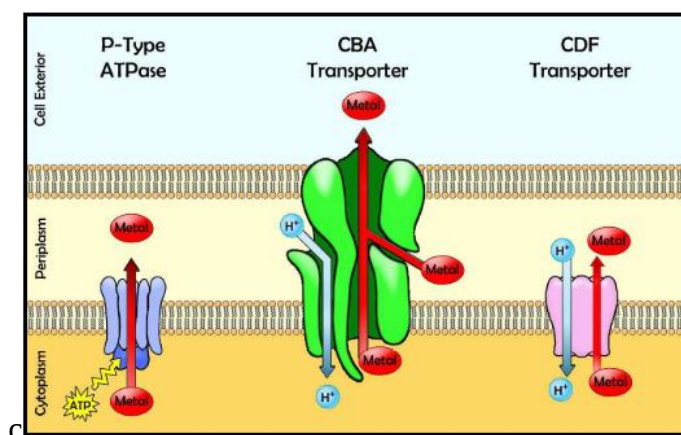


Figura 2. Participação das maiores famílias de transportadores na resistência a metais (Adaptado de

Prabhakaran et al., 2016).

Bactérias podem ser classificadas como sensíveis, tolerantes ou resistentes aos poluentes. Microrganismos tolerantes são capazes de sobreviver em ambientes poluídos por meio de suas propriedades intrínsecas. Microrganismos possuem a capacidade de sobreviver em altas concentrações de substâncias tóxicas, por meio de mecanismos de desintoxicação normalmente codificados nos plasmídeos e transposons (Prabhakaran et al., 2016).

1.1.5. Cobalto

O Co é um metal brilhante, prateado acinzentado e quebradiço. Tem número atômico 27, massa atômica de $58,9332 \text{ g.mol}^{-1}$, densidade $8,9 \text{ kg.cm}^{-3}$ a 20°C e dois principais estados de oxidação (2^+ e 3^+). É um membro do grupo VIII da tabela periódica, sendo semelhante ao ferro e níquel em suas propriedades físicas. Esse metal tem propriedades únicas que o tornam um metal chave no desenvolvimento tecnológico (Fisher, 2011). O Co é um metal muito duro, resistente, mantém resistência em altas temperaturas. Além disso, suas condutividades, térmica e elétrica, são razoavelmente baixas. Possui um alto ponto de fusão e múltiplas valências. O Co tem características ferromagnéticas que o tornam capaz de ser magnetizado mesmo em altas temperaturas (até 1121°C). Adicionalmente, têm capacidade de formar ligas com muitos outros metais como cromo, molibdênio e níquel (Petavratzi et al., 2019).

O Co puro não é encontrado na natureza, mas são conhecidos aproximadamente 30 minerais que contêm Co. Encontra-se preferencialmente ligado a Fe, Ni, Cu e S. Também é encontrado na forma de óxidos, hidróxidos e carbonatos. Depósitos contendo Ni-Cu podem atingir teores de Co de 0,4 a 1,3% (Roberts & Gunn, 2013). No Marrocos, o Co é um produto primário de mineração. Somente em 2011, 1800 toneladas de Co foram produzidas, além de Ni, Au e As como subprodutos. Embora o Marrocos contribua com 2% da demanda mundial de Co, o restante é gerado principalmente como subproduto das minas de Ni-Cu (Petavratzi et al., 2019).

1.1.6. Aplicações do Co

O Co é um metal estratégico com muitas aplicações industriais insubstituíveis. (Heider, 2018). Os usos do Co são divididos em dois grupos principais de aplicações de uso final: as aplicações metalúrgicas e as aplicações químicas (Petavratzi et al., 2019).

Na forma de metal, óxidos e hidróxidos, o Co é utilizado na produção de cátodos para baterias recarregáveis. Os veículos elétricos são o maior setor de uso final do Co com 34% da demanda de 2021 (Fisher, 2022). O Co também é utilizado em baterias de celulares e computadores (Fisher, 2022; Research, 2022). Além destes usos, o Co é usado em uma

variedade de ligas, incluindo superligas, ligas magnéticas, ligas protéticas e ligas resistentes ao desgaste. As superligas são utilizadas no setor aeroespacial, em reatores nucleares, usinas de energia e em equipamentos químicos. Ligas cromo-Co, são utilizadas na área médica, em próteses para substituições de quadris e joelhos, e em implantes dentários (Petavratzi et al., 2019). Além destes usos, o Co possui uma variedade de aplicações industriais em pigmentos, sabões, adesivos, maquiagens e bijuterias (Earl et al., 2022).

1.1.7. Demanda global

O Co é considerado como uma matéria prima crítica e como um elemento estrategicamente importante (Cobalt Institute, 2021). A demanda de Co aumentou progressivamente desde o ano 2000 e aumentou cerca de 360%, passando de 34 kt para cerca de 159 kt em 2021 (Earl et al., 2022). O principal setor de uso final de Co é o de baterias. Na indústria química a produção de poliéster, cerâmicas e corantes são os principais usos do Co (Cobalt Institute, 2021).

A República Democrática do Congo (RDC) fornece a maior parte do Co global (Cobalt Institute, 2021). O cinturão de cobre da África do Sul detém os maiores depósitos de Co no mundo com aproximadamente 51% das reservas (Earl et al., 2022). A RDC também considera o Co como um mineral estratégico, mas são relatados problemas nas regiões de mineração que envolvem instabilidade política, lavra predatória e condições de trabalho perigosas que violam os direitos humanos e colocam em risco a cadeia global de suprimentos de Co (Earl et al., 2022; Nascimento & Soares, 2019).

Até 2030 a meta é que as vendas de veículos elétricos representem pelo menos 35% das vendas globais de veículos e estima-se que para suprir a demanda sejam necessárias 1,2 milhões de toneladas de Co (Fisher, 2022). Isto representa apenas a demanda de um único setor que depende desse mineral. Essas projeções de demanda de Co para o futuro somadas as possíveis instabilidades na cadeia de suprimentos tem estimulado o desenvolvimento de técnicas para recuperar Co de resíduos sólidos. Uma economia circular desse mineral, através da reciclagem pode ajudar a garantir o suprimento de Co, reduzindo a pressão sobre a extração do mineral (Earl et al., 2022).

No Brasil o Co era minerado como subproduto de níquel e cobre em três jazidas, Niquelândia – GO, Americano do Brasil – GO e Fortaleza de Minas – MG. O Brasil tanto minerava quanto refinava Co, principalmente para exportação. A Votorantim fornecia Co para as indústrias químicas, fabricantes de sulfatos de Co (fertilizantes e ração animal), secantes, octoatos de Co, adesivos para borracha e indústrias fabricantes de ligas especiais e superligas (Fonseca, 2019). Como era minerado como subproduto da mineração de níquel, a queda nos

preços desse metal tornou inviável economicamente a extração de Co. Entretanto, a possibilidade de retomada da extração desse metal tem sido estudada em diversos projetos (Nascimento & Soares, 2019).

1.1.8. Cobalto: toxicidade e resistência em bactérias

O Co é um metal de transição, que em baixas concentrações é essencial para os organismos vivos. Desempenha um papel fundamental como íon central em um anel tetrapirrólico, com um núcleo corrina, formando a coenzima vitamina B₁₂ (adenosilcobalamina [AdoCbl]) e seus derivados de cobalamina (Cbl) (Cheng et al., 2011). O Co também pode ser associado a outras proteínas não corrinas como metionina aminopeptidase, prolina dipeptidase, nitrila hidratase, glicose isomerase, entre outras (Kobayashi & Shimizu, 1999).

A fim de manter os níveis intracelulares de Co suficientes para o metabolismo celular e evitar a entrada de altas concentrações de Co por transportadores inespecíficos, as bactérias desenvolveram sistemas de absorção de Co de alta afinidade (Cheng et al., 2011). A absorção de Co e Ni nas bactérias é mediada por vários transportadores ABC, primários e secundários (Eitinger et al., 2005). Quando as concentrações externas de Co são muito altas, o acúmulo de Co pode se tornar tóxico. O Co pode se ligar a sítios ativos de outros metais, competindo por exemplo com o Fe e Ni e inativar numerosas proteínas levando a formação de EROs (Ranquet et al., 2007). Sua alta afinidade por grupos tiol rompe pontes dissulfeto em proteínas, reduz o pool de tiol livre e pode interferir na assimilação do enxofre causando danos generalizados nas células (Barras & Fontecave, 2011)(Barras e Fontecave, 2011). Adicionalmente, o Co pode inativar a atividade de aglomerados de Fe-S que se mostraram essenciais para a sensibilidade de *E. coli* ao excesso de Co (Ranquet et al., 2007).

Para atenuar os danos causados pelo excesso de Co dentro das células, as bactérias utilizam diversos mecanismos. Em *Cupriavidus. metallidurans* CH34, foram descritos os sistemas de transporte RND (resistência-nodulação-divisão celular) que compõe diversas proteínas relacionadas ao efluxo de compostos tóxicos. A família de proteínas de efluxo de metais pesados (EMP) incluem o sistema CzcCBA, relatado pela primeira vez no plasmídeo pMOL30 de *C. metallidurans*. CzcCBA é um complexo proteico ligado à membrana que catalisa um efluxo dependente de energia dos três cátions metálicos, Co²⁺, Zn²⁺ e Cd²⁺ (Nies, 1992; Niu et al., 2015; Mazhar et al., 2020).

Adicionalmente, os aglomerados de Fe-S desempenham papéis importantes em processos vitais fundamentais na célula. A exposição de células de *E. coli* ao Co resultou na inativação de enzimas de Fe-S (Ranquet et al., 2007). A biossíntese dos aglomerados de Fe-S ocorre por três vias primárias, i) o sistema *nif*, para o complexo enzimático da nitrogenase, ii)

o sistema *isc*, como uma via geral de maturação dessas proteínas e iii) o sistema *suf*, descrito em *E. coli* medeia a montagem dos aglomerados de Fe-S sob condições de estresse oxidativo e de limitação de Fe (Chahal et al., 2009; Outten et al., 2004). Além disso, o sistema *suf* foi descrito como essencial na tolerância ao excesso de Co. Nocautes para o sistema *suf* mostraram maior sensibilidade ao Co e inativação da aconitase (AcnA). A aconitase ativa a isomerização de citrato a isocitrato no ciclo do ácido tricarboxílico e, segundo Ranquet et al. (2007), o Co compete pelos sítios de ligação do Fe na aconitase levando à inativação enzimática, o que pôde ser revertido pela adição de ferro ao meio, protegendo a atividade da enzima.

O estudo de bactérias, capazes de promover o crescimento vegetal de forma direta, pela fixação biológica de nitrogênio e solubilização de nutrientes de difícil acesso para as plantas e de forma indireta, com importantes características de biocontrole e de resistência a estresses abióticos é uma estratégia sustentável para reduzir o uso de aditivos químicos nas culturas. Adicionalmente, direcionam para a descoberta de genes de interesse econômico no âmbito do desenvolvimento biotecnológico.

1.1.11 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Gluconacetobacter diazotrophicus foi isolada no Brasil, a partir de amostras de raiz e colmos de cana-de-açúcar e nomeada *Saccharobacter nitrocaptans* (Cavalcante & Dobereiner, 1988). Após análises de rRNA 16S, foi reclassificada como *Gluconacetobacter diazotrophicus* em 1997 (Yamada et al., 1997). Essa bactéria pertence ao filo Proteobacteria, à classe α -proteobacteria, ordem Rhodospirillales, família Acetobacteraceae e ao gênero *Gluconacetobacter* (Kerstens et al., 2006).

A família Acetobacteraceae inclui várias cepas economicamente importantes com aplicações biotecnológicas de fins industriais, incluindo a produção de vinagres e alimentos fermentados, produção de sorbose, um precursor chave da vitamina C (Guzman & Vilcinskis, 2022; Tucaliuc et al., 2022). Acetobacteraceae é dividida em dois grupos, bactérias acéticas e acidófilas (Guzman & Vilcinskis, 2022). As bactérias acéticas ou bactérias do ácido acético em sua maioria podem transformar etanol em ácido acético e são normalmente encontradas em órgãos açucarados de plantas (Yamada, 2016). Esta família inclui 19 gêneros e 97 espécies de bactérias acéticas, entre eles o gênero *Gluconacetobacter* e espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Guzman & Vilcinskis, 2022; Kersters et al., 2006).

G. diazotrophicus é uma bactéria gram-negativa, endofítica obrigatória, diazotrófica, ácido tolerante e aeróbica obrigatória. Possui formato de bacilo com extremidades arredondadas com tamanho de 0,7-0,9 μm por 2 μm (Figura 1). As células têm de 1 a 3 flagelos

peritríqueos ou laterais. Podem se apresentar isoladas, como diplobacilos ou em cadeias de tamanhos variáveis (Gillis et al., 1989).

A bactéria *G. diazotrophicus* possui várias características de elevado interesse biotecnológico, entre elas, a fixação biológica de nitrogênio, a tolerância a condições extremas de pH e teor de açúcar, sem perder a atividade de fixação biológica de nitrogênio (FBN). *G. diazotrophicus* é capaz de crescer em condições de cultivo com teor de sacarose de até 30% e é capaz de fixar nitrogênio (FBN) em condições ácidas extremas, com pH abaixo de 3,0 (Cavalcante & Dobereiner, 1988; Fisher & Newton, 2005). Surpreendentemente, é uma bactéria extremamente versátil quanto a sua fonte de açúcar, além de sacarose, é capaz de metabolizar outras 22 fontes de carbono que incluem açúcares, álcoois e compostos fenólicos (Barbosa et al., 2006).

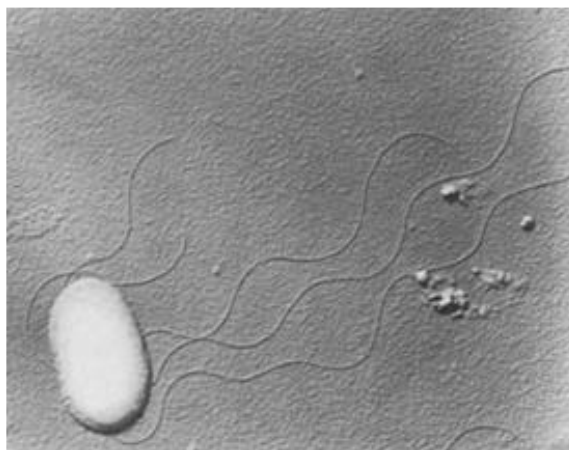


Figura 3. Eletromicrografia de *G. diazotrophicus* PAI5. A célula com formato de bacilo com 0,7-0,9 μm por 2 μm , isolada e com flagelos visíveis (Gillis et al., 1989).

1.1.12. Promoção do Crescimento Vegetal

Originalmente isolada de cana-de-açúcar, *G. diazotrophicus* é capaz de colonizar outras culturas de importância agrícola e levar à promoção do crescimento vegetal. Acerca da interação natural, *G. diazotrophicus* foi isolada dos tecidos de diferentes culturas como café (Jimenez-Salgado et al., 1997), milheto (Loganathan et al., 1999), abacaxi (Tapia-Hernández et al., 2000), banana, beterraba, cenoura e tomate (Madhaiyan et al., 2004). Soares (2022) compilou diversos trabalhos de literatura recentes que demonstram que a colonização não nativa por *G. diazotrophicus* faz com que a bactéria colonize com sucesso outras culturas de interesse agrônomo como milho, arroz, trigo, canola, sorgo, feijão, mandioca, morango, alface e forma também coloniza *Arabidopsis thaliana*, planta modelo no estudo de interação

bactéria-planta. Essa capacidade da bactéria de colonizar outros hospedeiros põe em evidência seu potencial como bioinoculante.

Além da FBN, essa bactéria tem diversas características que causam efeitos positivos na interação bactéria-planta e levam a promoção do crescimento na planta hospedeira. Assim, *G. diazotrophicus* é considerada uma bactéria promotora do crescimento vegetal (BPCV) com elevado potencial biotecnológico. Junto à FBN, a bactéria é capaz de induzir a produção fitormônios (principalmente auxina e giberelina), a produção de sideróforos, solubilização de fósforo inorgânico e zinco e, ainda atuar no biocontrole de fitopatógenos, além de elevada resistência a estresses abióticos (Saravanan et al., 2007). O sequenciamento do genoma de *G. diazotrophicus* PA15 confirmou várias das características endofíticas da bactéria, como a presença de genes que codificam enzimas para a fixação biológica de nitrogênio, produção de polissacarídeos (polissacarídeos, exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos), produção de fitohormônios, absorção de nutrientes, tolerância a ácidos e osmotolerância (Bertalan et al., 2009).

1.1.13. Resposta a estresses abióticos

O uso de fertilizantes químicos e defensivos agrícolas, que agem de forma rápida liberando nutrientes e combatendo pragas aumentaram de forma rápida e eficiente a produção agrícola mundial (Mahmud et al., 2021). No entanto, o uso, massivo e descuidado, desses químicos geram altos custos de produção, deterioração da qualidade do solo, redução da fertilidade dos solos, o que pode levar ainda mais ao acúmulo de metais nos tecidos vegetais, o que se torna um risco para a agricultura, segurança alimentar e ambiental (Farnia & Hasanpoor, 2015; Itelima et al., 2018). O uso de BPCV como biofertilizantes representam uma alternativa aos fertilizantes químicos para aumentar a produção das culturas de forma sustentável. Entretanto, a eficácia dessas bactérias como biofertilizantes é influenciada por estresses ambientais antes e após a inoculação.

G. diazotrophicus pode induzir a promoção do crescimento vegetal indiretamente, atenuando os efeitos nocivos dos estresses abióticos. O estresse osmótico causado por altas concentrações de sacarose inibem o crescimento de vários microrganismos, mas *G. diazotrophicus* coloniza cana-de-açúcar, vivendo em ambientes com 10% de sacarose e sendo capaz de tolerar até 30% de sacarose (Cavalcante & Dobereiner, 1988; Reis & Döbereiner, 1998). Isto mostra sua adaptação a osmotolerância. Vários sistemas de osmoproteção foram identificados por Bertalan e colaboradores (2009) no sequenciamento genômico de *G. diazotrophicus* PA15. Recentemente, trabalhos do nosso grupo de pesquisa validaram mecanismos essenciais de osmotolerância em *G. diazotrophicus* que ajudam a bactéria a tolerar ambientes

com altas concentrações de açúcar (Leandro et al., 2021a; Leandro et al., 2021c).

A exposição de *G. diazotrophicus* ao polietileno glicol 400 (PEG 400), um agente indutor de estresse osmótico não iônico, alterou a fluidez da membrana das células regulando negativamente a absorção de nutrientes e induzindo a expressão de proteínas associadas a biossíntese de ácidos graxos saturados (AccC), peptidoglicanos e lipopolissacarídeos (GlmS e GlmU). Adicionalmente, a análise de genética reversa mostrou o papel essencial da biossíntese de ácidos graxos saturados (*accC*), osmoprotetores (*mtlK* e *ostA*) e absorção de nutrientes (porina de carboidratos (*oprB*) e transportador dependente de receptor TonB (*tbdR*)) para a tolerância de *G. diazotrophicus* ao estresse osmótico (Leandro et al., 2021a).

Quando a sacarose foi utilizada como agente de estresse alguns mecanismos de tolerância foram similares aos encontrados para o estresse osmótico. As proteínas relacionadas com a absorção de nutrientes foram reprimidas, indicando que nos dois estresses a bactéria ajustou a permeabilidade da membrana como mecanismo de tolerância. Além desse grupo, proteínas de ajuste osmótico foram induzidas nos dois estresses, na presença de PEG, OstA e MtlK, e na presença de sacarose, OstA, ProC e MtlK. O nocaute *mtlK* mostrou sensibilidade principalmente em altas concentrações de agente estressor, 300 mM de PEG e 600 mM de sacarose (Leandro et al., 2021a; Leandro et al., 2021c). O MtlK é uma manitol-2-desidrogenase, é a enzima responsável pela conversão de frutose em manitol (Ortiz et al., 2017). A tolerância a sacarose em *G. diazotrophicus* foi atribuída também a outros grupos funcionais diferentes do estresse por PEG. *G. diazotrophicus* intensifica o metabolismo de açúcar com a regulação positiva de 16 proteínas, produzindo ácido glucônico e oxidando etanol. A falta da proteína glicose-6-fosfato-1-desidrogenase (*Zwf*) afeta a tolerância de *G. diazotrophicus* à altas concentrações de sacarose (Leandro et al., 2021c). O *Zwf* é um componente essencial para a degradação da glicose, uma vez que integra a fase oxidativa da via das pentoses-fosfato (Saavedra e Sesma 2005).

Tejera et al. (2003) destacaram que a atividade de FBN é comprometida severamente na presença de 150 mM e 200 mM de NaCl. Em 200 mM de NaCl, as células de *G. diazotrophicus* sofrem alterações morfológicas com o alongamento exagerado das células (Boniolo et al., 2009). Posteriormente, De Oliveira et al. (2016) demonstraram que a sensibilidade ao NaCl estava relacionada a uma resposta específica ao ânion Cl⁻ e não a presença do Na⁺ e possivelmente o alongamento das células também estava relacionado com o ânion Cl⁻. Em solos salinizados a concentração de NaCl varia de 20-40 mM, em solos de salinidade baixa, a 160 mM de NaCl em solos com salinidade alta (Leandro et al., 2020). Um trabalho que avaliou as respostas moleculares de *G. diazotrophicus* a NaCl, demonstrou que o alongamento celular filamentososo a 150 mM de NaCl não afetou a viabilidade celular (Leandro et al., 2020).

Entretanto, NaCl, especificadamente modula proteínas associadas ao controle de qualidade de proteínas, com destaque para a protease DegP, essencial na tolerância de *G. diazotrophicus* ao estresse salino (Leandro et al., 2020) (Figura 2).

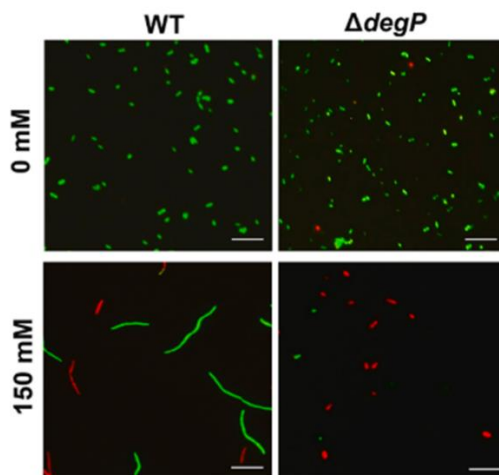


Figura 4. Microscopia de fluorescência demonstrando a viabilidade de *G. diazotrophicus* selvagem (WT) e do nocaute DegP na presença de 150 mM de NaCl. O silenciamento de DegP afeta a tolerância de *G. diazotrophicus* ao estresse salino. Barra de 5 μ m. (Adaptado de (Leandro et al., 2020).

Intorne et al. (2012) avaliaram a capacidade de *G. diazotrophicus* de resistir ao estresse por MP's. *G. diazotrophicus* é altamente resistente a cádmio (Cd), zinco (Zn) e cobalto (Co) com concentrações mínimas inibitórias de 1,2, 20 e 20 mM, respectivamente. Intorne et al. (2012) identificaram o determinante *czcA*, como o principal gene na resistência a esses metais. *czcA* codifica uma proteína envolvida no efluxo de metais e está organizado em um operon, *czcCBARS* (Nies, 1992). *G. diazotrophicus* possui duas cópias do gene *czcA*, porém apenas uma cópia está associada ao operon *czcCBARS*. Recentemente Moreira et al. (2022) desenvolveram um trabalho avaliando as respostas moleculares de *G. diazotrophicus* a cádmio e identificaram a proteína CzcC como essencial na resposta a esse metal. O cádmio regulou diferencialmente proteínas relacionadas à absorção de nutriente, bomba de efluxo de metais, resposta de estresse oxidativo e o controle de qualidade de proteínas (Moreira et al., 2022). A regulação negativa de proteínas relacionadas com a absorção de nutrientes é uma resposta molecular de *G. diazotrophicus* comum aos estresses por PEG, NaCl, sacarose e cádmio (Leandro et al., 2020; Leandro et al., 2021a; Leandro et al., 2021b; Moreira et al., 2022). Portanto, pesquisas sobre as respostas moleculares de *G. diazotrophicus* a Co poderão propiciar um melhor entendimento sobre como a bactéria resiste a altas concentrações desses metais.

2. Mecanismos moleculares envolvidos na resposta a cobalto na bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15

Authors: Vivian Ribeiro Pimentel¹, Leandro Fernandes Andrade¹, Luciano de Souza Vespoli¹, Mariana Ramos Leandro¹, Júlia Rosa Moreira¹, Fabiano Silva Soares¹, Vanildo Silveira¹, Gonçalo Apolinário de Souza Filho^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia (Setor de Biologia Integrativa), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Av. Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil

Key-words: Efflux system; bactéria endofítica; extracitoplasmatic proteins; LC-MS/MS; cobalt stress; carbohydrate metabolism

2.1. Resumo

Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) são uma alternativa sustentável para aumentar a produção das culturas. *G. diazotrophicus* é uma BPCV com características osmotolerantes e de resistência ao excesso de metais. Apesar do seu potencial biotecnológico, a compreensão dos mecanismos que controlam a resposta a cobalto ainda são pouco compreendidos. O presente estudo investigou os principais mecanismos envolvidos na resistência de *G. diazotrophicus* a Co. A proteômica comparativa foi utilizada para investigar as principais vias funcionais reguladas em *G. diazotrophicus* na presença de 2,5 mM de CoCl₂. Dentre as 144 proteínas reguladas, as principais vias identificadas foram de absorção de nutrientes, sistema de efluxo, metabolismo de Fe-S, metabolismo de carboidratos, metabolismo de aminoácidos e o controle de qualidade de proteínas. A proteína extracitoplasmática CzcC, do efluxo de metais na membrana externa, foi a única proteína aumentada nesse compartimento e regulada apenas na presença de Co. O papel dessas vias na resposta da bactéria ao Co foi investigado por genética reversa e revelou que o nocaute *czcC* do sistema de efluxo tornou-se extremamente sensível quando o meio foi suplementado com Co. Adicionalmente, *argH* e *zwf* mostraram aumento da sensibilidade conforme a concentração de Co no meio aumentou, indicando a importância do metabolismo de arginina e da via da pentose fosfato na proteção ao excesso de Co. Juntos nossos dados contribuem para a compreensão dos mecanismos de resistência a Co em *G. diazotrophicus*.

Palavras-chave: BPCV; metal pesado; proteômica; metabolismo de açúcar; sistema SUF; sistema CzcCBA

2.2. Abstract

Plant growth promoting bacteria (PGPB) are a sustainable alternative to increase crop production. *G. diazotrophicus* is a PGPB with osmotolerant characteristics and resistance to excess metals. Despite its biotechnological potential, little is known about the mechanisms that control the response to metals. The present study investigated the main mechanisms involved in the resistance of *G. diazotrophicus* to Co. Comparative proteomics was used to investigate the main functional pathways regulated in *G. diazotrophicus* in the presence of 2.5 mM CoCl₂. Among the 144 regulated proteins, the main pathways identified were nutrient absorption, efflux system, Fe-S metabolism, carbohydrate metabolism, amino acid metabolism and protein quality control. The extracytoplasmic protein CzcC, from the efflux of metals in the outer membrane, was the only protein increased in this compartment and regulated only in the presence of Co. The role of these pathways in the bacterial response to Co was investigated by reverse genetics and revealed that the *czcC* knockout of the efflux system became extremely sensitive when the medium was supplemented with Co. Additionally, *argH* and *zwf* showed increased sensitivity as the Co concentration in the medium increased, indicating the importance of arginine metabolism and the pentose phosphate pathway in protecting Co excess. Together our data contribute to the understanding of mechanisms of resistance to Co in *G. diazotrophicus*.

Keywords: PGPB; heavy metal; proteomics; sugar metabolism; SUF system; *czcCBA* system

2.3. Introdução

A demanda de cobalto (Co) aumentou progressivamente desde o ano 2000. A mineração de cobalto aumentou cerca de 360%, passando de 34 kt para cerca de 159 kt em 2021. A estimativa é que nos próximos 5 anos a demanda de Co se aproxime de 320 kt, aumentando a um CAGR de 12,7% em relação a 2021 (H. Fisher, 2022).

O Co é minerado como subproduto da mineração de cobre e níquel (Cobalt Institute, 2021). Adicionalmente, o Co é um metal estratégico com muitas aplicações industriais insubstituíveis. Os veículos elétricos são o maior setor de uso final do Co com 34% da demanda de 2021, seguido de outras aplicações em baterias de celulares, computadores e no armazenamento de energia que é fundamental para a matriz energética mundial (H. Fisher, 2022; Research, 2022). Além destes usos, o Co é usado em uma variedade de aplicações industriais em pigmentos, sabões, adesivos, maquiagens, bijuterias, superligas, implantes ortopédicos e no setor aeroespacial (Cobalt Institute, 2021).

A descarga inapropriada de resíduos dessas atividades industriais aumentam a quantidade de Co nos solos e corpos d'água se tornando um risco para a saúde humana, a segurança ambiental e a agricultura (Lwalaba et al., 2017; Mahey et al., 2020). O Co é um metal de transição que em baixas concentrações age como cofator enzimático em vários processos celulares como na oxidação de ácidos graxos, síntese de DNA e principalmente na síntese de cobalaminas (Mahey et al., 2020). Nos sistemas vegetais uma exposição maior do que os limites permissíveis aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) levando a distúrbios no fotossistema II, pigmentos fotossintéticos e metabolismo de nitrogênio (Ali et al., 2010; Azarakhsh et al., 2015).

O uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) como biofertilizante pode induzir tolerância a estresses abióticos e suprimir a ação de patógenos (Leandro et al., 2020; Ngalmat et al., 2021). Para evitar o acúmulo e intoxicação intracelular de MPs, os microrganismos desenvolveram várias respostas adaptativas para manter a homeostase (Nies, 1999). Através do controle dos processos de transporte de nutrientes, tráfego intracelular de metais, efluxo do excesso de metais e conservação das proteínas na célula, esses sistemas garantem a biodisponibilidade dos metais aos processos celulares e previnem danos aos componentes celulares (Ma et al., 2009).

De fato, muitos microrganismos possuem genes em cromossomos, plasmídeos e transposons que codificam características de resistência a uma variedade de íons metálicos (Bruins et al., 2000). Em situações com excesso de íons metálicos, a bactéria pode induzir a expressão de genes e sintetizar sistemas de efluxo específicos para excluir o excesso do metal.

Os genes *czcC*, *czcB* e *czcA* codificam um complexo tripartido de proteínas, CzcCBA, que cataliza o efluxo de cobalto (Co), cádmio (Cd) e zinco (Zn) dependente de energia (Nies, 1992). Esse sistema age como um antiporter quimiosmótico que pode expulsar o excesso de Co, Cd e Zn do citoplasma ou do periplasma por meio do efluxo de íons impulsionado por uma força próton motriz (Intorne et al., 2012; Nies, 1999).

No citoplasma, as propriedades redox do Co levam à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a célula ao estresse oxidativo. Adicionalmente, o Co^{2+} pode interferir com a homeostase de outros metais essenciais (níquel, ferro, manganês). Ainda, o Co tem afinidade química com átomos de enxofre e pode afetar várias proteínas dependentes de thiol/cysteine groups (Barras & Fontecave, 2011). Em *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*, claramente o Co afeta os aglomerados de Fe-S (Fontecave et al., 2005; Ranquet et al., 2007; Ray et al., 2013). Ferro-enxofre [Fe-S] são enzimas envolvidas em uma variedade de funções biológicas críticas, incluindo transferência de elétrons, ligação/ativação de substrato, regulação da expressão gênica e catálise redox e não redox (Ranquet et al., 2007).

Gluconacetobacter diazotrophicus PA15 é uma BPCV endofítica, Gram-negativa, reconhecida por sua capacidade de fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes e produção de fitohormônios (Cavalcante & Dobereiner, 1988; Reis & Teixeira, 2015). Além disso, vários estudos demonstraram a resistência de *G. diazotrophicus* a estresses osmóticos e MP's (De Oliveira et al., 2016; Intorne et al., 2012; Leandro et al., 2020, Leandro et al., 2021a; Leandro et al., 2021b). A análise genômica revelou que *G. diazotrophicus* possui uma grande variedade de genes previstos como envolvidos na homeostase ou resistência a estresses abióticos (Bertalan et al., 2009). Embora as respostas bacterianas ao estresse por MP's tenham sido amplamente descritas, as respostas moleculares de BPCV resistentes a Co ainda permanecem pouco compreendidas.

O presente trabalho teve como objetivo investigar os mecanismos moleculares envolvidos com a resposta de *G. diazotrophicus* PA15 ao estresse por Co. Os efeitos do estresse por Co foram avaliados quanto aos danos à multiplicação e viabilidade celular. Os principais mecanismos regulados em resposta ao estresse foram identificados por meio de análise proteômica comparativa. O papel de tais mecanismos na resistência ao estresse foi avaliado por meio de genética reversa, utilizando nocautes bacterianos defectivos para proteínas componentes das principais vias reguladas.

2.4. Material e métodos

2.4.1. Cepas bacterianas, meio e condições de cultivo

A cepa selvagem de *G. diazotrophicus* PA15 foi obtida da coleção de culturas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil). Nocautes de inserção foram obtidos da coleção de mutantes de *G. diazotrophicus* PA15 do Laboratório de Biotecnologia – UENF (Intorne et al., 2009). Os nocautes defectivos para a produção das proteínas receptor dependente de TonB (*tbdR*), Zwf (*zwf*), PdhB (*pdhB*), ArgH (*argH*) and CzcC (*czcC*) foram gerados usando o kit de inserção EZ-Tn5 <R6Kyori/KAN-2>Tnp (Epicentre, Madison, WI, EUA). As culturas estoque foram produzidas conforme descrito anteriormente por De Oliveira et al. (2016). Especificamente, uma única colônia de cada cepa bacteriana, foi cultivada em meio DYGS (1 L: 2 g de glicose; 2 g de extrato de levedura; 1,5 g de peptona; 1,3 g de ácido glutâmico; 500 mg K₂HPO₄; 500 mg MgSO₄.7H₂O; pH 6,0) (Reis et al., 1994) sob agitação constante (250 rpm min⁻¹, 30°C) até atingir DO_{600nm} de 1,0. Em seguida, transferimos 750 µL de cada cultura para microtubos (1,5 mL) e adicionamos homogeneamente 250 µL de glicerol (85%). Para armazenamento, os microtubos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

2.4.2. Ensaio de estresse por cobalto

Os ensaios de estresse foram realizados conforme descrito por De Oliveira et al. (2016) com modificações. A solução estoque de cobalto (CoCl₂.6H₂O, M.W. 237.93, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) foi preparada usando o dobro da concentração final e filtrada. 5 mL de células de *G. diazotrophicus* PA15 selvagem do estoque foram inoculados em 45 mL de meio DYGS e armazenados em frascos Erlenmeyer (250 mL). Os frascos foram mantidos sob agitação constante (250 rpm min⁻¹, 30°C) até atingir DO_{600nm} 1,0. As culturas foram centrifugadas a 10.000 g a 25°C por 15 min. Então, as células foram ressuspensas em meio DYGS concentrado 2x. 25 mL de cultura com DO_{600nm} ajustada para 0,2, foram misturados em frascos Erlenmeyer com volumes iguais de água filtrada suplementada com 0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 e 3,5 mM de solução estoque de CoCl₂.6H₂O. Os frascos foram mantidos sob agitação constante (250 rpm min⁻¹, 30°C). Após 12 horas, foi realizada a análise DO_{600nm}, e 2 mL de cada cultura foram separados para análise microscópica. Os dados foram analisados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

2.4.3. Análise de microscopia

A microscopia e a viabilidade celular foram realizadas conforme descrito anteriormente (Leandro et al., 2021a). Para análise da viabilidade celular, as células lavadas dos ensaios de estresse com Co foram submetidas ao método de coloração por epifluorescência utilizando o Live/Dead Bacterial Viability Kit (BacLight™, Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Para análise morfológica, após a lavagem das células, cada suspensão bacteriana (5 µL) foi aplicada nas lâminas de vidro tratadas com uma gota de sacarose 0.8%, cobertas com lamínulas e observadas com o microscópio Carl Zeiss Axion Imager A.2. As imagens foram observadas ao microscópio (Carl Zeiss Axion Imager A.2 Microscope). As células vivas foram coradas em fluorescência verde, enquanto as células mortas foram coradas em fluorescência vermelha. As lâminas foram separadas em seis campos para contagem de células bacterianas vivas e mortas para cada tratamento. As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

2.4.4. Extração de proteínas

Para a preparação do extrato proteico, foram utilizadas amostras biológicas em triplicata de células de *G. diazotrophicus* tipo selvagem, não expostas (controle) e expostas a 2,5 mM CoCl₂.6H₂O durante 12 horas. Cada amostra correspondeu a 20 mL de cada tratamento. Os métodos de extração de proteínas foram realizados conforme descrito por Damerval et al. (1986) para todas as amostras. A concentração final de proteína de cada amostra foi estimada com 2-D Quant Kit (2-D Quant Kit - G.E. Healthcare Life Sciences).

2.4.5. Digestão de proteínas e análise por espectrometria de massas

As análises proteômicas foram realizadas conforme descrito por Passamani et al. (2018) com algumas modificações. Após a digestão, as amostras foram transferidas para frascos de recuperação total (Waters) e 1 µg peptídeo/amostra foi utilizada para análise por espectrometria de massa. Em seguida, um nanoAcquity UPLC conectado a um espectrômetro de massa Synapt G2-Si HDMS (Waters) foi utilizado para as análises ESI-LC-MS/MS conforme descrito por Leandro et al. (2020).

2.4.6. Análise de dados da proteômica

A busca em banco de dados e o processamento espectral foram feitos conforme descrito anteriormente por Passamani et al. (2018). Os softwares utilizados foram ProteinLynx Global Server (PLGS; versão 3.0.2) (Waters, Milford, CT, EUA) e ISOQuant (Distler et al.,

2014, 2016). O processamento espectral nos softwares PLGS e ISOQUANT foi realizado com as configurações descritas anteriormente (Leandro et al., 2021a). A taxa de falsa descoberta (Fdr) para identificação de peptídeos e proteínas foi regulada para um máximo de 1%, com um comprimento mínimo de peptídeo de seis aminoácidos. O processamento dos dados proteômicos utilizou o banco de dados de proteomas *G. diazotrophicus* RIOGENE (www.uniprot.org/proteomes/UP000001176). A configuração detalhada dos parâmetros de processamento ISOQuant é fornecida na Tabela S1.

Após a análise dos dados no ISOQuant, apenas as proteínas presentes ou ausentes (para proteínas únicas) em todas as três réplicas biológicas foram consideradas na análise de abundância diferencial. O teste *t* de Student (bicaudal) foi utilizado para análise dos dados. Proteínas com valores de $p < 0,05$ foram consideradas induzidas se o *fold change* (FC) fosse maior que 1,5 e reprimidas se o FC fosse menor que 0,667.

A análise da rede de proteínas foi realizada usando o banco de dados STRING com confiança nas arestas da rede de 0,700 de pontuação de interação (alta confiança) (<http://www.string-db.org/>). Para a previsão da localização subcelular (extracelular, membrana externa, periplasma, membrana citoplasmática e citoplasma) de proteínas diferencialmente acumuladas (PDAs) identificadas na proteômica, foi utilizado o software PSORTB (<http://www.psort.org/psortb/>).

2.4.7. Análise de genética reversa

As análises de genética reversa foram realizadas conforme descrito (Leandro et al., 2021a). Para isso, 5 mL de células estoque de *G. diazotrophicus* PA15 selvagem e de cada nocaute de inserção foram inoculados em 45 mL de meio LGI (45 mL) (1L: 5 g sacarose; 0,6 g KH_2PO_4 ; 0,2 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 0,7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g FeCl_3 ; 0,002 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; pH 6,0) (Cavalcante & Dobereiner, 1988) em frascos de Erlenmeyer (250 mL). As culturas cresceram sob agitação constante (250 rpm min^{-1} , 30°C) até atingirem $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 1,0.

As culturas foram preparadas em microplacas de 96 poços contendo meio sólido LGI suplementado com $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0, 0,7, 3,0 ou 4,5 mM), $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0, 0,01, 0,03 e 0,035 mM) e $\text{ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0, 0,5, 1,5 e 2,5 mM) e inoculados usando um replicador de 96 pinos (Boekel, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA). As placas foram incubadas a 30°C por cinco dias e então avaliadas. Experimentos prévios foram realizados para definir as concentrações desse ensaio. Este ensaio foi repetido pelo menos três vezes para confirmação dos resultados.

2.5.Resultados

2.5.1 O crescimento de *G. diazotrophicus* é inibido por Co

Com o objetivo de avaliar os efeitos do Co sobre a bactéria *G. diazotrophicus*, culturas bacterianas foram cultivadas em concentrações crescentes de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ variando entre 0 e 3,5 mM. Nenhuma das concentrações de Co causou alterações morfológicas aparentes nas células bacterianas.

O crescimento de *G. diazotrophicus* foi inibido por todas as concentrações de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ testadas, variando de 10% de inibição, em 1,5 mM, a 75% de inibição, em 3,5 mM (Fig. 1A; Fig. 1B). O efeito do estresse do Co promoveu uma redução substancial no crescimento bacteriano a 2,5 mM, de aproximadamente 40% de inibição, o dobro da inibição causada por 2,0 mM, de aproximadamente 19% de inibição (Fig. 1A). Além disso, a análise de microscopia de epifluorescência mostrou que nenhuma das concentrações de Co afeta significativamente a viabilidade celular da cepa selvagem de *G. diazotrophicus* (Fig. 1C).

Esses resultados sugerem que, apesar da inibição do crescimento de *G. diazotrophicus* causado pela suplementação do meio com Co, as células bacterianas ativaram mecanismos de resistência para manter a viabilidade celular nessas circunstâncias. Assim, selecionamos o tratamento com 2,5 mM de Co para análises dos aspectos moleculares da resposta bacteriana ao Co por meio das análises proteômicas.

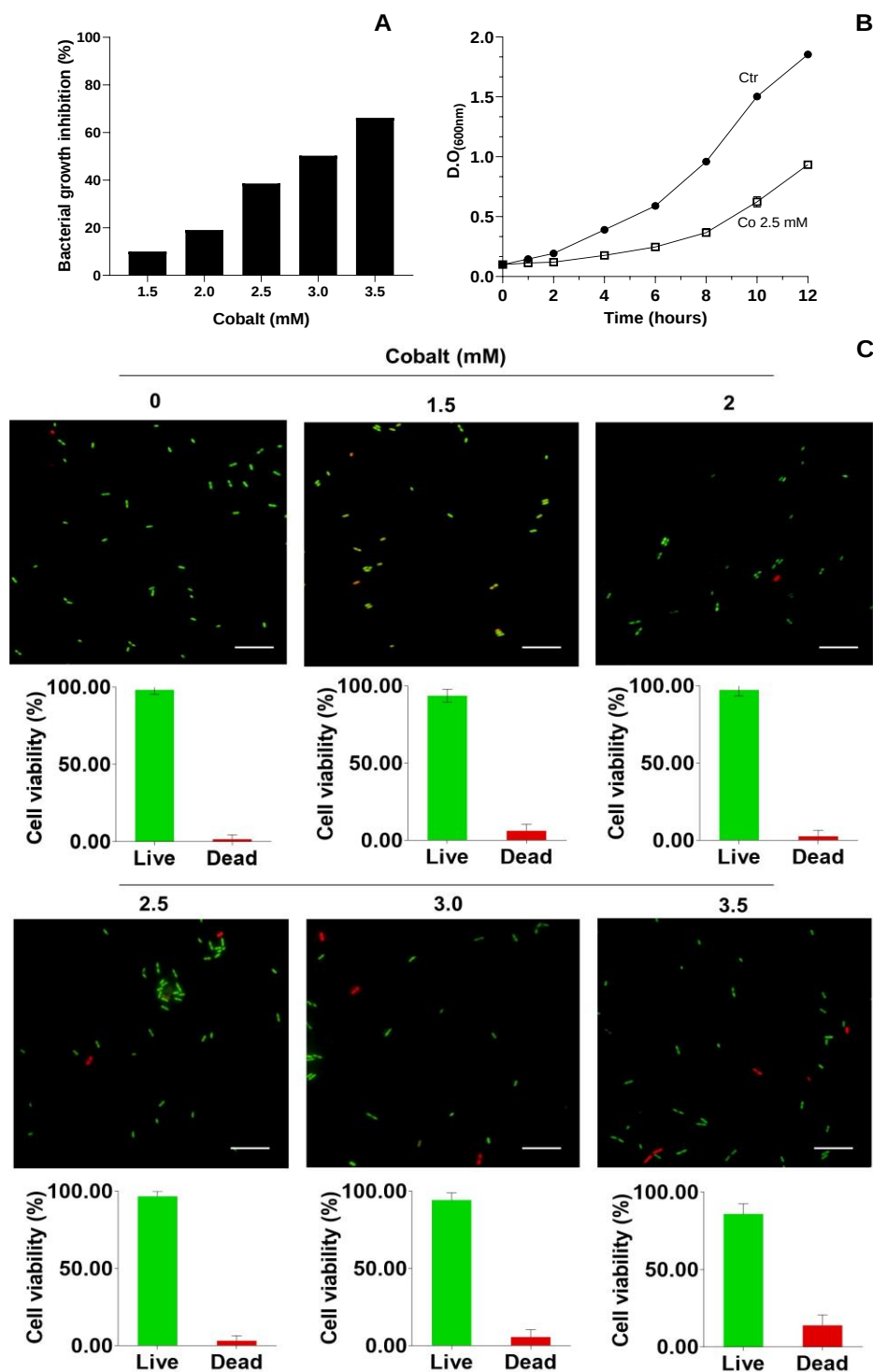


Figura 5. O cobalto induz a inibição do crescimento de *G. diazotrophicus*, mas não afeta a viabilidade celular. *G. diazotrophicus* foi cultivado por 12 h em meio líquido suplementado com diferentes concentrações de Co (0 – 3,5 mM). Os tratamentos foram analisados pelo kit Live/Dead Bacterial Viability, e seu desempenho de crescimento (a), curva de crescimento de *G. diazotrophicus* na presença ou ausência de 2,5 mM de CoCl_2 (b) e viabilidade celular (c). Barra 5 μm .

2.5.2 O Co causa alterações no perfil proteômico de *G. diazotrophicus*

Análises proteômicas comparativas por ESI-LC-MS/MS foram usadas para explorar os processos moleculares regulados em *G. diazotrophicus* quando exposta a 2,5 mM de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. No total, foram identificadas 700 proteínas (Tabela S1) (Figura 2A). Entre essas proteínas, 114 proteínas (16,28%) foram diferencialmente acumuladas, 70 acumuladas para cima e 44 acumuladas para baixo, em resposta ao metal (Fig. 2B). Uma proteína da família TolC, CzcC (A9HG75), foi observada exclusivamente em células de *G. diazotrophicus* expostas a $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Tabela S1).

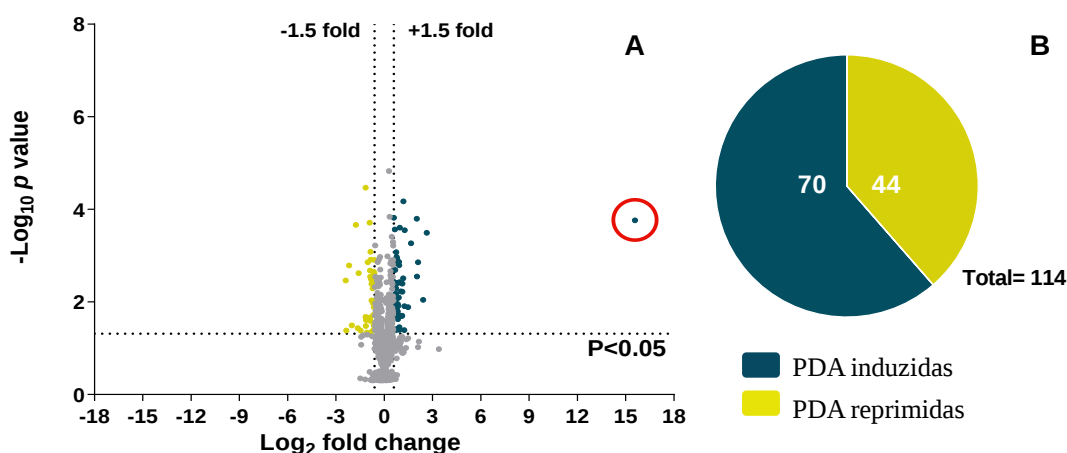


Figura 6. A exposição de *G. diazotrophicus* ao cobalto causa alterações proteômicas. (A) O Volcano plot mostra a mudança geral induzida no proteoma. (B) Representação gráfica das proteínas diferencialmente acumuladas (PDAs). Os pontos representam as proteínas identificadas (log₂ fold change) na análise proteômica, de acordo com o nível de significância estatística (-log₁₀ p-value) para $p < 0,05$. Os pontos amarelos representam proteínas reduzidas, os pontos azuis proteínas aumentadas, os pontos cinzas são proteínas que não sofreram alteração no grau de acumulação. O círculo vermelho representa a proteína superexpressa apenas no tratamento com Co.

2.5.3 Proteínas extracitoplasmáticas são reduzidas sob estresse de cobalto

Com o objetivo de investigar o efeito de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ no perfil de proteínas em diferentes compartimentos celulares, a previsão da localização celular dos 114 PDAs foi realizada usando a ferramenta de software PSORT (ver métodos). Respostas distintas foram observadas entre os compartimentos celulares (Figura 3). Com exceção da proteína CzcC (A9HG75) superexpressa na membrana externa, todas as proteínas reguladas nos compartimentos da superfície celular (2 PDAs no periplasma, 6 PDAs na membrana externa e 1 DAP extracelular) foram reduzidas (Figura 3). Identificamos que a maioria das proteínas reguladas (76,25%) pertencem ao compartimento citoplasmático (80 PDAs), onde 61 eram PDAs induzidas e 19 proteínas eram reprimidas. Além disso, 6 PDAs foram associados à membrana plasmática,

sendo duas reprimidas e quatro induzidas (5,26% do total de PDAs).

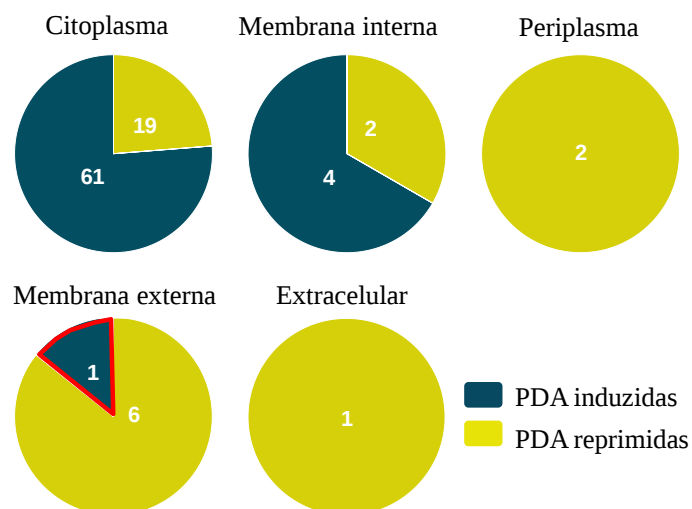


Figura 7. Proteínas de diferentes compartimentos celulares foram reguladas diferencialmente por Co em *G. diazotrophicus*. As PDAs identificadas foram classificadas pela localização subcelular prevista com o software FUEL-mLoc. A forma vermelha representa uma proteína superexpressa apenas no tratamento com Co.

2.5.4. Vias funcionais reguladas em *G. diazotrophicus* em resposta ao Co

Nossas análises proteômicas revelaram a regulação de proteínas potencialmente envolvidas na proteção das células de *G. diazotrophicus* contra o estresse por Co. Cinco vias funcionais foram identificadas por meio da caracterização funcional das PDAs: metabolismo do ferro, síntese e degradação de aminoácidos, controle da qualidade de proteínas, metabolismo de carboidratos e efluxo de MP's (Figura 4). Tais vias são descritas abaixo.

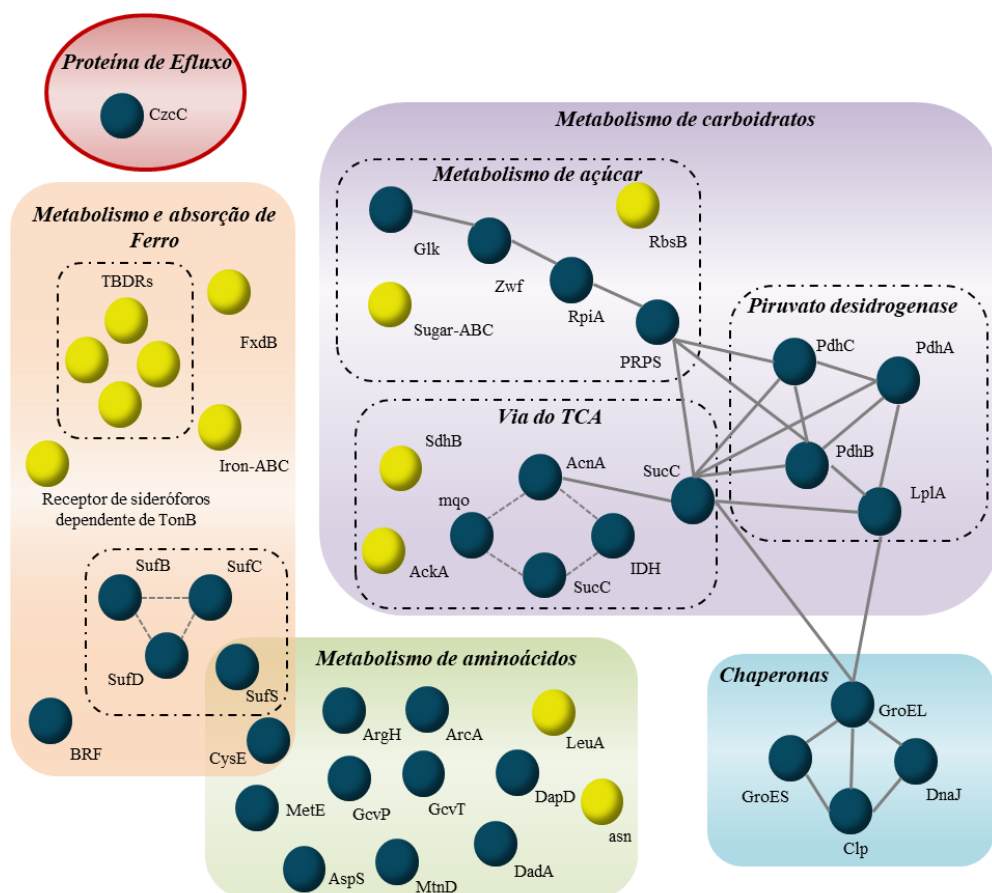


Figura 8. Representação das proteínas reguladas nos principais grupos funcionais em *G. diazotrophicus* durante estresse por Co. Redes de proteínas diferencialmente acumuladas identificadas por STRING (cinza) e grupos funcionais confirmados por busca manual no banco de dados NCBI. Bolas amarelas representam proteínas reprimidas e bolas azuis as proteínas induzidas.

2.5.4.1 Absorção e metabolismo de ferro

Treze proteínas associadas à captação e metabolismo do ferro foram reguladas em resposta ao Co, correspondendo a 11,4% das PDA's (Figura 4). Uma das vias reguladas foi a biogênese de clusters Fe-S, onde as proteínas SufB, SufC e SufD (A9HRY9, A9HRY6, A9HRY4) foram reguladas positivamente. Além disso, as proteínas cisteína dessulfurase - SufS (A9HRY2) e proteína serina O-acetiltransferase CysE (A9HMC8), componentes da via de biossíntese de aminoácidos contendo enxofre (cisteína e serina, respectivamente) foram superexpressas (Tabela 1).

Juntamente com a indução de clusters Fe-S, proteínas com função de armazenamento de ferro na célula também foram reguladas. Uma proteína contendo o domínio de ligação do cluster de ferro-enxofre 2Fe-2S (A9HMI7) foi regulada negativamente, enquanto uma Bacterioferritina (A9H7G6) foi induzida (Tabela 1).

Cinco receptores relacionados à absorção de ferro foram sub-regulados, sendo quatro receptores dependentes de TonB - TBDRs (A9H7M7, A9HEU6, A9H7L9 e A9HNM4) e um receptor de sideróforo dependente de TonB (A9H7L3). Além disso, um transportador de proteína de ligação ao substrato Iron ABC foi regulado negativamente (A9HK76) (Tabela 1).

Esses resultados indicam que o estresse de Co sugere a diminuição do sistema de absorção de nutrientes em *G. diazotrophicus*. Além disso, sugere um o aumento na biogênese dos aglomerados Fe-S.

2.5.4.2 Metabolismo de carboidratos

Dezesseis proteínas associadas ao metabolismo de carboidratos, correspondendo a 14 % das PDA's, foram reguladas em resposta ao Co. Seis dessas proteínas estão envolvidas na absorção e metabolismo de açúcares (Figura 4). Entre elas, duas proteínas, a proteína de ligação ao substrato do transportador de açúcar ABC e a proteína periplasmática de ligação à D-ribose (RbsB) (A9H577 e A9HPK6) estão associadas à absorção de glicose, além de quatro proteínas envolvidas com o metabolismo da glicose, RpiA, Glk, Zwf e PRPS (respectivamente, A9H338, A9HI04, A9H326 e A9HBZ3) (Tabela 1).

Três subunidades do complexo piruvato desidrogenase foram superexpressas: PdhA, PdhB e PdhC (A9HJA6, A9HJA9 e A9HJB2). Além disso, uma proteína LpdA - dihidrolipoil desidrogenase (A9HJB6) foi regulada positivamente. Quatro proteínas do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) foram induzidas, IDH, mgo, AcnA e SucC (respectivamente A9HJQ1, A9HKZ6, A9HEZ2 e A9HFD5) e uma reprimida, a SdhB (A9HFD5). Uma outra proteína que contribui para a síntese de Acetil-CoA a partir do acetato, a AckA (A9HGX6) foi reprimida (Tabela 1). Esses resultados indicaram que, em resposta ao estresse por Co, *G. diazotrophicus* intensifica o metabolismo de açúcares.

2.5.4.3 Metabolismo de aminoácidos

Onze proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos foram reguladas, correspondendo a 9,64% dos PDAs identificados em resposta ao Co. Entre elas estão as proteínas Argininosuccinato liase - ArgH (ARLY) e Arginina deiminase - ArcA (A9HNM6), envolvidas na síntese de L-arginina. ArgH foi induzida e ArcA reprimida na presença de Co. A Acireductona dioxigenase - MtnD (MTND) e homocisteína metiltransferase - MetE (A9HNX4) da biossíntese de L-metionina foram induzidas; D-aminoácido desidrogenase - DadA (A9HMX8), envolvido na degradação da L-alanina foi induzida; 2,3,4,5-tetrahidropiridina-2,6-dicarboxilato N-succiniltransferase - DapD (A9HKR5) da biossíntese de L-lisina foi induzida; 2-isopropilmalato sintase - LeuA (A9HDT4) da biossíntese de leucina foi reprimida

e o sistema de clivagem de glicina aminometiltransferase T - GcvT (A9HM51) e glicina desidrogenase - GcvP (A9HM48) envolvidas na síntese e ciclagem de glicina foi induzido.

Além disso, proteínas envolvidas na biossíntese e metabolismo de cisteína e serina (também relacionadas à absorção e metabolismo do ferro) foram induzidas: cisteína desulfurase-SufS (A9HRY2) e serina O-acetiltransferase (CysE-A9HMC8) (Tabela 1), indicando que a exposição ao estresse de Co aumenta a demanda de proteínas com grupamento de enxofre.

2.5.4.4 Controle de qualidade de proteínas

Quatro proteínas envolvidas na manutenção da conformação proteica (chaperonas) e no controle da qualidade proteica foram induzidas (Figura 4): DnaJ (DNAJ), funcionalmente associada ao enovelamento, reenovelamento e desagregação de polipeptídeos nascentes; as proteínas do sistema GroEL – GroES (CH602, A9HPH9) que atuam no enovelamento de proteínas intermediárias para o correto enovelamento de proteínas nativas (Tabela 1); e a subunidade proteolítica da Clp protease dependente de ATP (A9HRV4), que atua na proteólise de proteínas defeituosas e mal dobradas (Tabela 1), indicando que a exposição ao Co leva à ativação de sistemas proteolíticos em *G. diazotrophicus*.

2.5.4.5 Efluxo de compostos tóxicos

Apenas uma proteína de membrana externa do sistema de efluxo de compostos tóxicos, foi regulada pelo estresse de Co (Tabela 1). O componente CzcC (A9HG75) do canal de membrana externa do sistema tripartido de bombas de efluxo foi regulado positivamente, indicando que, sob estresse de Co, *G. diazotrophicus* ativa o sistema de efluxo multidrogas para transportar agentes tóxicos para fora da célula.

Tabela 1. Principais grupos funcionais regulados em *G. diazotrophicus* na presença de Co.

Grupos Funcionais	Acessos	Descrição	Localização	Fold Change
Proteína de efluxo	A9HG75	CzcC Efflux pump	Membrana externa	49176
Absorção e Metabolismo de ferro	A9HRY4	Fe-S cluster assembly protein SufD (SufD)	Citoplasma	2,40
	A9HRY6	Fe-S cluster assembly ATPase SufC (SufC)	Citoplasma	3,17
	A9HRY9	Fe-S cluster assembly protein SufB (SufB)	Citoplasma	6,23

A9HMI7	2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein (FxdB)	Citoplasma	0,60
A9H7G6	Bacterioferritin	Citoplasma	1,96
A9H7L3	TonB-dependent siderophore receptor (TBDT)	Membrana externa	0,33
A9H7M7	TonB-dependent receptor (TbdR)	Membrana externa	0,19
A9HEU6	TonB-dependent receptor (TbdR)	Membrana externa	0,45
A9H7L9	TonB-dependent receptor (TbdR)	Membrana externa	0,53
A9HNM4	TonB-dependent receptor (TbdR)	Membrana externa	0,55
A9HK76	Iron ABC transporter substrate-binding protein (Iron-ABC)	Periplasma	0,54
Metabolismo de Carboidratos			
A9H577	Sugar ABC transporter substrate-binding protein (Sugar-ABC)	Periplasma	0,62
A9HPK6	D-ribose-binding periplasmic protein (RbsB)	Periplasma	0,55
A9HI04	Glucokinase (Glk)	Citoplasma	1,54
A9H326	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (Zwf)	Citoplasma	1,71
A9HBZ3	ribose-phosphate pyrophosphokinase (PRPS)	Citoplasma	1,59
A9H338	ribose-5-phosphate isomerase (RpiA)	Citoplasma	1,58
A9HJB2	pyruvate dehydrogenase complex dihydrolipoamide acetyltransferase (PdhC)	Citoplasma	1,73
A9HJA9	pyruvate dehydrogenase complex E1 component subunit beta (PdhB)	Citoplasma	1,88
A9HJA6	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transfering) E1 component subunit alpha (PdhA)	Citoplasma	1,93
A9HJB6	dihydrolipoyl dehydrogenase (LpdA)	Citoplasma	1,78
A9HFB1	dihydrolipoyl dehydrogenase (SucC)	Citoplasma	1,62
A9HKZ6	malate:quinone oxidoreductase (mqo)	Citoplasma	1,68
A9HJQ1	Isocitrate dehydrogenase (IDH)	Citoplasma	1,57
A9HEZ2	aconitate hydratase (AcnA)	Citoplasma	1,55
A9HGX6	acetate/propionate family kinase (AckA)	Citoplasma	0,56
A9HFD5	Succinate dehydrogenase (SdhB)	Citoplasma	0,55
Metabolismo de aminoácidos			
ARLY	argininosuccinate lyase (ArgH)	Citoplasma	1,63
A9HRY2	Cysteine desulfurase (SufS)	Citoplasma	1,59
A9HMC8	serine O-acetyltransferase (CysE)	Citoplasma	1,52
MTND	acireductone dioxygenase (MtnD)	Citoplasma	4,29
A9HNX4	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase (MetE)	Citoplasma	1,89

Chaperonas	A9HMX8	D-amino acid dehydrogenase (DadA)	Membrana interna	1,58
	A9HKR5	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase (DapD)	Citoplasma	1,6
	A9HMA2	2-isopropylmalate synthase (LeuA)	Citoplasma	0,61
	A9HM51	glycine cleavage system aminomethyltransferase (GcvT)	Citoplasma	1,64
	A9HM48	aminomethyl-transferring glycine dehydrogenase (GcvP)	Citoplasma	1,77
	A9HNM6	arginine deiminase (ArcA)	Citoplasma	0,58
	DNAJ	molecular chaperone DnaJ	Citoplasma	1,80
	CH602	chaperonin GroEL	Citoplasma	4,10
	A9HPH9	co-chaperone GroES	Citoplasma	5,37
	A9HRV4	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	Citoplasma	1,66

2.5.5 Análise de genética reversa revela proteínas essenciais na resistência ao estresse por Co

A relevância das cinco vias funcionais acima mencionadas foi validada por genética reversa, usando nocautes insercionais. Nesse sentido, comparou-se o crescimento de linhagens nocautes de *G. diazotrophicus*, nocautes para genes relacionados ao metabolismo de carboidratos (*zwf* e *pdhB*), metabolismo de aminoácidos (*argH*), absorção e metabolismo de ferro (*tbdR*) e efluxo de compostos tóxicos (*czcC*) com a resposta da cepa selvagem, sob diferentes concentrações de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Cada nocaute apresentou sensibilidade diferente ao estresse de Co em comparação com a cepa selvagem (Figura 5). O nocaute *czcC* foi o mais sensível ao Co. O *czcC* foi fortemente afetado e apresentou inibição do crescimento mesmo na menor concentração de Co testada. A ligeira sensibilidade demonstrada por *zwf* e *pdhB* destaca a importância do metabolismo de carboidratos para a tolerância ao Co (Figura 5). Esses resultados destacam o papel essencial das vias relacionadas ao metabolismo de carboidratos e efluxo de compostos tóxicos para a resistência bacteriana ao estresse por Co.

A relevância desses nocautes para a resistência ao Co sugeriu investigar suas respostas a outros metais. Na Figura 5 foi possível observar o comportamento dos nocautes em diferentes concentrações de cádmio (Cd) e zinco (Zn). O nocaute *czcC* foi fortemente sensível a Cd e Zn, semelhante ao encontrado para Co. Curiosamente, a resposta de *tbdR* sugere maior tolerância as concentrações utilizadas no estresse por Co, o que pode indicar que se aumentarmos a concentração desse metal, a sensibilidade pode aparecer. Em contrapartida,

tbdR mostrou alta sensibilidade a Cd e Zn. Adicionalmente, *argH* apresentou um comportamento semelhante ao *tbdR*, com maior sensibilidade ao Cd e Zn, mas tolerância às concentrações de Co. O nocaute *zwf* mostra um leve aumento na sensibilidade na presença de Co, Cd e Zn. *pdhB* mostra resistência a concentrações de Cd com comportamento semelhante à cepa selvagem, mas uma leve sensibilidade a Co e Zn. Embora para alguns nocautes tenham respostas distintas nas concentrações utilizadas de Co, Cd e Zn, os resultados sugerem que os metais compartilham genes de resposta, mas que cada metal promove respostas específicas em *G. diazotrophicus*.

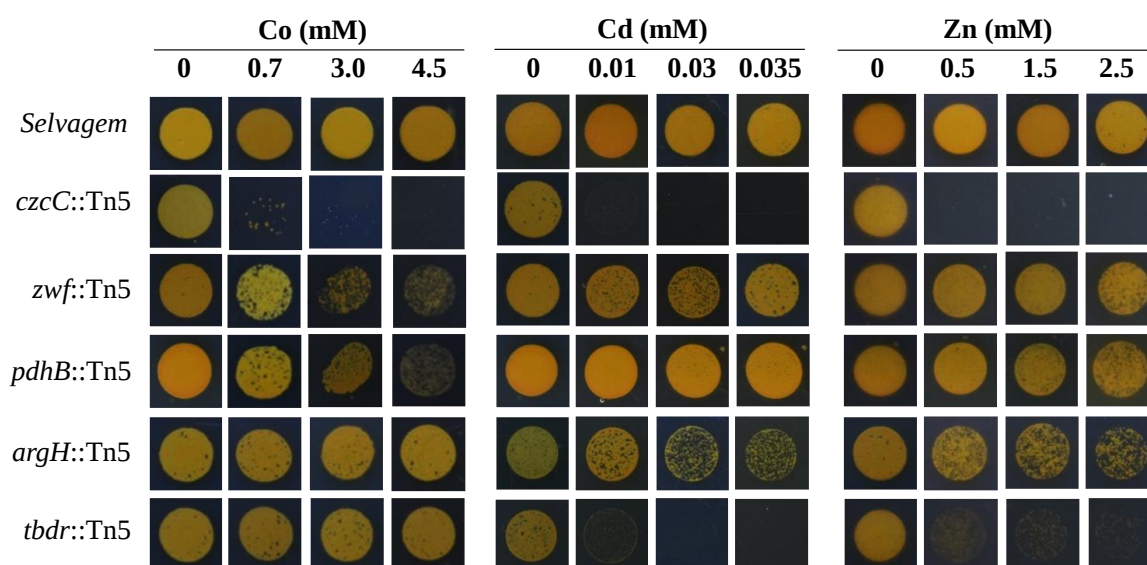


Figura 9. CzcC está envolvido na resistência de *G. diazotrophicus* a metais. *G. diazotrophicus* selvagem e nocautes $\Delta czcC$, Δzwf , $\Delta pdhB$, $\Delta argH$ e $\Delta tbdR$ foram cultivados até DO_{600nm} de 1,0 em meio líquido LGI sob agitação constante. As culturas foram transferidas para microplacas de 96 poços e carimbadas em meio LGI sólido suplementado com 0, 0,7, 3,0 e 4,5 mM de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0 - 0,035 mM de $CdCl_2 \cdot H_2O$ e 0 - 2,5 mM de $ZnCl_2 \cdot H_2O$, com um replicador de 96 pinos. Os resultados foram registrados após cinco dias de exposição ao estresse do Co a 30°C.

3. Discussão

G. diazotrophicus PA15 é um BPCV altamente versátil, capaz de crescer em ambientes com altas concentrações de metais (Intorne et al., 2012). O presente estudo revelou que esta bactéria modula diferentes mecanismos moleculares para mitigar os efeitos tóxicos do Co. Este metal inibiu fortemente o crescimento bacteriano, mas não induziu a morte celular, o que sugere a ativação de mecanismos de resistência. A proteômica e a genética reversa permitiram identificar os mecanismos de resposta/resistência ao estresse ativados pelo Co. Dentre esses mecanismos, o efluxo de compostos tóxicos mostrou-se essencial para a resistência de *G. diazotrophicus* ao Co.

Na bactéria gram-negativa *G. diazotrophicus* os compartimentos extracitoplasmáticos desencadeiam respostas de estresse para manter a homeostase celular (Leandro et al., 2021a; Leandro et al., 2021c; Moreira et al., 2022). A exposição de *G. diazotrophicus* ao estresse osmótico e ao excesso de cádmio promoveu uma regulação negativa de proteínas associadas aos compartimentos extracitoplasmáticos (periplasma, membrana externa e extracelular) (Leandro et al., 2021a; Leandro et al., 2021c; Moreira et al., 2022). Nossos dados mostram a regulação negativa de 9 proteínas extracitoplasmáticas. oito dessas proteínas reprimidas estão relacionadas com a absorção de nutrientes, principalmente ferro e açúcar. Esses dados sugerem que a regulação das proteínas extracitoplasmáticas fazem parte dos mecanismos de resistência de *G. diazotrophicus* ao Co.

Sobre as proteínas relacionadas com a absorção de nutrientes, observamos a regulação negativa de quatro proteínas da classe TonB, além de um receptor de sideróforo dependente de TonB, um transportador de ferro ABC, um transportador de açúcar ABC e uma proteína periplasmática de ligação a D-ribose (RbsB). sob excesso de Co. Todas as proteínas TonB (A9H7M7, A9HEU6, A9H7L9 e A9HNM4) reguladas negativamente no estresse por Co também foram reprimidas na presença de Cd, NaCl, PEG e, na presença de sacarose apenas A9H7M7 e A9HEU6 foram reprimidas em *G. diazotrophicus*. Uma resposta comum a todos esses estresses foi a regulação negativa da TonB-dependent siderophore receptor (A9H7L3) (Leandro, et al., 2020; Leandro et al., 2021a; Leandro et al., 2021b; Moreira et al., 2022).

A regulação negativa de proteínas da membrana externa altera a fluidez da membrana. Essa estratégia reduz a entrada de compostos tóxicos na célula, por outro lado (Yoon et al., 2015), dificulta a entrada de moléculas essenciais, como ferro e glicose. Uma análise de genética reversa mostrou que o nocaute de *tbdR::Tn5* não aumenta a sensibilidade de *G. diazotrophicus* ao Co. Embora a sensibilidade do nocaute de *tbdR::Tn5* a outros metais (Cd e

Zn) tenha afetado drasticamente a resistência da bactéria (Figura 5). Estas respostas sugerem que este TbdR específico é essencial para a sobrevivência de *G. diazotrophicus* às condições de estresse de Cd e Zn e provavelmente outras TonB em níveis baixos são suficientes para resistência ao Co. Além disso, as concentrações utilizadas de Co são inferiores às concentrações que causam sensibilidade nesse nocaute sem afetar a sensibilidade da cepa selvagem. A regulação negativa dos transportadores de nutrientes da superfície celular de *G. diazotrophicus* demonstram a importância desse grupo de proteínas como um mecanismo de defesa a condições estressantes.

Para compensar o influxo de metais, as células induzem a expressão de sistemas de efluxo (Nies, 1992; Zheng et al., 2019). Quando *G. diazotrophicus* foi exposto ao Co, apenas CzcC foi fortemente induzida no espaço extracitoplasmático. Além disso, a mutação do gene *czcC* (Figura 5) resultou em forte sensibilidade ao estresse por Co, Cd e Zn. Estudos sobre a contribuição individual de CzcC, CzcB e CzcA para o efluxo de metais mostram que, em *Cupriavidus metallidurans* CH34, a deleção de *czcC* reduziu a resistência a cátions metálicos e resultou em maior perda de resistência ao Co (Nies, 1992; Rensing et al., 1997). Entretanto, os genes *czcCBA* estão organizados em um *operon* e *czcC* é o primeiro gene do operon *czcCBA* de *G. diazotrophicus*. O papel do operon *czcCBA* na resistência de *G. diazotrophicus* a metais foi previamente demonstrado por Intorne et al. (2012) que destacaram o papel determinante do gene *czcA* na resistência a Co, Cd e Zn. Foi determinado que a concentração mínima inibitória de Co para *G. diazotrophicus* é de 20 mM, mas a primeira concentração a induzir sensibilidade no nocaute *czcA* foi de 2 mM (Intorne et al., 2012). Essa concentração é diferente da encontrada em nossos experimentos, notavelmente porque o trabalho de Intorne et al., (2012) utilizou meio sólido e em nosso trabalho foi utilizado meio líquido. A diferença entre os meios disponibiliza o metal de forma diferente, acentuando a sua toxicidade em meio líquido. O nocaute *czcC* foi drasticamente sensível a 0,7 mM. Provavelmente a interrupção do gene *czcC* interrompeu a transcrição de *czcB* e *czcA*. Nossos dados não são suficientes para esclarecer se a não detecção da proteína CzcA nas análises proteômicas indica que o gene *czcA* não foi transcrito e que a proteína CzcC é capaz de lidar com o excesso de Co. Mas, nossos dados reforçam a importância do sistema CzcCBA na resistência de *G. diazotrophicus* ao Co, Cd e Zn.

Nossos dados proteômicos mostraram que *G. diazotrophicus* modula diferencialmente o envelope celular e as proteínas citoplasmáticas. Dentre as respostas citoplasmáticas, *G. diazotrophicus* induziu a expressão de SufBCD na presença de Co. Essas proteínas distintas compõem o Sistema Suf responsável pela biossíntese dos aglomerados de Fe-S, que atuam como cofatores de proteínas associadas à transferência de elétrons, catálise redox e não-redox

e detecção de processos regulatórios (Takahashi & Tokumoto, 2002; Yuda et al., 2017). A regulação da maquinaria relacionada à biossíntese *de novo* de aglomerados Fe-S em condições de estresse oxidativo é uma resposta comum ao excesso de Co (Fontecave et al., 2005; Ranquet et al., 2007; Ray et al., 2013).

A falta de aglomerados de Fe-S em *E. coli* mostrou que os aglomerados de Fe-S são os primeiros alvos da toxicidade do Co (Fantino et al., 2010; Ranquet et al., 2007). A indução da expressão de SufBCD, portanto, sugere que podem atuar indiretamente na resistência de *G. diazotrophicus* aumentando a síntese de aglomerados Fe-S, substituindo aglomerados Fe-S não funcionais para manter a homeostase celular. Essa hipótese é reforçada porque esses aglomerados Fe-S mobilizam enxofre pela cisteína dessulfurase (SufS) que foi regulada positivamente em nossa análise proteômica. SufS converte L-cisteína em L-alanina e sulfato de enxofre, transportando o elemento para vários receptores de enxofre, dependendo da via fisiológica (Chahal et al., 2009; Tian et al., 2014). CysE, serina O-acetiltransferase, proteína induzida, também está associada à biossíntese de L-cisteína, o que indica uma alta demanda de enxofre para o processamento celular.

Durante a resposta de Co, observamos o acúmulo de MetE, enzima da última etapa da biossíntese *de novo* de metionina a partir da homocisteína, o que indica que na presença de Co, *G. diazotrophicus* induz a produção de metionina. Junto com SufS e CysE, o MetE está envolvido no metabolismo de aminoácidos sulfurados e foi regulado positivamente sob Co. CysE e MetE respondem sob condições de estresse oxidativo para aumentar a produção de cisteína e metionina (Hondorp & Matthews, 2004). O acúmulo de MetE pode aumentar a disponibilidade de metionina sob condições de estresse e manter a funcionalidade dos processos biossintéticos celulares (Mordukhova & Pan, 2013).

ArgH, que participa da produção de arginina, também foi acumulado na presença de Co. No entanto, ao investigar o papel essencial do gene *argH::Tn5* sob Co, o nocaute mostrou alta tolerância a esse metal. Além disso, o nocaute se mostrou sensível às concentrações utilizadas de Cd e Zn, o que sugere que as concentrações utilizadas de Co não foram suficientes para induzir sensibilidade no nocaute. O catabolismo da arginina ajuda a manter o pH citoplasmático e sob estresse ácido, uma bactéria utiliza o catabolismo de arginina via arginina deiminase (ADI) como mecanismo de proteção (Cusumano & Caparon, 2015). Entretanto, a proteína ArcA (arginina deiminase), componente do ADI foi reprimida nas nossas condições experimentais.

O GcvP e o GcvT também foram regulados positivamente. Esta proteína pertence ao *Glycine Cleavage System* (GC System) que é ativado durante a superprodução de glicina e gera amônia, CO₂ e metileno (Xu et al., 2022). As proteínas componentes do sistema GC

foram diretamente relacionadas com a taxa da síntese de glicina. No entanto, ensaios in vitro sobre a atividade do sistema GC na presença de metais bivalentes indicaram 100% de inibição da atividade na presença de Co e Zn (Xu et al., 2022). Além disso, o Co interage com o grupo tiol e inativa a maioria das enzimas, o que provavelmente indica que *G. diazotrophicus* aumenta os níveis dessas proteínas para suprir as proteínas danificadas. Outros estudos são necessários para melhor elucidar o *Glycine Cleavage System* presente em *G. diazotrophicus* e seu papel na resistência a metais.

Estudos proteômicos também demonstraram a regulação positiva de várias proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos. A indução de 16 dessas proteínas sugere que *G. diazotrophicus* aumenta o metabolismo de carboidratos como uma estratégia de resposta ao excesso de Co. Seis proteínas do metabolismo de açúcares (Glk, Zwf, Gdh, BudA, PRPS e RpiA) acumularam-se no tratamento com Co. O aumento da regulação de Glk, Zwf, RpiA e PRPS, enzimas independentes de íons metálicos, sugere que o uso da via das pentose-fosfato pode ser um aumento da alteração metabólica adaptativa à resistência ao excesso de Co em *G. diazotrophicus*, como ocorre em *Streptococcus pneumoniae* sob estresse por cádmio (Neville et al., 2020). A ativação da via das pentose-fosfato ocorre principalmente como uma resposta ao estresse oxidativo quando os níveis de moléculas antioxidantes são aumentados (NADPH), mas também é a via para a formação de precursores de aminoácidos aromáticos e de ribose 5-fosfato que é necessário para formar o RNA e o DNA (Sandoval et al., 2011; Stincone et al., 2015). Nas condições testadas neste trabalho, não identificamos níveis alterados de proteínas com atividades antioxidantes. Em trabalhos futuros poderá ser avaliada a expressão e atividade das enzimas antioxidantes de *G. diazotrophicus* na presença de Co. Assim, será possível elucidar se o estresse foi suficiente para induzir a formação de ROS nas células.

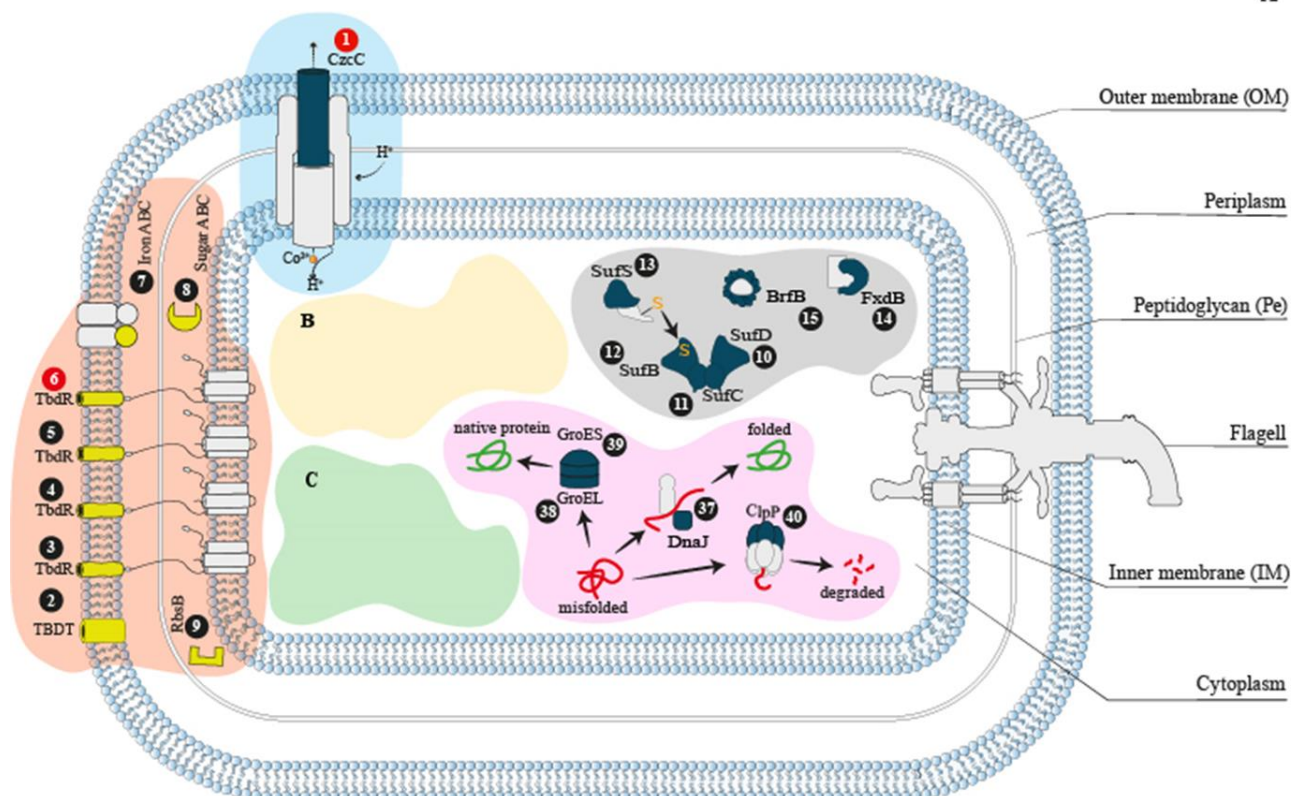
No pacote de proteínas induzidas no metabolismo de carboidratos podemos observar que *G. diazotrophicus* também ativa o metabolismo do piruvato e o ciclo do TCA. O ciclo do TCA é muito importante no metabolismo central produzindo precursores e como fonte de energia para a sobrevivência celular (Rezaei et al., 2015). *Pseudomonas putidas* apresentou níveis acumulados de isocitrato desidrogenase, succinil-CoA sintase e citrato sintase na presença de níquel e Co, o que indica que o metabolismo de carboidratos é afetado principalmente no ciclo do TCA durante esses estresses. O fato de *G. diazotrophicus* induzir a expressão do metabolismo de carboidratos destaca o papel essencial dessas enzimas para a tolerância ao excesso de Co.

Durante o estresse por Co, quatro chaperonas foram induzidas no citoplasma, possivelmente envolvidas na homeostase conformacional de proteínas celulares (Sharma et al.,

2008; Tang et al., 2008). As chaperonas DnaJ, Clp, GroEL e GroES foram reguladas positivamente. Durante o estresse abiótico, as estruturas das proteínas são danificadas, levando a uma perda de viabilidade celular na população bacteriana (Tamarit et al., 1998). Além disso, baixos níveis de GroEL/ES diminuem a capacidade de sobrevivência quando as bactérias são desafiadas por estresse abiótico, enquanto baixos níveis de DnaK/DnaJ têm o fenótipo selvagem (Susin et al., 2006). A superexpressão de *groES* e *groEL* aumentou o crescimento celular e a sobrevivência de *Zymomonas mobilis* sob estresse abiótico (Kaewchana et al., 2021). Embora não tenhamos investigado outros estresses, existem várias linhas de evidência que confirmam que a superexpressão de *groEL* aumenta a tolerância ao estresse e o controle efetivo do dobramento de proteínas celulares (Gupta et al., 2006; Zhang et al., 2017). A indução de DnaJ, Clp, GroEL e GroES melhora o reparo de proteínas danificadas durante a resposta de *G. diazotrophicus* ao estresse por Co.

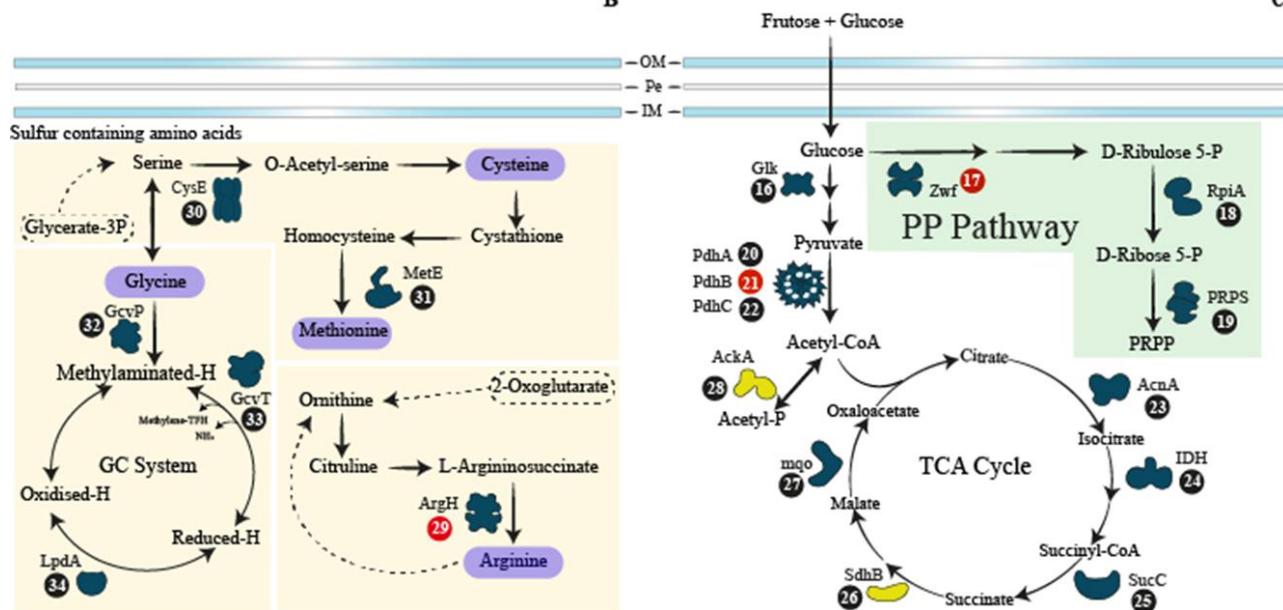
A Figura 6 resume os principais mecanismos de resposta de *G. diazotrophicus* ao estresse por Co deduzidos da análise de proteômica e genética reversa. Primeiro, a regulação negativa de proteínas extracitoplasmáticas relacionadas à absorção de nutrientes reduz a entrada de Co no citoplasma. Ao mesmo tempo, a indução do sistema CzcC na membrana externa promove o efluxo de Co. Para atenuar os efeitos do Co no citoplasma, a bactéria regula positivamente os mecanismos de produção de aglomerados de Fe-S, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de carboidratos e controle de qualidade de proteínas.

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram aspectos moleculares da resposta/resistência de *G. diazotrophicus* ao estresse por Co, com destaque para a regulação de proteínas extracitoplasmáticas, ativação de mecanismos de redução de danos citoplasmáticos e o papel essencial do sistema de efluxo de compostos tóxicos (CzcC). Esses achados contribuem para a compreensão dos mecanismos ativados durante a resposta a MP's em *G. diazotrophicus*.



B

C



GC System = Glycine Cleavage System; PP Pathway = Pentose Phosphate Pathway; TCA Cycle = Tricarboxylic Acid Cycle.

Figura 10. Ilustração esquemática das principais respostas de *G. diazotrophicus* ao estresse por Co. As formas azul e amarela representam proteínas classificadas como induzidas e reprimidas, respectivamente, e as formas cinza representam proteínas não reguladas. Os números em vermelhos indicam nocautes da figura 5. Informações detalhadas sobre cada proteína neste esquema são fornecidas na Tabela S3.

4. Referências

- Akcil, A., Erust, C., Ozdemiroglu, S., Fonti, V., & Beolchini, F. (2015). A review of approaches and techniques used in aquatic contaminated sediments: Metal removal and stabilization by chemical and biotechnological processes. **Journal of Cleaner Production**, 86, 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.08.009>
- Ali, B., Hayat, S., Hayat, Q., & Ahmad, A. (2010). Cobalt stress affects nitrogen metabolism, photosynthesis and antioxidant system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Journal of Plant Interactions**, 5(3), 223–231. <https://doi.org/10.1080/17429140903370584>
- Azarakhsh, M. R., Asrar, Z., & Mansouri, H. (2015). Effects of seed and vegetative stage cysteine treatments on oxidative stress response molecules and enzymes in *Ocimum basilicum* L. under cobalt stress. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 15(3), 651–662. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000044>
- Barbosa, E. A., Perin, L., & Reis, V. M. (2006). Use of different carbon sources by strains of *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolated from sugarcane. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, 41(5), 827–833. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2006000500015>
- Barras, F., & Fontecave, M. (2011). Cobalt stress in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: Molecular bases for toxicity and resistance. In **Metallomics** (Vol. 3, Issue 11, pp. 1130–1134). <https://doi.org/10.1039/c1mt00099c>
- Beard, S. J., Hughes, M. N., & Poole, R. K. (1995). Inhibition of the cytochrome bd-terminated NADH oxidase system in *Escherichia coli* K-12 by divalent metal cations. **FEMS Microbiology Letters**, 131(2), 205–210. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00260-C](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00260-C)
- Bertalan, M., Albano, R., de Pádua, V., Rouws, L., Rojas, C., Hemerly, A., Teixeira, K., Schwab, S., Araujo, J., Oliveira, A., França, L., Magalhães, V., Alquéres, S., Cardoso, A., Almeida, W., Loureiro, M. M., Nogueira, E., Cidade, D., Oliveira, D., Ferreira, P. C. G. (2009). Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics**, 10, 450. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-450>
- Boniolo, F. S., Rodrigues, R. C., Delatorre, E. O., Da Silveira, M. M., Flores, V. M. Q., & Berbert-Molina, M. A. (2009). Glycine betaine enhances growth of nitrogen-fixing bacteria *gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 under saline stress conditions. **Current Microbiology**, 59(6), 593–599. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9479-7>
- Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 45(3), 198–207. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1860>
- Cavalcante, V. A., & Dobereiner, J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, 108(1), 23–31. <https://doi.org/10.1007/BF02370096>
- Chahal, H. K., Dai, Y., Saini, A., Ayala-Castro, C., & Outten, F. W. (2009). The SufBCD Fe-S scaffold complex interacts with sufA for Fe-s cluster transfer. **Biochemistry**, 48(44), 10644–10653. <https://doi.org/10.1021/bi901518y>
- Chandrangsu, P., & Helmann, J. D. (2016). Intracellular Zn(II) Intoxication Leads to Dysregulation of the PerR Regulon Resulting in Heme Toxicity in *Bacillus subtilis*. **PLoS Genetics**, 12(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006515>
- Chandrangsu, P., Rensing, C., & Helmann, J. D. (2017). Metal homeostasis and resistance

- in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, 15(6), 338–350. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.15>
- Cheng, J., Poduska, B., Morton, R. A., & Finan, T. M. (2011). An ABC-type cobalt transport system is essential for growth of *Sinorhizobium meliloti* at trace metal concentrations. **Journal of Bacteriology**, 193(17), 4405–4416. <https://doi.org/10.1128/JB.05045-11>
- Cobalt Institute. (2021). State of the Cobalt market report 2020. **Cobalt Institute**. www.cobaltinstitute.org
- Cusumano, Z. T., & Caparon, M. G. (2015). Citrulline protects *Streptococcus pyogenes* from acid stress using the arginine deiminase pathway and the F1Fo-ATPase. **Journal of Bacteriology**, 197(7), 1288–1296. <https://doi.org/10.1128/JB.02517-14>
- Damerval, C., De Vienne, D., Zivy, M., & Thiellement, H. (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, 7(1), 52–54. <https://doi.org/10.1002/elps.1150070108>
- De Oliveira, M. V. V., Intorne, A. C., Vespoli, L. de S., Madureira, H. C., Leandro, M. R., Pereira, T. N. S., Olivares, F. L., Berbert-Molina, M. A., & De Souza Filho, G. A. (2016). Differential effects of salinity and osmotic stress on the plant growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **Archives of Microbiology**, 198(3), 287–294. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1176-2>
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., Levin, Y., Schild, H., & Tenzer, S. (2014). Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. **Nature Methods**, 11(2), 167–170. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2767>
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., & Tenzer, S. (2016). Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics. **Nature Protocols**, 11(4), 795–812. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.042>
- Earl, C., Shah, I. H., Cook, S., & Cheeseman, C. R. (2022). Environmental Sustainability and Supply Resilience of Cobalt. **Sustainability (Switzerland)**, 14(7), 1–10. <https://doi.org/10.3390/su14074124>
- Eitinger, T., Suhr, J., Moore, L., & Smith, J. A. C. (2005). Secondary transporters for nickel and cobalt ions: Theme and variations. **BioMetals**, 18(4), 399–405. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-3714-x>
- Fantino, J. R., Py, B., Fontecave, M., & Barras, F. (2010). A genetic analysis of the response of *Escherichia coli* to cobalt stress. **Environmental Microbiology**, 12(10), 2846–2857. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02265.x>
- Farnia, A., & Hasanpoor, K. (2015). Comparison between Effect of Chemical and Biological Fertilizers on Yield and Yield Components Wheat (*Triticum aestivum* L.) Pishtaz Cultivar. **International Bimonthly Indian Journal Of Natural Sciences** www.tnsroindia.org. © IJONS, 5(30), 976–997. www.tnsroindia.org.
- Fernandes, G. W., Goulart, F. F., Ranieri, B. D., Coelho, M. S., Dales, K., Boesche, N., Bustamante, M., Carvalho, F. A., Carvalho, D. C., Dirzo, R., Fernandes, S., Galetti, P. M., Millan, V. E. G., Mielke, C., Ramirez, J. L., Neves, A., Rogass, C., Ribeiro, S. P., Scariot, A., & Soares-Filho, B. (2016). Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. **Natureza e Conservacao**, 14(2), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.ncon.2016.10.003>
- Ferronato, N., & Torretta, V. (2019). Waste mismanagement in developing countries: A review of global issues. **International Journal of Environmental Research and Public**

- Health**, 16(6). <https://doi.org/10.3390/ijerph16061060>
- Fisher, H. (2022). Cobalt Market Report 2021. **Cobalt Institute**. https://www.cobaltinstitute.org/wp-content/uploads/2022/05/FINAL_Cobalt-Market-Report-2021_Cobalt-Institute-1.pdf
- Fisher, K. G. (2011). Cobalt Processing Developments. **The Southern African Institute of Mining and Metallurgy 6th Southern African Base Metals Conference**, 0(0), 237–258.
- Fisher, K., & Newton, W. E. (2005). Nitrogenase proteins from *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane-colonizing bacterium. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, 1750(2), 154–165. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.04.010>
- Fonseca, D. S. (2019). Sumário Mineral Brasileiro 2018 - Cobalto (Issue 1).
- Fontecave, M., Choudens, S. O. De, Py, B., & Barras, F. (2005). Mechanisms of iron-sulfur cluster assembly: The SUF machinery. In **Journal of Biological Inorganic Chemistry** (Vol. 10, Issue 7, pp. 713–721). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00775-005-0025-1>
- Fung, D. K. C., Lau, W. Y., Chan, W. T., & Yan, A. (2013). Copper efflux is induced during anaerobic amino acid limitation in *Escherichia coli* to protect iron-sulfur cluster enzymes and biogenesis. **Journal of Bacteriology**, 195(20), 4556–4568. <https://doi.org/10.1128/JB.00543-13>
- Gadd, G. M. (2010). Metals, minerals and microbes: **Geomicrobiology and bioremediation. Microbiology**, 156(3), 609–643. <https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0>
- Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R. M., Stephan, M. P., Teixeira, K. R. S., Dobereiner, J., & De Ley, J. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 39(3), 361–364. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-361>
- Gupta, P., Aggarwal, N., Batra, P., Mishra, S., & Chaudhuri, T. K. (2006). Co-expression of chaperonin GroEL/GroES enhances in vivo folding of yeast mitochondrial aconitase and alters the growth characteristics of *Escherichia coli*. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 38(11), 1975–1985. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.05.013>
- Guzman, J., & Vilcinskis, A. (2022). Genome analysis suggests the bacterial family Acetobacteraceae is a source of undiscovered specialized metabolites. Antonie van Leeuwenhoek, **International Journal of General and Molecular Microbiology**, 115(1), 41–58. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01676-7>
- Hassan, M. U., Chattha, M. U., Khan, I., Chattha, M. B., Aamer, M., Nawaz, M., Ali, A., Khan, M. A. U., & Khan, T. A. (2019). Nickel toxicity in plants: Reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, 26(13), 12673–12688. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04892-x>
- He, Z., Shentu, Yang, X., Baligar, Zhang, T., & Stoffella, &. (2015). Heavy Metal Contamination of Soils: Sources, Indicators, and Assessment. **Journal of Environmental Indicators**, 9(Table 2), 17–18.
- Heider, M. (2018). Perspectivas do Cobalto no Brasil. In the **Mine**. <https://www.inthemine.com.br/site/perspectivas-do-cobalto/>

- Hondorp, E. R., & Matthews, R. G. (2004). Oxidative stress inactivates cobalamin-independent methionine synthase (MetE) in *Escherichia coli*. **PLoS Biology**, 2(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020336>
- Intorne, A. C., de Oliveira, M. V. V., de M Pereira, L., & de Souza Filho, G. A. (2012). Essential role of the *czc* determinant for cadmium, cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. **International Microbiology**, 15(2), 69–78. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.160>
- Intorne, A. C., De Oliveira, M. V. V., Lima, M. L., Da Silva, J. F., Olivares, F. L., & De Souza Filho, G. A. (2009). Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. **Archives of Microbiology**, 191(5), 477–483. <https://doi.org/10.1007/s00203-009-0472-0>
- Isabella Sanseverino, Anna Navarro Cuenca, Robert Loos, Dimitar Marinov, & Teresa Lettieri. (2018). State of the art on the contribution of water to antimicrobial resistance. In **Publications Office of the European Union**. <https://doi.org/doi:10.2760/771124>
- Itelima, J. U., Bang, W. J., Onyimba, I. A., Sila, M. D., & Egber, O. J. (2018). Bio-fertilizers as Key Player in Enhancing Soil Fertility and Crop Productivity: A Review. **Journal of Microbiology**, 2(1), 74–83. <http://irepos.unijos.edu.ng/jspui/handle/123456789/1999%0Ahttps://dspace.unijos.edu.ng/jspui/bitstream/123456789/1999/1/Itelima-et-al%281%29.pdf>
- Jain, D., Kour, R., Bhojiya, A. A., Meena, R. H., Singh, A., Mohanty, S. R., Rajpurohit, D., & Ameta, K. D. (2020). Zinc tolerant plant growth promoting bacteria alleviates phytotoxic effects of zinc on maize through zinc immobilization. **Scientific Reports**, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70846-w>
- Jimenez-Salgado, T., Fuentes-Ramirez, L. E., Tapia-Hernandez, A., Mascarua-Esparza, M. A., Martinez-Romero, E., & Caballero-Mellado, J. (1997). *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 63(9), 3676–3683. <https://doi.org/10.1128/aem.63.9.3676-3683.1997>
- Jones, H., & Boger, D. V. (2012). Sustainability and waste management in the resource industries. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, 51(30), 10057–10065. <https://doi.org/10.1021/ie202963z>
- Kaewchana, A., Techaparin, A., Boonchot, N., Thanonkeo, P., & Klanrit, P. (2021). Improved high-temperature ethanol production from sweet sorghum juice using *Zymomonas mobilis* overexpressing *groESL* genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 105(24), 9419–9431. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11686-0>
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K., & Swings, J. (2006). The Family Acetobacteraceae: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. In **The Prokaryotes**. https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_9
- Kobayashi, M., & Shimizu, S. (1999). Cobalt proteins. **European Journal of Biochemistry**, 261(1), 1–9. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00186.x>
- Leandro, M. R., Andrade, L. F., de Souza Vespoli, L., Moreira, J. R., Pimentel, V. R., Soares, F. S., Passamani, L., Silveira, V., & de Souza Filho, G. (2021). Comparative proteomics reveals essential mechanisms for osmotolerance in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Research in Microbiology**, 172(1), 103785. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.09.005>
- Leandro, M. R., Andrade, L. F., de Souza Vespoli, L., Soares, F. S., Moreira, J. R., Pimentel,

- V. R., Barbosa, R. R., de Oliveira, M. V. V., Silveira, V., & de Souza Filho, G. A. (2021). Combination of osmotic stress and sugar stress response mechanisms is essential for *Gluconacetobacter diazotrophicus* tolerance to high-sucrose environments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 105(19), 7463–7473. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11590-7>
- Leandro, M. R., Vespoli, L. de S., Andrade, L. F., Soares, F. S., Boechat, A. L., Pimentel, V. R., Moreira, J. R., Passamani, L. Z., Silveira, V., & de Souza Filho, G. A. (2020). DegP protease is essential for tolerance to salt stress in the plant growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **Microbiological Research**, 243(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126654>
- Leandro, M. R., Vespoli, L. de S., Andrade, L. F., Soares, F. S., Boechat, A. L., Pimentel, V. R., Moreira, J. R., Passamani, L. Z., Silveira, V., & de Souza Filho, G. A. (2021). DegP protease is essential for tolerance to salt stress in the plant growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **Microbiological Research**, 243(May 2020). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126654>
- Loganathan, P., Sunita, R., Parida, A. K., & Nair, S. (1999). Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine coracana* L. **Journal of Applied Microbiology**, 87(1), 167–172. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00804.x>
- Luo, C., Liu, C., Wang, Y., Liu, X., Li, F., Zhang, G., & Li, X. (2011). Heavy metal contamination in soils and vegetables near an e-waste processing site, south China. **Journal of Hazardous Materials**, 186(1), 481–490. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.024>
- Lwalaba, J. L. W., Zvobgo, G., Fu, L., Zhang, X., Mwamba, T. M., Muhammad, N., Munde, R. P. M., & Zhang, G. (2017). Alleviating effects of calcium on cobalt toxicity in two barley genotypes differing in cobalt tolerance. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 139, 488–495. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.019>
- Ma, Z., Chandrangu, P., Helmann, T. C., Romsang, A., Gaballa, A., & Helmann, J. D. (2014). Bacillithiol is a major buffer of the labile zinc pool in *Bacillus subtilis*. **Mol. Microbiol.**, 94(4). <https://doi.org/10.1038/nature08365>.Reconstructing
- Ma, Z., Jacobsen, F. E., & Giedroc, D. P. (2009). Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. **Chemical Reviews**, 109(10), 4644–4681. <https://doi.org/10.1021/cr900077w>
- Madhaiyan, M., Saravanan, V. S., Jovi, D. B. S. S., Lee, H., Thenmozhi, R., Hari, K., & Sa, T. (2004). Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. **Microbiological Research**, 159(3), 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.04.001>
- Mahey, S., Kumar, R., Sharma, M., Kumar, V., & Bhardwaj, R. (2020). A critical review on toxicity of cobalt and its bioremediation strategies. **SN Applied Sciences**, 2(1279). <https://doi.org/10.1007/s42452-020-3020-9>
- Mahmud, A. A., Upadhyay, S. K., Srivastava, A. K., & Bhojiya, A. A. (2021). Biofertilizers: A Nexus between soil fertility and crop productivity under abiotic stress. **Current Research in Environmental Sustainability**, 3, 100063. <https://doi.org/10.1016/j.crsust.2021.100063>
- Mazhar, S. H., Herzberg, M., Ben Fekih, I., Zhang, C., Bello, S. K., Li, Y. P., Su, J., Xu, J., Feng, R., Zhou, S., & Rensing, C. (2020). Comparative Insights Into the Complete Genome Sequence of Highly Metal Resistant *Cupriavidus metallidurans* Strain BS1

- Isolated From a Gold–Copper Mine. **Frontiers in Microbiology**, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00047>
- McDevitt, C. A., Ogunniyi, A. D., Valkov, E., Lawrence, M. C., Kobe, B., McEwan, A. G., & Paton, J. C. (2011). A molecular mechanism for bacterial susceptibility to Zinc. **PLoS Pathogens**, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002357>
- Mordukhova, E. A., & Pan, J. G. (2013). Evolved cobalamin-independent methionine synthase (MetE) improves the acetate and thermal tolerance of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, 79(24), 7905–7915. <https://doi.org/10.1128/AEM.01952-13>
- Moreira, J. R., Leandro, M. R., Vespoli, L. de S., Andrade, L. F., Pimentel, V. R., Soares, F. S., de Souza, S. A., Intorne, A. C., Silveira, V., & de Souza Filho, G. A. (2022). Essential role of extracytoplasmic proteins in the resistance of *Gluconacetobacter diazotrophicus* to cadmium. **Research in Microbiology**, 103922. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.103922>
- Nairn, B. L., Lonergan, Z. R., Wang, J., Braymer, J. J., Calcutt, M. W., Lisher, J. P., Gilston, B. A., Chazin, W. J., Crécy-lagard, V. De, Giedroc, D. P., & Skaar, E. P. (2016). The response of *Acinetobacter baumannii* to Zinc starvation Corresponding authors HHS Public Access. **Cell Host Microbe**, 19(6), 826–836. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.007>.The
- Nanda, M., Kumar, V., & Sharma, D. K. (2019). Multimetal tolerance mechanisms in bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to ‘clean-up’ heavy metal contaminants from water. **Aquatic Toxicology**, 212, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.04.011>
- Nascimento, M., & Soares, P. S. M. (2019). Cobalto no Brasil: metalurgia extrativa, ocorrências e projetos.
- Neville, S. L., Eijkelkamp, B. A., Lothian, A., Paton, J. C., Roberts, B. R., Rosch, J. W., & McDevitt, C. A. (2020). Cadmium stress dictates central carbon flux and alters membrane composition in *Streptococcus pneumoniae*. **Communications Biology**, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01417-y>
- Ngalimat, M. S., Hata, E. M., Zulperi, D., Ismail, S. I., Ismail, M. R., Zainudin, N. A. I. M., Saidi, N. B., & Yusof, M. T. (2021). Plant growth-promoting bacteria as an emerging tool to manage bacterial rice pathogens. **Microorganisms**, 9(4), 1–23. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040682>
- Nies, D. H. (1992). Resistance to Cadmium, Cobalt, Zinc, and Nickel in Microbes. **Plasmid**, 27, 17–28.
- Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 51(6), 730–750. <https://doi.org/10.1007/s002530051457>
- Ortiz, M. E., Bleckwedel, J., Fadda, S., Picariello, G., Hebert, E. M., Raya, R. R., & Mozzi, F. (2017). Global analysis of mannitol 2-dehydrogenase in *Lactobacillus reuteri* crl 1101 during mannitol production through enzymatic, genetic and proteomic approaches. **PLoS ONE**, 12(1), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169441>
- Outten, F. W., Djaman, O., & Storz, G. (2004). A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, 52(3), 861–872. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04025.x>
- Owen, J. R., Kemp, D., Lèbre, Svobodova, K., & Pérez Murillo, G. (2020). Catastrophic tailings dam failures and disaster risk disclosure. **International Journal of Disaster**

Risk Reduction, 42. <https://doi.org/10.1016/j.ijdr.2019.101361>

- Passamani, L. Z., Bertolazi, A. A., Ramos, A. C., Santa-Catarina, C., Thelen, J. J., & Silveira, V. (2018). Embryogenic Competence Acquisition in Sugar Cane Callus Is Associated with Differential H⁺-ATPase Abundance and Activity. **Journal of Proteome Research**, 17(8), 2767–2779. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00213>
- Petavratzi, E., Gunn, G., & Kresse, C. (2019). BGS COMMODITY REVIEW: Cobalt (1st ed., Issue November). **British Geological Survey**. https://www.researchgate.net/publication/337604314_BGS_COMMODITY_REVIEW_Cobalt
- Prabhakaran, P., Ashraf, M. A., & Aqma, W. S. (2016). Microbial stress response to heavy metals in the environment. In **RSC Advances** (Vol. 6, Issue 111, pp. 109862–109877). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c6ra10966g>
- Ranquet, C., Ollagnier-de-Choudens, S., Loiseau, L., Barras, F., & Fontecave, M. (2007). Cobalt stress in *Escherichia coli*: The effect on the iron-sulfur proteins. **Journal of Biological Chemistry**, 282(42), 30442–30451. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702519200>
- Ray, P., Girard, V., Gault, M., Job, C., Bonneau, M., Mandrand-Berthelot, M. A., Singh, S. S., Job, D., & Rodrigue, A. (2013). *Pseudomonas putida* KT2440 response to nickel or cobalt induced stress by quantitative proteomics. **Metallomics**, 5(1), 68–79. <https://doi.org/10.1039/c2mt20147j>
- Reis, V. M., & Döbereiner, J. (1998). Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. **Archives of Microbiology**, 171(1), 13–18. <https://doi.org/10.1007/s002030050672>
- Reis, V. M., Olivares, F. L., & Döbereiner, J. (1994). Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 10(4), 401–405. <https://doi.org/10.1007/BF00144460>
- Reis, V. M., & Teixeira, K. R. dos S. (2015). Nitrogen fixing bacteria in the family Acetobacteraceae and their role in agriculture. In **Journal of Basic Microbiology** (Vol. 55, Issue 8, pp. 931–949). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400898>
- Rensing, C., Pribyl, T., & Nies, D. H. (1997). New Functions for the Three Subunits of the CzcCBA Cation-Proton Antiporter. In **Journal of Bacteriology** (Vol. 179, Issue 22). <http://jb.asm.org/>
- Research, S. (2022). **Cobalt Market. Market Research Report**. <https://straitresearch.com/report/cobalt-market>
- Rezaei, M. N., Aslankoohi, E., Verstrepen, K. J., & Courtin, C. M. (2015). Contribution of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and the glyoxylate shunt in *Saccharomyces cerevisiae* to succinic acid production during dough fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, 204, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.004>
- Roberts, S., & Gunn, G. (2013). Cobalt. **Critical Metals Handbook**, 122–149. <https://doi.org/10.1002/9781118755341.ch6>
- Roche, C., Thygesen, K., & Baker, E. (2017). Mines tailings storage : Safety is no accident. A UNEP Rapid Response Assessment (C. Roche, K. Thygesen, & E. Baker (eds.); 1st ed.). **United Nations Environment Programme and GRID-Arendal**.
- Sandoval, J. M., Arenas, F. A., & Vásquez, C. C. (2011). Glucose-6-phosphate dehydrogenase protects *Escherichia coli* from tellurite-mediated oxidative stress. **PLoS ONE**,

6(9), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025573>

- Saravanan, V. S., Madhaiyan, M., Osborne, J., Thangaraju, M., & Sa, T. M. (2007). Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* members: Their possible role in plant growth promotion. **Microbial Ecology**, 55(1), 130–140. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9258-6>
- Sharma, S., Chakraborty, K., Müller, B. K., Astola, N., Tang, Y. C., Lamb, D. C., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2008). Monitoring Protein Conformation along the Pathway of Chaperonin-Assisted Folding. **Cell**, 133(1), 142–153. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.048>
- Soares, F. S. (2022). Efeitos de compostos orgânicos voláteis produzidos por *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 sobre a morfologia, fisiologia e o proteoma de *Arabidopsis thaliana*. **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro**.
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. m M., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N.-M., Krüger, A., Alam, M. T., Keller, M. A., Breitenbach, M., Brindle, K. M., Rabinowitz, J. D., & Ralser, M. (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, 90(3), 927–963. <https://doi.org/10.1111/brv.12140>.The
- Susin, M. F., Baldini, R. L., Gueiros-Filho, F., & Gomes, S. L. (2006). GroES/GroEL and DnaK/DnaJ have distinct roles in stress responses and during cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, 188(23), 8044–8053. <https://doi.org/10.1128/JB.00824-06>
- Takahashi, Y., & Tokumoto, U. (2002). A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in Archaea and plastids. **Journal of Biological Chemistry**, 277(32), 28380–28383. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200365200>
- Tamarit, J., Cabiscol, E., & Ros, J. (1998). Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, 273(5), 3027–3032. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.5.3027>
- Tang, Y. C., Chang, H. C., Chakraborty, K., Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M. (2008). Essential role of the chaperonin folding compartment in vivo. **EMBO Journal**, 27(10), 1458–1468. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.77>
- Tapia-Hernández, A., Bustillos-Cristales, M. R., Jiménez-Salgado, T., Caballero-Mellado, J., & Fuentes-Ramírez, L. E. (2000). Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. **Microbial Ecology**, 39(1), 49–55. <https://doi.org/10.1007/s002489900190>
- Tejera, N. A., Ortega, E., González-López, J., & Lluch, C. (2003). Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Journal of Applied Microbiology**, 95(3), 528–535. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02007.x>
- Tian, T., He, H., & Liu, X. Q. (2014). The SufBCD protein complex is the scaffold for iron-sulfur cluster assembly in *Thermus thermophilus* HB8. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 443(2), 376–381. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.131>
- Tirry, N., Tahri Joutey, N., Sayel, H., Kouchou, A., Bahafid, W., Asri, M., & El Ghachtouli, N. (2018). Screening of plant growth promoting traits in heavy metals resistant bacteria: Prospects in phytoremediation. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**,

- 16(2), 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.06.004>
- Tucaliuc, A., Cîs, A., & Blaga, A. C. (2022). Purification of Vitamin C.
- Vergilio, C. dos S., Lacerda, D., Oliveira, B. C. V. de, Sartori, E., Campos, G. M., Pereira, A. L. de S., Aguiar, D. B. de, Souza, T. da S., Almeida, M. G. de, Thompson, F., & Rezende, C. E. de. (2020). Metal concentrations and biological effects from one of the largest mining disasters in the world (Brumadinho, Minas Gerais, Brazil). **Scientific Reports**, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62700-w>
- Xu, Y., Ren, J., Wang, W., & Zeng, A. P. (2022). Improvement of glycine biosynthesis from one-carbon compounds and ammonia catalyzed by the glycine cleavage system in vitro. **Engineering in Life Sciences**, 22(1), 40–53. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100047>
- Yamada, Y. (2016). Acetic acid bacteria: Ecology and physiology. In Kazunobu Matsushita, H. Toyama, N. Tonouchi, & A. Okamoto-Kainuma (Eds.), *Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology* (8th ed., pp. 1–350). **Springer Tokyo**. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-55933-7>
- Yamada, Y., Hoshino, K. I., & Ishikawa, T. (1997). The Phylogeny of Acetic Acid Bacteria Based on the Partial Sequences of 16S Ribosomal RNA: The Elevation of the Subgenus *Gluconoacetobacter* to the Generic Level. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 61(8), 1244–1251. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1244>
- Yoon, Y., Lee, H., Lee, S., Kim, S., & Choi, K. H. (2015). Membrane fluidity-related adaptive response mechanisms of foodborne bacterial pathogens under environmental stresses. **Food Research International**, 72, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.016>
- Yuda, E., Tanaka, N., Fujishiro, T., Yokoyama, N., Hirabayashi, K., Fukuyama, K., Wada, K., & Takahashi, Y. (2017). Mapping the key residues of SufB and SufD essential for biosynthesis of iron-sulfur clusters. **Scientific Reports**, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09846-2>
- Zahra, N., Hafeez, M. B., Shaukat, K., Wahid, A., & Hasanuzzaman, M. (2021). Fe toxicity in plants: Impacts and remediation. **Physiologia Plantarum**, 173(1), 201–222. <https://doi.org/10.1111/ppl.13361>
- Zhang, R., Cao, Y., Liu, W., Xian, M., & Liu, H. (2017). Improving phloroglucinol tolerance and production in *Escherichia coli* by GroESL overexpression. **Microbial Cell Factories**, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0839-x>
- Zheng, C., Jia, M., Gao, M., Lu, T., Li, L., & Zhou, P. (2019). PmtA functions as a ferrous iron and cobalt efflux pump in *Streptococcus suis*. **Emerging Microbes and Infections**, 8(1), 1254–1264. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1660233>

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cobalto é um metal essencial para os organismos vivos e é considerado um metal estratégico para o desenvolvimento econômico global. As projeções da demanda de cobalto indiretamente pressupõem o aumento do descarte inadequado de resíduos sólidos que contém esse metal. Muitos locais ainda sofrem com a acumulação do e-lixo (resíduos sólidos de eletrônicos de consumo) e descarte de efluentes residuais das industriais no ambiente. Adicionalmente, o uso indiscriminado de fertilizantes e defensivos químicos que continuam a induzir o acúmulo de metais nos solos, causando perdas econômicas para o setor da agricultura.

Consequentemente, os microrganismos do solo estão suscetíveis as condições ambientais adversas e desenvolveram mecanismos moleculares para manter a homeostase celular e garantir sua sobrevivência. Assim, explorar o potencial dos microrganismos benéficos que interagem com as plantas oferece alternativas de valor econômico, biotecnológico e sustentável para a produção das culturas. Muitos estudos demonstraram o efeito *in vitro* de altas concentrações de cobalto sobre diferentes microrganismos. Mas pouco se sabe sobre a resposta de bactérias promotoras do crescimento vegetal a cobalto. Assim, no presente estudo, foram abordadas as respostas moleculares de *G. diazotrophicus*, uma BPCV, frente ao estresse por cobalto.

Em *G. diazotrophicus*, 2,5 mM de cobalto inibiu o crescimento da bactéria, mas aproximadamente 95% das células continuaram vivas. Isto demonstra que a bactéria ativou mecanismos que permitiram sua sobrevivência, mesmo afetando a multiplicação. Por proteômica comparativa demonstramos que de fato, diversas proteínas foram diferencialmente reguladas nas condições experimentais testadas e que a bactéria induziu respostas de resistência ao excesso do metal. Foi observado que nos compartimentos extracitoplasmáticos houve menor acúmulo de proteínas de transporte de nutrientes, principalmente ferro e açúcar. Tais resultados permitem hipotetizar que a redução no acúmulo dessas proteínas representa uma estratégia para alterar a fluidez da membrana e que o Co pode utilizar esses transportadores para ter acesso à célula. A bactéria induziu o acúmulo da proteína CzcC, que atua no efluxo de Zn, Cd e Co em condições de estresse.

Quanto a resposta citoplasmática, a bactéria induziu o acúmulo de diversas proteínas. Observamos a indução do sistema *suf* de montagem de aglomerados de Fe-S que parece ser essencial para a resistência da bactéria ao excesso de Co. Diferentemente de *E. coli*, onde esse sistema é ativado somente na presença de estresse oxidativo e limitação de ferro, *G. diazotrophicus* mostrou que esse sistema atua na formação de aglomerados de Fe-S em condições normais de cultivo e que sua expressão é aumentada na presença de Co. Trabalhos futuros

podem confirmar se a regulação desse sistema é um mecanismo de resistência da bactéria ou se está relacionada com a inativação enzimática através da ligação do Co com os sítios ativos dessas enzimas.

Desde a descoberta de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em 1988, muitos estudos foram publicados sobre sua sobrevivência, habitats e colonização de plantas considerando sua importância para a aplicação na agricultura devido a sua capacidade de fixar biologicamente o nitrogênio. Os conhecimentos acerca das Acetobacteraceae mostram a versatilidade dessa família para diferentes aplicações industriais. É reconhecida a necessidade de ampliar os conhecimentos acerca de *G. diazotrophicus* para explorar o potencial dessa bactéria para novas aplicações biotecnológicas.

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram aspectos moleculares da resposta/resistência ao estresse por metais. Esses achados contribuem para a compreensão dos mecanismos ativados durante a resposta a MP's em bactérias promotoras do crescimento vegetal. Estudos interdisciplinares são necessários para identificar os principais mecanismos de tolerância ao excesso de metais. Esses dados têm grande potencial de uso em tecnologias avançadas de melhoramento.

6. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Proteínas identificadas durante a resposta de *G. diazotrophicus* a Co.

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Putative type I secretion outer membrane protein, TolC	A9HG75	-	-	-	47667	49043	50819	0,00017	-	49176	-	Única_Co
FeS assembly protein SufB	A9HRY9	1913	3041	2819	14678	17028	16706	0,00032	2591	16137	6,2294	UP
10 kDa chaperonin	A9HPH9	4256	3077	2503	16833	21682	14260	0,00898	3279	17592	5,3657	UP
Acireductone dioxygenase	MTND	8210	5554	5274	30758	24052	26871	0,00139	6346	27227	4,2904	UP
60 kDa chaperonin	CH602	27400	25993	27733	98798	120858	113175	0,00281	27042	110944	4,1026	UP
Phosphomethylpyrimidine synthase	A9H8N9	2447	3579	4479	12976	15305	14508	0,00016	3502	14263	4,0731	UP
FeS assembly protein SufC	A9HRY6	37856	40127	48226	132894	133948	133218	0,00054	42070	133354	3,1698	UP
Uncharacterized protein	A9HFF6	18057	9107	5434	32246	30537	27978	0,01298	10866	30254	2,7843	UP
Putative fumarylacetoacetate	A9HCF1	6765	8350	9680	18454	20144	21226	0,00028	8265	19941	2,4127	UP
Putative FeS assembly protein SufD	A9HRY4	17701	16882	15817	32486	43909	44496	0,01237	16800	40297	2,3986	UP
Translation initiation factor IF-3	A9HFP7	21360	25135	3952	25670	43033	50796	0,04075	16816	39833	2,3688	UP
Cold-shock DEAD box protein A homolog	A9HRW6	5282	5022	6044	12922	11759	12692	0,00007	5449	12457	2,2861	UP
Putative pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	A9HHP7	6077	4901	6040	11488	12568	14426	0,00307	5673	12827	2,2611	UP
Putative 2-nitropropane dioxygenase	A9HJ45	5298	4679	5487	11718	12297	9894	0,00404	5155	11303	2,1927	UP
Malate dehydrogenase	A9HH05	3050	3713	4746	8707	9505	6880	0,00601	3837	8364	2,1801	UP
Putative steroid protein related	A9H0M3	4393	9395	4028	12487	11771	14432	0,01977	5939	12897	2,1718	UP
Acetoin reductase	A9HPB2	1994	6061	3922	7516	9988	7988	0,02014	3992	8497	2,1285	UP
Putative rod shape-determining protein mreB	A9HM98	10509	19636	17984	32854	35599	29876	0,00592	16043	32776	2,0430	UP
Riboflavin synthase alpha chain	A9HDG0	2938	2620	3280	5545	5994	5817	0,00025	2946	5785	1,9637	UP
Bacterioferritin	A9H7G6	15365	12159	6831	19092	27750	20607	0,01966	11451	22483	1,9633	UP
Beta-lactamase-like protein	A9HC31	9457	6387	6328	14869	15960	12656	0,00376	7390	14495	1,9613	UP
50S ribosomal protein L15	RL15	19601	17783	15793	26519	32350	44289	0,04010	17726	34386	1,9399	UP

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	A9HJA6	7193	18747	22908	34437	31520	28138	0,03498	16283	31365	1,9263	UP
Adenylyl-sulfate kinase	A9H0W3	3297	6166	5551	7316	11337	10118	0,02022	5005	9590	1,9163	UP
Putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	A9H2M9	37917	49622	55042	98058	85345	87466	0,00161	47527	90290	1,8998	UP
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	A9HNX4	15877	12033	19386	27491	33121	28779	0,00380	15765	29797	1,8901	UP
Aspartate--tRNA(Asp/Asn) ligase	A9HLJ4	3881	3294	3959	6515	7674	6824	0,00137	3711	7005	1,8873	UP
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	A9HJA9	30019	29955	45947	63719	64148	70997	0,00800	35307	66288	1,8775	UP
Riboflavin biosynthesis protein RibD	A9HDG2	4786	5988	3671	8848	8657	9023	0,01209	4815	8843	1,8365	UP
Chaperone protein DnaJ	DNAJ	11358	8061	5408	13724	16035	14868	0,02366	8276	14876	1,7975	UP
Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta	ACCD	15995	14510	13898	30638	26522	22372	0,01615	14801	26511	1,7912	UP
Dihydrolipoyl dehydrogenase	A9HJB6	19980	19413	24826	31433	42034	41142	0,01108	21406	38203	1,7846	UP
Glycine dehydrogenase (decarboxylating)	A9HM48	2821	3377	4086	4842	6233	7113	0,01874	3428	6063	1,7684	UP
6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	A9HDF5	21158	14280	23741	37909	32444	33476	0,00842	19726	34610	1,7545	UP
Transcription termination factor Rho	A9HE94	14514	14509	15083	24827	27049	25133	0,00117	14702	25670	1,7460	UP
Glycine--tRNA ligase beta subunit	A9HM86	5929	7757	8645	12754	12250	13805	0,00398	7444	12936	1,7379	UP
Luciferase-like monooxygenase	A9HSA0	4649	4649	4799	8591	8906	6933	0,01472	4699	8143	1,7330	UP
Chemoreceptor mcpA (Methyl-accepting chemotaxis protein)	A9HHE0	15031	14084	17325	24878	29261	26284	0,00144	15480	26808	1,7318	UP
Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	A9HJB2	13092	14596	21786	20553	33304	31696	0,03819	16492	28518	1,7292	UP
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	A9H326	10967	10536	17231	19981	22736	23518	0,01674	12911	22078	1,7100	UP
Peptide deformylase	A9HS47	9204	8448	8112	15770	14421	13845	0,00106	8588	14679	1,7092	UP
Elongation factor G	A9HS02	23498	25488	26959	35438	46942	46451	0,01759	25315	42944	1,6964	UP
Conserved protein	A9H3Z0	7426	5287	7135	10627	13245	9689	0,01477	6616	11187	1,6909	UP

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Thiazole synthase	THIG	26147	23117	28973	42506	42929	46133	0,00084	26079	43856	1,6817	UP
Probable malate:quinone oxidoreductase	A9HKZ6	3858	4479	5459	7541	7295	8299	0,00389	4598	7711	1,6770	UP
Transcription termination/antitermination protein NusA	A9HF12	8862	9698	13348	14655	17632	20909	0,01940	10636	17732	1,6672	UP
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	A9HRV4	60818	67368	65744	97009	118203	107047	0,00663	64644	107419	1,6617	UP
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	A9HID1	40263	54101	51612	82966	77693	81127	0,00509	48659	80595	1,6563	UP
GTP-binding protein TypA/BipA	A9H9C1	6618	8057	9562	10902	15759	13284	0,02175	8079	13315	1,6481	UP
Glycine cleavage system aminomethyl-transferase T	A9HM51	43029	45847	53379	76699	79061	77343	0,00387	47418	77701	1,6386	UP
ATP synthase subunit beta	ATPB	59088	64999	97842	108935	132976	120591	0,01977	73976	120834	1,6334	UP
1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	A9HIR0	12679	11470	13174	20543	20180	20090	0,00123	12441	20271	1,6294	UP
Argininosuccinate lyase	ARLY	4348	2130	4430	5581	6383	5801	0,04111	3636	5922	1,6286	UP
Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	A9H8C5	41380	25880	39989	57183	61911	55395	0,01609	35750	58163	1,6269	UP
Dihydrolipoyl dehydrogenase	A9HFH1	33850	46865	52712	68435	66640	81227	0,00999	44476	72101	1,6211	UP
2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	A9HKR5	14947	17059	17903	27059	26119	26890	0,00204	16636	26689	1,6043	UP
Methylenetetrahydrofolate reductase	A9HNY2	9063	7460	8029	11735	14749	12871	0,00756	8184	13118	1,6030	UP
Ribose-phosphate pyrophosphokinase	A9HBZ3	8609	8399	12522	15101	15177	16799	0,01710	9843	15692	1,5942	UP
Cysteine desulfurase	A9HRY2	34035	36404	37932	56380	57762	58222	0,00027	36123	57455	1,5905	UP
D-2-hydroxyacid dehydrogenase	A9HDT4	145460	139892	137947	237726	236273	195714	0,01223	141100	223238	1,5821	UP
D-amino acid dehydrogenase	A9HMX8	31463	34023	39799	55426	55924	55161	0,00686	35095	55504	1,5815	UP
Ribose-5-phosphate isomerase A	A9H338	31768	22597	33239	46923	48523	43053	0,01051	29201	46166	1,5810	UP
Isocitrate dehydrogenase (NAD(+))	A9HJQ1	45043	55209	67660	91666	86683	85710	0,01573	55971	88020	1,5726	UP
Putative glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	A9HJR7	42796	50668	58407	76661	80933	81024	0,00811	50623	79539	1,5712	UP
Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	PNP	17139	20369	24376	30423	33055	33701	0,00823	20628	32393	1,5703	UP
Aconitate hydratase	A9HEZ2	73576	83098	92909	135051	136901	114896	0,00403	83194	128950	1,5500	UP

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Glucokinase	A9HI04	34187	41643	36169	58724	53107	60181	0,00149	37333	57337	1,5358	UP
Putative serine acetyltransferase	A9HMC8	8931	8517	9115	13955	13081	13292	0,00015	8854	13443	1,5182	UP
Geranyltranstransferase	A9HIR3	23230	21358	19022	32096	34421	29734	0,00204	21204	32084	1,5131	UP
ABC transporter ATP-binding protein	A9H4G2	6623	7681	8536	11409	10848	12037	0,00364	7613	11431	1,5015	UP
Putative tonB-dependent receptor protein	A9H7M7	70008	75655	59369	12295	12731	13907	0,00345	68344	12978	0,1899	DOWN
Uncharacterized protein	A9H732	14873	10318	5914	1766	2508	1803	0,04145	10368	2025	0,1953	DOWN
Uncharacterized protein	A9HE44	12174	12092	9567	3224	1835	2414	0,00163	11278	2491	0,2209	DOWN
30S ribosomal protein S5	RS5	114046	120388	58165	27759	21062	23954	0,03218	97533	24258	0,2487	DOWN
Uncharacterized protein	A9H730	19130	18262	16298	5392	6670	3803	0,00022	17896	5288	0,2955	DOWN
50S ribosomal protein L23	RL23	74767	72653	37044	22231	20311	16782	0,03699	61488	19775	0,3216	DOWN
Putative TonB-dependent receptor	A9H7L3	37198	38857	32330	12893	11812	11433	0,00240	36128	12046	0,3334	DOWN
Endoribonuclease L-PSP	A9HC24	37632	37352	17189	13098	4910	15202	0,04158	30724	11070	0,3603	DOWN
30S ribosomal protein S3 rpsC PE 3	RS3	18930	20195	19547	13499	6289	6507	0,02104	19557	8765	0,4482	DOWN
Putative tonB-dependent receptor	A9HEU6	176534	177967	165345	76348	73071	83841	0,00003	173282	77753	0,4487	DOWN
Putative sulfotransferase	A9HQQ2	22083	18922	12646	8235	9038	7046	0,03314	17883	8106	0,4533	DOWN
Uncharacterized protein	A9HCT2	70659	73712	43692	32452	17847	35664	0,02467	62688	28654	0,4571	DOWN
Transcription elongation factor GreA	A9H1Q0	41393	32353	20706	20301	14802	9712	0,04573	31484	14938	0,4745	DOWN
Gluconate 2-dehydrogenase (Acceptor)	A9HK15	165447	159447	143438	79666	71402	78603	0,00139	156110	76557	0,4904	DOWN
Endoribonuclease L-PSP	A9HBS7	44553	28180	28212	18622	16955	17536	0,04929	33649	17704	0,5261	DOWN
TonB-dependent receptor	A9H7L9	15796	16109	11362	7320	7482	8009	0,02237	14422	7604	0,5272	DOWN
50S ribosomal protein L16	RL16	41939	52063	28369	25110	19263	20219	0,04927	40790	21531	0,5278	DOWN
Uncharacterized protein	A9HSC1	18903	27821	16833	11556	9996	12187	0,04668	21185	11246	0,5309	DOWN
Periplasmic binding protein	A9HK76	44992	49484	46380	26620	23601	25247	0,00019	46952	25156	0,5358	DOWN
Aldose 1-epimerase	A9HBF6	24210	17635	18313	11262	11069	10024	0,02160	20053	10785	0,5378	DOWN
30S ribosomal protein S11	RS11	11034	15214	10868	7564	6525	6137	0,02421	12372	6742	0,5449	DOWN
D-ribose-binding periplasmic protein	A9HPK6	204671	226866	218241	118729	118512	117654	0,00211	216593	118298	0,5462	DOWN
Putative TonB-dependent receptor	A9HNM4	24442	22826	21073	11928	12748	12745	0,00284	22780	12474	0,5476	DOWN

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	A9HFD5	16529	15004	10524	8693	8711	5645	0,02568	14019	7683	0,5480	DOWN
Acetate kinase	A9HGX6	16717	16225	18208	9395	9036	10041	0,00083	17050	9491	0,5566	DOWN
Putative NAD dependent epimerase	A9H2U3	11301	11954	10121	6047	5587	7035	0,00122	11125	6223	0,5594	DOWN
Putative L-asparaginase II protein	A9HE73	39122	47655	43310	23346	23431	27339	0,00323	43362	24705	0,5697	DOWN
Surface antigen protein	A9HAP4	76394	86198	72435	42053	38558	55305	0,00407	78342	45306	0,5783	DOWN
Amidinotransferase	A9HNM6	9826	10788	12362	6732	6469	6000	0,00925	10992	6400	0,5823	DOWN
Putative 2Fe-2S ferredoxin	A9HMI7	53565	82962	78097	41804	45558	41366	0,04243	71541	42909	0,5998	DOWN
2-isopropylmalate synthase	A9HMA2	26219	31438	31191	17561	17005	19592	0,00512	29616	18052	0,6096	DOWN
Guanylate kinase	A9HDA8	14822	14067	11946	8805	8156	8187	0,01050	13612	8383	0,6158	DOWN
Putative periplasmic binding proteins	A9H577	100633	117826	128612	72300	65316	77923	0,00971	115691	71846	0,6210	DOWN
Conserved protein	A9HSH2	84762	65236	71649	44707	46720	47992	0,01905	73882	46473	0,6290	DOWN
Putative ribonuclease D	A9HKL8	11492	11674	12264	8644	7058	6882	0,00424	11810	7528	0,6375	DOWN
Molybdopterin binding domain	A9HL54	20948	29413	28759	17416	15413	17613	0,03207	26373	16814	0,6375	DOWN
Ubiquinol oxidase subunit 2	A9HK01	99440	85757	91249	54615	59427	62294	0,00223	92149	58779	0,6379	DOWN
Fe-S protein, radical SAM family	A9HA97	28386	35761	33900	21673	19637	21541	0,01298	32682	20950	0,6410	DOWN
Cold-shock DNA-binding domain protein	A9HK34	24738	23370	20714	15678	13540	15326	0,00410	22941	14848	0,6472	DOWN
Uncharacterized protein	A9HAF1	17359	17752	19959	11755	10721	13426	0,00241	18356	11967	0,6519	DOWN
Probable transcriptional regulatory protein	A9HAV2	42852	49448	47404	30602	34543	26452	0,00339	46568	30532	0,6557	DOWN
Outer membrane protein assembly factor BamD	A9H0L0	22571	24765	22397	14128	12248	19773	0,03068	23244	15383	0,6618	DOWN
Alpha/beta hydrolase, chloride peroxidase	A9H000	45036	50386	45339	33114	28124	31940	0,00124	46920	31059	0,6620	DOWN
Putative amidohydrolase	A9HMC5	29463	27622	32385	18032	15090	26126	0,03809	29823	19749	0,6622	DOWN
Uncharacterized protein	A9H6W8	11608	9174	10964	7041	6986	7213	0,01978	10582	7080	0,6691	UNCHANGED
Putative polyketide synthase	A9H221	5577	6477	6641	5389	3953	3205	0,03282	6232	4182	0,6711	UNCHANGED
NADH-quinone oxidoreductase chain E	A9HRT6	23242	23258	17455	18865	12339	11726	0,04048	21318	14310	0,6713	UNCHANGED
Putative tonB-dependent receptor	A9HE38	181137	205378	182718	129338	122286	130663	0,00478	189744	127429	0,6716	UNCHANGED
Putative secretion protein, HlyD-family	A9HGT6	11565	12433	12756	8364	7735	8799	0,00060	12251	8299	0,6774	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Periplasmic serine endoprotease DegP-like	A9HBK9	32052	34132	31449	22242	22131	22448	0,00285	32544	22273	0,6844	UNCHANGED
Putative autotransporter protein	A9H4L1	21419	23089	19561	14743	14473	14670	0,01081	21356	14629	0,6850	UNCHANGED
Putative flavin reductase	A9HE57	17779	13867	13422	11375	10878	8631	0,02738	15023	10294	0,6853	UNCHANGED
50S ribosomal protein L3	RL3	67758	68823	52667	52593	33408	44867	0,03181	63083	43623	0,6915	UNCHANGED
Polyphenol oxidase	A9HBY8	20030	20171	19530	15398	14446	11489	0,01601	19910	13778	0,6920	UNCHANGED
Superoxide dismutase	A9HL14	124830	112580	97975	88111	79375	69016	0,01519	111795	78834	0,7052	UNCHANGED
Conserved protein	A9H282	17111	16593	17841	12733	10206	13467	0,01261	17181	12135	0,7063	UNCHANGED
10 kDa chaperonin	A9HK46	134943	106493	98931	87874	86153	69403	0,03943	113456	81143	0,7152	UNCHANGED
Nitrogen regulatory protein P-II	A9HMD4	56927	52446	40988	36120	38687	32893	0,04119	50121	35900	0,7163	UNCHANGED
Putative aldo-keto reductase	A9HQR7	9309	10697	10787	7800	7255	7192	0,00817	10264	7416	0,7225	UNCHANGED
Aldehyde Dehydrogenase	A9H4V7	119347	135092	133563	97582	86379	100927	0,00352	129334	94963	0,7342	UNCHANGED
Aldehyde dehydrogenase protein	A9H192	10238	11653	9039	7720	6832	8273	0,02468	10310	7608	0,7380	UNCHANGED
Choloylglycine hydrolase	A9H2I4	11018	12383	12026	8920	8396	8841	0,00455	11809	8719	0,7383	UNCHANGED
Enoyl-CoA hydratase/isomerase	A9HE55	24400	25743	27484	19592	17211	20757	0,00436	25876	19186	0,7415	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9H9H3	17037	19965	15431	15366	10985	12710	0,03634	17478	13020	0,7450	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HJS1	22991	20807	24413	16340	16277	18604	0,00732	22737	17074	0,7509	UNCHANGED
Secretion protein, HlyD-family	A9HA48	14723	14776	13682	9747	10871	11863	0,00634	14394	10827	0,7522	UNCHANGED
3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase CysQ	A9H1J6	18669	23744	20368	15268	16249	15723	0,03454	20927	15747	0,7525	UNCHANGED
Methylamine dehydrogenase heavy chain	A9H2X8	19912	23838	22972	17326	16288	16721	0,01879	22240	16778	0,7544	UNCHANGED
Bifunctional protein GlmU	GLMU	6158	6059	6538	4594	4849	4721	0,00137	6252	4721	0,7552	UNCHANGED
Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase	A9HK65	22536	23239	19947	15967	15455	19475	0,02002	21907	16966	0,7744	UNCHANGED
Outer-membrane lipoprotein carrier protein	A9H103	13735	13893	15203	11260	10117	11803	0,00461	14277	11060	0,7747	UNCHANGED
Carbamoyl-phosphate synthase small chain	A9H1P4	29867	27936	26682	20127	21304	24027	0,00707	28162	21819	0,7748	UNCHANGED
Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	SYFA	16308	15513	13396	12519	12285	10362	0,02078	15072	11722	0,7777	UNCHANGED
N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	A9HLR0	34597	38255	43371	29414	28079	33182	0,02885	38741	30225	0,7802	UNCHANGED
Chaperone protein dnaJ	A9HAH3	67333	66865	67474	54380	50224	53046	0,00299	67224	52550	0,7817	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Putative gamma-glutamyltranspeptidase	A9H4A8	17424	18016	18439	13779	13272	15136	0,00410	17959	14062	0,7830	UNCHANGED
Carboxy-terminal protease protein	A9H3A3	83503	82590	72937	66584	59921	60879	0,00914	79677	62461	0,7839	UNCHANGED
PEBP family protein	A9HBI3	41209	40146	36852	32848	29538	30847	0,00433	39403	31078	0,7887	UNCHANGED
Ornithine carbamoyltransferase	A9HFT5	23031	26289	28474	21181	20352	20187	0,03608	25931	20573	0,7934	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HKE4	16455	17919	16441	12978	13457	13967	0,00357	16938	13467	0,7951	UNCHANGED
Threonylcarbamoyl-AMP synthase	A9H1J9	13263	12523	12370	9711	10595	10097	0,00120	12719	10135	0,7968	UNCHANGED
GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	A9H085	8606	8214	7598	6221	7142	6119	0,01012	8139	6494	0,7979	UNCHANGED
Conjugal transfer	A9HT68	87689	111018	100484	79721	71245	88551	0,04118	99730	79839	0,8005	UNCHANGED
Putative two component response regulator	A9HH92	10462	9958	9128	8203	7188	8451	0,01279	9849	7947	0,8069	UNCHANGED
Putative Ubiquinol-cytochrome c reductase	A9H861	33326	34814	29932	29435	22677	27373	0,03605	32691	26495	0,8105	UNCHANGED
NADPH dehydrogenase	A9H535	18861	19331	16928	14472	15192	15092	0,01666	18373	14918	0,8120	UNCHANGED
Dipeptidyl-peptidase	A9H090	78086	77075	77184	61713	61412	65926	0,00386	77448	63017	0,8137	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HHW9	28801	35947	32331	27319	27338	24971	0,04586	32359	26543	0,8202	UNCHANGED
Putative phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	A9HKI4	17299	17204	15467	14849	14390	12094	0,02854	16657	13778	0,8272	UNCHANGED
Conserved protein	A9HIX3	76019	86333	81999	77587	62606	62046	0,04577	81450	67413	0,8277	UNCHANGED
Serine protease	A9HEK6	135716	134287	127746	108641	117988	103733	0,00802	132583	110121	0,8306	UNCHANGED
Metal-dependent carboxypeptidase	A9HKD9	8296	8686	9081	7015	7146	7520	0,00427	8688	7227	0,8319	UNCHANGED
Bacteriocin protein	A9H5P1	39974	45566	39666	32626	35895	35677	0,02346	41736	34733	0,8322	UNCHANGED
dCTP deaminase	A9HFN2	29274	31645	34151	23879	25532	29830	0,04182	31690	26413	0,8335	UNCHANGED
Cof-like hydrolase	A9H329	8875	8859	7870	7272	7040	7059	0,02274	8535	7124	0,8347	UNCHANGED
Putative metallopeptidase	A9HRE6	31273	33830	29976	27569	25890	25958	0,01366	31693	26472	0,8353	UNCHANGED
Gamma-glutamyltranspeptidase	A9HM18	53129	53163	55000	43420	46521	45133	0,00106	53764	45025	0,8375	UNCHANGED
Argininosuccinate synthase	ASSY	48362	54230	56280	42594	42466	48262	0,02579	52957	44441	0,8392	UNCHANGED
Putative polysaccharide export protein	A9HMV6	50976	53726	52640	44803	43734	43965	0,00199	52447	44167	0,8421	UNCHANGED
Phosphate-binding protein PstS	A9H9X2	69914	74043	66754	61836	60474	55209	0,00969	70237	59173	0,8425	UNCHANGED
Putative penicillin-binding protein	A9H435	21476	22312	22846	20022	17478	18739	0,01206	22211	18746	0,8440	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Transcriptional regulator, IclR family/regu-calcin	A9HL52	22928	26391	26507	20824	20732	23539	0,03912	25275	21699	0,8585	UNCHANGED
Glutamine amidotransferase of anthranilate synthase	A9HJ94	15851	15258	16327	13403	14053	13367	0,00296	15812	13607	0,8606	UNCHANGED
Putative lipoprotein vacJ	A9HBF3	16144	17029	15636	14583	13790	13724	0,00699	16269	14032	0,8625	UNCHANGED
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	A9H8M9	19526	20140	21814	18143	17968	17350	0,02353	20494	17820	0,8696	UNCHANGED
S-adenosylmethionine synthase	METK	47837	51931	52851	42355	43759	46636	0,01547	50873	44250	0,8698	UNCHANGED
Putative membrane protein	A9H806	21713	23131	20414	18951	18167	19686	0,02440	21753	18935	0,8705	UNCHANGED
Alcohol dehydrogenase zinc-binding domain protein	A9HNN4	26611	27190	28280	23252	25477	23015	0,01388	27360	23915	0,8741	UNCHANGED
Flagellar motor switch protein FliN	A9HHD1	56008	55985	59962	49129	48382	53484	0,01464	57319	50332	0,8781	UNCHANGED
NADP-dependent L-serine/L-allo-threonine dehydrogenase	A9H4E8	88475	100775	88398	79435	78290	86869	0,04960	92549	81531	0,8809	UNCHANGED
UDP-3-O-acylglucosamine N-acyltransferase	A9HKU5	20490	19824	18312	16797	17685	17219	0,02730	19542	17234	0,8819	UNCHANGED
Periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator	A9HPB9	243558	266109	261095	220059	212968	247644	0,04327	256921	226890	0,8831	UNCHANGED
Preprotein translocase, SecE subunit	A9HJ83	22680	22637	20427	18007	20303	20160	0,04117	21915	19490	0,8894	UNCHANGED
4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	ISPE	27854	27400	30227	24235	24722	27111	0,03290	28494	25356	0,8899	UNCHANGED
Acetyl-CoA hydrolase	A9HIK2	24434	25466	24990	20944	22901	23130	0,02316	24963	22325	0,8943	UNCHANGED
Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	ACCA	69397	69111	74048	63524	62581	64805	0,01602	70852	63637	0,8982	UNCHANGED
Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	A9HBE5	22540	21341	23851	19913	20986	21024	0,04926	22577	20641	0,9143	UNCHANGED
Putative ABC transporter ATP-binding protein in rpoN region	A9HKM9	21705	21383	22370	20471	19804	20649	0,00907	21820	20308	0,9307	UNCHANGED
UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	A9H0I3	4858	5015	5128	4633	4746	4791	0,02515	5000	4723	0,9447	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Uncharacterized protein	A9HBG4	15134	13848	14698	15631	15292	15945	0,04407	14560	15623	1,0730	UNCHANGED
Acetoin(Diacetyl) reductase	A9HHS9	21128	20464	20466	21923	23134	22508	0,00826	20686	22522	1,0887	UNCHANGED
Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	A9HES3	12248	12417	12433	13840	13157	13530	0,01059	12366	13509	1,0924	UNCHANGED
Trigger factor	TIG	129201	124812	125183	136978	144121	139810	0,00375	126399	140303	1,1100	UNCHANGED
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	A9HRE0	52463	52708	54440	60733	62689	59917	0,00103	53203	61113	1,1487	UNCHANGED
Alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant/ Mal allergen	A9H8D6	292221	333980	296753	330509	370351	364534	0,02964	307652	355131	1,1543	UNCHANGED
Phosphatidylserine decarboxylase pro-enzyme	PSD	30643	35665	35373	39931	39196	38733	0,03714	33894	39287	1,1591	UNCHANGED
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	A9H0G0	36342	36546	42261	45292	42267	46694	0,03052	38383	44751	1,1659	UNCHANGED
Tryptophan synthase alpha chain	TRPA	60869	66728	55277	74001	70624	68962	0,03639	60958	71196	1,1680	UNCHANGED
50S ribosomal protein L10	RL10	77027	81104	82432	86431	95198	99789	0,02879	80187	93806	1,1698	UNCHANGED
4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	DAPA	25640	26157	30057	30560	31671	33718	0,02844	27285	31983	1,1722	UNCHANGED
Thiamine-phosphate pyrophosphorylase	A9HI58	18009	18978	20337	23153	20595	23493	0,02422	19108	22414	1,1730	UNCHANGED
Putative short-chain dehydrogenase	A9HLW8	48098	50066	50084	61698	54385	59038	0,02125	49416	58374	1,1813	UNCHANGED
Elongation factor Tu	EFTU	344234	421160	392446	427773	467007	483930	0,03144	385947	459570	1,1908	UNCHANGED
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	A9HHX8	23520	21077	18466	25738	22780	26928	0,04938	21021	25149	1,1964	UNCHANGED
Porin	A9HAM5	17221	17455	14947	19233	21113	19060	0,01816	16541	19802	1,1972	UNCHANGED
Universal stress protein	A9H0V0	64928	65515	68074	73249	77257	87676	0,04247	66172	79394	1,1998	UNCHANGED
TonB-dependent Receptor protein	A9HFV5	217120	245544	205459	266358	270515	267059	0,03056	222708	267977	1,2033	UNCHANGED
Histidine--tRNA ligase	SYH	7509	9325	9330	10025	10596	10908	0,04084	8721	10510	1,2051	UNCHANGED
Enolase	ENO	116781	126578	150392	156128	164556	156073	0,04989	131250	158919	1,2108	UNCHANGED
RNA-metabolising metallo-beta-lactamase protein	A9HRR8	77941	88341	91661	98822	103543	112047	0,01472	85981	104804	1,2189	UNCHANGED
Pyruvate, phosphate dikinase	A9HEP2	4340	4558	5129	5533	6032	5552	0,01386	4675	5706	1,2204	UNCHANGED
Elongation factor Ts	A9HRQ5	56384	56537	59512	67733	74771	69087	0,00684	57478	70530	1,2271	UNCHANGED
3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyl-transferase	PANB	20172	25691	26097	30566	26288	31462	0,04795	23987	29439	1,2273	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	A9HIP1	14133	15750	16932	18607	20471	18389	0,01460	15605	19156	1,2275	UNCHANGED
1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	A9HKV5	8900	10244	10866	12189	12490	12270	0,02721	10003	12316	1,2312	UNCHANGED
CRISPR-associated protein, Cse4 family	A9HLC8	20936	20842	20483	25488	25350	25899	0,00001	20754	25579	1,2325	UNCHANGED
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]	A9HKA6	6447	6001	5402	7119	7706	7176	0,01246	5950	7334	1,2326	UNCHANGED
Flavin-dependent thymidylate synthase thyX PE 3	A9HBG1	15531	15516	14608	16862	19380	20305	0,03082	15218	18849	1,2386	UNCHANGED
Putative 2-keto-4-pentenoate hydratase-like	A9HDT5	29606	36098	34893	42400	46483	36102	0,04915	33532	41662	1,2424	UNCHANGED
Enolase-phosphatase E1	MTNC	12014	11704	11480	14258	13813	15692	0,01503	11733	14588	1,2434	UNCHANGED
Glutamate--cysteine ligase	A9H108	12695	12035	15586	16119	18895	15325	0,04766	13439	16780	1,2486	UNCHANGED
Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	A9HJV2	8081	8373	8549	10778	10426	10481	0,00014	8334	10562	1,2673	UNCHANGED
Signal recognition particle protein	A9HS68	24167	28972	28439	35522	33198	34700	0,01303	27193	34473	1,2677	UNCHANGED
Leucyl aminopeptidase	A9HJY3	9576	11855	11998	14432	13283	14797	0,02012	11143	14170	1,2717	UNCHANGED
Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	A9HEX3	86304	68199	84217	102583	100873	100255	0,03058	79573	101237	1,2722	UNCHANGED
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	A9HIY5	69346	59540	70264	88091	79558	86605	0,00757	66384	84751	1,2767	UNCHANGED
ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	A9H199	9179	11518	11519	13236	13329	14622	0,02052	10739	13729	1,2785	UNCHANGED
Hopanoid-associated sugar epimerase	A9HGZ6	33081	42795	38710	47776	50610	48119	0,02625	38195	48835	1,2786	UNCHANGED
Chaperone protein DnaK	DNAK	114282	131533	152910	163007	168269	179754	0,03064	132908	170343	1,2817	UNCHANGED
Putative N-carbamoyl-L-amino acid amidohydrolase	A9HJT7	11283	8837	11145	12402	12548	15161	0,03517	10422	13370	1,2829	UNCHANGED
ATP synthase subunit alpha	ATPA	114074	119500	150042	162022	157601	172855	0,03381	127872	164159	1,2838	UNCHANGED
Phosphate import ATP-binding protein PstB	A9H9W2	8609	9163	10705	13746	11025	11868	0,02972	9492	12213	1,2866	UNCHANGED
Alpha/beta hydrolase fold	A9H7Y7	4654	4184	4045	5426	5048	6169	0,02103	4294	5547	1,2919	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Uncharacterized protein	A9H8H8	120700	137805	135211	151161	180458	177077	0,01672	131238	169565	1,2920	UNCHANGED
Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+))	ILVC	16598	14772	17550	20109	22999	20113	0,01021	16307	21073	1,2923	UNCHANGED
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	CLPX	13230	14936	18605	18514	22044	19996	0,04124	15591	20185	1,2947	UNCHANGED
DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	RPOA	68497	80714	83178	94610	101657	106322	0,00849	77463	100863	1,3021	UNCHANGED
Alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant/ Mal allergen	A9HFB9	16090	14522	11612	18451	20010	16652	0,03155	14075	18371	1,3053	UNCHANGED
Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	A9HEE4	12580	13784	16634	17338	19020	19847	0,02286	14333	18735	1,3072	UNCHANGED
NADH dehydrogenase (Ubiquinone)	A9HKL6	24255	25638	27331	32777	34194	34044	0,00217	25741	33672	1,3081	UNCHANGED
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	A9HPF0	32256	38235	43496	50919	49314	48887	0,03214	37996	49707	1,3082	UNCHANGED
Carbamoyl-phosphate synthase large chain	A9H1P7	3737	4514	5366	5388	5891	6548	0,03944	4539	5943	1,3093	UNCHANGED
DEAD/DEAH box helicase domain protein	A9H0S9	18069	20317	20688	24692	26449	26219	0,00266	19691	25787	1,3095	UNCHANGED
Putative nitrogen fixation protein	A9HFA7	33528	36549	33295	47570	43557	44329	0,00147	34457	45152	1,3104	UNCHANGED
Cysteine synthase	A9HFX5	26862	29269	28300	34197	37287	39243	0,00706	28144	36909	1,3114	UNCHANGED
Transcriptional regulator LysR	A9H0A8	69856	70552	80079	93975	85941	109256	0,02996	73496	96390	1,3115	UNCHANGED
Preprotein translocase, YajC subunit	A9HL42	25224	26225	18956	31310	31753	29410	0,03621	23468	30824	1,3135	UNCHANGED
Sialic acid receptor particle receptor FtsY	A9HM31	8950	7461	9510	11289	11401	11575	0,02142	8640	11422	1,3219	UNCHANGED
Acetylglutamate kinase	ARGB	25394	25562	26446	35779	35036	31785	0,00780	25801	34200	1,3256	UNCHANGED
Alkyl hydroperoxide reductase AhpD	AHPD	69381	73435	63941	101413	84766	88000	0,01450	68919	91393	1,3261	UNCHANGED
Uroporphyrinogen decarboxylase	DCUP	22556	19738	19856	29034	27843	25729	0,00349	20716	27535	1,3292	UNCHANGED
Aminotransferase	A9HSE7	6997	7308	7002	8982	9145	10226	0,01039	7103	9451	1,3306	UNCHANGED
Putative 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	A9HMR4	9106	9823	12783	13173	13672	15481	0,03370	10571	14109	1,3347	UNCHANGED
Histidinol dehydrogenase	A9HFM4	7300	8650	7928	10408	10350	11374	0,00312	7960	10711	1,3456	UNCHANGED
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	A9HIU7	3511	4064	5099	5342	5782	6029	0,03396	4224	5718	1,3535	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	A9HRE1	39262	38944	43864	56956	53295	55958	0,00127	40690	55403	1,3616	UNCHANGED
Aminotransferase	A9HCQ6	15760	17980	17718	23893	22232	24478	0,00140	17153	23534	1,3721	UNCHANGED
Glutaredoxin	A9HJG8	157016	160166	159172	224357	215413	217306	0,00039	158785	219025	1,3794	UNCHANGED
2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	A9HJ79	8652	9388	8753	10809	12252	14085	0,03031	8931	12382	1,3864	UNCHANGED
Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	A9HFD7	23554	27479	28660	31650	42044	37261	0,02709	26564	36985	1,3923	UNCHANGED
Ferrochelatase	A9HEQ4	13989	14469	18339	20743	22956	21896	0,01449	15599	21865	1,4017	UNCHANGED
Succinate-semialdehyde dehydrogenase	A9H549	41792	45665	54130	63201	65981	69441	0,00976	47196	66208	1,4028	UNCHANGED
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	A9HFG9	89890	103407	122910	136216	159195	148355	0,01333	105402	147922	1,4034	UNCHANGED
N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide mutase	A9HHQ7	9258	9400	8903	12368	12564	13749	0,00386	9187	12894	1,4035	UNCHANGED
Conserved protein	A9HLE5	6715	6585	7411	8782	9176	11151	0,02482	6904	9703	1,4055	UNCHANGED
aldehyde dehydrogenase	A9HB30	4103	4168	4499	5604	6178	6175	0,00147	4256	5985	1,4062	UNCHANGED
Biotin carboxylase protein	A9HEX0	15562	22655	25847	26582	33410	30457	0,04141	21355	30150	1,4119	UNCHANGED
Conserved protein	A9HBW8	10512	11241	12864	17177	14767	17014	0,00523	11539	16319	1,4143	UNCHANGED
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	A9HFE6	42031	47246	67516	71891	65857	85053	0,04516	52264	74267	1,4210	UNCHANGED
Putative chemotaxis protein cheA	A9HHF0	4202	4553	6415	6256	7337	7968	0,03601	5056	7187	1,4214	UNCHANGED
Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	A9H165	11674	12878	14254	17882	18226	19048	0,00421	12935	18386	1,4214	UNCHANGED
Adenosylhomocysteinase	A9HFI7	14164	16076	17728	19111	24181	25051	0,02317	15989	22781	1,4247	UNCHANGED
Flp pilus assembly protein CpaB	A9HHL4	11753	12408	11429	19417	15247	16097	0,02584	11863	16920	1,4262	UNCHANGED
Oxidoreductase (Aldo/keto reductase) protein	A9H614	6864	7623	8110	11382	10902	10163	0,00147	7532	10816	1,4359	UNCHANGED
Phosphate acyltransferase	PLSX	9888	11040	11362	15391	15770	15424	0,00288	10763	15528	1,4427	UNCHANGED
Putative phosphate acetyltransferase	A9HL01	7460	8205	8420	11468	11801	11539	0,00159	8028	11603	1,4453	UNCHANGED
Protein RecA	A9HM16	10491	15000	13240	17592	17446	20973	0,01536	12910	18671	1,4462	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Transaldolase	A9H320	62010	65585	88416	97660	104378	113304	0,01858	72004	105114	1,4598	UNCHANGED
Putative short-chain dehydrogenase	A9HAC6	11479	11189	12117	17682	16980	16201	0,00051	11595	16954	1,4622	UNCHANGED
Tryptophan synthase beta chain	A9HE87	16162	17083	22191	25833	27498	27791	0,01728	18479	27041	1,4633	UNCHANGED
Phosphoribosylformylglycinamidine cycloligase	A9HJV0	22826	26713	30350	42200	34996	39791	0,00758	26629	38996	1,4644	UNCHANGED
Putative prolyl-tRNA synthetases	A9HBP4	4229	4733	4673	6995	6781	6228	0,00124	4545	6668	1,4672	UNCHANGED
Putative pilus assembly protein	A9HHL8	13800	15489	15865	22209	22900	21194	0,00061	15052	22101	1,4684	UNCHANGED
30S ribosomal protein S6	RS6	9769	6426	11205	13628	12610	14192	0,03995	9133	13477	1,4755	UNCHANGED
Multifunctional fusion protein	A9HDF8	4764	4556	5558	6561	7334	8216	0,00927	4959	7370	1,4862	UNCHANGED
Putative conjugal transfer	A9HSY7	27372	26993	22842	22481	20756	14316	0,05057	25736	19185	0,7454	UNCHANGED
Putative multidrug resistance protein mdtA	A9H3E8	12959	14357	13526	7852	1674	10043	0,05093	13614	6523	0,4791	UNCHANGED
Acetylornithine aminotransferase	A9HFT8	45543	55045	53764	45583	41339	43949	0,05203	51451	43624	0,8479	UNCHANGED
33 kDa chaperonin	A9HFT1	3098	3082	2537	3131	4301	4103	0,05214	2905	3845	1,3234	UNCHANGED
Putative chemotaxis protein cheY	A9HHE7	26230	18310	11502	10782	5770	5928	0,05260	18681	7493	0,4011	UNCHANGED
Extracellular solute-binding protein family 1	A9HPE1	183473	200657	183022	183829	161229	158817	0,05276	189051	167958	0,8884	UNCHANGED
Citrate synthase	A9HII7	47610	55645	59364	59755	62113	68320	0,05294	54206	63396	1,1695	UNCHANGED
Probable cytosol aminopeptidase	A9H1J4	13235	13845	15901	17263	18980	24830	0,05318	14327	20358	1,4209	UNCHANGED
ATP synthase epsilon chain	ATPE	34886	35739	40751	47775	38852	47842	0,05339	37125	44823	1,2073	UNCHANGED
Putative oxidoreductase	A9H878	5474	5539	5659	5967	5701	6249	0,05379	5557	5973	1,0747	UNCHANGED
Putative serine-pyruvate aminotransferase	A9HPX2	4688	5308	7314	8451	6662	8468	0,05418	5770	7860	1,3622	UNCHANGED
Isochorismatase hydrolase	A9H559	5072	4959	5589	6442	5664	5614	0,05428	5207	5907	1,1345	UNCHANGED
Histone family protein DNA-binding protein	A9HP12	17375	21824	19940	16596	16924	15503	0,05433	19713	16341	0,8289	UNCHANGED
Putative outer membrane protein	A9H9Q6	24991	26854	26429	23527	22649	25528	0,05457	26091	23901	0,9161	UNCHANGED
50S ribosomal protein L24	RL24	19543	12818	16822	12668	10366	10945	0,05466	16394	11326	0,6909	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9GZV1	17969	15847	10248	9121	9521	7319	0,05510	14688	8654	0,5892	UNCHANGED
Aminotransferase	A9H8M1	5428	5128	5552	7368	5755	6678	0,05518	5369	6601	1,2293	UNCHANGED
Outer membrane protein	A9HA51	12991	15730	15758	18419	15705	17999	0,05548	14826	17374	1,1718	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Peroxidase	A9HPI6	8169	15087	3908	18426	26581	13279	0,05586	9055	19429	2,1457	UNCHANGED
Putative dehydrogenase	A9HQE8	22190	23939	26303	20742	20110	22587	0,05651	24144	21147	0,8758	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HJX9	64462	63714	60334	8623	8410	52610	0,05670	62837	23215	0,3694	UNCHANGED
Putative nitrogen regulatory protein	A9H7Z8	43324	35196	26952	23573	27452	19137	0,05699	35157	23387	0,6652	UNCHANGED
Ribosome-binding ATPase YchF	A9HC06	5767	4196	7675	8586	8236	8795	0,05735	5879	8539	1,4524	UNCHANGED
Cysteine synthase	A9HAE5	49819	55636	47781	40991	43369	48930	0,05819	51079	44430	0,8698	UNCHANGED
Putative Acetyl-CoA acetyltransferase	A9HE46	7220	8639	8140	7429	5457	6736	0,05832	8000	6541	0,8176	UNCHANGED
Ribosome maturation factor RimP	RIMP	35457	33567	32209	32060	30199	31961	0,05853	33744	31407	0,9307	UNCHANGED
MltA domain protein	A9HK87	6520	7113	7687	6246	4451	6235	0,05897	7106	5644	0,7942	UNCHANGED
Ribulokinase	A9HPD7	21184	24969	33675	29937	38731	40987	0,05923	26609	36552	1,3736	UNCHANGED
Zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein	A9H2A8	20870	22569	24401	20790	18023	20820	0,05938	22613	19878	0,8790	UNCHANGED
Glutamine synthetase	A9H7Z5	136403	167978	224419	238731	245498	246271	0,05971	176267	243500	1,3814	UNCHANGED
Threonine synthase	A9HKE7	30677	25149	23041	21396	22295	18550	0,05976	26289	20747	0,7892	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HIF7	7044	9041	8541	6455	6539	7233	0,06013	8209	6742	0,8214	UNCHANGED
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	A9HM29	335233	369225	386251	383361	411181	405438	0,06013	363570	399993	1,1002	UNCHANGED
Putative ribitol 2-dehydrogenase	A9HPG2	99157	117956	106953	116143	124804	122662	0,06067	108022	121203	1,1220	UNCHANGED
RNA-binding protein Hfq	HFQ	59734	46262	29665	29281	17115	26095	0,06109	45220	24164	0,5344	UNCHANGED
Putative gamma-glutamyltranspeptidase	A9HJR4	21120	22054	24803	19867	19145	21004	0,06144	22659	20005	0,8829	UNCHANGED
Putative cysteine desulfuration protein sufE	A9H196	9805	11057	8716	12039	11829	10628	0,06172	9859	11498	1,1663	UNCHANGED
Glucans biosynthesis protein G	A9HBM4	37955	45547	43462	37553	34624	38636	0,06263	42321	36937	0,8728	UNCHANGED
Bifunctional NAD(P)H-hydrate repair enzyme	A9HRW0	7106	8304	9767	6541	5977	7169	0,06286	8392	6562	0,7819	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HI41	13383	10707	8687	7956	7824	6932	0,06287	10926	7571	0,6929	UNCHANGED
Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]	A9H0U5	17956	17267	21232	22906	20705	21545	0,06294	18818	21718	1,1541	UNCHANGED
Putative cytochrome c551 peroxidase	A9HK81	15285	15345	17372	14029	14268	14672	0,06295	16001	14323	0,8951	UNCHANGED
Glucose-1-phosphate thymidyltransferase	A9HH12	7929	9581	13574	14269	13643	15381	0,06300	10361	14431	1,3928	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Isocitrate dehydrogenase [NADP]	A9HBR3	35752	38071	33196	37951	48024	41808	0,06366	35673	42594	1,1940	UNCHANGED
Transcriptional regulator protein	A9HF00	9340	10568	13316	13837	14520	13359	0,06437	11074	13905	1,2556	UNCHANGED
Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase	A9HEM3	39915	50112	41632	35284	40807	32194	0,06456	43887	36095	0,8225	UNCHANGED
Indole-3-glycerol phosphate synthase	A9HJA0	18708	19022	22524	22452	22560	27682	0,06460	20084	24232	1,2065	UNCHANGED
Acyl-[acyl-carrier-protein]--UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase	A9HKU0	23449	25757	24707	21906	23428	23618	0,06483	24638	22984	0,9329	UNCHANGED
ATP-dependent protease subunit HslV	A9H1A3	18337	26935	22884	32229	24320	32525	0,06492	22719	29691	1,3069	UNCHANGED
Serine--tRNA ligase	SYS	29186	28850	30028	36479	31605	41870	0,06553	29355	36651	1,2486	UNCHANGED
Quinolinate synthase A	A9H8C0	36295	52219	53602	33699	31759	36739	0,06553	47372	34066	0,7191	UNCHANGED
Exodeoxyribonuclease III Xth	A9HIE6	25084	23783	15826	15893	16018	12786	0,06798	21564	14899	0,6909	UNCHANGED
Putative CinA-like	A9HJD6	12582	11809	14423	12243	10707	10361	0,06830	12938	11103	0,8582	UNCHANGED
Adenylate kinase	KAD	76103	64572	52564	53943	50789	42288	0,06875	64413	49007	0,7608	UNCHANGED
Aldo/keto reductase family	A9HF59	17724	23196	16801	16006	14800	13310	0,06927	19240	14705	0,7643	UNCHANGED
UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase	A9H0H5	6816	7854	7851	6617	6574	6967	0,06936	7507	6719	0,8950	UNCHANGED
Heat shock protein Hsp20	A9HHR8	2595	2057	2085	1803	1777	1952	0,06948	2246	1844	0,8212	UNCHANGED
ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit	A9HLQ2	21867	22688	19902	22353	23354	24964	0,06972	21486	23557	1,0964	UNCHANGED
Conseved protein	A9H247	9352	10748	11711	8865	8796	9521	0,07124	10604	9061	0,8545	UNCHANGED
Export-related chaperone CsaA	A9H0Q7	15106	10026	8919	6654	6726	7398	0,07193	11350	6926	0,6102	UNCHANGED
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	A9HJ89	18957	20630	18118	22670	19698	24300	0,07197	19235	22223	1,1553	UNCHANGED
Putative phosphoserine aminotransferase	A9HLQ7	4961	5712	6731	6280	7032	7716	0,07211	5802	7009	1,2081	UNCHANGED
Gluconate 5-dehydrogenase	A9H995	92132	102390	110671	93121	92572	84198	0,07336	101731	89964	0,8843	UNCHANGED
Glycine cleavage system H protein	A9HM50	32559	35915	38457	40573	55274	42029	0,07349	35643	45959	1,2894	UNCHANGED
NADPH-dependent 7-cyano-7-deazaguanine reductase	A9H9B4	9949	9694	7557	6732	8604	5579	0,07377	9067	6972	0,7689	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HC33	8035	7532	9499	13704	9075	16177	0,07397	8355	12985	1,5541	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Oxidoreductase	A9HAF3	122064	141397	87709	82363	72065	94274	0,07472	117057	82901	0,7082	UNCHANGED
Pyrrolo-quinoline quinone	A9H134	62593	71129	56418	54282	51777	55899	0,07526	63380	53986	0,8518	UNCHANGED
Membrane dipeptidase	A9HFJ9	18805	20379	16653	21440	19656	24746	0,07562	18612	21947	1,1792	UNCHANGED
Chaperone clpB	A9HH31	2424	2397	6177	5738	6569	6898	0,07677	3666	6402	1,7463	UNCHANGED
Inositol-1-monophosphatase	A9H6E0	19456	21410	23731	31451	29781	22000	0,07729	21532	27744	1,2885	UNCHANGED
Putative amine oxidase	A9HGY5	4554	6780	6631	7140	7426	8011	0,07765	5988	7526	1,2567	UNCHANGED
Dehydrogenase (Zinc-binding alcohol dehydrogenase)	A9H246	21400	23246	25708	25442	26322	26662	0,07781	23452	26142	1,1147	UNCHANGED
Conserved protein	A9HM79	76339	81812	92699	98642	89871	92987	0,07796	83617	93833	1,1222	UNCHANGED
30S ribosomal protein S9	A9H812	138299	127397	114897	116840	108168	112374	0,07803	126865	112461	0,8865	UNCHANGED
Putative haloacid dehalogenase-like hydro-lase	A9HBE7	29526	32248	35315	29651	26841	29898	0,07825	32363	28797	0,8898	UNCHANGED
Conserved protein	A9H314	33483	36376	38183	35355	28774	31376	0,07889	36014	31835	0,8840	UNCHANGED
Putative molybdopterin biosynthesis protein moeA	A9HJ67	12248	13123	14587	11139	12418	12074	0,07909	13319	11877	0,8917	UNCHANGED
Serine hydroxymethyltransferase	A9HRP5	34391	39111	39737	40610	43540	39915	0,07985	37747	41355	1,0956	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HLE3	16104	9954	8784	17559	18572	13406	0,07995	11614	16512	1,4217	UNCHANGED
Electron transfer flavoprotein subunit beta	A9HEE6	67416	74070	74374	73997	76815	82362	0,08003	71953	77725	1,0802	UNCHANGED
3.3.7 dgoA PE 4	A9HL34	10772	10260	8883	10556	11743	11175	0,08084	9972	11158	1,1190	UNCHANGED
Conserved protein	A9HAR7	21065	22605	21714	21440	17298	19212	0,08194	21795	19317	0,8863	UNCHANGED
Alkyl hydroperoxide reductase AhpD	A9HFF9	38102	40652	38365	41112	39561	41846	0,08246	39040	40840	1,0461	UNCHANGED
Phosphoadenosine phosphosulfate reductase	A9H0V9	17500	22040	21219	9758	19979	11830	0,08278	20253	13856	0,6841	UNCHANGED
Conserved protein	A9HF41	19042	21484	19811	24996	20426	23087	0,08302	20112	22836	1,1354	UNCHANGED
Putative iron-sulfur assembly protein	A9HLI4	40400	31055	22968	20901	27196	13257	0,08304	31474	20451	0,6498	UNCHANGED
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2	A9HRD7	47148	68666	55386	65601	66046	80053	0,08317	57067	70567	1,2366	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9H8I6	17680	16700	13643	13470	13444	13349	0,08356	16008	13421	0,8384	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HRD5	40761	49897	46601	37521	40591	42710	0,08372	45753	40274	0,8802	UNCHANGED
Conserved protein	A9H9B9	35416	15625	37549	31947	52766	54535	0,08442	29530	46416	1,5718	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Putative regulatory protein	A9HF98	23080	26269	25689	27173	26039	30858	0,08563	25013	28023	1,1204	UNCHANGED
Mannitol 2-dehydrogenase	A9HBL5	20490	22822	29526	26983	29511	32936	0,08639	24279	29810	1,2278	UNCHANGED
Phosphoglucosyltransferase/phosphomannosyltransferase alpha/beta/alpha domain I	A9H070	71095	67967	73192	67004	62454	69649	0,08661	70751	66369	0,9381	UNCHANGED
Flavin oxidoreductase	A9H2N2	53884	57604	55400	35724	47101	53182	0,08868	55629	45336	0,8150	UNCHANGED
Putative Aldose 1-epimerase	A9HDX0	12493	14793	14086	12637	11865	12854	0,08894	13791	12452	0,9029	UNCHANGED
Gluconate 2-dehydrogenase (Acceptor)	A9H186	10666	9942	7287	4862	9251	4035	0,08909	9298	6049	0,6506	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HMQ3	91271	98269	101151	93514	77547	90414	0,08919	96897	87158	0,8995	UNCHANGED
Phosphoribosylformylglycinamidine synthase subunit PurS	A9HJF5	49425	52797	45294	44141	44915	45429	0,09002	49172	44828	0,9117	UNCHANGED
Arginine--tRNA ligase	A9HLH8	3830	4573	5147	4539	6058	6246	0,09005	4516	5614	1,2431	UNCHANGED
Putative transporter protein	A9H3U2	8246	9316	7578	7550	7650	6974	0,09010	8380	7391	0,8820	UNCHANGED
Chaperone protein HtpG	A9HLJ9	18729	22017	27619	25956	26887	36516	0,09014	22788	29786	1,3071	UNCHANGED
3-isopropylmalate dehydratase large subunit	A9HS56	22707	9022	32658	8310	8119	6534	0,09032	21462	7654	0,3566	UNCHANGED
Fucose operon fucU protein	A9HPM0	11020	11220	14309	10130	8307	11416	0,09337	12183	9951	0,8168	UNCHANGED
Xylulose kinase	A9HPF3	2406	3392	3778	3383	4978	4159	0,09359	3192	4173	1,3074	UNCHANGED
Transketolase	A9H317	111291	133499	174353	167981	172981	184775	0,09403	139714	175246	1,2543	UNCHANGED
Transcription termination/antitermination protein NusG	A9H988	62414	62811	54562	57238	55183	51814	0,09405	59929	54745	0,9135	UNCHANGED
Putative L-amino-acid oxidase	A9HN63	19512	26148	21260	19463	17038	19067	0,09412	22307	18523	0,8304	UNCHANGED
TonB-dependent receptor	A9HFL0	17700	15976	13330	13130	14380	12231	0,09423	15669	13247	0,8454	UNCHANGED
Putative endoribonuclease protein	A9HN59	6087	4223	3610	3217	3988	2382	0,09440	4640	3196	0,6887	UNCHANGED
ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	A9HB14	10323	8676	12962	12449	13295	13419	0,09450	10654	13054	1,2253	UNCHANGED
3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	A9H466	21680	23775	22273	27232	23945	23392	0,09486	22576	24856	1,1010	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9H3X9	54134	37791	32582	31338	33252	22962	0,09488	41502	29184	0,7032	UNCHANGED
Putative toluene tolerance	A9HBF1	24249	14721	11982	10795	11272	7715	0,09557	16984	9927	0,5845	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Nucleoid-associated protein GDI3467/Gdia_2910	Y3467	21351	32429	17576	37065	38130	24895	0,09743	23786	33363	1,4027	UNCHANGED
30S ribosomal protein S8	RS8	144767	142244	146597	145363	115655	109439	0,09830	144536	123486	0,8544	UNCHANGED
Porin	A9HPF6	29752	33953	27743	31758	35691	43791	0,09834	30483	37080	1,2164	UNCHANGED
Phosphoglycerate kinase	A9HM30	189305	196006	191135	194862	197309	195396	0,09845	192149	195855	1,0193	UNCHANGED
1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino] imidazole-4-carboxamide isomerase	A9GZX2	8812	9989	12111	11877	11650	12716	0,09982	10304	12081	1,1724	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HF96	24308	18617	13296	12957	14913	10845	0,10003	18740	12905	0,6886	UNCHANGED
Ferredoxin--NADP reductase	A9HLF6	21711	19908	14465	21750	43825	27055	0,10075	18695	30877	1,6516	UNCHANGED
Conserved protein	A9HHR5	23135	24908	14468	13968	18417	12246	0,10088	20837	14877	0,7140	UNCHANGED
NADH-quinone oxidoreductase subunit I	A9HRS9	17328	13350	5158	5310	5193	5380	0,10225	11945	5294	0,4432	UNCHANGED
Type II and III secretion system protein	A9HHL5	24145	24812	20076	14874	23491	15963	0,10387	23011	18109	0,7870	UNCHANGED
Single-stranded DNA-binding protein	A9HM62	12248	11786	5450	12245	14219	14793	0,10421	9828	13752	1,3993	UNCHANGED
Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase (UDP-forming)	A9HBU6	5984	8712	12055	11275	11901	13018	0,10447	8917	12065	1,3530	UNCHANGED
Putative extracellular solute-binding protein, PotD/PotF family	A9HGR9	8431	10839	8274	8412	7412	7276	0,10456	9181	7700	0,8386	UNCHANGED
Putative oxidoreductase	A9HM21	49926	47739	40803	44821	62927	66407	0,10510	46156	58052	1,2577	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HH94	22659	16870	8931	9001	11306	6922	0,10546	16153	9076	0,5619	UNCHANGED
PrkA serine protein kinase	A9HIB1	20845	25036	21787	23965	23968	27083	0,10622	22556	25005	1,1086	UNCHANGED
Catalas	A9GZZ4	184690	267953	197490	167931	158546	186246	0,10633	216711	170908	0,7886	UNCHANGED
Lytic murein transglycosylase	A9HI90	8207	5871	5194	4789	5894	3305	0,10638	6424	4662	0,7257	UNCHANGED
Peptidase M24	A9HJP9	9073	11304	13073	12289	12527	15878	0,10722	11150	13564	1,2165	UNCHANGED
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	A9H397	120236	128056	145727	133923	151103	151448	0,10765	131340	145491	1,1077	UNCHANGED
NADH dehydrogenase/NAD(P)H nitroreductase rutE	A9HFB0	13119	13565	14593	13806	15247	14917	0,10968	13759	14657	1,0652	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Multifunctional fusion protein	A9H0J6	27667	29142	15262	23574	10484	11388	0,10969	24024	15149	0,6306	UNCHANGED
Rieske (2Fe-2S) domain protein	A9HL46	52493	51942	21936	33105	23555	17474	0,11045	42124	24711	0,5866	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HRF9	9388	10486	12840	9546	8395	9546	0,11152	10905	9162	0,8402	UNCHANGED
UPF0303 protein GDI1201	A9HDU3	55970	61265	56273	57518	51276	53932	0,11156	57836	54242	0,9379	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HEH6	16772	18392	12985	19097	19756	17500	0,11202	16050	18784	1,1704	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9H6W0	31348	33217	31578	24601	21985	32791	0,11272	32048	26459	0,8256	UNCHANGED
Outer membrane protein	A9H3F7	11181	13561	14652	11573	11243	11273	0,11276	13131	11363	0,8653	UNCHANGED
50S ribosomal protein L19	RL19	44794	37772	26850	45612	44965	45834	0,11334	36472	45471	1,2467	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HAE9	31047	18230	14428	13883	14742	9553	0,11356	21235	12726	0,5993	UNCHANGED
Fumarate hydratase class I	A9HBG7	13311	11610	18183	16726	16808	19563	0,11421	14368	17699	1,2318	UNCHANGED
Putative xanthine dehydrogenase iron-sul-fur-binding subunit	A9H189	12378	11566	15326	11517	11955	10012	0,11530	13090	11161	0,8527	UNCHANGED
Putative tTnB-dependent receptor	A9HH16	7535	7501	5612	5411	6317	5733	0,11552	6883	5820	0,8456	UNCHANGED
Flagellar L-ring protein	A9HHH1	10667	13859	14970	11908	7955	11883	0,11659	13166	10582	0,8038	UNCHANGED
Putative ATPase	A9HFG1	2998	3194	4226	3766	4116	5936	0,11718	3473	4606	1,3263	UNCHANGED
Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amido-transferase subunit B	A9HRI7	6598	7213	8664	7913	8333	9540	0,11744	7492	8595	1,1473	UNCHANGED
6-phosphogluconate dehydrogenase, decar-boxylating	A9H324	200043	208215	202458	237590	202142	221900	0,11806	203572	220544	1,0834	UNCHANGED
Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	A9HFE5	25680	34167	35359	35617	36040	38610	0,11817	31735	36756	1,1582	UNCHANGED
Trehalose 6-phosphate phosphatase	A9HBU3	27159	32031	31518	28486	28967	24418	0,11817	30236	27291	0,9026	UNCHANGED
Putative chemotaxis protein cheY	A9HHG3	64079	35967	39523	32501	36951	26862	0,11973	46523	32105	0,6901	UNCHANGED
Glutathione peroxidase	A9HKB6	22392	16994	14209	13735	16263	11647	0,11974	17865	13881	0,7770	UNCHANGED
Histidinol-phosphate aminotransferase	HIS8	15675	16978	17335	19328	16561	18106	0,12169	16663	17998	1,0802	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9H3Z8	5511	3528	4524	2979	4600	2396	0,12190	4521	3325	0,7354	UNCHANGED
Thiamine biosynthesis oxidoreductase thiO	A9HI52	18065	25890	20558	23069	25857	26818	0,12192	21504	25248	1,1741	UNCHANGED
Conservev protein	A9GZU8	65479	47308	30963	31662	38590	25695	0,12328	47917	31982	0,6675	UNCHANGED
Beta sliding clamp	A9HI34	28543	31644	43908	38826	45571	42173	0,12368	34698	42190	1,2159	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
ABC transporter related	A9HPE7	63165	71626	76433	75245	74499	79887	0,12561	70408	76544	1,0871	UNCHANGED
Conserved protein	A9HRX3	10449	8035	5295	5121	6299	5301	0,12579	7926	5574	0,7032	UNCHANGED
Putative threonine dehydratase catabolic	A9H381	6029	6416	5575	6262	7126	6192	0,12624	6007	6527	1,0866	UNCHANGED
Protein TonB	A9HF68	27641	15038	11593	26219	24647	26604	0,12634	18091	25823	1,4274	UNCHANGED
Outer membrane protein assembly factor BamA	A9HKV0	37699	40176	31518	32249	35644	27772	0,12750	36464	31888	0,8745	UNCHANGED
Phosphoribosylformylglycinamidine synthase subunit PurQ	A9HJG0	22591	18120	20700	23887	21104	22697	0,12750	20470	22563	1,1022	UNCHANGED
ATP synthase gamma chain	ATPG	57299	68705	78487	80665	74123	78011	0,12975	68164	77600	1,1384	UNCHANGED
Transcriptional regulator, CarD family	A9HIN7	29563	28257	12620	20378	14637	9752	0,13011	23480	14923	0,6355	UNCHANGED
Tyrosine--tRNA ligase	A9HMK2	13538	16337	21246	20121	20789	20576	0,13216	17040	20495	1,2028	UNCHANGED
Peptidoglycan-associated protein	A9HB05	503849	524654	435663	350534	259471	514674	0,13281	488055	374893	0,7681	UNCHANGED
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	A9HJ15	133062	124797	123781	130797	139912	128610	0,13290	127213	133106	1,0463	UNCHANGED
Electron transport protein SCO1/SenC	A9H4T2	26274	25837	57891	24540	17864	20521	0,13781	36667	20975	0,5720	UNCHANGED
Carbonic anhydrase	A9HL77	63585	61556	66481	63284	67760	69424	0,13860	63874	66823	1,0462	UNCHANGED
Outer membrane protein	A9HKU8	5687	2815	4700	2773	4152	2432	0,13930	4401	3119	0,7087	UNCHANGED
UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase	A9H0J0	5546	5603	5713	5656	6632	5873	0,13978	5621	6054	1,0770	UNCHANGED
OmpA/MotB domain protein	A9GZP4	26320	28523	51490	26387	26196	19149	0,14292	35444	23911	0,6746	UNCHANGED
4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (flavodoxin)	ISPG	5465	6762	8621	6047	5425	5436	0,14303	6949	5636	0,8110	UNCHANGED
6-phosphogluconate dehydrogenase NAD-binding	A9HL10	15292	14465	12860	12592	9385	14342	0,14375	14205	12106	0,8522	UNCHANGED
Putative dihydro-orotase protein	A9GZR4	17985	21164	23210	21258	22712	25543	0,14776	20786	23171	1,1147	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HSZ4	49654	47849	39934	42397	39146	43465	0,15033	45812	41669	0,9096	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Tryptophan--tRNA ligase	A9HIP8	10972	13891	12366	14338	12759	13690	0,15115	12410	13596	1,0955	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9H986	21556	28099	30063	28278	15353	19468	0,15164	26573	21033	0,7915	UNCHANGED
dTDP-glucose 4,6-dehydratase	A9H3I5	3259	4136	5545	6149	4691	4991	0,15200	4313	5277	1,2234	UNCHANGED
Biotin synthase	BIOB	13120	12747	15514	12559	10479	13773	0,15266	13794	12271	0,8896	UNCHANGED
S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase	A9HK57	49614	58137	65136	52929	47908	53745	0,15380	57629	51527	0,8941	UNCHANGED
50S ribosomal protein L7/L12	RL7	108883	74418	73271	168007	65101	303410	0,15395	85524	178839	2,0911	UNCHANGED
GTP cyclohydrolase 1	A9HAP7	12140	11520	9169	10994	8754	9031	0,15407	10943	9593	0,8766	UNCHANGED
3-isopropylmalate dehydratase small subunit	LEUD	9212	6626	5032	5457	5916	4577	0,15462	6957	5317	0,7642	UNCHANGED
Phosphate-specific transport system accessory protein PhoU	A9HS74	4796	4972	3775	4408	5203	6477	0,15477	4514	5362	1,1878	UNCHANGED
Cof-like hydrolase	A9H332	84254	77540	82166	79636	87216	92246	0,15531	81320	86366	1,0621	UNCHANGED
PKHD-type hydroxylase GDI1238/Gdia_1949	Y1238	93875	98885	47438	54051	66727	54106	0,15692	80066	58295	0,7281	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HJK6	17995	18510	12520	15680	5726	14630	0,15939	16342	12012	0,7350	UNCHANGED
Methionine--tRNA ligase	A9HIA3	3710	5237	5293	5334	5498	5447	0,15996	4747	5427	1,1432	UNCHANGED
Putative TonB-dependent receptor	A9HDZ9	13217	11674	9688	9888	11176	9448	0,16132	11526	10170	0,8824	UNCHANGED
50S ribosomal protein L4	RL4	94571	79566	42699	53699	61441	41921	0,16299	72279	52354	0,7243	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HBZ1	15848	17034	16777	14643	13023	17248	0,16342	16553	14971	0,9044	UNCHANGED
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	A9HM70	26281	15570	12679	12219	16180	10077	0,16415	18177	12825	0,7056	UNCHANGED
Putative D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	A9HFV9	25809	21357	19189	19951	20064	18881	0,16467	22118	19632	0,8876	UNCHANGED
Multidrug resistance protein A	A9H3B5	15843	17999	17287	15218	22432	23237	0,16468	17043	20296	1,1909	UNCHANGED
Tol-Pal system protein TolB	A9HB04	133077	155911	131872	133944	135173	120575	0,16538	140287	129897	0,9259	UNCHANGED
Alcohol dehydrogenase	A9HBQ8	4376	4784	4035	5022	4371	4752	0,16654	4398	4715	1,0720	UNCHANGED
60 kDa chaperonin 1	CH601	241881	325095	336902	341250	315022	362485	0,16689	301293	339586	1,1271	UNCHANGED
Si al peptidase I	A9H4M0	18372	15332	12675	18377	17212	17005	0,16726	15460	17532	1,1340	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HHE4	10757	9116	8672	8688	8536	8940	0,16828	9515	8721	0,9166	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Delta-aminolevulinic acid dehydratase	A9HRP9	22581	21960	23152	21418	19670	22992	0,16863	22565	21360	0,9466	UNCHANGED
Alpha-ribazole phosphatase	A9HH08	15734	15633	12988	13619	13070	14326	0,17211	14785	13672	0,9247	UNCHANGED
NADH-quinone oxidoreductase subunit C	A9HRU1	26955	28749	23630	30834	26789	27923	0,17246	26445	28515	1,0783	UNCHANGED
Conserved protein	A9HS32	7955	6336	3862	9123	10928	4978	0,17464	6051	8343	1,3789	UNCHANGED
4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	A9HS93	12046	13347	11824	13356	12199	13748	0,17737	12406	13101	1,0560	UNCHANGED
Putative histidine triad (HIT) protein	A9GZW3	10731	9876	8185	13437	17951	7837	0,17831	9597	13075	1,3624	UNCHANGED
Site-determining protein	A9HLY3	81435	97976	105641	109469	101611	99738	0,17841	95018	103606	1,0904	UNCHANGED
Bifunctional purine biosynthesis protein PurH	A9HDN9	26715	29814	36413	33173	33490	36429	0,18043	30981	34364	1,1092	UNCHANGED
Proline--tRNA ligase	A9HRR5	22438	24634	27807	25178	26018	31284	0,18219	24960	27494	1,1015	UNCHANGED
Lipoprotein-releasing system ATP-binding protein LolD	A9HRR2	4344	3531	2055	2685	2450	2464	0,18305	3310	2533	0,7654	UNCHANGED
Putative glycyl aminopeptidase	A9HN12	40604	49146	44902	42314	37944	44691	0,18321	44884	41650	0,9279	UNCHANGED
Adenylosuccinate lyase	A9HJE7	9039	9678	6841	8556	9796	10362	0,18373	8519	9571	1,1235	UNCHANGED
FMN-dependent NADH-azoreductase	AZOR	23927	23211	21447	21680	23197	14511	0,18586	22862	19796	0,8659	UNCHANGED
Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	A9HRI9	26239	46110	51706	49882	47404	52787	0,18927	41352	50024	1,2097	UNCHANGED
50S ribosomal protein L6	RL6	48133	47840	35443	39902	16075	45187	0,19332	43805	33722	0,7698	UNCHANGED
ROS/MUCR transcriptional regulator protein	A9HFC1	2922	3491	2383	3392	4080	2755	0,19741	2932	3409	1,1626	UNCHANGED
NADP oxidoreductase coenzyme F420-dependent	A9HL93	31484	39635	37175	33035	30359	36332	0,19784	36098	33242	0,9209	UNCHANGED
50S ribosomal protein L11	RL11	56612	64562	46641	65268	76410	51596	0,19848	55938	64425	1,1517	UNCHANGED
50S ribosomal protein L1	RL1	91176	76830	94342	95586	93534	90316	0,20164	87449	93145	1,0651	UNCHANGED
Putative transcriptional regulator, rrf2 family	A9HRZ0	13040	11989	10258	11271	13730	13413	0,20235	11762	12805	1,0886	UNCHANGED
Carboxymethylenebutenolidase	A9H121	12733	14837	16235	13812	12069	14427	0,20299	14602	13436	0,9202	UNCHANGED
Putative serine carboxypeptidase	A9HS00	11293	14184	13657	11496	11130	13366	0,20419	13045	11998	0,9197	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
TonB-dependent receptor	A9H932	63727	65905	53074	53175	57039	59881	0,20662	60902	56698	0,9310	UNCHANGED
Insulinase protein	A9H438	22749	29788	26934	25649	22057	25181	0,20712	26490	24296	0,9172	UNCHANGED
Glycosyl transferase group 1	A9HLZ7	37967	44319	40718	40048	47317	43278	0,20726	41001	43547	1,0621	UNCHANGED
Ribosomal RNA large subunit methyltransferase E	A9HIS5	17923	17650	10686	13538	10127	14897	0,20806	15419	12854	0,8336	UNCHANGED
Dihydroxy-acid dehydratase	A9HA40	10442	10676	14018	12747	12965	12908	0,21031	11712	12873	1,0991	UNCHANGED
Aminopeptidase	A9HFU5	66754	76078	79030	81615	71373	82777	0,21072	73954	78588	1,0627	UNCHANGED
NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	NQOR	30143	35241	39629	39523	31480	56452	0,21114	35004	42485	1,2137	UNCHANGED
Putative transcriptional regulatory protein, MerR family	A9HS23	15837	8947	2395	4526	7368	3602	0,21210	9060	5166	0,5702	UNCHANGED
Flagellar P-ring protein	A9HH48	10264	12389	11993	10530	10845	11304	0,21278	11549	10893	0,9432	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9H0Y9	46666	56466	50690	49668	49262	46323	0,21350	51274	48418	0,9443	UNCHANGED
30S ribosomal protein S2	RS2	99286	152677	151729	144829	140663	172931	0,21617	134564	152807	1,1356	UNCHANGED
Protein GrpE	A9HEA5	4139	3355	2091	3512	5755	3034	0,21692	3195	4100	1,2833	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9H3D7	40252	27250	19972	22403	27247	20355	0,21746	29158	23335	0,8003	UNCHANGED
Heat-inducible transcription repressor HrcA	A9HF56	3497	3804	6758	5797	6998	4565	0,21824	4686	5786	1,2347	UNCHANGED
Protease protein	A9HAN0	26210	28886	31838	56303	28843	28470	0,21858	28978	37872	1,3069	UNCHANGED
Putative transcriptional Regulator	A9HFD0	3571	2118	1312	2206	1653	1209	0,22158	2334	1689	0,7239	UNCHANGED
Molybdenum cofactor biosynthesis protein B	A9HAM8	26942	29071	23366	25349	25894	23230	0,22219	26459	24825	0,9382	UNCHANGED
Lysine--tRNA ligase	A9HK29	5625	7029	7516	6420	7561	8085	0,22390	6723	7355	1,0940	UNCHANGED
Fructose-bisphosphate aldolase class 1	A9H6A5	105416	117919	89873	93160	99642	97574	0,22458	104403	96792	0,9271	UNCHANGED
Putative nitroreductase family protein	A9GZY4	29209	12363	28303	18635	16472	19489	0,22548	23292	18199	0,7813	UNCHANGED
Hopanoid biosynthesis associated radical SAM protein HpnH	A9HAA5	14672	17159	12903	14694	15690	18466	0,22921	14911	16283	1,0920	UNCHANGED
Anthranilate phosphoribosyltransferase	A9HJ97	13615	15425	16441	15601	16329	15810	0,23062	15160	15913	1,0497	UNCHANGED
Glutamate--tRNA ligase 1	SYE1	20219	21021	14786	15324	18045	17209	0,23072	18675	16859	0,9028	UNCHANGED
Mammalian cell entry related domain protein	A9H983	9558	10663	10760	11016	10431	10603	0,23287	10327	10683	1,0345	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Folate-binding protein YgfZ	A9H151	6626	7122	22429	7012	6825	8464	0,23346	12059	7434	0,6164	UNCHANGED
Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+]	A9HNC1	34307	40247	23534	46505	41454	27903	0,23443	32696	38621	1,1812	UNCHANGED
Putative peptidase	A9H6C0	5874	2866	2407	3330	2589	2316	0,23481	3716	2745	0,7387	UNCHANGED
Putative membrane protein	A9HAA2	9158	6636	4377	5704	6807	3656	0,23632	6724	5389	0,8014	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9H1P1	12720	11212	6722	7561	10597	7438	0,23655	10218	8532	0,8350	UNCHANGED
Orotate phosphoribosyltransferase	A9HII0	41504	44115	52608	47391	48924	50801	0,23713	46076	49038	1,0643	UNCHANGED
Conserved protein	A9HS96	25780	38152	33915	29346	28681	30410	0,23968	32616	29479	0,9038	UNCHANGED
NADH-quinone oxidoreductase subunit B 2	NUOB2	35542	38701	41423	39802	34968	35562	0,23986	38556	36777	0,9539	UNCHANGED
Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase	A9HJ43	24111	24663	29456	28387	25636	28927	0,24014	26077	27650	1,0603	UNCHANGED
Adenylosuccinate synthetase	PURA	43841	54513	53674	47038	51743	43371	0,24058	50676	47384	0,9350	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HGX9	4177	4619	5110	4370	4208	4619	0,24308	4635	4399	0,9490	UNCHANGED
6-phosphogluconolactonase	A9H335	68174	85098	55606	55044	51179	76144	0,24346	69626	60789	0,8731	UNCHANGED
Conserved protein	A9H137	9942	5585	5682	5512	5011	6947	0,24363	7069	5823	0,8237	UNCHANGED
Dihydroorotase	A9H142	9923	11401	13749	11336	12133	15407	0,24532	11691	12959	1,1085	UNCHANGED
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	A9HCR1	64102	57721	58166	52729	74110	69545	0,24732	59996	65461	1,0911	UNCHANGED
Alcohol dehydrogenase GroES domain protein	A9H073	15631	16913	17728	20765	16390	16711	0,24852	16757	17956	1,0715	UNCHANGED
Putative Antibiotic biosynthesis mono-oxygenase	A9HP28	54495	23348	15677	18278	33120	11546	0,25163	31173	20981	0,6731	UNCHANGED
Cell division protein FtsZ	A9H0K4	38113	36047	41762	34030	38675	38283	0,25172	38641	36996	0,9574	UNCHANGED
DSBA oxidoreductase	A9HIK8	57450	42232	36092	44754	39639	35646	0,25359	45258	40013	0,8841	UNCHANGED
30S ribosomal protein S1	A9H459	99843	104173	109190	94356	104564	104715	0,25367	104402	101212	0,9694	UNCHANGED
Putative phospholipase C	A9HNB0	7923	8028	8625	7542	7593	8563	0,25446	8192	7899	0,9643	UNCHANGED
Peptidase, family M16	A9HKF0	10389	12379	12823	15039	9467	16084	0,25535	11864	13530	1,1405	UNCHANGED
Methylthioribose-1-phosphate isomerase	A9HLJ6	11230	12700	13430	9403	12048	13115	0,25785	12453	11522	0,9252	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Efflux transporter, RND family, MFP subunit	A9HEF9	45327	47522	49549	46162	42257	48998	0,25905	47466	45806	0,9650	UNCHANGED
Flagellar M-ring protein	A9HHC2	6956	7900	10006	7221	11194	9568	0,25929	8287	9328	1,1256	UNCHANGED
Conserved protein	A9HBT6	15193	13879	16334	13793	15453	14317	0,26018	15135	14521	0,9594	UNCHANGED
Quinone oxidoreductase	A9H7Y9	10668	14229	12523	12543	12417	15494	0,26035	12473	13485	1,0811	UNCHANGED
ATP synthase subunit delta	ATPD	13594	12134	13667	12731	15537	13249	0,26281	13132	13839	1,0539	UNCHANGED
2-octaprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase	A9HMD1	7113	9246	10584	8890	9178	11627	0,26496	8981	9898	1,1021	UNCHANGED
Putative general stress response protein	A9H3E6	27522	16674	17517	20575	14384	18504	0,26716	20571	17821	0,8663	UNCHANGED
NADH-quinone oxidoreductase	A9HRT3	16917	21394	24303	21027	22769	23722	0,26757	20871	22506	1,0783	UNCHANGED
Putative peroxiredoxin osmC	A9H0U0	15147	16826	26911	7642	23996	15190	0,27041	19628	15609	0,7952	UNCHANGED
ATP-dependent dethiobiotin synthetase BioD	A9HJ62	4674	7219	5526	6434	5856	6800	0,27170	5806	6363	1,0959	UNCHANGED
Homoserine dehydrogenase	A9HCQ4	26357	29339	32826	32134	28986	31580	0,27785	29507	30900	1,0472	UNCHANGED
Aminotransferase	A9H801	6626	7854	7880	7365	7141	6978	0,27903	7453	7161	0,9608	UNCHANGED
Coenzyme PQQ synthesis protein B	PQQB	14838	15736	14222	16495	19915	12744	0,27917	14932	16384	1,0973	UNCHANGED
Lipoprotein SmpA/OmlA family	A9HS35	34300	32171	35366	28988	37029	30541	0,27964	33946	32186	0,9481	UNCHANGED
dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	A9H3H9	33712	33717	31902	35952	34230	16490	0,28402	33110	28891	0,8726	UNCHANGED
Putative molybdenum transport protein modE	A9HJC5	16093	12122	5634	8418	9971	9285	0,28519	11283	9225	0,8176	UNCHANGED
Aldo/keto reductase	A9HH27	21932	16185	24014	20466	23348	23174	0,28614	20710	22330	1,0782	UNCHANGED
Oxidoreductase domain protein	A9HDU1	109454	124652	142699	131971	128104	136025	0,28787	125602	132033	1,0512	UNCHANGED
4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase	A9HET4	14191	15068	13428	14749	13468	13259	0,28821	14229	13826	0,9716	UNCHANGED
Outer membrane protein	OMPC	225447	385767	344657	166590	324789	333030	0,28910	318624	274803	0,8625	UNCHANGED
3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	A9HJI4	25617	27370	29243	27327	24055	27947	0,28923	27410	26443	0,9647	UNCHANGED
Uracil phosphoribosyltransferase	A9H391	5551	5260	4359	1715	5619	5325	0,28949	5057	4220	0,8345	UNCHANGED
Putative capsule polysaccharide export inner-membrane protein ctrB	A9HMOV0	5743	5998	6352	5987	5980	6632	0,29007	6031	6200	1,0279	UNCHANGED
Putative outer membrane protein	A9H6D3	3750	4556	3644	4173	3320	3784	0,29338	3983	3759	0,9437	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
tRNA pseudouridine synthase B	TRUB	19412	24666	22973	22931	22230	25048	0,29587	22351	23403	1,0471	UNCHANGED
Gamma-glutamyl phosphate reductase	A9HC10	7281	6037	6536	5315	8288	8111	0,29792	6618	7238	1,0937	UNCHANGED
Bifunctional enzyme IspD/IspF	A9HLU2	26769	29383	30875	30347	32089	27575	0,30312	29009	30004	1,0343	UNCHANGED
Ribokinase3	A9H0C5	10231	13179	11475	11231	10504	11560	0,30400	11628	11098	0,9544	UNCHANGED
Methionyl-tRNA formyltransferase	FMT	11469	10022	10790	10737	11174	11130	0,30690	10760	11014	1,0236	UNCHANGED
Maf-like protein GDI1438	A9HFL9	4537	4421	3208	3821	4036	3537	0,30722	4055	3798	0,9365	UNCHANGED
D-xylose ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein	A9HNP0	185027	196528	224659	176463	207473	198180	0,31037	202071	194038	0,9602	UNCHANGED
Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	A9HHG0	30284	32312	33856	34159	31076	27873	0,31431	32151	31036	0,9653	UNCHANGED
Peptidase protein, modulator of DNA gyrase	A9HEU1	9066	15805	24430	21130	18931	16772	0,31734	16434	18944	1,1528	UNCHANGED
Aminotransferase	A9HSE9	58839	67541	69613	65816	68051	67657	0,31777	65331	67175	1,0282	UNCHANGED
Alcohol dehydrogenase	A9HNA5	18955	28434	28105	29033	22853	29439	0,31822	25165	27108	1,0772	UNCHANGED
Nitrilase/cyanide hydratase	A9GZH7	26791	27824	27903	24386	28485	27574	0,31983	27506	26815	0,9749	UNCHANGED
Putative aerobic cobaltochelatase cobS subunit	A9HJ01	26837	28477	30328	28306	28443	30876	0,32052	28547	29208	1,0232	UNCHANGED
Uridylate kinase	A9HKW8	52587	59911	66620	62884	57771	65420	0,32497	59706	62025	1,0388	UNCHANGED
Ubiquinone/menaquinone biosynthesis C-methyltransferase UbiE	A9HI27	43846	49405	50409	47941	45849	46680	0,33018	47887	46823	0,9778	UNCHANGED
Ribose import ATP-binding protein RbsA	A9HPC3	7819	10800	12373	6474	12920	8272	0,33149	10331	9222	0,8926	UNCHANGED
LexA repressor	LEXA	12585	12818	8769	9729	10343	11971	0,33151	11391	10681	0,9377	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HM07	32198	35408	21247	31572	30244	33494	0,33431	29618	31770	1,0727	UNCHANGED
Nitrogen assimilation regulatory protein ntrX	A9HLS3	5605	6439	7166	7056	5550	7684	0,33498	6403	6763	1,0562	UNCHANGED
Two-component response regulator	A9HFR4	22261	24473	21151	23746	21831	20440	0,33634	22628	22006	0,9725	UNCHANGED
Glycosyl transferase	A9HH55	59916	66509	57954	64017	59691	64812	0,33883	61460	62840	1,0225	UNCHANGED
50S ribosomal protein L25	RL25	128440	99827	84765	97970	102767	94130	0,34270	104344	98289	0,9420	UNCHANGED
Putative Outer membrane protein oprM	A9HEG4	17193	21855	22946	20327	18252	20816	0,34326	20665	19798	0,9581	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Putative pyruvate dehydrogenase E2 component	A9HHP4	19975	23106	25187	26874	25348	19545	0,34535	22756	23922	1,0512	UNCHANGED
Cold shock-like protein cspE	A9HIW8	146595	131939	90755	125301	122177	145600	0,34795	123096	131026	1,0644	UNCHANGED
Pyruvate kinase	A9HEH3	84052	99133	113660	118301	102687	90612	0,34817	98948	103867	1,0497	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HCR3	13318	16686	13928	14785	15976	10856	0,35132	14644	13872	0,9473	UNCHANGED
Phosphoglucomutase	A9HSH5	56823	66318	74841	68423	53510	67398	0,35250	65994	63111	0,9563	UNCHANGED
Peptidase protein	A9HET1	16450	22174	22165	16873	19011	21986	0,35437	20263	19290	0,9520	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9GZL6	19638	21269	26928	25458	22637	15154	0,35450	22611	21083	0,9324	UNCHANGED
Conserved protein	A9HHA4	82806	111755	116001	108849	102273	112759	0,35866	103521	107960	1,0429	UNCHANGED
Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	A9HI07	116628	133150	121899	126893	122796	128214	0,35949	123892	125967	1,0168	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9H4N6	7302	7881	8477	7232	5749	9349	0,35972	7886	7443	0,9438	UNCHANGED
50S ribosomal protein L5	A9H3M8	134719	144915	148715	153767	132305	132590	0,35985	142783	139554	0,9774	UNCHANGED
Protein-export protein SecB	SECB	56155	58511	64517	51948	78157	58857	0,36226	59728	62987	1,0546	UNCHANGED
FAD linked oxidase domain protein	A9H1K4	20915	21557	25100	22434	21246	22307	0,36471	22524	21996	0,9766	UNCHANGED
Thioredoxin protein	A9H2A4	43919	50946	45550	57875	39568	49445	0,36677	46805	48963	1,0461	UNCHANGED
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	A9HIQ1	159157	171750	146171	147722	134763	178140	0,36732	159026	153542	0,9655	UNCHANGED
dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	A9H3H6	6915	6214	5364	6607	6504	5936	0,36757	6164	6349	1,0300	UNCHANGED
50S ribosomal protein L9	RL9	136217	120257	76920	101885	148447	108000	0,36813	111131	119444	1,0748	UNCHANGED
Branched-chain-amino-acid aminotransferase	A9HNB7	50225	58028	46670	51513	45363	53541	0,36891	51641	50139	0,9709	UNCHANGED
Glycerol kinase	A9HHY3	134031	165589	198606	174754	161844	183144	0,37219	166075	173247	1,0432	UNCHANGED
YceI family protein	A9HFY2	16459	4687	7958	11779	5771	16412	0,37325	9701	11321	1,1669	UNCHANGED
Nucleoside diphosphate kinase	NDK	76199	94574	50748	67720	91455	77469	0,37487	73841	78881	1,0683	UNCHANGED
Alcohol dehydrogenase [acceptor]	A9HK12	82579	89169	73681	95664	94727	66252	0,37501	81810	85547	1,0457	UNCHANGED
Methionine aminopeptidase	A9H4B0	8400	5718	4437	6898	5414	7615	0,37684	6185	6642	1,0740	UNCHANGED
2-nitropropane dioxygenase	A9HF38	6749	7248	8257	8606	7770	6616	0,37685	7418	7664	1,0331	UNCHANGED
Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF	HIS6	6858	8736	7764	6952	7817	7952	0,37774	7786	7573	0,9727	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Protein TolR	A9HAZ8	45143	38374	28927	40125	39136	38214	0,37813	37482	39158	1,0447	UNCHANGED
Phosphoglycolate phosphatase	A9HI43	32009	39111	44503	37152	33590	40684	0,37880	38541	37142	0,9637	UNCHANGED
NADH-quinone oxidoreductase subunit F	A9HRT4	4476	3597	3029	2841	4762	4200	0,37962	3701	3935	1,0632	UNCHANGED
Methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	MTNB	11880	9235	6995	10596	10861	8281	0,38000	9370	9913	1,0579	UNCHANGED
HAD-superfamily hydrolase, subfamily IA, variant 3	A9HDX4	12541	16254	16572	16327	13464	17112	0,38959	15122	15634	1,0338	UNCHANGED
Electron transfer flavoprotein alpha subunit	A9HEE9	90715	68652	87353	71325	81263	104964	0,39111	82240	85851	1,0439	UNCHANGED
Ferritin Dps family protein	A9HB55	40288	36331	38396	42681	34901	34855	0,39186	38338	37479	0,9776	UNCHANGED
Putative transcriptional regulator protein	A9H0C0	6092	4828	3467	4842	5235	3499	0,39282	4796	4525	0,9436	UNCHANGED
Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	A9HDE6	63667	81275	80307	71781	71315	76819	0,39515	75083	73305	0,9763	UNCHANGED
Putative thioredoxin protein	A9HSA5	108159	73857	72556	91885	98983	75377	0,39592	84857	88748	1,0459	UNCHANGED
Probable phosphoketolase	A9HGX3	35393	49403	54824	49963	47708	47194	0,39612	46540	48288	1,0376	UNCHANGED
OmpW family protein	A9HED6	75033	69171	41203	62976	57659	55420	0,39785	61802	58685	0,9496	UNCHANGED
Thioredoxin reductase	A9H0A5	10050	11132	14908	10693	16016	11192	0,40090	12030	12634	1,0502	UNCHANGED
Bifunctional protein FOLD	FOLD	29399	34851	38311	31546	33789	34961	0,40312	34187	33432	0,9779	UNCHANGED
PRC-barrel protein	A9HNNW8	56948	55524	51446	63479	38488	69835	0,40537	54639	57267	1,0481	UNCHANGED
Hydroxyacylglutathione hydrolase	A9H1G0	11976	15343	14295	12304	13723	14666	0,40675	13871	13564	0,9779	UNCHANGED
Inorganic pyrophosphatase	A9H4G5	311708	283766	306750	282052	316717	293504	0,40813	300741	297424	0,9890	UNCHANGED
Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA	A9HI15	62830	50887	35328	48836	56505	36301	0,40823	49682	47214	0,9503	UNCHANGED
Putative 6-phosphogluconolactonase	A9HJ42	19500	22673	18812	21144	19906	18910	0,40824	20328	19986	0,9832	UNCHANGED
Alcohol dehydrogenase zinc-binding domain protein	A9HE22	7180	6345	8509	5253	8764	9055	0,40885	7345	7691	1,0471	UNCHANGED
CRISPR-associated protein Cas5 family	A9HLC6	12021	7980	7971	12522	6767	7012	0,41131	9324	8767	0,9402	UNCHANGED
Fructose-1,6-bisphosphatase	A9HCQ2	146205	175677	151903	178348	127734	181949	0,41251	157929	162677	1,0301	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HT76	91057	89581	101939	98908	92846	87203	0,41338	94192	92986	0,9872	UNCHANGED
Outer membrane efflux protein	A9H3U0	6858	6876	8351	7484	6395	8768	0,41843	7362	7549	1,0254	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Peptidase U62 modulator of DNA gyrase	A9HKF2	16651	19487	22611	19690	19307	18610	0,42341	19583	19202	0,9806	UNCHANGED
Aminopeptidase	A9HMM0	42251	48384	58783	46309	47965	51901	0,42421	49806	48725	0,9783	UNCHANGED
Putative exported protein	A9HDN7	20940	10083	9116	14664	16603	11298	0,42881	13380	14188	1,0604	UNCHANGED
Sec-independent protein translocase protein TatA	TATA	31663	3941	12566	11175	12938	29642	0,43170	16057	17918	1,1159	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HMM2	18184	9239	9677	10723	16173	8164	0,43264	12366	11686	0,9450	UNCHANGED
Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	A9HRF1	45185	34982	31497	39954	31637	42740	0,43754	37221	38110	1,0239	UNCHANGED
Lipase protein	A9HBK6	44314	52465	64945	56493	55086	53361	0,43770	53908	54980	1,0199	UNCHANGED
Signal peptidase I	A9HKX7	9963	10076	8745	11049	7005	11500	0,43849	9595	9851	1,0268	UNCHANGED
Putative DNA-binding response regulator mtrA	A9HIE2	20808	22191	17061	19317	21483	18395	0,44047	20020	19731	0,9856	UNCHANGED
Peptidase	A9HEL6	42341	35454	37784	38975	35990	39629	0,44785	38527	38198	0,9915	UNCHANGED
Triosephosphate isomerase	TPIS	47151	54989	47708	48870	48548	53694	0,44851	49950	50370	1,0084	UNCHANGED
Riboflavin biosynthesis protein	A9H8G8	7651	7891	8813	8276	7797	8450	0,44903	8118	8174	1,0069	UNCHANGED
Phosphoglycerate mutase	A9HBZ6	33907	48659	42799	43015	41266	39296	0,45189	41789	41192	0,9857	UNCHANGED
Dehydrogenase	A9H159	10974	11116	9928	11339	9634	10805	0,45265	10672	10593	0,9925	UNCHANGED
Thioredoxin	A9HA92	51664	42177	57928	51480	61527	35394	0,45339	50590	49467	0,9778	UNCHANGED
Carboxymethylenebutenolidase	A9HK54	25499	28583	31120	26997	28263	29267	0,45353	28401	28176	0,9921	UNCHANGED
Phosphoribosylamine--glycine ligase	A9H4P1	11150	10913	11774	11061	11893	10721	0,45369	11279	11225	0,9952	UNCHANGED
Putative inositol-1-monophosphatase	A9HLR6	6443	4761	6018	5258	5884	5879	0,45539	5741	5673	0,9883	UNCHANGED
Octanoyltransferase	LIPB	9343	9741	11530	9886	12933	8310	0,45862	10205	10376	1,0168	UNCHANGED
30S ribosomal protein S19	RS19	41670	15960	22922	22137	22750	32824	0,45903	26851	25903	0,9647	UNCHANGED
Putative rare lipoprotein A	A9HI92	18617	19833	8655	15706	12393	17773	0,46134	15702	15290	0,9738	UNCHANGED
Conserved protein	A9HFQ7	44145	47357	47239	44192	52188	41276	0,46201	46247	45885	0,9922	UNCHANGED
Aminotransferase class-III	A9HJT9	11491	16505	12957	18137	10900	12703	0,46303	13651	13914	1,0192	UNCHANGED
Gluconokinase	A9HSC5	24366	11344	5359	14269	20851	7949	0,46328	13690	14357	1,0487	UNCHANGED

Descrição	Acesso	Ctr 1	Ctr 2	Ctr 3	Co 1	Co 2	Co 3	teste t	Média do Ctr	Média do Co	Fold Change	TAG
Alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant/ Mal allergen	A9H3W7	71116	61226	53035	52814	60557	69941	0,46422	61792	61104	0,9889	UNCHANGED
Glucokinase protein	A9HIS0	61499	66642	73657	65005	64899	70748	0,46507	67266	66884	0,9943	UNCHANGED
Putative penicillin-binding protein 5	A9HI96	9560	11201	11359	9999	11387	10536	0,46516	10707	10641	0,9938	UNCHANGED
Biopolymer transport exbB protein	A9HF70	135831	139947	122821	141350	177619	87243	0,46627	132866	135404	1,0191	UNCHANGED
Probable chemoreceptor glutamine deamidase CheD	A9HHG6	4023	4530	4062	4722	2519	5623	0,46838	4205	4288	1,0198	UNCHANGED
Phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurL	A9HJG3	8563	9696	9098	8783	9378	9115	0,47294	9119	9092	0,9970	UNCHANGED
ATPase associated with various cellular activities AAA_3	A9H3C6	29831	26710	24194	26483	26603	28009	0,47467	26912	27032	1,0045	UNCHANGED
Gluconate 2-dehydrogenase (Acceptor)	A9HBC6	4432	7121	8036	6827	5928	6600	0,47500	6530	6452	0,9881	UNCHANGED
Inositol-3-phosphate synthase	A9H8S7	96427	103423	130032	112697	99472	119868	0,47761	109960	110679	1,0065	UNCHANGED
Ferredoxin--NADP reductase	FENR	25432	28965	29538	27024	25421	31895	0,47853	27979	28113	1,0048	UNCHANGED
Partitioning protein	A9HT61	14372	18260	8882	10850	11070	19034	0,48173	13838	13651	0,9865	UNCHANGED
Inositol-1-monophosphatase	A9HRD4	36538	36904	33418	36675	37784	32128	0,48363	35620	35529	0,9975	UNCHANGED
2-ketogluconate reductase	A9H3Y4	36929	37641	30346	30927	35151	38427	0,48384	34972	34835	0,9961	UNCHANGED
Peptide chain release factor 2	A9HF65	17762	19155	18425	18845	17644	18924	0,48460	18447	18471	1,0013	UNCHANGED
Amidophosphoribosyltransferase	A9H4K2	6451	7173	7802	6198	6586	8583	0,49139	7142	7122	0,9973	UNCHANGED
Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	A9HI24	22046	24224	15928	22547	21660	18179	0,49176	20733	20796	1,0030	UNCHANGED
50S ribosomal protein L14	RL14	42373	34719	28709	35177	33587	36873	0,49517	35267	35212	0,9984	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HK68	11531	14183	13418	11864	12963	14266	0,49544	13044	13031	0,9990	UNCHANGED
Molybdopterin biosynthesis protein moeB	A9HEI1	8093	9309	10774	10113	7995	10033	0,49586	9392	9380	0,9988	UNCHANGED
Lipoprotein	A9HPJ3	41207	49304	47894	45928	42377	49996	0,49609	46135	46100	0,9992	UNCHANGED
Flagellar protein FliL	A9HHK6	12346	6007	4117	13070	3733	5591	0,49750	7490	7465	0,9966	UNCHANGED
Uncharacterized protein	A9HPC7	8972	10978	10554	9362	9520	11630	0,49886	10168	10171	1,0003	UNCHANGED

4 **Tabela S2. Predição da localização das proteínas induzidas e reprimidas na resposta de *G. diazotrophicus* a Co.**

Acesso	Identificação	Fold Change	Localização	TAG
A9HE44	sel1 repeat family protein	0,22	Extracelular	DOWN
A9HG75	CzcC Efflux pump	-	Membrana externa	Única_Co
A9H7L3	TonB-dependent siderophore receptor	0,33	Membrana externa	DOWN
A9H7M7	TonB-dependent receptor	0,19	Membrana externa	DOWN
A9HEU6	TonB-dependent receptor	0,45	Membrana externa	DOWN
A9H7L9	TonB-dependent receptor	0,53	Membrana externa	DOWN
A9HNM4	TonB-dependent receptor	0,55	Membrana externa	DOWN
A9H0L0	outer membrane protein assembly factor BamD	0,66	Membrana externa	DOWN
A9HPK6	D-ribose-binding periplasmic protein (RbsB)	0,55	Periplasma	DOWN
A9HK76	Iron ABC transporter substrate-binding protein (Iron-ABC)	0,54	Periplasma	DOWN
A9H732	Dyp-type peroxidase	0,20	Periplasma	DOWN
A9H577	Sugar ABC transporter substrate-binding protein (Sugar-ABC)	0,62	Periplasma	DOWN
A9HSA0	LLM class flavin-dependent oxidoreductase	1,73	Membrana interna	UP
A9HHE0	methyl-accepting chemotaxis protein	1,73	Membrana interna	UP
A9HMX8	D-amino acid dehydrogenase	1,58	Membrana interna	UP
A9HJR7	AtzE family amidohydrolase	1,57	Membrana interna	UP
A9HK01	ubiquinol oxidase subunit II	0,64	Membrana interna	DOWN
A9HFD5	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	0,55	Membrana interna	DOWN
A9HRY9	Fe-S cluster assembly protein SufB (SufB)	6,23	Citoplasma	UP
A9HPH9	co-chaperone GroES	5,37	Citoplasma	UP
MTND	acireductone dioxygenase (MtnD)	4,29	Citoplasma	UP
CH602	chaperonin GroEL	4,10	Citoplasma	UP
A9H8N9	phosphomethylpyrimidine synthase ThiC	4,07	Citoplasma	UP
A9HRY6	Fe-S cluster assembly ATPase SufC	3,17	Citoplasma	UP
A9HFF6	2OG-Fe(II) oxygenase	2,78	Citoplasma	UP
A9HCF1	fumarylacetoacetate hydrolase family protein	2,41	Citoplasma	UP
A9HRY4	Fe-S cluster assembly protein SufD	2,40	Citoplasma	UP

Acesso	Identificação	Fold Change	Localização	TAG
A9HFP7	Translation initiation factor IF-3	2,37	Citoplasma	UP
A9HRW6	DEAD/DEAH box helicase	2,29	Citoplasma	UP
A9HHP7	alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta	2,26	Citoplasma	UP
A9HJ45	2-nitropropane dioxygenase	2,19	Citoplasma	UP
A9HH05	NAD-dependent malic enzyme	2,18	Citoplasma	UP
A9HPB2	Acetoin reductase	2,13	Citoplasma	UP
A9HM98	rod shape-determining protein	2,04	Citoplasma	UP
A9HDG0	Riboflavin synthase	1,96	Citoplasma	UP
A9H7G6	Bacterioferritin	1,96	Citoplasma	UP
A9HC31	MBL fold metallo-hydrolase	1,96	Citoplasma	UP
RL15	50S ribosomal protein L15	1,94	Citoplasma	UP
A9HJA6	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) E1 component subunit alpha	1,93	Citoplasma	UP
A9H2M9	glucose 1-dehydrogenase	1,90	Citoplasma	UP
A9HNX4	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	1,89	Citoplasma	UP
A9HLJ4	aspartate--tRNA ligase	1,89	Citoplasma	UP
A9HJA9	pyruvate dehydrogenase complex E1 component subunit beta	1,88	Citoplasma	UP
A9HDG2	bifunctional diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase/5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase RibD	1,84	Citoplasma	UP
DNAJ	molecular chaperone DnaJ	1,80	Citoplasma	UP
ACCD	acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit beta	1,79	Citoplasma	UP
A9HJB6	dihydrolipoyl dehydrogenase	1,78	Citoplasma	UP
A9HM48	aminomethyl-transferring glycine dehydrogenase (GcvP)	1,77	Citoplasma	UP
A9HDF5	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	1,75	Citoplasma	UP
A9HE94	transcription termination factor Rho	1,75	Citoplasma	UP
A9HM86	glycine--tRNA ligase subunit beta	1,74	Citoplasma	UP

Acesso	Identificação	Fold Change	Localização	TAG
A9HJB2	pyruvate dehydrogenase complex dihydrolipoamide acetyltransferase	1,73	Citoplasma	UP
A9H326	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1,71	Citoplasma	UP
A9HS47	Peptide deformylase	1,71	Citoplasma	UP
A9HS02	Elongation factor G	1,70	Citoplasma	UP
THIG	Thiazole synthase	1,68	Citoplasma	UP
A9HKZ6	malate:quinone oxidoreductase	1,68	Citoplasma	UP
A9HF12	transcription termination/antitermination protein	1,67	Citoplasma	UP
A9HRV4	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	1,66	Citoplasma	UP
A9HID1	IMP dehydrogenase	1,66	Citoplasma	UP
A9H9C1	translational GTPase	1,65	Citoplasma	UP
A9HM51	glycine cleavage system aminomethyltransferase	1,64	Citoplasma	UP
ATPB	F0F1 ATP synthase subunit beta	1,63	Citoplasma	UP
A9HIR0	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	1,63	Citoplasma	UP
ARLY	argininosuccinate lyase	1,63	Citoplasma	UP
A9H8C5	carboxylating nicotinate-nucleotide diphosphorylase	1,63	Citoplasma	UP
A9HFH1	dihydrolipoyl dehydrogenase (SucC)	1,62	Citoplasma	UP
A9HKR5	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	1,60	Citoplasma	UP
A9HNY2	methylenetetrahydrofolate reductase [NAD(P)H]	1,60	Citoplasma	UP
A9HBZ3	ribose-phosphate pyrophosphokinase	1,59	Citoplasma	UP
A9HRY2	Cysteine desulfurase	1,59	Citoplasma	UP
A9HDT4	2-hydroxyacid dehydrogenase	1,58	Citoplasma	UP
A9H338	ribose-5-phosphate isomerase	1,58	Citoplasma	UP
A9HJQ1	Isocitrate dehydrogenase	1,57	Citoplasma	UP
PNP	polyribonucleotide nucleotidyltransferase	1,57	Citoplasma	UP
A9HEZ2	aconitate hydratase	1,55	Citoplasma	UP
A9HI04	Glucokinase	1,54	Citoplasma	UP

Acesso	Identificação	Fold Change	Localização	TAG
A9HMC8	serine O-acetyltransferase	1,52	Citoplasma	UP
A9HIR3	polyprenyl synthetase family protein	1,51	Citoplasma	UP
A9H4G2	energy-dependent translational throttle protein EttA	1,50	Citoplasma	UP
A9HKL8	ribonuclease D	0,64	Citoplasma	DOWN
A9HNM6	arginine deiminase (ArcA)	0,58	Citoplasma	DOWN
A9HGX6	acetate/propionate family kinase (AckA)	0,56	Citoplasma	DOWN
A9HE73	asparaginase	0,57	Citoplasma	DOWN
A9H1Q0	transcription elongation factor GreA	0,47	Citoplasma	DOWN
A9HDA8	guanylate kinase	0,62	Citoplasma	DOWN
A9H000	alpha/beta hydrolase	0,66	Citoplasma	DOWN
A9HL54	competence/damage-inducible protein A	0,64	Citoplasma	DOWN
A9HMI7	2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein	0,60	Citoplasma	DOWN
A9HMA2	2-isopropylmalate synthase	0,61	Citoplasma	DOWN
A9HA97	hopanoid biosynthesis associated radical SAM protein HpnJ	0,64	Citoplasma	DOWN
A9HC24	RidA family protein	0,36	Citoplasma	DOWN
A9HBS7	RidA family protein	0,53	Citoplasma	DOWN
RS5	30S ribosomal protein S5	0,25	Citoplasma	DOWN
RL23	50S ribosomal protein L23	0,32	Citoplasma	DOWN
RS3	30S ribosomal protein S3	0,45	Citoplasma	DOWN
RL16	50S ribosomal protein L16	0,53	Citoplasma	DOWN
RS11	30S ribosomal protein S11	0,54	Citoplasma	DOWN
A9HK34	cold-shock protein	0,65	Citoplasma	DOWN
A9HAV2	YebC/PmpR family DNA-binding transcriptional regulator	0,66	Citoplasma	DOWN
A9HBF6	galactose mutarotase	0,54	Citoplasma	DOWN

Tabela S3. Suporte da ilustração esquemática das principais respostas de *G. diazotrophicus* ao estresse por cobalto.

Acesso	Descrição	Número	Localização	Fold Change
Proteína de efluxo				
A9HG75	CzcC Efflux pump	1	Membrana externa	49176
Absorção e metabolismo de ferro				
A9H7L3	TonB-dependent siderophore receptor (TBDT)	2	Membrana externa	0,33
A9H7M7	TonB-dependent receptor (TbdR)	3	Membrana externa	0,19
A9HEU6	TonB-dependent receptor (TbdR)	4	Membrana externa	0,45
A9H7L9	TonB-dependent receptor (TbdR)	5	Membrana externa	0,53
A9HNM4	TonB-dependent receptor (TbdR)	6	Membrana externa	0,55
A9HK76	Iron ABC transporter substrate-binding protein (Iron-ABC)	7	Periplasma	0,54
A9HRY4	Fe-S cluster assembly protein SufD (SufD)	10	Citoplasma	2,40
A9HRY6	Fe-S cluster assembly ATPase SufC (SufC)	11	Citoplasma	3,17
A9HRY9	Fe-S cluster assembly protein SufB (SufB)	12	Citoplasma	6,23
A9HMI7	2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein (FxdB)	14	Citoplasma	0,60
A9H7G6	Bacterioferritin	15	Citoplasma	1,96
Metabolismo de carboidratos				
A9H577	Sugar ABC transporter substrate-binding protein (Sugar-ABC)	8	Periplasma	0,62
A9HPK6	D-ribose-binding periplasmic protein (RbsB)	9	Periplasma	0,55
A9HI04	Glucokinase (Glk)	16	Citoplasma	1,54
A9H326	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (Zwf)	17	Citoplasma	1,71
A9H338	ribose-5-phosphate isomerase (RpiA)	18	Citoplasma	1,58
A9HBZ3	ribose-phosphate pyrophosphokinase (PRPS)	19	Citoplasma	1,59
A9HJA6	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) E1 component subunit alpha (PdhA)	20	Citoplasma	1,93
A9HJA9	pyruvate dehydrogenase complex E1 component subunit beta (PdhB)	21	Citoplasma	1,88
A9HJB2	pyruvate dehydrogenase complex dihydrolipoamide acetyltransferase (PdhC)	22	Citoplasma	1,73
A9HEZ2	aconitate hydratase (AcnA)	23	Citoplasma	1,55
A9HJQ1	Isocitrate dehydrogenase (IDH)	24	Citoplasma	1,57

Acesso	Descrição	Número	Localização	Fold Change
A9HFD5	diacylglycerol acyltransferase (GatA)	25	Citoplasma	1,62
A9HFD5	Succinate dehydrogenase (SdhB)	26	Citoplasma	0,55
A9HKZ6	malate:quinone oxidoreductase (mqo)	27	Citoplasma	1,68
A9HGX6	acetate/propionate family kinase (AckA)	28	Citoplasma	0,56
Metabolismo de aminoácidos				
A9HRY2	Cysteine desulfurase (SufS)	13	Citoplasma	1,59
ARLY	argininosuccinate lyase (ArgH)	29	Citoplasma	1,63
A9HMC8	serine O-acetyltransferase (CysE)	30	Citoplasma	1,52
A9HMX4	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase (MetE)	31	Citoplasma	1,89
A9HM48	aminomethyl-transferring glycine dehydrogenase (GcvP)	32	Citoplasma	1,77
A9HM51	glycine cleavage system aminomethyltransferase (GcvT)	33	Citoplasma	1,64
A9HJB6	diacylglycerol acyltransferase (LpdA)	34	Citoplasma	1,78
Chaperonas				
DNAJ	molecular chaperone DnaJ	37	Citoplasma	1,80
CH602	chaperonin GroEL	38	Citoplasma	4,10
A9HPH9	co-chaperone GroES	39	Citoplasma	5,37
A9HRV4	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	40	Citoplasma	1,66