

MARIA APARECIDA KNOPIK

Isolamento e Caracterização dos Genes
nifA e *nifB* de *Azospirillum brasilense*

Tese apresentada ao Departamento de
Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná para a obtenção do título de Mestre
em Bioquímica.

CURITIBA

1991

ORIENTADORES:

Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

Dr. Shigehiro Funayama

A todos que têm
coragem e amizade a
oferecer
desinteressadamente

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa e ao Dr. Shigehiro Funayama pela orientação e amizade inestimáveis durante a realização deste trabalho. À Dra. Liu Un Rigo pela ajuda dispendida.

Agradeço à Dra. Glaci Terezinha Zancan pelo apoio e colaboração prestados. A todos os professores do Departamento de Bioquímica que contribuíram para a elaboração deste trabalho.

A todos os colegas, especialmente Sérgio Luiz Primo-Parmo, Márcia Helena Mendonça, Marcos Machado e Kátia Regina dos Santos Teixeira pela amizade e auxílio dispendidos. Aos colegas de laboratório pela solidariedade demonstrada.

À minha família pelo incentivo e estímulo em todas as etapas, fáceis e árduas, deste momento de minha vida.

Agradeço à Coordenação do curso de Pós-Graduação pelo direcionamento apropriado de suas atividades.

Aos órgãos CNPq, CAPES e FINEP pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	x
	LISTA DE TABELAS.....	xii
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
	RESUMO.....	xvi
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	DESCRIÇÃO DO MICRORGANISMO.....	1
1.1.1	Histórico do microrganismo.....	1
1.1.2	Características gerais do gênero <i>Azospirillum</i>	1
1.1.3	Importância econômica do microrganismo.....	3
1.1.4	Diferenças entre as espécies.....	4
1.2	O COMPLEXO ENZIMÁTICO DA NITROGENASE.....	5
1.2.1	Nitrogenase clássica ou Mo-dependente.....	5
1.2.2	Nitrogenases alternativas ou Mo-independentes..	8
1.3	REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE.....	9
1.3.1	Efeito da amônia e da glutamina.....	9
1.3.2	Influência da glutamina sintetase sobre a atividade da nitrogenase.....	11
1.3.3	Efeito do oxigênio sobre a atividade da nitrogenase.....	13
1.4	GENÉTICA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.....	15
1.4.1	Em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
1.4.2	Em <i>Azotobacter</i> spp.....	18
1.4.3	Em <i>Azospirillum</i> spp.....	18

1.5	REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES <i>nif</i>	20
1.5.1	Sistema de regulação do metabolismo nitrogenado (<i>ntr</i>).	20
1.5.2	Regulação <i>nif</i> -específica.	24
1.5.3	Homologia entre os operons <i>nifA</i> e <i>ntrC</i>	30
1.5.4	Promotores <i>nif</i> e <i>ntr</i>	31
2	MATERIAIS E MÉTODOS.	34
2.1	MICROORGANISMOS E PLASMÍDEOS.	34
2.2	MEIOS DE CULTURA.	34
2.3	ANTIBIÓTICOS.	39
2.4	REAGENTES QUÍMICOS.	40
2.5	TAMPÕES E SOLUÇÕES.	41
2.5.1	Tampões de ressuspensão celular.	41
2.5.2	Misturas de lise celular.	41
2.5.3	Soluções de neutralização para preparo de DNA.	41
2.5.4	Preparo de fenol.	41
2.5.5	Soluções para precipitação de DNA.	42
2.5.6	Tampão de solubilização de DNA.	42
2.5.7	Soluções para transformação.	42
2.5.8	Tampões eletroforéticos.	42
2.5.9	Corante eletroforético.	43
2.5.10	Tampões de transferência de DNA para membranas.	43
2.5.11	Solução de hidrólise de DNA em hibridizações.. . . .	43
2.5.12	Solução desnaturante de DNA.	43
2.5.13	Solução neutralizante de hibridização.	43
2.5.14	Soluções de pré-hibridização.	43
2.5.15	Solução estoque de Denhardt (100x).	44

2.5.16	Deionização de formamida.....	44
2.5.17	Soluções para marcação com ^{32}P	44
2.5.18	Soluções para marcação com digoxigenina 11-dUTP (10x).....	45
2.5.19	Tampões de hibridização não-radioativa.....	45
2.5.20	Soluções de reação e coloração.....	45
2.6	ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO.....	46
2.7	CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	49
2.8	CONTAGEM DE BACTÉRIAS.....	50
2.9	CONJUGAÇÃO BACTERIANA.....	50
2.9.1	Conjugação com o banco genômico.....	51
2.9.2	Conjugação com <i>E. coli</i> 1230 (pR68.45).....	52
2.9.3	Conjugação com outros mutantes de <i>A. brasilense</i>	53
2.10	TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. coli</i>	54
2.10.1	Obtenção de células competentes.....	54
2.10.2	Procedimento de transformação.....	55
2.11	TRANSFORMAÇÃO DE <i>K. pneumoniae</i>	56
2.12	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE.....	57
2.13	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA.....	58
2.14	REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE.....	58
2.14.1	Efeito de íons amônio sobre a atividade da nitrogenase de <i>A. brasilense</i>	58
2.14.2	Efeito da temperatura sobre a atividade da nitrogenase.....	59
2.15	ISOLAMENTO DE PLASMÍDEOS.....	59
2.16	ELETROFORESE DE DNA.....	62
2.16.1	Plasmídeos maiores que 50 kpb.....	63

2.16.2	Fragmentos de restrição.....	64
2.16.3	Eletroforese em agarose de baixo ponto de fusão.....	64
2.17	PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA.....	65
2.17.1	Eluição do gel de agarose BPF.....	65
2.17.2	Eliminação do brometo de etídio.....	65
2.18	CONSTRUÇÃO DO BANCO GENÔMICO.....	67
2.19	MAPA FÍSICO DE RESTRIÇÃO.....	70
2.19.1	Padrão de restrição dos plasmídeos pMAK1-pMAK8.....	70
2.19.2	Mapa de restrição do plasmídeo pMAK7.....	71
2.20	HIBRIDIZAÇÃO.....	72
2.20.1	Hibridização pelo método de marcação com digoxigenina 11-dUTP.....	74
2.20.2	Hibridização pelo método de marcação com ³² P..	77
3	RESULTADOS.....	78
3.1	BANCO GENÔMICO DE <i>A. brasilense</i> FP2.....	78
3.2	ISOLAMENTO DE PLASMÍDEOS RECOMBINANTES CAPAZES DE COMPLEMENTAR O MUTANTE <i>nifA</i> ⁻ DE <i>A. brasilense</i>	78
3.3	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS TRANSCONJUGANTES DE <i>A. brasilense</i> FP10 (pMAK1-pMAK8).....	81
3.3.1	Cura dos transconjugantes de <i>A. brasilense</i> FP10 dos plasmídeos recombinantes (pMAK1-pMAK7).....	81
3.3.2	Recuperação da atividade nitrogenásica em transconjugantes de <i>A. brasilense</i> FP10.....	83
3.3.3	Determinação do padrão de clivagem dos	

	plasmídeos recombinantes (pMAK1-pMAK8).....	89
3.3.4	Mapa de restrição do plasmídeo pMAK7.....	95
3.3.5	Regiões do pMAK7 homólogas ao gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i>	101
3.3.6	Regiões do pMAK7 homólogas ao gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i>	102
3.3.7	Regiões do pMAK7 homólogas ao operon <i>nifHDK</i> de <i>A. brasilense</i>	105
3.3.8	Caracterização preliminar do conteúdo gênico do plasmídeo pMAK7.....	105
3.4	REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE.....	107
3.4.1	Efeito dos íons amônio sobre a atividade da nitrogenase.....	107
3.4.2	Efeito da temperatura sobre a atividade da nitrogenase.....	110
3.5	COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE <i>nifB</i> ⁻ DE <i>K. pneumoniae</i> (50581) PELO PLASMÍDEO pMAK7....	113
4	DISCUSSÃO.....	116
5	CONCLUSÕES.....	132
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133

LISTA DE FIGURAS

1	MODELO DE REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES <i>nif</i> EM <i>K. pneumoniae</i>	21
2	DESENHO ESQUEMÁTICO DA CONSTRUÇÃO DO BANCO GENÔMICO.	68
3	PERFIL ELETROFORÉTICO DE PLASMÍDEOS DE TRANSCONJUGANTES DE <i>A. brasilense</i> (FP10).....	82
4	PERFIL ELETROFORÉTICO DE PLASMÍDEOS DOS TRANSCONJUGANTES DE <i>A. brasilense</i> FP10 (pMAK1) E (pMAK2).....	85
5	PERFIL ELETROFORÉTICO DE PLASMÍDEOS DOS TRANSCONJUGANTES DE <i>A. brasilense</i> FP10 (pMAK4) E (pMAK5).....	86
6	PERFIL ELETROFORÉTICO DE PLASMÍDEOS DOS TRANSCONJUGANTES DE <i>A. brasilense</i> FP10 (pMAK6) E (pMAK7).....	87
7	PERFIL ELETROFORÉTICO DE PLASMÍDEOS DOS TRANSCONJUGANTES DE <i>A. brasilense</i> FP10 (pMAK1) A (pMAK8).....	88
8	PERFIL DA CLIVAGEM DOS PLASMÍDEOS pMAKs COM A ENZIMA <i>EcoR</i> I.....	90
9	PERFIL DA CLIVAGEM DOS PLASMÍDEOS pMAKs COM A ENZIMA <i>Sal</i> I.....	91
10	MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pMAK7.....	100
11	PERFIS ELETROFORÉTICO E DE HIBRIDIZAÇÃO DO PLASMÍDEO pMAK7 COM O DNA-SONDA <i>nifA</i> DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (DOMÍNIO CENTRAL).....	103
12	PERFIS ELETROFORÉTICO E DE HIBRIDIZAÇÃO DO PLASMÍDEO pMAK7 COM O DNA-SONDA <i>nifA</i> DE <i>H. seropedicae</i> (DOMÍNIO D E EXTREMIDADE C-TERMINAL).	104

13	PERFIS ELETROFORÉTICO E DE HIBRIDIZAÇÃO DO PLASMÍDEO pMAK7 COM O DNA-SONDA <i>nifD</i> DE <i>H. seropedicae</i>	106
14	PERFIL ELETROFORÉTICO DOS TRANSCONJUGANTES DE <i>A. brasilense</i> CONTENDO O PLASMÍDEO pMAK7.....	108
15	EFEITO DE NH_4^+ SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE DO TRANSCONJUGANTE <i>A. brasilense</i> FP10 (pMAK7).....	109
16	EFEITO REVERSÍVEL DO NH_4^+ SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE DE TRANSCONJUGANTE <i>A. brasilense</i> FP10 (pMAK7).....	111

LISTA DE TABELAS

1	BACTÉRIAS.....	35
2	PLASMÍDEOS.....	36
3	CONDIÇÕES DE ENSAIO COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	47
4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE DOS TRANSCONJUGANTES DE <i>Azospirillum brasilense</i> FP10 COMPLEMENTADOS POR PLASMÍDEOS RECOMBINANTES.....	80
5	EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE EM TRANSCONJUGANTES DE <i>Azospirillum brasilense</i>	84
6	CLIVAGEM E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS <i>EcoR</i> I e <i>Sal</i> I DOS PLASMÍDEOS pMAK1-pMAK8.....	92
7	DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DOS PLASMÍDEOS pMAK1-pMAK8..	93
8	CLIVAGEM E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS DO PLASMÍDEO pMAK7.....	97
9	CLIVAGEM E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS DO PLASMÍDEO pMAK7 EM SISTEMAS DE RESTRIÇÃO BINÁRIA.	98
10	DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA AMÔNIA SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE DOS TRANSCONJUGANTES DE <i>A. brasilense</i> FP10.....	112
11	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE NITROGENÁSICA DOS TRANSCONJUGANTES DE <i>A. brasilense</i> A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	114
12	COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE DE <i>K. pneumoniae</i> (50581)..	115

LISTA DE ABREVIATURAS

pb	=	pares de bases
kpb	=	quillo pares de bases
g	=	grama
l	=	litro
mg	=	miligrama
ml	=	mililitro
μ g	=	micrograma
μ l	=	microlitro
ng	=	nanograma
nmol	=	nanomol
M	=	concentração molar
mM	=	concentração milimolar
μ M	=	concentração micromolar
N	=	concentração normal
nm	=	nanômetro
DO _{540 nm}	=	densidade óptica a 540 nm
DO _{300 nm}	=	densidade óptica a 300 nm
s	=	segundo
min	=	minuto
h	=	hora
°C	=	temperatura em graus Celsius
rpm	=	rotação por minuto
v/v	=	volume/volume
m/v	=	massa/volume

V	=	volts
V/cm	=	volts/cm
C_2H_2	=	acetileno
C_2H_4	=	etileno
C_2H_6	=	etano
NH_4^+	=	íons amônio
<i>Tn</i>	=	transposon
DNA	=	ácido desoxirribonucleico
DNase	=	desoxirribonuclease
RNA	=	ácido ribonucleico
RNase	=	ribonuclease
N-terminal	=	extremidade amino-terminal
C-terminal	=	extremidade carboxi-terminal
ABF	=	azul de bromofenol
EtBr	=	brometo de etídio
ATP	=	adenosina-5'-trifosfato
ADP	=	adenosina-5'-difosfato
AMP	=	adenosina-5'-monofosfato
UMP	=	uridina-5'-monofosfato
dATP	=	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dTTP	=	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
dCTP	=	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	=	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
NAD^+	=	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	=	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
$NADP^+$	=	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	=	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
Tris	=	tris hidroximetilaminometano

EDTA	=	ácido etilenodiaminotetracético
BSA	=	soroalbumina bovina
Tc	=	tetraciclina
NaI	=	ácido nalidíxico
Km	=	canamicina
Sm	=	estreptomicina
Tp	=	triptofano
Ap	=	ampicilina
R	=	resistência à
Nif	=	fenótipo para fixação de nitrogênio
<i>nif</i>	=	genótipo para fixação de nitrogênio
<i>fix</i>	=	genótipo para fixação de nitrogênio simbiótica
<i>ntr</i>	=	genótipo para metabolismo geral de compostos nitrogenados
GS	=	glutamina sintetase
UTase	=	uridililil-transferase
ATase	=	adenilililil-transferase

RESUMO

A conjugação do mutante *nifA*⁻ de *Azospirillum brasilense*, FP10, com um banco genômico de *A. brasilense* em PLAFR3 permitiu o isolamento de sete transconjugantes capazes de fixar nitrogênio. Os transconjugantes apresentaram níveis de atividade nitrogenásica próxima à observada para a estirpe selvagem (FP2). A presença dos plasmídeos recombinantes, pMAK1-pMAK7, mostrou-se essencial à complementação genética, pois os transconjugantes foram incapazes de fixar nitrogênio quando curados desses plasmídeos. Foram identificados quatro grupos diferentes de plasmídeos capazes de restaurar o fenótipo *Nif*⁺ do mutante. O plasmídeo pMAK7 possibilitou ainda a complementação do mutante *nifB*⁻ de *Klebsiella pneumoniae* (50581). Experimentos de hibridização comprovaram a presença dos genes *nifA* e *nifB* no inserto. Por outro lado, o plasmídeo pMAK7 foi incapaz de complementar os mutantes deficientes na síntese do cofator FeMo, *ntrC*⁻ e *nifHDK*⁻ de *A. brasilense*, bem como de hibridizar com DNA-sonda contendo os genes *nifHDK* de *A. brasilense*. Os transconjugantes de *A. brasilense* FP10 contendo pMAK1 ou pMAK7 apresentaram inativação reversível da nitrogenase por NH_4^+ , semelhante àquela observada na estirpe selvagem. Transconjugantes de *A. brasilense* FP10 contendo esses plasmídeos apresentaram fixação de nitrogênio também a 37°C, ao contrário do que foi verificado para os transconjugantes *A. brasilense* FP10 (pCK3), contendo o gene *nifA* de *K. pneumoniae*. Esses dados sugerem que o produto do gene *nifA* de *A. brasilense* é termoestável a 37°C.

1 INTRODUÇÃO

1.1 DESCRIÇÃO DO MICRORGANISMO

1.1.1 Histórico do microrganismo

As bactérias do gênero *Azospirillum* foram inicialmente descritas como *Azotobacter spirillum* (14) e, logo a seguir, como *Spirillum lipoferum* (15). Estudo taxonômico detalhado de uma coleção de isolados levou à criação de um novo gênero, *Azospirillum* (231). Esse gênero compreende, hoje, cinco espécies: *A. brasilense* (231), *A. lipoferum* (231), *A. amazonense* (158), *A. halopraeferans* (199) e *A. irakense* (140), dentre as quais *A. brasilense* é a espécie melhor estudada.

1.1.2 Características gerais do gênero *Azospirillum*

O nome do gênero, *Azospirillum*, se deve ao aspecto espiralado dos microrganismos e de sua capacidade de fixar nitrogênio (231).

Azospirillum spp. são organismos unicelulares de cerca de 1 μm de diâmetro. O conteúdo celular dos microrganismos é uniforme, exceto pelos grânulos de poli-beta-hidroxibutirato (25 a 70% do peso seco das bactérias). O gênero contém bactérias de aspecto vibríóide,

podendo apresentar forma de S ou helicoidal quando crescidas em meio semi-sólido isento de fonte de nitrogênio fixado. São bactérias de vida livre com um único flagelo polar quando crescidas em meio líquido e numerosos flagelos laterais, além do flagelo polar, quando crescidas em meio sólido (231). O flagelo polar, ao contrário dos flagelos laterais, está envolto por bainha mucilagínosa (103).

A propriedade diazotrófica, isto é, de crescer utilizando N_2 como fonte única de nitrogênio, é encontrada somente em seres procariontes. Sob condições microaerofílicas, as espécies de *Azospirillum* são capazes de reduzir N_2 a NH_3 . Em anaerobiose podem converter o nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), óxido nitroso (N_2O) ou nitrogênio (N_2) (146). A espécie *A. amazonense* parece não ser capaz de se comportar desta forma em anaerobiose (158). O gênero *Azospirillum* se destaca dentre os organismos diazotróficos por sua capacidade de fixar nitrogênio a temperaturas superiores a 35°C (53, 63).

As células vegetativas de *Azospirillum*, em condições inadequadas, podem se diferenciar em formas C encapsuladas, imóveis e com abundantes grânulos de poli- β -hidroxibutirato (77, 207, 231). Estas formas celulares são consideradas cistos verdadeiros, os quais são mais resistentes à dessecação e a radiações ultra-violeta e gama (148).

Azospirillum spp. são bactérias de vida livre encontradas nas regiões da rizosfera e associadas às raízes de gramíneas, onde predominam as condições microaerofílicas (11, 168). O gênero apresenta quimiotropismo, sendo atraído

de forma específica pelos exudatos das raízes da planta hospedeira a ser colonizada e também pela concentração ideal de oxigênio para a expressão da fixação de nitrogênio (10, 11). As bactérias são capazes de aderir às células da superfície das raízes (12, 80, 123, 168).

Algumas estirpes de *Azospirillum* parecem competir com outros microrganismos da microflora em razão da produção de bacteriocinas (168, 181), bem como pelo "sequestro" de Fe^{+3} (111) realizado pelos sideróforos que produzem (8, 105).

O gênero apresenta metabolismo versátil (10), podendo utilizar facilmente sais de ácidos orgânicos, tais como: malato, lactato, succinato e piruvato como fontes únicas de carbono e energia para crescimento e fixação de nitrogênio (146, 199, 231).

1.1.3 Importância econômica do microrganismo

As estirpes de *Azospirillum* são encontradas associadas a raízes de diversas gramíneas de interesse agrícola, tais como: arroz, cevada, milho, sorgo e trigo (83). A capacidade de fixar nitrogênio a temperaturas condizentes com o solo dos países tropicais, bem como temperados, possivelmente contribui para a distribuição cosmopolita da bactéria (83).

Estudos envolvendo inoculação de $(10^5 - 10^6)$ células / planta) de *Azospirillum* em diversas espécies vegetais mostraram aumento no peso seco e no conteúdo total de fósforo, potássio e nitrogênio das plantas (139, 175).

Estes aumentos foram considerados como fatores positivos da associação (63, 175) e têm sido atribuídos à produção e excreção de fitormônios pela bactéria, os quais estimulam o aumento do número de pêlos radiculares (129, 175, 235).

Os vegetais são incapazes de utilizar nitrogênio molecular (N_2) diretamente, mas podem utilizar a amônia fixada pelos organismos diazotróficos como fonte de nitrogênio (63, 175, 235). O aumento significativo do conteúdo de nitrogênio biologicamente fixado somente foi observado na associação de *A. halopraeferans* com a gramínea *Leptochloa fusca* (159, 168). Outros experimentos indicaram não haver contribuição, em termos de nitrogênio fixado, para as plantas inoculadas com *Azospirillum* (22, 63, 168).

1.1.4 Diferenças entre as espécies

As diferenças entre as espécies do gênero quanto à utilização de fontes de nitrogênio e de carbono são de grande valia na determinação taxonômica das várias estirpes de *Azospirillum* (108, 158, 161, 199) e, além disso, influem significativamente na capacidade diazotrófica dos microrganismos (50, 108, 177).

A. brasilense e *A. amazonense* não requerem vitaminas para seu crescimento. *A. lipoferum* e a *A. halopraeferans*, ao contrário, necessitam de biotina (158, 199, 231).

As espécies de *Azospirillum* diferem entre si em sua capacidade de utilização de açúcares. *A. brasilense* e *A. halopraeferans* (199, 240) são incapazes de utilizar

D-glucose como fonte única de carbono, ao contrário de *A. lipoferum* (231). *A. brasilense*, apesar de apresentar a via glicolítica, é incapaz de transportar glucose para o interior da célula. Esta espécie é capaz de utilizar o gluconato para crescimento (240). *A. brasilense* (51) e *A. lipoferum* crescem em presença de D-frutose (231). Por outro lado, *A. amazonense* se diferencia de *A. brasilense* e *A. lipoferum* por ser capaz de crescer em presença de lactose e maltose (158, 161). *A. amazonense* é a única espécie capaz de crescer diazotroficamente, utilizando sacarose (158).

A. lipoferum e *A. amazonense* crescem bem em presença dos aminoácidos: glutamato, aspartato, serina ou histidina como fontes de nitrogênio e carbono, o que não ocorre em *A. brasilense* (50, 108).

A. amazonense difere das demais espécies do gênero por tolerar pHs mais ácidos e concentrações de oxigênio mais elevadas (158), assemelhando-se a *Herbaspirillum seropedicae* (9).

1.2 O COMPLEXO ENZIMÁTICO DA NITROGENASE

1.2.1 Nitrogenase clássica ou Mo-dependente

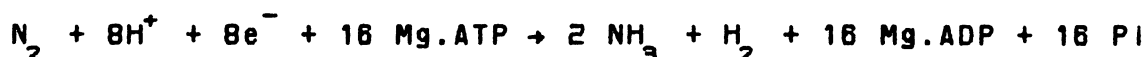
A redução de N_2 a amônia pelos microrganismos diazotróficos requer um complexo enzimático, a nitrogenase (196). Este complexo enzimático consiste de duas proteínas distintas: a dinitrogenase ou proteína-MoFe (proteína

ferro-molibdênio) e a dinitrogenase redutase ou proteína-Fe (proteína ferro) (49, 88, 196). Nitrogenases isoladas de diversos microrganismos apresentam propriedades semelhantes (89, 196).

A proteína-MoFe é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ de massa molecular de aproximadamente 220000 daltons, que contém dois átomos de molibdênio, 26-34 átomos de ferro e 24-36 íons de enxofre por molécula. As subunidades α apresentam cerca de 50000 daltons e as subunidades β cerca de 60000 daltons (88, 218). A proteína-MoFe contém dois cofatores ferro-molibdênio (FeMoco), quatro núcleos cúbicos de [4Fe-4S] (centros P) e dois outros centros contendo ferro (centros S) (151, 182, 218, 219). Os cofatores apresentam a composição $\text{MoFe}_6\text{S}_4\text{S}_{4-10}$ e parecem participar do sítio catalítico da nitrogenase (218, 243). Esses e os centros P podem ser oxidados e reduzidos independentemente (151, 172). Os centros P apresentam potencial redox mais negativo que os centros FeMoco, sugerindo que os centros P transfiram elétrons para os cofatores (151, 239).

A proteína-Fe é formada por duas subunidades idênticas de 60000 daltons e possui um único núcleo Fe_4S_4 (100, 218, 243). A proteína-Fe reduzida apresenta sítio de ligação para ATP e atua como doador de elétrons específico para a proteína-MoFe que, como citado acima, contém os sítios de ligação e redução do substrato (102, 182). A proteína-Fe parece possuir dois sítios de ligação: um para o complexo Mg.ATP e outro para Mg.ADP (100), os quais são provavelmente idênticos no início da reação (49).

A proteína-Fe e a proteína-MoFe somente apresentam atividade catalítica quando presentes simultaneamente (196). A nitrogenase requer doador de elétrons de baixo potencial redox e Mg.ATP para a redução de N_2 a NH_3 (196). O complexo Mg.ATP se liga à proteína-Fe na qual induz alterações conformacionais que diminuem seu potencial redox (218, 243). A transferência de elétrons da proteína-Fe para os substratos, via proteína-MoFe, requer a hidrólise de 2 moléculas de Mg.ATP por elétron transferido (49, 99). A redução da proteína-MoFe é um processo cíclico realizado em 8 etapas, com a transferência de um elétron a cada etapa, para que N_2 seja reduzido a NH_3 conforme a reação (68, 151, 218):



O cofator FeMoco da proteína-MoFe é encontrado em vários níveis de oxidação, indicando o processo cíclico de redução da proteína-MoFe, bem como o envolvimento desse cofator na redução dos substratos da nitrogenase (69, 172).

A atividade da nitrogenase é inibida por Mg.ADP (68, 99, 234), provavelmente através da indução de uma mudança conformacional na proteína-Fe, impedindo o acesso do substrato ao sítio de redução (244) e por impossibilitar a ligação de Mg.ATP necessário à transferência de elétrons para a proteína-MoFe (49, 99). A proteína-Fe não é inibida por NH_4^+ ou glutamina (68, 243), entretanto a proteína-Fe e a proteína-MoFe são inativadas se expostas ao oxigênio (196).

A nitrogenase pode reduzir muitos compostos análogos que apresentem ligações triplas terminais, dentre os quais:

$-C\equiv C-$, $-C\equiv N$, $N\equiv N$, $N\equiv O$ (186). A capacidade da nitrogenase de reduzir acetileno a etileno tem sido utilizada rotineiramente na determinação rápida de sua atividade (56, 198, 211).

1.2.2 Nitrogenases alternativas ou Mo-independentes

Recentemente, outros sistemas nitrogenásicos, capazes de reduzir N_2 , foram identificados em *Azotobacter* spp. (20, 187, 205). *Azotobacter vinelandii* (20, 21) e *Azotobacter chroococcum* (205), além de possuírem o sistema clássico contendo Mo, apresentam uma segunda nitrogenase contendo vanádio e ferro (nitrogenase-VFe). *A. vinelandii* possui um segundo sistema alternativo que contém somente ferro (nitrogenase-Fe) (46, 187). O complexo da nitrogenase-VFe de *A. vinelandii* e *A. chroococcum* é composto de duas proteínas homólogas àsquelas da nitrogenase-MoFe: a proteína-VFe ou dinitrogenase-VFe e a proteína-Fe ou dinitrogenase-VFe redutase (182, 218). A proteína-Fe é um dímero que contém um único centro $[Fe_4-S_4]$. Esta proteína atua como doador de elétrons para a proteína-VFe e é ativada por MgATP (233). O sistema nitrogenásico VFe parece ser menos eficiente na redução de N_2 a NH_3 e C_2H_2 a C_2H_4 que o sistema nitrogenásico MoFe (219). Mutantes de *A. vinelandii* com deleções simultâneas nos genes que codificam a nitrogenase-MoFe e a nitrogenase-VFe foram ainda capazes de fixar nitrogênio na ausência de Mo e V, indicando que *A. vinelandii* é capaz de sintetizar uma terceira nitrogenase

(nitrogenase-Fe) independente de Mo e V (48, 187), elementos estes que podem inibir a nitrogenase-Fe (134, 187). Os sistemas nitrogenásicos -Fe e -V permitem a redução de acetileno a etileno (C_2H_4) e etano (C_2H_6), uma propriedade ausente nas nitrogenases dependentes de Mo (57, 187).

1.3 REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE

A regulação da nitrogenase ocorre a nível de atividade catalítica e a nível de transcrição dos genes envolvidos na fixação de nitrogênio (32, 81, 137, 196).

A nitrogenase pode ser inativada "in vitro" por Mg.ADP (234) ou por oxigênio (72, 196). "In vivo" pode ser inibida por NH_4^+ (137, 208) e por O_2 (106, 118, 195).

1.3.1 Efeito da amônia e da glutamina

A nitrogenase é inibida "in vivo" por íons amônio (137, 208, 250). Este mecanismo reversível de inativação foi primeiramente demonstrado em *Rhodospirillum rubrum* (138, 152). O mecanismo de inativação foi então denominado "desligamento" ("switch-off") e o de reativação foi denominado de "ligação" ("switch-on") (250).

Estudos do "desligamento" do complexo da nitrogenase mostraram que a proteína-Fe é modificada covalentemente. Um resíduo ADP-ribose, derivado do NAD^+ , é ligado a um resíduo específico de arginina de uma das subunidades da

dinitrogenase redutase (137, 138, 152). Essa reação de inativação é catalisada pela enzima dinitrogenase redutase ADP-ribosil-transferase (DraT) e é dependente do complexo de cátion divalente-ADP (154). A reativação da proteína-Fe, "ligação" ("switch-on"), é catalisada por uma enzima ativadora ATP-dependente, a glicohidrolase ativadora da dinitrogenase redutase (DraG), quando os íons amônio já foram metabolizados (206, 251).

A. brasilense (176) e *A. lipoferum* (109) são os únicos organismos diazotróficos não-fotossintéticos que apresentam este sistema de controle metabólico de fixação de N_2 e, por isso, o especial interesse em seu estudo. A proteína ativadora de *A. brasilense* apresenta massa molecular de 33500 daltons (150), semelhante àquela da proteína DraG isolada de *R. rubrum* (32800) (206, 251). As enzimas DraG de *A. brasilense* e *R. rubrum* (150, 206) são ativadas por Mn^{2+} (98) e praticamente inativas na presença de Mg^{2+} que em concentrações elevadas, exerce efeito inibitório (98, 150). *A. amazonense* aparentemente não possui o sistema enzimático ativador-inativador da proteína-Fe (220), apresentando um sistema com inativação rápida da nitrogenase na presença de NH_4^+ , semelhante ao de *A. vinelandii* (220). Regiões homólogas aos genes *draT* e *draG* foram detectadas no DNA genômico de *A. brasilense* e *A. lipoferum*, mas não em *A. amazonense* (88). Os genes *draG* e *draT* foram mapeados próximos ao *nifJ* de *A. lipoferum* (89). A nitrogenase dos transconjugantes *ntrC*⁻ de *A. brasilense*, complementados pelo gene *nifA*^C de *K. pneumoniae*, é

praticamente insensível à inibição reversível por íons amônio (191, 192). Esses resultados sugerem que o produto do gene *ntrC* pode estar envolvido no mecanismo de maturação reversível da nitrogenase (191, 192).

1.3.2 Influência da glutamina sintetase sobre a atividade da nitrogenase

Experimentos mostraram que a adição de metionina-sulfoximina (MSX), um análogo da glutamina e inibidor da glutamina sintetase (GS), impede e reverte o "switch-off" da nitrogenase por NH_4^+ (245, 249). Estas evidências sugeriram que a glutamina poderia estar envolvida no processo de inibição reversível da nitrogenase "in vivo", ou ainda, que a GS ativa tivesse participação como provedora de glutamina ou outro sinal químico para o desencadeamento do "switch-off" (109, 136, 245, 250). A adição de MSX a culturas de *A. brasilense* e *A. lipoferum* fixando nitrogênio, previne a inativação da nitrogenase pela adição posterior de NH_4^+ (109, 176), de forma semelhante à verificada para organismos diazotróficos fotossintéticos (249).

A glutamina sintetase é uma proteína multimérica codificada pelo gene *glnA* (55), já sequenciado em *A. brasilense* Sp7 (27, 28), e que participa da via de assimilação de amônia por microrganismos em condições diazotróficas. A atividade de GS é regulada por um sistema de adenililação e desadenililação. Em altas concentrações de NH_4^+ , a GS é inativada pela ligação de um resíduo AMP a um resíduo de tirosina em cada uma das 12 subunidades da GS

(84, 222). A adenililação é promovida pelo produto do gene *glnE*, a enzima adenilil-transferase (ATase). A função da ATase, por sua vez, é regulada pelo produto do gene *glnB*, a proteína P_{II} (130). A proteína P_{II} apresenta duas formas: a forma não modificada, P_{II} , estimula a adenililação da GS pela ATase e sua forma uridililada, P_{II} -UMP, favorece a desadenililação da GS (87). A ligação do grupamento UMP à proteína P_{II} é catalisada pelo produto do gene *glnD*, a enzima uridilil-transferase (UTase) (38, 130). A atividade da GS parece ser regulada pela relação NH_4^+ /glutamina ou α -cetoglutarato/glutamina (38, 222).

O nível de atividade da GS é um reflexo do seu estado de adenililação, porém, parece não estar relacionado com o processo de "switch-off" da nitrogenase (1, 137, 249) visto que culturas de *Rhodobacter palustris*, com elevada atividade nitrogenásica, foram insensíveis ao "switch-off" por NH_4^+ , apesar dos níveis normais de adenililação da GS (249, 250). Os resultados de experimentos envolvendo a adição de MSX a culturas de *A. brasilense* têm sido contraditórios quanto à inibição do "switch-off" por este análogo da glutamina (91, 109). Além disto, mutantes de *A. brasilense* auxotróficos para glutamina, com deficiências em GS, mostraram atividade constitutiva da nitrogenase em presença de NH_4^+ (92). Mutantes de *A. brasilense* resistentes a etilenodiamina e constitutivos para fixação de nitrogênio, em presença de NH_4^+ , apresentaram a capacidade de excretar NH_4^+ derivada de N_2 . Esses mutantes apresentaram GS constitutivamente adenililada (193).

1.3.3 Efeito do oxigênio sobre a atividade da nitrogenase

O oxigênio também exerce efeito inibidor sobre a atividade da nitrogenase. As proteínas dinitrogenase redutase e dinitrogenase, "in vitro", são inativadas irreversivelmente se expostas ao oxigênio (72, 196). A proteína-Fe de *K. pneumoniae* e a de *A. chroococcum* apresentam tempo de meia vida de aproximadamente 45 s e 2 min, respectivamente, quando expostas ao ar (72). A proteína-MoFe de *K. pneumoniae* e a de *A. chroococcum*, por sua vez, têm tempo de meia vida de 8 e 10 min, respectivamente (69, 70). A proteína-VFe é mais sensível que a proteína-MoFe quando exposta ao oxigênio (71).

O efeito de inibição da nitrogenase por oxigênio "in vivo" também é denominado "switch-off" e é reversível ("switch-on") dependendo da concentração e do tempo de exposição ao oxigênio (106, 114). O efeito ocorre em diversos microrganismos, incluindo em *Azospirillum* spp. (106, 118). Um pequeno aumento da concentração de oxigênio em culturas sob condições de fixação de nitrogênio promove inativação reversível da nitrogenase, sem modificação da proteína-Fe em *A. brasilense* e *A. lipoferum* (106). Este efeito é, provavelmente, decorrente do desvio de elétrons da nitrogenase pelo oxigênio, impedindo a redução do N_2 (93, 180, 204). Entretanto, concentrações mais elevadas de O_2 levam à inativação irreversível da nitrogenase (106, 177).

Organismos fixadores de nitrogênio possuem mecanismos de proteção da nitrogenase contra a inativação pelo oxigênio

(63, 196, 203). Dentre estes incluem-se: aumento da taxa respiratória a fim de remover rapidamente o excesso de oxigênio (3, 204); modificação conformacional da nitrogenase a fim de torná-la tolerante ao ar e parada simultânea da fixação de nitrogênio (203, 210); compartimentalização celular (heterocisto de cianobactérias) (195, 225); possível proteção através das enzimas superóxido dismutase, peroxidase e catalase, as quais removem os metabólitos tóxicos oriundos da redução de O_2 como o íon superóxido (O_2^-), peróxido (H_2O_2) e radical hidroxílico (HO) (170, 174); proteção química através de carotenóides por dismutação espontânea do superóxido e dos radicais de oxigênio (41, 147, 174); agregação bacteriana protegendo camadas celulares mais interiores (16, 115, 178); aerotropismo para concentrações de O_2 mais adequadas (11, 63, 178).

A concentração ótima de O_2 para permitir a fixação de nitrogênio em *Azospirillum* spp. fica em torno de 0,6 a 8 μM , suficientes para saturar as oxidases terminais de alta afinidade (177, 179). Neste gênero foram observados os seguintes mecanismos: de proteção respiratória limitada (177), aerotropismo (11, 53, 178), proteção conformacional (106, 154, 179) e proteção através de carotenóides (107). Mutantes de *A. brasilense* com superprodução de carotenóides apresentam capacidade diazotrófica cinco vezes superior à verificada no tipo selvagem sob altas concentrações de O_2 , confirmando a existência e eficiência desse mecanismo de proteção (107). Superprodução de catalase, entretanto, parece não ter efeito de proteção contra o oxigênio (113).

O aerotropismo pode ser observado na formação e no deslocamento da película bacteriana, em meio semi-sólido, em direção a regiões de concentrações de O_2 compatíveis com a atividade da nitrogenase (11, 53, 178).

A proteína-Fe de *A. lipoferum* e *A. brasilense* sob condições de anaerobiose (106, 177) é inativada por modificação covalente (ADP-ribosilação), o que não ocorre em *A. amazonense* (106, 114, 220). Nestas condições, a inativação da nitrogenase poderia ser decorrente do aumento dos níveis de ADP, um ativador da enzima DraT (154).

1.4 GENÉTICA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.

1.4.1 Em *Klebsiella pneumoniae*

O caráter de fixação de nitrogênio é conferido por um complexo de genes, denominados genes *nif* (196). A genética da fixação de nitrogênio mais estudada é a de *Klebsiella pneumoniae*. Neste organismo, 21 genes *nif* estão distribuídos em 7 a 9 operons compreendidos em um único regulon. O regulon se estende por mais de 23 kilobases (kpb) (81, 164) e está localizado entre o operon *his* (mobilização de histidina) e o gene *shiA* (shikimate permease) (196). A transcrição ocorre da direita para esquerda, excetuando os operons *nifF* e *nifCJ* (4, 164, 190, 196):

hisD.nifQB.nifAL.nifF.nifM.ZW.VSU.nifXNE.nifYTKDH.nifCJ.shiA
 ← ← ← → ← ← ← ← ← → ←

Dentre os genes *nif*, 17 foram identificados através de estudos da genética clássica e tecnologia de DNA recombinante. Os outros quatro genes *nif*, dentre eles: *nifC*, *nifT*, *nifW* e *nifZ*, foram identificados, mais recentemente, através de estudos de seqüenciamento dos genes *nif* (4, 188, 213, 216, 224).

A transcrição de todos os gene *nif* de *K. pneumoniae* é controlada pelos produtos do operon *nifLA*, o qual constitui o sistema *nif*-específico de regulação da fixação de nitrogênio. O produto do gene *nifA* (NifA) funciona como ativador e o produto do gene *nifL* (NifL) como anti-ativador (61, 164). Os genes *nifLA*, por sua vez, são regulados pelo sistema geral de regulação de fixação de nitrogênio (genes *ntr*) (61, 164).

Os genes estruturais *nifD* e *nifK* são codificantes das subunidades α e β da proteína-MoFe, respectivamente, e o gene *nifH* é codificante da proteína-Fe (125, 201, 228). Os produtos dos genes *nifB*, *nifE* e *nifN* estão relacionados com a biossíntese do cofator ferro-molibdênio (FeMoco). Mutantes nesses genes apresentam proteína-MoFe inativa. A adição do FeMoco purificado proporciona a recuperação da atividade da proteína nesses mutantes (110, 201). O produto do gene *nifH*, a proteína-Fe, provavelmente transfere elétrons para o complexo NifNE para que este possa sintetizar o FeMoco (84, 202). Os genes *nifQ* e *nifV* também estão envolvidos na biossíntese do FeMoco. O gene *nifQ* parece estar envolvido no transporte de Mo para a proteína-MoFe (124). Mutantes *nifV*⁻ apresentam nitrogenase de baixa afinidade por N₂, mas ainda

capaz de reduzir acetileno a etileno (111). O produto do gene *nifV* foi identificado como uma homocitrato sintase (214). O homocitrato parece ser incorporado ao FeMoco e estar relacionado com o sítio ativo da nitrogenase, conferindo as características de especificidade à nitrogenase (214). O cofator extraído dos mutantes *nifV*⁻, quando adicionado à proteína-MoFe de mutantes *nifB*⁻, resulta em uma nitrogenase com as propriedades alteradas e semelhantes às observadas naqueles mutantes, indicando a possível participação do FeMoco no sítio catalítico da nitrogenase (110, 111).

O produto do gene *nifM* está, possivelmente, envolvido na modificação pós-traducional da proteína-Fe (188, 201). Isto foi confirmado pela obtenção de proteína-Fe ativa, sintetizada em *Escherichia coli*, requerendo somente os genes *nifH*, *nifA* e *nifM* de *K. pneumoniae* (120).

Os produtos dos genes *nifF* e *nifJ* foram purificados e caracterizados como uma flavodoxina e uma piruvato-flavodoxina oxidorreductase, respectivamente, as quais estão envolvidas no transporte de elétrons para a nitrogenase (24, 54). Os produtos *nifU* e *nifS* parecem interferir na maturação da proteína-MoFe, de forma semelhante ao produto do gene *nifM* (80, 201).

Mutantes *nifZ*⁻ e *nifV*⁻ de *K. pneumoniae* mantiveram capacidade de redução de N₂ e C₂H₂, mas atividade reduzida da proteína-MoFe, sugerindo que esses dois genes estariam relacionados com a ativação da proteína-MoFe (188).

As funções dos genes *nifC*, *nifT*, *nifY* e *nifX* ainda

permanecem indefinidas (164). O produto do gene *nifX*, entretanto, parece estar envolvido na regulação por O_2 (95, 96).

1.4.2 Em *Azotobacter* spp.

Azotobacter vinelandii apresenta dois operons *nifHDK* que codificam a nitrogenase-MoFe e a nitrogenase-VFe como também observado em *A. chroococcum* (29, 127, 135). Além destes dois operons estruturais, há um gene tipo *nifH* que codifica a nitrogenase-Fe em *A. vinelandii* (187). Estudos de DNA recombinante indicaram diferenças espaciais significativas entre grande parte dos genes *nif* de *A. vinelandii* e *K. pneumoniae* (127).

A. vinelandii apresenta três genes tipo-*nifA*: *nifA* requerido para a expressão dos sistemas de fixação de nitrogênio Mo-dependente e MoV-independente, *vnfA* que regula o sistema de fixação V-dependente e *anfA* do sistema de fixação em condições de ausência de vanádio e molibdênio (134). O gene *anfA* foi localizado acima dos genes *anfHDKGK* e o gene *vnfA* acima de um gene tipo *nifE*. As semelhanças entre os produtos AnfA, VnfA e NifA sugerem que os produtos AnfA e VnfA também atuem como reguladores positivos dos respectivos sistemas de fixação de nitrogênio (134).

1.4.3 Em *Azospirillum* spp.

Os genes *nifHDK* de *A. brasilense*, recentemente seqüenciados (82, 246), e de *A. lipoferum* estão organizados

em um único operon, mostrando homologia com os genes de *K. pneumoniae* (81, 194, 197, 212). Genes de *Azospirillum*, homólogos ao *nifE* (90) e *nifUS* (75), foram localizados na região abaixo do operon *nifHDK*. Estudos de hibridização revelaram ainda a presença dos genes *fixAB* e, provavelmente, *fixC* a 3' dos genes *nifUS* em *A. brasilense* e apresentando homologia com os genes *fixABC* de *Azorhizobium caulinodans* (75). Esses genes estão envolvidos no transporte de elétrons na fixação simbiótica de nitrogênio em rhizobia (73). Os promotores dos genes *fixABC* de *Rhizobium meliloti* não são funcionais em *A. brasilense* (117).

O funcionamento do sistema de regulação em *A. brasilense* foi estabelecido através do estudo com mutantes *Nif⁻* e parece análogo ao de *K. pneumoniae* (192). Os mutantes de *Azospirillum* spp. foram complementados por genes *nifA* e *ntrC* de *K. pneumoniae* (163, 192). Algumas diferenças, porém, foram observadas no sistema de regulação desses dois microrganismos. A clonagem do gene *nifA* de *Klebsiella oxytoca* permitiu a expressão constitutiva em mutantes *nifA⁻* de *K. pneumoniae*, mas não em *A. lipoferum*, sugerindo possíveis diferenças estruturais entre os produtos *NifA* (237). Mutantes *nifA⁻* de *A. brasilense* foram ainda complementados pelo gene *nifA* de *H. seropedicae*, sugerindo que a regulação da fixação de nitrogênio é semelhante nesses dois microrganismos (221).

1.5 REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES *nif*

A fixação de N_2 é geralmente reprimida por altas concentrações de NH_4^+ e de O_2 (70, 137, 196) e, em alguns microrganismos, por temperaturas elevadas ($37^\circ C$) (32, 247).

O sistema de regulação da expressão dos genes *nif* em *Klebsiella pneumoniae* é o mais bem estudado e serve como modelo para o estudo da regulação da fixação de nitrogênio em outros microrganismos. A transcrição dos genes *nif* em *K. pneumoniae* é regulada a dois níveis: a nível *nif* - específico, através dos genes *nifA* e *nifL*, e a nível do metabolismo geral do nitrogênio mediado pelos genes *ntrA* (*rpoN*), *ntrB* e *ntrC* (Figura 1). O sistema geral participa também da regulação de outros operons (ex: *his*, *hut*) envolvidos na utilização de fontes alternativas de nitrogênio (60, 132, 163, 183).

1.5.1 Sistema de regulação do metabolismo nitrogenado (*ntr*)

A utilização de fontes alternativas de nitrogênio em enterobactérias envolve a expressão de operons regulados pelo sistema *ntr*. Este compreende os genes *ntrA* (*rpoN*), *ntrB*, *ntrC* e *glnA* (30, 61, 78, 156).

A hipótese inicial do envolvimento da glutamina sintetase como ativador transcricional dos genes *nif* (1, 137, 249) foi abandonada com o descobrimento dos genes *ntrB* e *ntrC*, os reguladores da expressão dos genes *nif* (78, 156).

Em *K. pneumoniae*, os genes *ntrC* e *ntrB* são contíguos em um único operon juntamente com o *glnA* (GS), *glnAntrBC* (61, 78, 156), enquanto o gene *ntrA* está localizado em outra região do cromossomo (30, 78). Os genes *ntrBC* também são chamados de *glnLG* e o gene *ntrA* é denominado de *glnF* ou *rpoN* (45, 122).

Estudos de regulação de fixação de nitrogênio em *K. pneumoniae* revelaram que a síntese da nitrogenase é reprimida por amônia (70, 236) ou oxigênio (70). Em presença de concentrações limitantes de NH_4^+ , a transcrição do operon *nifLA* é ativada pelo produto do gene *ntrC* (*glnG*), em presença do produto do gene *ntrA* (*rpoN*), um fator σ da RNA polimerase (σ^{54}) (30). Em altos níveis de NH_4^+ (> 10 mM), o produto do gene *ntrB* inativa o produto do gene *ntrC*, bloqueando a transcrição do operon *nifLA*. Em concentrações intermediárias de NH_4^+ (4 mM), insuficientes para causar a inativação do produto do gene *ntrC* pela proteína NtrB, o produto do gene *nifA* é inibido pelo produto do gene *nifL* (61, 163).

Os produtos dos genes *ntrB* e *ntrC*, as proteínas NtrB e NtrC, fazem parte de uma família de proteínas regulatórias que atuam aos pares: uma reguladora (NtrC) e outra sensora (NtrB) (66, 67, 78). A proteína NtrB, de cerca de 36000 daltons, em condições limitantes de nitrogênio catalisa a fosforilação da NtrC, enquanto que em presença de excesso de nitrogênio catalisa a defosforilação da NtrC. A atividade da NtrB é determinada pelo produto do gene *glnB* (a proteína

P_{II}) que, na sua forma não uridililada estimula a atividade fosfatásica da NtrB, levando à inativação da NtrC. Em condições limitantes de nitrogênio fixado, a proteína P_{II} é uridililada pelo produto do gene *glnD*, a uridilil-transferase (UTase). A proteína P_{II} uridililada (P_{II} -UMP) estimula a NtrB a fosforilar a NtrC (38, 173). A UTase também parece ser responsável pela remoção dos grupamentos UMP da proteína P_{II} e a sua atividade é modulada pela relação glutamina/ α -cetoglutarato (38). Mutantes no gene *ntrB* podem sintetizar proteína NtrB insensível à proteína P_{II} , fosforilando constitutivamente a proteína NtrC que, neste estado, promove a síntese constitutiva de GS e histidase (45, 155, 173). Contrariamente, mutantes no gene *ntrB*, que não produzem a proteína NtrB, ainda respondem fracamente aos níveis de nitrogênio presentes na célula, sugerindo que a NtrC possa ser autofosforilada ou sofrer a ação de outra proteína quinase (8, 155). Mutantes *glnB*⁻, apresentando P_{II} incapaz de ser uridililada, apresentam capacidade de fosforilação de NtrC, indicando que a proteína P_{II} não é essencial para o controle da fixação de nitrogênio, apesar de ter papel significativo na defosforilação da NtrC através da NtrB (119).

A proteína NtrC atua como repressora ou como ativadora, em resposta aos níveis nutricionais da célula e da sequência regulatória do promotor com o qual interage, *nifLA*, *glnA* e *his* (157, 185). A níveis limitantes de NH_4^+ , a proteína se encontra fosforilada, sua forma ativa (173).

1.5.2 Regulação *nif* - específica

A transcrição dos genes *nif* de *K. pneumoniae* está sob controle de reguladores *nif* - específicos, os produtos dos genes *nifA* e *nifL* (163, 183, 241). Estes dois genes constituem um operon cuja expressão está sob controle dos produtos dos genes *ntrB* e *ntrC* e requer o fator σ^{54} como já descrito. Em concentrações limitantes de NH_4^+ e O_2 , o produto do gene *nifA* ativa a transcrição de todos os operons *nif*, inclusive o próprio (85) e quando expresso constitutivamente ativa também a transcrição de promotores *ntr* (65, 163, 183) (Figura 1). Em concentrações intermediárias de NH_4^+ e O_2 , o produto do gene *nifL* é ativado e, funcionando como um anti-ativador, bloqueia a transcrição dos operons *nif* ativada pela proteína NifA. A presença de genes homólogos ao *nifA* de *K. pneumoniae* tem sido descrita em todos os diazotrofos já estudados, com a possível exceção de *Clostridium pasteurianum* (44). Assim, o *nifA* se encontra contíguo ao gene *nifB* na bactéria fotossintética *Rhodobacter capsulatus* (144), em *Rhizobium leguminosarum* (97), *R. meliloti* e *K. pneumoniae* (39) e em *H. seropedicae* (221).

A proteína NifL de *K. pneumoniae* apresenta massa molecular em torno de 50000 daltons (60) e regula negativamente a transcrição dos genes *nif* na presença de O_2 , aminoácidos ou níveis intermediários de NH_4^+ (4 mM) (165). A proteína NifL não possui nenhum domínio de ligação a DNA, sugerindo que ela interage diretamente à proteína NifA e não

com o gene *nifA* (67). O produto NifL apresenta baixa homologia com o produto NtrB quando comparado com o grau de homologia verificado entre NifA e NtrC (67). A homologia do produto NifL com NtrB é mais acentuada na região C-terminal (67, 247). O promotor *nifL* pode ser ativado tanto por NifA quanto NtrC (65).

Em *K. pneumoniae*, o oxigênio parece exercer efeito repressor via inativação da proteína NifA (114) pelo produto NifL. Nesse caso, o NifL parece atuar como sensor de oxigênio (67). Além disso, em presença de O_2 , a transcrição do operon *nifLA* se encontra limitada (61, 67).

Em *Rhizobium meliloti*, a expressão *nif/fix* é regulada por O_2 a nível de transcrição do gene *nifA* (59), a qual parece não ser diretamente regulada pelo sistema *ntr* (7, 229). Nesse organismo, os produtos NifA e NtrC são os responsáveis pela ativação da transcrição dos operons *nif* a baixas e altas concentrações de oxigênio, respectivamente (59, 230, 238). Em concentrações limitantes de O_2 , a transcrição do *nifA* é ativada pelo produto do gene *fixJ* (112) que é ativado pelo produto do gene *fixL*. Contrariamente, em altas concentrações de oxigênio, a proteína FixL inativa a FixJ (52). Um sinal simbiótico parece ser necessário para a expressão do operon *fixLJ* (229) em concentrações limitantes de oxigênio (59, 230).

A proteína FixJ ativa, também, a transcrição do gene *fixK* (112). A proteína FixK de *R. meliloti* é homóloga às proteínas Fnr das bactérias entéricas e parece reconhecer seqüências homólogas aos "anaerobox" (13, 112). O produto

FixK ou tipo-Fnr de *R. meliloti* está envolvido na modulação da transcrição do gene *nifA* em resposta às concentrações de oxigênio (13, 112), mas não em *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (48). A sequência "anaerobox" provavelmente tem função ativadora quando sobreposta ao início de transcrição e função repressora quando localizada na região codificadora do gene *nifA* (171). Sítio semelhante ao de ligação para Fnr foi encontrado no gene *nifN*, mas não no gene *nifA* de *R. meliloti* (13), no gene *nifA* de *Azorhizobium caulinodans* (31) e no interior do gene *nifA* de *H. seropedicae* (221) e do gene *nifD* de *Bradyrhizobium japonicum* (171), sugerindo a existência de genes análogos ao *fnr* de *E. coli* (13, 215). Nesses organismos, a expressão do gene *nifA* estaria regulada também a nível da proteína FixK, respondendo às variações nos níveis de oxigênio (13, 221). Além disso, mutações no interdomínio (entre os domínios D e E) das proteínas NifA sensíveis ao oxigênio confirmaram o possível papel dessa região como sensora dos níveis oxigênio (145).

Em *Bradyrhizobium japonicum*, o gene *nifA* faz parte do operon *fixNifA* (232) e parece não ser regulado pelos produtos dos genes *fixLJ* (2), pois é transcrito sob condições aeróbicas. O NifA sob condições microaeróbicas é capaz de ativar o operon *fixNifA*, permitindo uma síntese elevada de seu produto (NifA), necessária para a ativação dos outros operons *fix* e *nif* (232). A sensibilidade da proteína NifA de *B. japonicum* ao oxigênio está, provavelmente, relacionada com a labilidade de resíduos cisteínicos essenciais (85, 86).

Em *Azorhizobium caulinodans*, o gene *nifA* ativa transcrição dos genes *nif* e *fix* e é inibido por O_2 e NH_4^+ (31). O promotor *nifA* contém três domínios que parecem importantes para a sua expressão: a sequência consenso -24 e -12, a sequência UAS ("upstream activator sequence") para a interação com NifA e uma sequência semelhante à consenso para interação da proteína Fnr (31, 171, 198, 226). Um gene tipo-*fnr* ou tipo-*fixK* parece estar envolvido na modulação da atividade da NifA em resposta às concentrações de oxigênio (31). A expressão do gene *nifA* nesse microrganismo parece ser auto-regulada negativamente sob condições não simbióticas de fixação de N_2 (31). A regulação da transcrição do gene *nifA* de *A. caulinodans* envolve três produtos gênicos: as proteínas NtrC, NtrY e NtrX (31, 226). A sequência de aminoácidos deduzida para a NtrY e para a NtrX mostrou homologia com as proteínas sensoras (tipo-NtrB) e reguladoras (tipo-NtrC), respectivamente (31, 198, 226).

O gene *nifA*, tal qual o gene *nifB*, apresenta-se duplicado em *Rhodobacter capsulatus* (144). O efeito dessa duplicação gênica na fixação de nitrogênio ainda não foi esclarecido (144), embora estudos com mutantes estruturais *nifHDK*⁻ sugiram a existência de uma nitrogenase alternativa independente de Mo e V (143), cuja transcrição poderia ser ativada pela segunda cópia do gene *nifA*. Esse microrganismo se assemelha aos simbióticos fixadores de nitrogênio por também apresentar o interdomínio responsável pela sensibilidade do NifA ao oxigênio o que talvez explique ainda não ter sido encontrado nenhum gene análogo ao *nifL*

(143, 144).

Os três sistemas de fixação de nitrogênio de *A. vinelandii* apresentam genes semelhantes ao *nifA* de *K. pneumoniae* denominados *nifA*, *vnfA* e *anfA* (134). Os sítios de ligação para VnfA e AnfA, entretanto, diferem do sistema *nif* pois aparentemente não possuem sequência UAS (126). A expressão desses sistemas dependem da disponibilidade de Mo que reprime a expressão dos genes *vnf* e *anf* e de V que reprime o sistema *anf* (128, 134, 187). Os genes *vnfH* e *vnfD*, são transcritos tanto na presença de V quanto na ausência de Mo e V e diferem dos genes *anfHDK* e *nifHDK* por serem expressos também em presença de NH_4^+ . Além disso, a expressão do gene *vnfH* é dependente de *vnfA* e *anfA*, enquanto a do gene *vnfD* é dependente de *vnfA*, indicando que os genes estruturais da nitrogenase-VFe sejam regulados independentemente e que o gene *anfA* exerça papel regulatório nesse sistema de fixação de nitrogênio (126). Além disso, estudos anteriores demonstraram que o sistema da nitrogenase-Fe necessita da expressão do gene *nifA* para a atividade máxima da enzima sob condições de carência de Mo e V (134). O sistema da nitrogenase-MoFe nessa espécie é ativado pelos genes *nifA* e *nfrX*, enquanto o sistema da nitrogenase-VFe é regulado pelos genes *vnfA* e *ntrC* (209).

Em *K. pneumoniae*, temperaturas superiores a 35°C ocasionam repressão da transcrição dos genes *nif* (32). Nessas condições, o efeito repressor ocorre via inativação da proteína NifA, sem envolvimento do produto NifL (32, 247). Foi verificado, porém, uma menor termolabilidade

do produto NifA em mutantes *nifL*⁻ de *K. pneumoniae*, cuja proteína NifL, embora capaz de se ligar à NifA, é incapaz de inativá-la (5). O complexo NifA / NifL⁻ parece estabilizar os sistemas acoplados de transcrição-tradução "in vitro" dos genes *nif*, mesmo a temperaturas superiores a 30°C (5). Esses resultados corroboraram com trabalhos anteriores que sugeriram que a termossensibilidade do sistema de transcrição dos genes *nif* em *K. pneumoniae* é decorrente da labilidade intrínseca da proteína NifA (208).

O gene *nifA* de *Enterobacter cloacae* foi isolado e o seu produto (NifA) caracterizado como termoestável, permitindo a fixação de nitrogênio a 39°C (248).

Três mutantes Nif⁻ de *A. brasilense* (FP8, FP9 e FP10) foram complementados pelo plasmídeo pCK3 que carrega o gene *nifA* de *K. pneumoniae* expresso constitutivamente (191, 192). Dois destes mutantes foram caracterizados como mutantes *ntrC*⁻ (FP8 e FP9) e um deles como *nifA*⁻ (FP10) (191, 192). A expressão *nif* nesses transconjugantes a 30°C, mas não a 37°C se deveu provavelmente à termolabilidade do produto do gene *nifA* de *K. pneumoniae* (32, 247). Por outro lado, as espécies de *Azospirillum* fixam nitrogênio a temperaturas entre 35-37°C, sugerindo que o produto do gene *nifA* de *A. brasilense* é termoestável nesta faixa de temperatura (53, 63). A termoestabilidade do NifA de *A. brasilense* despertou especial interesse não só para o estudo dos mecanismos de regulação da fixação de nitrogênio, bem como pela possibilidade da utilização do gene *nifA* em sistemas transgênicos (192).

1.5.3 Homologia entre os operons *nifA* e *ntrC*

A proteína NtrC apresenta massa molecular de 52000 ou 54000 daltons, massa muito semelhante à apresentada pela proteína NifA, 53000 daltons (40, 66). As sequências nucleotídicas dos genes *nifA* e *ntrC* mostram que seus produtos gênicos apresentam homologias consideráveis nos níveis de aminoácidos como deduzido pela estrutura secundária das proteínas NifA e NtrC. Os domínios N-terminais (domínios A e C) destas proteínas não apresentam homologia. A porção central (domínio D) das proteínas NifA e NtrC parece estar implicada no controle positivo e poder interagir com NtrA ou σ^{54} da RNA polimerase e um bloco de maior homologia indicativo da função comum dessas duas proteínas. Além disso, as proteínas NifA e NtrC possuem domínio central semelhante à região de ligação de nucleotídeos das GTPases e ATPases. Esta região talvez esteja envolvida na fosforilação do produto NtrC por NtrB. Não se sabe, porém, se o produto NifA estaria sujeito a mecanismo semelhante de fosforilação (66). A extremidade C-terminal (domínio E) de cada proteína contém um domínio hélice-volta-hélice homólogo aos domínios de ligação de DNA encontrados nos repressores, ativadores e resolvases (40, 66). A primeira hélice é idêntica entre as proteínas NtrC e NifA, parecendo determinar a afinidade geral da proteína pelo DNA, enquanto a segunda hélice não é homóloga e parece constituir a hélice de reconhecimento para interação direta com o DNA. Os ligantes específicos de NtrC e NifA diferem entre si, confirmando as diferenças

verificadas na segunda-hélice. A extremidade N-terminal de NtrC é homóloga à de várias proteínas de controle e parece estar envolvida na modulação da atividade biológica da proteína (74).

A homologia dos produtos do operon *nifLA* com os do *ntrBC* sugeriu a ação semelhante e a hipótese de que o operon *nifLA* tenha evoluído de unidade ancestral *ntrBC* (66, 67). Outro aspecto desta homologia é o efeito pleiotrópico do gene *nifA*, cujo produto pode ativar os promotores regulados por NtrC, como o do *hutUH*, além de ser capaz de ativar seu próprio promotor (65, 163, 183).

1.5.4 Promotores *nif* e *ntr*

O gene *ntrA* (*rpoN*) codifica uma subunidade sigma (σ^{54}) da RNA polimerase específica para o reconhecimento dos promotores *nif* e *ntr* (164) e é transcrito constitutivamente, independente das concentrações de nitrogênio fixado presentes (165). A subunidade σ^{54} é um polipeptídeo ácido de massa molecular de 54000 daltons (30, 165). O fator σ^{54} não apresenta homologia com o fator σ^{70} da RNA polimerase convencional de *E. coli*, codificado pelo gene *rpoD* (30, 116), sendo, entretanto, capaz de competir com o mesmo (165).

Os promotores *nif* e *ntr* apresentam seqüências consenso-específicas: CTGGPIAPIPu-N₄-TTGC^A_T para os promotores *nif* ativados por NifA ou NTGGCPu-N₄-TTGC^A_T para promotores *nif* e *ntr* ativados por NtrC. Nessas seqüências se

liga o complexo RNA polimerase σ^{54} . Em ambos os casos, os nucleotídeos GG a -24 e GC a -12 são invariáveis (18, 65) e estão representados em negrito. Alterações no espaçamento entre esses nucleotídeos podem eliminar total ou parcialmente a atividade desses promotores (33, 65, 141, 184). Mutagênese sítio-dirigida indicou que transições de G para A a -13 impedem a ativação da transcrição tanto por NifA quanto por NtrC (33, 35).

Há uma sequência consenso adicional para a ativação pelo NifA, localizada na extremidade 5' (a montante ou "upstream") do início da transcrição do promotor *nifH*, ausente no promotor *nifL* (35). Essa sequência, denominada UAS ("upstream activator sequence") e localizada a cerca de -100 a -120 apresenta a seguinte estrutura: TGT-N₁₀-ACA para promotores ativados por NifA e GCACPI-N₅-GGTGCA para os ativados por NtrC (37, 60). A sequência consenso NifA - específica do promotor *nifH*, quando inserida a 120 nucleotídeos acima do início de transcrição do *nifL*, aumenta a taxa de transcrição do *nifL* pelo NifA, mas não pelo NtrC, confirmando o envolvimento da sequência UAS na ativação pelo NifA (36). Esta sequência a -100 é o sítio mais provável de ligação da proteína NifA (33). A UAS pode agir a uma distância de até 2 kpb, apesar de ter como distância ótima a de -136 do início do sítio de transcrição (35).

A capacidade do NifA e do NtrC para agir a distância levou à postulação de um novo modelo de controle positivo em procariontes. Nesse modelo, as proteínas ligadas ao UAS fazem contacto com as proteínas ligadas na região -24 e -12

através de dobramentos na molécula de DNA (33). Esse contacto requer a ligação das proteínas à mesma face da hélice do DNA de modo a permitir uma correta relação espacial entre as seqüências a montante (extremidade 5') e a juzante (extremidade 3') (6, 34, 169).

A desrepressão de todas unidades transcricionais *nif* é coordenada e se inicia em todos os casos uma hora antes da atividade nitrogenásica poder ser detectada (60, 61). A velocidade inicial de transcrição dos promotores *nifLA* e *nifBQ* é inferior à dos outros operons *nif*, sugerindo a complexidade da síntese de seus produtos ou menor afinidade de seus promotores pelas proteínas reguladoras (32, 60, 61).

Mutantes regulatórios de *A. brasilense* têm sido isolados a fim de se investigar o mecanismo de regulação da expressão dos genes *nif* nesse microrganismo. Não há indicação na literatura especializada do isolamento de gene homólogo ao *nifA* em *A. brasilense* capaz de complementar os mutantes *nifA*⁻ (76, 217). O interesse em se isolar e caracterizar o gene *nifA* deste microrganismo prende-se não somente a aspectos acadêmicos, mas também à termoestabilidade da proteína NifA a 37°C que possibilitaria o melhoramento genético de outros microrganismos diazotróficos de maior importância agrícola através de transferência do gene *nifA* (192). Neste trabalho tivemos por objetivos a clonagem, o isolamento e a caracterização do gene *nifA* de *A. brasilense* estirpe FP2, bem como o estudo da expressão desse gene tipo-*nifA* sob diferentes condições fisiológicas, incluindo variações da temperatura.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMOS E PLASMÍDEOS

Os microrganismos e plasmídeos utilizados estão listados nas tabelas 1 e 2, respectivamente. As estirpes de *Azospirillum brasilense*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foram estocadas em glicerol 50% a -20°C , onde permanecem viáveis por pelo menos 2 anos (160). As diversas estirpes de *A. brasilense* e *E. coli* também foram estocadas nos respectivos meios sólidos à temperatura ambiente, onde permanecem viáveis por pelo menos 1 ano. Culturas em meio líquido, com no máximo 7 dias de idade, mantidas à temperatura ambiente, foram utilizadas como pré-inóculo para crescimento em grandes volumes.

2.2 MEIOS DE CULTURA

O meio de cultura utilizado para crescimento de *A. brasilense* foi o meio NFbHP (192), que apresenta a seguinte composição em g.l^{-1} :

KH_2PO_4	4,0
K_2HPO_4	6,0

TABELA 1: BACTÉRIAS

Estirpes	Genótipo/Fenótipo	Fonte/Referência
----------	-------------------	------------------

Azospirillum brasilense

FP2	Sp7 ATCC 29145 Nif ⁺ Sm ^R Nal ^R	192
FP3	NifHDK ⁻ Sm ^R Nal ^R	192
FP6	Nif ⁻ (proteína FeMo ⁻) Sm ^R Nal ^R	192
FP8	NtrC ⁻ Sm ^R Nal ^R	192
FP9	NtrC ⁻ Sm ^R Nal ^R	192
FP10	NifA ⁻ Sm ^R Nal ^R	192

Escherichia coli

HB101	<i>pro leu thi lacY endoI⁻</i> <i>recA13 r⁻m⁻ Sm^R</i>	26
1230	<i>pro met recA⁻ Sm^R</i>	A.W.B Johnston
MC1061	<i>recA⁺ tra⁻ mob⁻ hsdR hsdM⁺ Sm^R</i>	43
DH5	<i>recA1 supE44 thi1 r⁻m⁻ Nal^R</i>	194

Klebsiella pneumoniae

M5a1	Nif ⁺	62
50581	NifB ⁻	C. Kennedy

TABELA 2: PLASMÍDEOS

Plasmídeo	Genótipo/Fenótipo	Fonte/Referência
pLAFR3	<i>cos</i> IncP-1 Tc ^R	223
pRK2013	<i>tra</i> ⁺ Km ^R	83
pRK290	<i>mob</i> ⁺ Tc ^R	58
pR68.45	<i>tra</i> ⁺ <i>mob</i> ⁺ IncP-1 Km ^R Tc ^R Cb ^R	101
pEMS101	<i>nifA</i> e <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> Cb ^R	221
pEMS300	<i>nifA</i> e <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> Cb ^R	221
pAB35	<i>nifHDK</i> de <i>A. brasilense</i> Tc ^R	131
pMAK1-pMAK8	pLAFR3 contendo fragmentos de DNA de <i>A. brasilense</i> FP2	este trabalho
pBR322	Ap ^R Tc ^R	25
pGR113	<i>nifNE</i> de <i>K. pneumoniae</i> Tc ^R	200
pCK3	<i>nifA</i> ^C de <i>K. pneumoniae</i> IncP-1 Tc ^R	186

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
NaCl	0,1
CaCl_2	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Ácido nitrilo triacético	$5,6 \cdot 10^{-2}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Biotina	$1,0 \cdot 10^{-4}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$2,4 \cdot 10^{-3}$
H_3BO_3	$2,8 \cdot 10^{-3}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$8,0 \cdot 10^{-5}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,4 \cdot 10^{-4}$
Lactato de sódio	5,0

Como fontes de nitrogênio foram utilizados usualmente 5 mM de glutamato de sódio ou 20 mM de NH_4Cl , denominando-se o meio de NFbHPG ou NFbHPN, respectivamente. Concentrações diferentes de NH_4Cl ou diferentes fontes de nitrogênio empregadas estão indicadas oportunamente. O meio apresenta um pH final de 6,8.

Para obtenção de meio NFbHP semi-sólido, os meios líquidos foram adicionados de $1,65 \text{ g.l}^{-1}$ de ágar.

Escherichia coli foi crescida em meio Luria-Broth (LB) (160), que apresenta a seguinte composição em g.l^{-1} :

Triptona	10
Extrato de levedura	5
NaCl	10

O pH do meio foi ajustado com NaOH 2 N para 7,5.

As células de *E. coli* que foram utilizadas para infecção bacteriófaga foram crescidas em meio TB que apresenta a seguinte composição em g.l^{-1} :

Tryptona	10
NaCl	8
Tiamina pirofosfato	$5 \cdot 10^{-3}$
Maltose	2 (0,2%)

O meio foi autoclavado, contendo somente triptona e NaCl. A maltose e a tiamina pirofosfato foram estocadas separadamente e esterilizadas por filtração.

Klebsiella pneumoniae foi crescida em meio LB logo após ser retirada de estoque em glicerol 50% para facilitar e assegurar o crescimento das células. Para os testes fisiológicos de fixação de nitrogênio, foi crescida em meio líquido Davis e Mingioli livre de nitrogênio (NFDM) (42), o qual apresenta a seguinte composição em g.l^{-1} :

K_2HPO_4	12,06
KH_2PO_4	3,4
MgSO_4	0,1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$25 \cdot 10^{-3}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$25 \cdot 10^{-3}$
glucose	20

O pH do meio NFDM foi ajustado para 7,4 após a adição de fosfato. A glucose do meio foi esterilizada separadamente por filtração. Não foi adicionada nenhuma fonte de nitrogênio.

Para obtenção de meios sólidos, os meios líquidos foram acrescidos de 15 g.l^{-1} de ágar. O meio LB acrescido de ágar passa a ser denominado de meio Luria - Ágar (LA). Para obtenção de top ágar, os meios líquidos foram acrescidos de $7,5 \text{ g.l}^{-1}$ de ágar.

Todos os meios foram esterilizados em autoclave a 120°C a 1 atm por 20 min.

2.3 ANTIBIÓTICOS

As soluções estoques dos antibióticos utilizados nos meios de cultura foram preparadas conforme descrito em Maniatis e colaboradores (160), obedecendo as concentrações permitidas para o crescimento de cada microrganismo.

A solução estoque de ácido nalidíxico (NaI, 10 mg.ml^{-1}) foi preparada em água destilada, neutralizada com NaOH 1 N para completa solubilização e esterilizada por filtração em filtro millipore HAWP ($0,45 \mu$). A solução de cloridrato de tetraciclina (Tc) foi preparada na concentração de $12,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ em etanol 50% v/v. As soluções estoque de canamicina (Km), carbenicilina (Cb) e estreptomicina (Sm) foram preparadas em água destilada na concentração de 20 mg.ml^{-1} e posteriormente esterilizadas em filtro millipore HAWP ($0,45 \mu$).

Todos os antibióticos e as respectivas soluções-estoque foram mantidos a -20°C . Os meios sólidos contendo

antibióticos foram guardados a 4°C por tempo determinado pelas especificações de durabilidade de cada antibiótico nesta forma (180).

Antibióticos (Tabelas 1 e 2) foram adicionados aos meios de cultura como requerido. Os antibióticos usados foram: NaI¹⁰ (10 µg.ml⁻¹) para *E. coli* DH5, Sm¹⁰⁰ (100 µg.ml⁻¹) para *A. brasilense*, Tc¹⁵ (15 µg.ml⁻¹) para os plasmídeos pLAFR3, pR68.45, pMAK1 a pMAK8, pBR322 e pCK3, Km⁶⁰ (60 µg.ml⁻¹) para os plasmídeos pRK2013 e pR68.45.

2.4 REAGENTES QUÍMICOS

Ácido nalidíxico, canamicina, cloridrato de tetraciclina, glutamato monossódico, agarose, ATP e soroalbumina bovina foram adquiridos da Sigma Chemical Company. As enzimas de restrição foram adquiridas de Boehringer Mannheim Biochemicals e de Bethesda Research Laboratories, bem como todos os kits de restrição. Os reagentes utilizados nas hibridizações não radioativas foram adquiridos de Boehringer Mannheim Biochemicals.

Os demais reagentes químicos utilizados provieram de diversas fontes, todos pró-análise e tidos como puros.

Os gases argônio, nitrogênio super seco, oxigênio, acetileno, etileno padrão (100 ppm), hidrogênio e ar comprimido foram adquiridos da White Martins S.A.

2.5 TAMPÕES E SOLUÇÕES

Os tampões e as soluções comumente utilizados estão listados abaixo, preparados de acordo com Maniatis e colaboradores (160).

2.5.1 Tampões de ressuspensão celular

GET: Tris-HCl 25 mM pH 8,0 contendo glucose 50 mM e EDTA 10 mM.

T₅₀E₂₀: Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo EDTA 20 mM.

2.5.2 Misturas de lise celular

SDS 1% em NaOH 0,2 N.

SDS 1% e EDTA 1,77% em NaOH 80 mN, pH 12,6.

2.5.3 Soluções de neutralização para preparo de DNA

KAcF: acetato de potássio 3 M em ácido fórmico 1,8 M pH 4,8.

Tris-sal: Tris-HCl 0,7 M pH 8,0 contendo NaCl 3,54 mM

2.5.4 Preparo de fenol

O fenol foi equilibrado pelo método descrito por Maniatis e colaboradores (160). Fenol cristalizado foi fundido a 65°C e acrescido de 8-hidroxiquinoleína (0,1%) e Tris-base 0,5 M (1 volume). A fase aquosa foi desprezada

após decantação e a fase orgânica extraída com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo 0,2% de β -mercaptoetanol até que o pH da fase aquosa fosse igual ou superior a 7,5.

A solução de fenol : clorofórmio : álcool isoamílico obedeceu a proporção de 25 : 24 : 1 (160).

2.5.5 Soluções para precipitação de DNA

ACE: acetato de sódio 0,3 M pH 8,0 em etanol 90% v/v.

NH_4^+AcO : acetato de amônio 0,83 M pH 7,3 em etanol 80% v/v.

LICI: cloreto de lítio 0,129 M em etanol 92% v/v.

2.5.6 Tampão de solubilização de DNA

T_{10}E_1 : Tris-HCl 10 mM pH 8,0 contendo EDTA 1 mM.

2.5.7 Soluções para transformação

CaCl_2 50 mM.

Tris-HCl 10 mM pH 8,0 contendo CaCl_2 50 mM.

2.5.8 Tampões eletroforéticos

TBE: Tris-base 89 mM pH 8,0 contendo ácido bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM.

TAE: Tris-base 40 mM pH 8,0 contendo ácido acético glacial 40 mM e EDTA 2,5 mM.

2.5.9 Corante eletroforético

ABF: azul de bromofenol 0,25% e glicerol 50% em tampão TBE.

2.5.10 Tampões de transferência de DNA para membranas

SSC 20x: NaCl 3 M e Na₂-citrato 0,3 M pH 7,0.

O tampão SSC foi utilizado em diversas concentrações (0,1x a 5x) para a lavagem da membrana de nylon Hybond-C adicionado, porém, de SDS 0,1% (concentração final).

2.5.11 Solução de hidrólise de DNA em hibridizações

HCl 0,25 N.

2.5.12 Solução desnaturante de DNA

NaCl 1,5 M em NaOH 0,5 N.

2.5.13 Solução neutralizante de hibridização

TE-sal: Tris-HCl 0,5 M pH 7,2 contendo NaCl 1,5 M e EDTA 1 mM.

2.5.14 Soluções de pré-hibridização

RB₁: reagente bloqueador 0,5% e SDS 0,02% m/v em tampão SSC 5x dissolvido a 60°C.

RB₂: solução de Denhardt 5x, formamida 50%, SDS 0,5%,

100 μ g de DNA de timo de boi em tampão SSC 6x desnaturado a 95°C.

2.5.15 Solução estoque de Denhardt (100x)

10 g de ficol, 10 g de polivinil-pirrolidona e 10 g de soroalbumina bovina foram misturadas em 500 ml de água bidestilada. Após o preparo, a solução foi esterilizada por filtração (Nalgene), dispensada em alíquotas de 25 ml e estocada a -20°C.

2.5.16 Deionização de formamida

5 g de resina iônica mista Amberlite BM1 foram adicionadas a 50 ml de formamida. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos e filtrada em papel Whatman nº1. A resina foi distribuída em alíquotas de 1 ml e estocada a -20°C.

2.5.17 Soluções para marcação com 32 P

T₉E_{0,2}: Tris-HCl 3 mM pH 7,0 contendo EDTA 0,2 mM.

Solução 0: Tris-HCl 1,25 M pH 8,0 contendo MgCl₂ 0,125 mM.

Solução A: 18 μ l de β -mercaptoetanol e 5 μ l de cada nucleotídeo (dCTP, dTTP, dGTP) em 1 ml das solução 0.

Solução B: Tampão HEPES 2 M pH 6,6 corrigido com NaOH 4 N ou tampão MOPS 2 M.

Solução C: 50 unidades de hexadesoxinucleotídeos em 550 μ l de $T_3E_{0,2}$ (concentração final de 90 U.ml⁻¹).

Tampão OLB: soluções A : B : C nas proporções 10 : 25 : 15.

2.5.18 Soluções para marcação com digoxigenina 11-dUTP (10x)

Mistura dNTP: dATP 1mM, dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, dTTP 0,65 mM e digoxigenina 11-dUTP 0,35 mM pH 6,5.

Mistura de hexadesoxinucleotídeos: 10x.

2.5.19 Tampões de hibridização não-radioativa

Tampão 1: Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 contendo NaCl 0,15 M.

Tampão 2: reagente bloqueador 0,5% m/v dissolvido no tampão 1 a 60°C.

Tampão 3: Tris-HCl 0,1 M pH 9,5 contendo NaCl 0,1 M e $MgCl_2$ 50 mM.

2.5.20 Soluções de reação e coloração

Ac: anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina, 750 U.ml⁻¹.

NBT: azul de nitrotetrazolium 75 mg.ml⁻¹ em dimetilformamida 70% v/v.

X-fosfato: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato 50 mg.ml⁻¹ em dimetilformamida 70% v/v.

2.6 ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO

As endonucleases de restrição foram utilizadas nas condições de ensaio especificadas pelos fornecedores (Boehringer Mannheim Biochemicals e Bethesda Research Laboratories) e indicadas na tabela 3. As soluções-estoque dos tampões foram adequadamente diluídas de acordo com as características de cada endonuclease de restrição.

A escolha do tampão a ser utilizado em sistemas mistos obedeceu as características das enzimas presentes.

Para um sistema de 20 μ l:	<i>Sac</i> I	0,1 μ l
	tampão Plus	2,0 μ l
	RNAse	0,1 μ l
	H ₂ O bidestilada	17,8 μ l

que deve ser analisado simultaneamente com um sistema de clivagem mista, *Xho* I / *Sac* I, na qual os tampões B, H e Plus são os mais indicados para *Xho* I e os tampões A, L e Plus são os mais indicados para a atividade de *Sac* I.

Para a obtenção de clivagens parciais, as enzimas foram utilizadas em baixas concentrações e os sistemas de clivagem foram incubados por menos tempo. Os sistemas foram mantidos a 37°C durante 5 - 80 min para clivagens parciais e durante 1 - 3 h para clivagens totais. Utilizou-se 1 - 5 unidades de cada enzima para a digestão de 0,2 a 1 μ g de DNA na presença do tampão adequado, em um volume total de 20 μ l.

TABELA 3: CONDIÇÕES DE ENSAIO COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Endonucleases de Restrição	Sítio de Reconhecimento	Tampões de Clivagem
<i>Bam</i> H I	G↓GATC C	A, B, M ou Plus
<i>Bgl</i> II	A↓GATC T	A, B, M, H ou Plus
<i>Eco</i> R I	G↓AATT C	A, B, M, H ou Plus
<i>Hae</i> II	A↓GCGC C G T	A ou Plus (*)
<i>Hind</i> III	A↓AGCT T	A, B, M ou Plus
<i>Pst</i> I	C↓TGCA G	H ou Plus
<i>Sac</i> I	G↓AGCT C	A, L ou Plus
<i>Sal</i> I	G↓TCGA C	B, H ou Plus (*)
<i>Sau</i> 3A I	↓GATC	A ou Plus
<i>Xho</i> I	C↓TCGA G	B, H ou Plus

Os tampões A, B, L, M e H foram utilizados na diluição de 1 : 10. O tampão Plus, por sua vez, foi utilizado na diluição de 1 : 10 para todas as enzimas listadas acima, excetuando-se nas clivagens com as enzimas *Sal* I e *Hae* II, nas quais a diluição utilizada foi de 1 : 5 (*).

Todos os sistemas de clivagem foram incubados a 37°C por tempo variável de 5 min a 2 h, exceto os sistemas contendo *Sal* I que foram incubados a 42°C por 1 a 3 horas.

Os tampões de reação listados na tabela 3 apresentam a seguinte composição quando diluídos 1 : 10 (180):

A:	Tris-acetato	33 mM pH 7,5 (37°C)
	Acetato de Magnésio	10 mM
	Acetato de Potássio	66 mM
	Ditiotreitol	0,5 mM
B:	Tris-HCl	10 mM pH 8,0 (37°C)
	Cloreto de Magnésio	5 mM
	Cloreto de Sódio	100 mM
	β -mercaptoetanol	1 mM
L:	Tris-HCl	10 mM pH 7,5 (37°C)
	Cloreto de Magnésio	10 mM
M:	Tris-HCl	10 mM pH 7,5 (37°C)
	Cloreto de Magnésio	10 mM
	Cloreto de Sódio	50 mM
H:	Tris-HCl	50 mM pH 7,5 (37°C)
	Cloreto de Magnésio	10 mM
	Cloreto de Sódio	100 mM
Plus:	Tris-acetato	10 mM pH 7,9 (37°C)
	Acetato de Magnésio	10 mM
	Acetato de Potássio	50 mM

2.7 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As culturas de *A. brasilense* em meio NFbHPG ou NFbHPN líquido foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio ou em frascos de 60 ml contendo 20 ml de meio, dependendo do volume necessário para o experimento. Quando utilizadas para purificações de DNA em larga escala, as culturas foram feitas em frascos de 1000 ml contendo 300 ml de meio. Todas as culturas foram incubadas em agitador rotatório a 130 rpm e a 30°C, até a densidade de células atingir absorvância de aproximadamente 2,0 em 540 nm (18 a 24 h), salvo indicação em contrário. Para a determinação da atividade da nitrogenase, *A. brasilense* foi cultivado em 4 ml de meio semi-sólido contidos em frascos de 10 ml e incubado a 30°C ou a 37°C.

As culturas de *E. coli* em meio líquido foram realizadas no mesmo tipo de frasco e obedecendo as mesmas proporções acima descritas e incubadas a 37°C por 12 h ou até atingir $DO_{540\text{ nm}}$ igual a 2,0.

Estirpes de *K. pneumoniae* foram cultivadas em meio LB, agitadas a 130 rpm e a 32°C, até a densidade de células atingir absorvância de 2,0 em 540 nm. As culturas para testes fisiológicos de fixação de nitrogênio foram crescidas a 32°C durante 24 horas em meio NFDM líquido em agitador rotatório a 180 rpm em frascos de 10 ml contendo 5 ml de cultura e tampados com rolhas de borracha para garantir ambiente micro- ou anaeróbico.

2.8 CONTAGEM DE BACTÉRIAS

O número de bactérias viáveis foi determinado, plaqueando-se diluições adequadas, de cada cultura, em meio sólido específico. Aliquotas (0,1 ml) foram espalhadas sobre placas com o meio apropriado, contendo antibióticos conforme requerido, e incubadas por 24-48 horas a 30°C. O número de células viáveis, formadoras de colônias por unidade de volume (ml) foi determinado, multiplicando-se o número de colônias de cada placa por 10 e pelo fator de diluição.

A frequência de conjugação foi calculada pela relação entre o número total de colônias transconjugantes e o número total de células de *A. brasilense* plaqueadas.

2.9 CONJUGAÇÃO BACTERIANA

A conjugação interespecífica de bactérias foi realizada conforme descrito por Pedrosa e Yates (192). Culturas de *A. brasilense* FP10 e seus transconjugantes foram crescidas em meio NFbHPN líquido, enquanto que as de *E. coli* DH5, HB101, 1230 e MC1061 foram crescidas em meio LB até atingirem $DO_{540\text{ nm}}$ de 1,5-2,0.

As conjugações foram realizadas por sistema binário na proporção de 10 : 1 de receptor : doador ou por sistema tríplice na proporção de 10 : 1 : 1 para as bactérias receptor : doador : mobilizador (192, 193). O plasmídeo

PRK2013 foi utilizado como mobilizador (*tra*⁺) nos sistemas triplíces por conter gene necessário à formação do "pilus", permitindo a transferência do plasmídeo de uma bactéria para outra (104, 149, 193).

As misturas de conjugação foram centrifugadas a 12000 rpm (10000 xg) por 3 min com o intuito de eliminar os antibióticos presentes nos meios de cultura e ressuspensas em 0,1 ml de LB. Essas misturas foram semeadas em meio sólido misto LA/NFbHPN (1 : 1) e incubadas a 30°C por 18 h. Após a incubação, a massa bacteriana foi suspensa em 1 ml de meio NFbHP, lavada e ressuspensa no mesmo meio.

As suspensões bacterianas foram diluídas e adequadamente plaqueadas (0,1 ml) em meios seletivos específicos NFbHPN Sm¹⁰⁰ para *A. brasilense* FP10, NFbHPN Sm¹⁰⁰Tc¹⁵ para os transconjugantes e LA para todas as bactérias presentes na mistura de conjugação. Após incubação por 24 h a 30°C, as colônias foram contadas.

2.9.1 Conjugação com o banco genômico

Os doze grupos de bactérias integrantes do banco genômico, cada um contendo de 200 a 1000 clones independentes, foram crescidos em frascos individuais e posteriormente misturados em volumes iguais a fim de permitir o crescimento não diferenciado dos diversos clones, minimizando o fator de competitividade entre as estirpes. A conjugação com o banco genômico foi feita através de um

sistema de conjugação tríplice (192). As suspensões de *A. brasilense* FP10 (receptor) e *E. coli* DH5 (pLAFR3 :: DNA de *A. brasilense* FP2) (doador) e *E. coli* HB101 (pRK2013) (mobilizador), foram misturadas na proporção 10 : 1 : 1, respectivamente e plaqueadas como descrito anteriormente. Alíquotas de 0,1 ml da massa bacteriana, nas diluições de 10^{-1} e 10^{-2} , foram distribuídas uniformemente sobre placas contendo NFbHP livre de nitrogênio fixado e incubadas a 30°C durante 10 dias em frasco hermeticamente vedado (GASPAK), contendo atmosfera de N_2 e 0,5-2% de oxigênio (192). Colônias que surgiram sob essas condições, possíveis transconjugantes Nif^+ , foram replicadas para meio sólido NFbHPN $Sm^{100}Tc^{15}$, a fim de eliminar possíveis contaminantes não fixadores nitrogênio. Colônias resistentes aos antibióticos foram isoladas, purificadas e crescidas em meio NFbHP semi-sólido a 30°C durante 36-48 horas.

Oito estirpes de tranconjugantes de *A. brasilense* FP10 (pLAFR3 :: Inserto de DNA total de *A. brasilense* FP2) foram purificadas em meio NFbHPN $Sm^{100}Tc^{15}$. Os plasmídeos recombinantes desses transconjugantes foram denominados pMAK1 a pMAK8.

2.9.2 Conjugação com *E. coli* 1230 (pR68.45)

Para demonstrar que a restauração do fenótipo Nif^+ dos transconjugantes *A. brasilense* FP10 (pMAK1-pMAK7) era devido à presença de plasmídeos recombinantes contendo

fragmentos de DNA da estirpe selvagem de *A. brasilense*, FP2, os transconjugantes foram conjugados com *E. coli* 1230 (pR68.45). A transferência dos plasmídeos (pR68.45) para os transconjugantes *A. brasilense* FP10 (pLAFR3 :: DNA de *A. brasilense* FP2) foi feita por conjugação binária (192). As suspensões de *A. brasilense* (receptor) e *E. coli* 1230 (pR68.45) (doador e mobilizador) foram misturadas na proporção de 10 : 1, respectivamente. A mistura de conjugação foi processada conforme descrito acima, usando-se NFbHPN NaI¹⁰Km⁶⁰ como meio seletivo para os transconjugantes de *A. brasilense* contendo o plasmídeo pR68.45. Vinte colônias de cada conjugação, resistentes aos antibióticos, foram isoladas e purificadas, transferidas para meio NFbHP semi-sólido e finalmente dosadas quanto à atividade da nitrogenase.

2.9.3 Conjugação com outros mutantes de *A. brasilense*

Os plasmídeos contendo inserto de DNA de *A. brasilense* FP2 foram isolados dos transconjugantes e utilizados para transformar *E. coli* MC1061. O transconjugante contendo o plasmídeo que passou a ser denominado pMAK7 foi escolhido para ensaios mais pormenorizados e conjugado com os mutantes de *A. brasilense* FP3 (*nifHDK*⁻), FP6 (*nif*⁻), FP8 (*ntrC*⁻) e FP9 (*ntrC*⁻). A transferência do plasmídeo pMAK7 de *E. coli* MC1061 para *A. brasilense* foi feita através do sistema de conjugação

tríplice, seguindo as mesmas estratégias utilizadas na conjugação de *E. coli* DH5 (pLAFR3 :: DNA de *A. brasilense* FP2) com *A. brasilense* FP10. A mistura da conjugação foi processada como descrito anteriormente, utilizando-se o meio seletivo NFbHPN Sm¹⁰⁰Tc¹⁵. A determinação da atividade da nitrogenase dos transconjugantes foi realizada após crescimento em NFbHPG.

2.10 TRANSFORMAÇÃO DE *E. coli*

A transformação de bactérias foi efetuada conforme descrito por Maniatis e colaboradores (180). Culturas de *E. coli* MC1061 foram crescidas a 37°C até saturação, durante 18 horas aproximadamente, em meio LB Sm⁵⁰. Este pré-inóculo (200 µl) foi adicionado a 50 ml de meio e crescido sob agitação a 180 rpm a 37°C até atingir DO_{540 nm} de aproximadamente 0,3. As células de *E. coli* competentes para transformação foram obtidas por tratamento de culturas frescas com CaCl₂, como descrito a seguir.

2.10.1 Obtenção de células competentes

A cultura foi resfriada rapidamente e mantida em banho de gelo por 15 min. Em seguida, as células foram centrifugadas em centrífuga Beckman JA-21B a 0-4°C durante 5 min a 5000 rpm (3020 xg). O precipitado foi, então, ressuspensão em 20 ml de solução 50 mM de CaCl₂ em 10 mM

tampão Tris-HCl pH 8,0. As células foram deixadas em repouso em banho de gelo durante 40 min, recentrifugadas e ressuspensas em 3 ml da mesma solução. As células competentes foram distribuídas em alíquotas de 200 μ l e mantidas em repouso a 4°C por 12-18 horas, a fim de permitir a recuperação celular e aumentar a eficiência de transformação.

2.10.2 Procedimento de transformação

O DNA (100 ng) de cada plasmídeo recombinante (pMAK1-pMAK8) foi adicionado (20 μ l) a tubo tipo Eppendorf contendo células competentes (200 μ l) de *E. coli* MC1061. Após incubação em banho de gelo por 40-60 min, as misturas de transformação foram submetidas a choque térmico de 42°C durante 3 min e, novamente mantidas em repouso por 10 min em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 800 μ l de meio LB em cada tubo e incubados a 37°C durante 45 min, período necessário à recuperação celular e expressão das resistências aos antibióticos. As células transformadas foram misturadas (1 ml) com 3 ml de meio LB contendo 7,5 g.l⁻¹ de ágar (top ágar) ou diretamente espalhadas (0,1 a 0,9 ml) sobre placas contendo meio seletivo LA Sm²⁰Tc¹⁵ e incubadas a 37°C durante 18 horas. Colônias resistentes são os possíveis transformantes de *E. coli* MC1061 (pMAK1-pMAK8). Esses transformantes foram utilizados para a estocagem dos plasmídeos recombinantes de forma estável, bem como para o isolamento desses plasmídeos.

2.11 TRANSFORMAÇÃO DE *K. pneumoniae*

Estirpes de *K. pneumoniae* foram transformadas pelo método rápido de congelamento-aquecimento desenvolvido por Merrick e colaboradores (1977). Volume de 100 μ l de cultura de *K. pneumoniae* crescida em LB durante aproximadamente 20 horas foi adicionado a 4,9 ml de LB e incubado sob agitação rotatória a 32°C durante 2 horas até $OD_{540\text{ nm}}$ de 0,4.

As células foram sedimentadas por centrifugação a 12000 rpm (10000 xg) a 4°C por 5 min, ressuspensas em 400 μ l de solução 50 mM $CaCl_2$ e distribuídas em alíquotas de 200 μ l em tubos Eppendorf.

Células competentes de *K. pneumoniae* 50581, mutante *nifB*⁻, foram utilizadas para transformação a fim de se verificar, através de complementação, se o plasmídeo pMAK7 contém o gene *nifB*. A um tubo contendo células competentes (200 μ l) de *K. pneumoniae* 50581 foram adicionados 20 μ l do plasmídeo pMAK7, seguido de congelamento rápido em nitrogênio líquido por 2 min. O tubo contendo a mistura de transformação e o tubo-controle foram aquecidos a 32°C e o ciclo de resfriamento rápido / aquecimento foi repetido. Finalmente, as células foram transferidas para 800 μ l de LB em frascos de 1,5 ml e incubadas a 32°C sob agitação rotatória durante 3 h. Diluições apropriadas foram plaqueadas em LA Tc¹⁵ como meio seletivo e incubadas a 30°C. A viabilidade das células foi estimada em meio não seletivo, tanto para a mistura de transformação quanto para o controle sem a adição de DNA.

2.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução de acetileno (56, 211). Os frascos com culturas foram vedados com rolhas de borracha ("subba-seals"), injetados com acetileno gasoso num total de 1/10 do volume da fase gasosa e incubados a 30°C ou 37°C, durante 1-2 h. As culturas de *A. brasilense* foram crescidas e ensaiadas em meio líquido NFbHPG sob agitação de 130 rpm, enquanto que as culturas em meio semi-sólido livre de nitrogênio fixado foram mantidas estáticas. As estirpes de *K. pneumoniae* foram crescidas em meio líquido NFDM contido em frascos de cultura tampados com rolhas de borracha e incubadas a 30°C sob agitação rotatória de 180 rpm. Amostras da fase gasosa foram coletadas em tempos regulares para a determinação através de cromatografia gasosa. Amostras (0,5 ml) foram analisadas em um cromatógrafo Varian 2440D equipado com coluna Porapak N e detector de ionização de chama. O gás de arraste foi nitrogênio super seco ($20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) e as temperaturas do injetor e da coluna foram mantidas a 130°C e a do detetor em 140°C.

Para o cálculo do etileno formado, foi utilizado o etileno padrão de 100 ppm fornecido pela White Martins S.A.. Alíquotas de 0,5 ml deste gás contêm 2,232 nmol de etileno, a 1 atm e 25°C, segundo a lei dos gases ideais.

A atividade específica da nitrogenase foi expressa como nanomoles de etileno formado por minuto e por miligrama de proteína.

2.13 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores (153), usando soroalbumina bovina como padrão. As determinações de proteínas em suspensões de células foram feitas após lise alcalina em NaOH 0,5 N por 2-12 horas (133).

2.14 REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE

2.14.1 Efeito de íons amônio sobre a atividade da nitrogenase de *A. brasilense*

Os transconjugantes *A. brasilense* (pMAK1 e pMAK7) e a estirpe selvagem *A. brasilense* FP2 foram crescidos em Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio NFbHPG Tc¹⁵ e NFbHPG, respectivamente, a 130 rpm e a 30°C até atingirem absorbância em 540 nm de aproximadamente 2 (12 h). Após vedar os frascos com rolhas de borracha, acetileno (10% final da fase gasosa) foi injetado e a incubação foi realizada da mesma forma que anteriormente. A atividade da nitrogenase de culturas de *A. brasilense* foi determinada antes e após a adição de NH₄Cl. Amostras gasosas (0,5 ml) foram coletadas em intervalos de tempo de 10-20 min durante 120 min de incubação e analisadas. Para cada tratamento foi realizado um controle sem adição de NH₄Cl.

Para a visualização da reversibilidade do efeito da

amônia sobre a atividade nitrogenásica, a concentração de NH_4Cl foi diminuída para 0,1 mM final.

Para determinar a expressão constitutiva da nitrogenase dos transconjugantes de *A. brasilense* FP10, estes foram cultivados estaticamente em 4 ml de meio NFbHPN, suplementado com 10 mM de NH_4Cl , contido em frascos tipo penicilina de 10 ml a 30°C durante 24 h e ensaiados para redução de acetileno.

2.14.2 Efeito da temperatura sobre a atividade da nitrogenase

Com a finalidade de se verificar a termoestabilidade do produto NifA codificado pelo gene *nifA* contido nos plasmídeos pMAK7 e pCK3, transconjugantes de *A. brasilense* FP10 foram cultivados em meio NFbHP semi-sólido a 30°C e a 37°C, durante 24-48 h. A redução de acetileno foi determinada nas respectivas temperaturas de crescimento. A estirpe selvagem, FP2, foi incubada como controle.

2.15 ISOLAMENTO DE PLASMÍDEOS

Os plasmídeos de *A. brasilense* FP2 e FP10 foram isolados pela técnica da lise alcalina descrita por Robson e colaboradores (205). Aliquotas (1,5 a 3 ml) de culturas crescidas em meio líquido até $\text{DO}_{540 \text{ nm}}$ de aproximadamente 2,0 foram centrifugadas em tubos Eppendorf estéreis em

uma microcentrífuga Spin 1 a 12000 rpm (10000 xg) durante 1,5 min. As células foram ressuspensas em 50 μ l de $T_{50}E_{20}$ (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 20 mM). A esta suspensão foram adicionados 950 μ l de mistura de lise (SDS 1%, EDTA 1,77% = 0,05 M em NaOH 0,8 mN, pH 12,6), misturada rapidamente e incubada por 25 min a 34°C. A seguir foram adicionados 170 μ l de Tris-sal (Tris-HCl 0,7 M pH 8,0, NaCl 3,54 M) e incubados por 15 min a -20°C para precipitação de DNA cromossomal, proteínas, SDS e resíduos celulares. A preparação foi então centrifugada a 12000 rpm (10000 xg) por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo Eppendorf estéril contendo 770 μ l de ACE (acetato de sódio 0,3 M em etanol 90% v/v). A mistura foi mantida a -20°C por 12-18 h para precipitação do DNA. A mistura foi centrifugada a 12000 rpm (10000 xg) por 10 min a 4°C e desprezado o sobrenadante. O DNA precipitado foi cuidadosamente seco por inversão do tubo sobre papel absorvente e, em seguida, sob fluxo de argônio a fim de eliminar o etanol residual. O DNA plasmidial foi cuidadosamente dissolvido em 20 μ l de $T_{10}E_1$ (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) a 30°C.

Os plasmídeos pMAK1-pMAK8, pLAFR3, pR68.45, pEMS101, pEMS300, pAB35 foram isolados de transformantes e transconjugantes de *E. coli* e de transconjugantes de *A. brasilense* FP3, FP6, FP8 e FP9 pela técnica de lise alcalina descrita por Birnboim e Doly (19). Aliquotas (1,5 a 3 ml) de culturas, crescidas em meio líquido até $DO_{540\text{ nm}}$ de aproximadamente 2,0 foram centrifugadas em tubo Eppendorf

estéril em microcentrífuga Spin 1. As células ressuspensas em 100 μ l de tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,0 contendo glucose 50 mM e EDTA 10 mM (GET) e lisadas com 200 μ l de SDS 1 % em NaOH 0,2 N foram misturadas rigorosamente e incubadas por 5 min à temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados 158 μ l de acetato de potássio 3 M em ácido fórmico 1,8 M, pH 4,8 (KAcF) gelado. A mistura foi incubada em gelo por 30 min para a precipitação do DNA cromossomal, sais, proteínas e resíduos celulares (contaminantes da preparação plasmidial). Foram adicionados 450 μ l de fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (25 : 24 : 1) e a preparação foi intensamente agitada a fim de associar os contaminantes à fase orgânica. Após centrifugação a 12000 rpm (10000 xg) durante 5 min a 4°C, a fase aquosa foi transferida para novo tubo Eppendorf estéril contendo 820 μ l de etanol 95% v/v. A preparação foi mantida à temperatura ambiente durante 5 min para a precipitação do DNA e a seguir centrifugada a 12000 rpm (10000 xg) durante 3 min a 4°C. O precipitado foi lavado 2 a 3 vezes com etanol 80% v/v. A preparação foi então centrifugada em Spin 1 a 4°C durante 4 min e desprezado o sobrenadante. O DNA foi cuidadosamente seco conforme descrito anteriormente e dissolvido em 20 μ l de $T_{10}E_1$ ou água bidestilada.

Os plasmídeos preparados foram precipitados com acetato de amônio 0,83 M em etanol 80% v/v e lavados em etanol 80% v/v, a fim de eliminar impurezas capazes de inibir as enzimas de restrição. As preparações de DNA plasmidial dissolvidas em $T_{10}E_1$ ou água bidestilada foram

tratadas com RNase (20 mg.ml^{-1}) a fim de eliminar o RNA.

Todas as soluções e os materiais foram previamente esterilizados por autoclavação ou filtração, excetuando-se as misturas de lise, que dispensam esterilização e devem ser preparadas imediatamente antes do uso.

2.16 ELETROFORESE DE DNA

A determinação do perfil eletroforético dos plasmídeos contidos nas diversas estirpes bacterianas foi feita por eletroforese em gel de agarose (160). Géis de agarose foram preparados nas concentrações de 0,6-0,9% em tampão TBE (Tris-base 89 mM pH 8,0, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM) ou TAE (Tris-base 40 mM pH 8,0, ácido acético glacial 40 mM, EDTA 2,5 mM). A corrida eletroforética foi efetuada com o gel submerso em tampão TBE ou TAE, aplicando-se 2 a 12 V/cm durante 2 a 4 horas ou até o corante ter migrado para fora do gel. As variações nas condições eletroforéticas serão apropriadamente indicadas abaixo. Placas de géis 7,5 cm de comprimento por 5 cm de largura, apresentando poços com capacidade para aplicação de até 25 μl de amostra/poço (pente eletroforético de $1,3 \times 4,5 \text{ mm/dente}$) ou em placas de 15 cm de comprimento por 10 cm de largura, apresentando poços com capacidade para aplicação de até 50 μl de amostra/poço (pente eletroforético de aproximadamente $1,2 \times 6 \text{ mm/dente}$) ou de até 25 μl (pente eletroforético de aproximadamente $1,4 \times 3,5 \text{ mm/dente}$) foram

utilizadas como suporte para os géis de agarose.

Após a adição de 3 μ l de corante para eletroforese (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 50%, SDS 1% em tampão TBE) às preparações de DNA plasmidial (20 μ l), estas foram aplicadas em gel de agarose e submetidas a eletroforese.

Após a eletroforese, os géis foram corados com solução de brometo de etídio (EtBr) a 0,5 μ g.ml⁻¹ durante 20-30 min. O excesso de brometo de etídio foi removido por lavagens sucessivas em água destilada. O complexo DNA-EtBr foi observado pela visualização em transiluminador de ultra-violeta e fotografado em filme preto e branco Kodak Iso/ASA 100, com abertura 1/8 e exposição de 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16 ou Kodak ISO/ASA 400 com a mesma abertura e exposição de 1/32, 1/64 e 1/128.

2.16.1 Plasmídeos maiores que 50 kpb

Os géis utilizados para análise dos plasmídeos de médios a grandes (50 a 400 kpb) foram preparados na concentração de 0,6% de agarose. Os géis foram preparados, submersos e eletroforetizados em tampão TBE. A corrida eletroforética foi efetuada a 5-8 V/cm durante 3,5 a 4 h ou até o corante ABF ter eluído completamente do gel. Este procedimento foi utilizado na determinação do padrão de plasmídeos dos transconjugantes de *A. brasiliense*, a fim de permitir uma boa resolução dos plasmídeos naturais destas estirpes. Os plasmídeos pR68.45 (60 kpb) e pLAFR3 (22 kpb) foram utilizados como DNAs-padrão de tamanho conhecido.

2.16.2 Fragmentos de restrição

Os géis de agarose para análise de fragmentos de restrição foram preparados na concentração de 0,8-0,9%. Os géis de agarose foram feitos nas placas de 15 × 10 cm a fim de permitir a aplicação de maior volume e, portanto, facilitar a visualização de pequenos fragmentos que porventura estivessem presentes, bem como permitir a comparação de diversas clivagens sob condições eletroforéticas idênticas. A corrida eletroforética foi efetuada em tampão TBE a 7 V/cm (100 V) durante 3,5 h. As eletroforeses lentas foram realizadas a 2 V/cm (30 V), durante 12-20 h.

Os géis de agarose utilizados para as hibridizações foram preparados na concentração de 0,7% em tampão TBE. Foram utilizados placas-suporte de 7,5 × 5 cm. A corrida eletroforética foi realizada a 7 V/cm (50 V) durante 1,5 h ou até o corante ABF estar a 2 cm da margem anódica do gel, evitando a perda de algum fragmento passível de se hibridizar com o DNA-sonda (160).

2.16.3 Eletroforese em agarose de baixo ponto de fusão

O isolamento de fragmentos dos plasmídeos pMAK7, pEMS101, pEMS300 e pAB35 foi realizado através de eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão (BPF) (64, 160). Os géis de agarose foram preparados na concentração de 0,7 - 0,8%. A corrida eletroforética foi realizada a 8 V/cm (40 V) por 1,5 a 2 h ou até o corante

ultrapassar em 1 - 2,5 cm a metade do gel. O gel foi preparado em tampão TAE a fim de se obter melhor separação dos fragmentos grandes e rendimento na preparação do DNA (160). Os géis foram preparados em placas de 7,5 x 5 cm com dois poços somente: um poço com capacidade de 25 μ l (para o padrão eletroforético) e o outro com capacidade para 170 μ l de amostra. Após eletroforese, coloração com EtBr, visualização e registro fotográfico, o fragmento de interesse foi cortado e extraído como descrito no item em 2.17.

2.17 PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA

2.17.1 Eluição do gel de agarose BPF

As regiões do gel de agarose correspondentes a cada fragmento foram cortadas e transferidas para tubos Eppendorf estéreis. A seguir, foram adicionados NaCl (0,25 M final), EDTA (1 mM final) e Tris-HCl pH 8,0 (10 mM final). A mistura foi mantida a 65°C por 5 min a fim de fundir a agarose de baixo ponto de fusão.

2.17.2 Eliminação do brometo de etídio

A seguir foi adicionado um volume de fenol neutralizado (500 μ l) e agitado vigorosamente por 1 min sob vórtex. A mistura foi então deixada em repouso durante

10 min e centrifugada por 3 min a 4°C em Spin 1. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo Eppendorf estéril. A fase orgânica foi lavada com 300 µl de $T_{10}E_1$, centrifugada a 4°C por 3 min e a fase aquosa foi juntada com a fase aquosa extraída na etapa anterior. A seguir um volume de fenol (750 µl) foi adicionado à fase aquosa, agitado e o material centrifugado a 12000 rpm (10000 xg) a 4°C durante 3 min. À fase superior, foram adicionados 700 µl da mistura de fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (25 : 24 : 1) e as fases foram homogeneizadas por agitação. Após centrifugação a 12000 rpm (10000 xg) durante 5 min a 4°C, a fase aquosa foi coletada e transferida para novo tubo Eppendorf e a preparação do DNA foi concentrada com butanol-2 (1 volume). As extrações com butanol-2 foram realizadas mediante homogeneização rigorosa, seguida de centrifugação a 12000 rpm (10000 xg) por 3 min a 4°C. Após cada centrifugação o butanol-2 saturado com água foi eliminado (fase superior), até atingir o volume de 100 µl de fase aquosa e eliminar o EtBr. Finalmente, o DNA foi precipitado, adicionando-se 66 µl de NH_4AcO 5 M (0,66 M final no sistema) e 332 µl de etanol 95% v/v aos 100 µl da preparação de DNA. A mistura foi mantida durante 1 hora a -20°C. O DNA foi precipitado por centrifugação a 4°C durante 10 min em centrífuga Spin 1, lavado 2 a 3 vezes com etanol 80% v/v, cuidadosamente seco e finalmente ressuspensão em 15 µl de $T_{10}E_1$ contendo RNase 20 µg.ml⁻¹.

As etapas foram rigorosa e cuidadosamente efetuadas,

evitando o comprometimento das análises eletroforéticas ou dos tratamentos posteriores realizados nos DNAs. Os materiais utilizados foram previamente esterilizados a fim de evitar a digestão do DNA por quaisquer DNases eventualmente presentes.

2.18 CONSTRUÇÃO DO BANCO GENÔMICO

O banco genômico de *Azospirillum brasilense* estirpe FP2 foi construído por E.M. Souza como representado na figura 2, seguindo a metodologia descrita por Staskawicz e colaboradores (223).

O plasmídeo PLAFR3 é um derivado do PLAFR1 no qual foram mantidos o sítio λ *cos*, os genes de resistência à tetraciclina e os de incompatibilidade plasmidial (*incP-1*) e inserido o promotor do gene *lacZ* 5' de uma sequência de múltiplos sítios de restrição entre dois sítios *Hae* II (223). O plasmídeo PLAFR3 foi clivado com as endonucleases de restrição *Hind* III e *EcoR* I. O PLAFR3 linearizado com *Hind* III e *EcoR* I foi tratado com fosfatase alcalina, enzima que catalisa a remoção dos resíduos 5'-fosfato das extremidades do DNA linearizado, com o intuito de prevenir sua recircularização (17, 160). O plasmídeo foi clivado com a enzima de restrição *Bam*H I, formando-se os braços necessários à inserção de fragmentos *Sau*3A I, ligação e empacotamento do DNA.

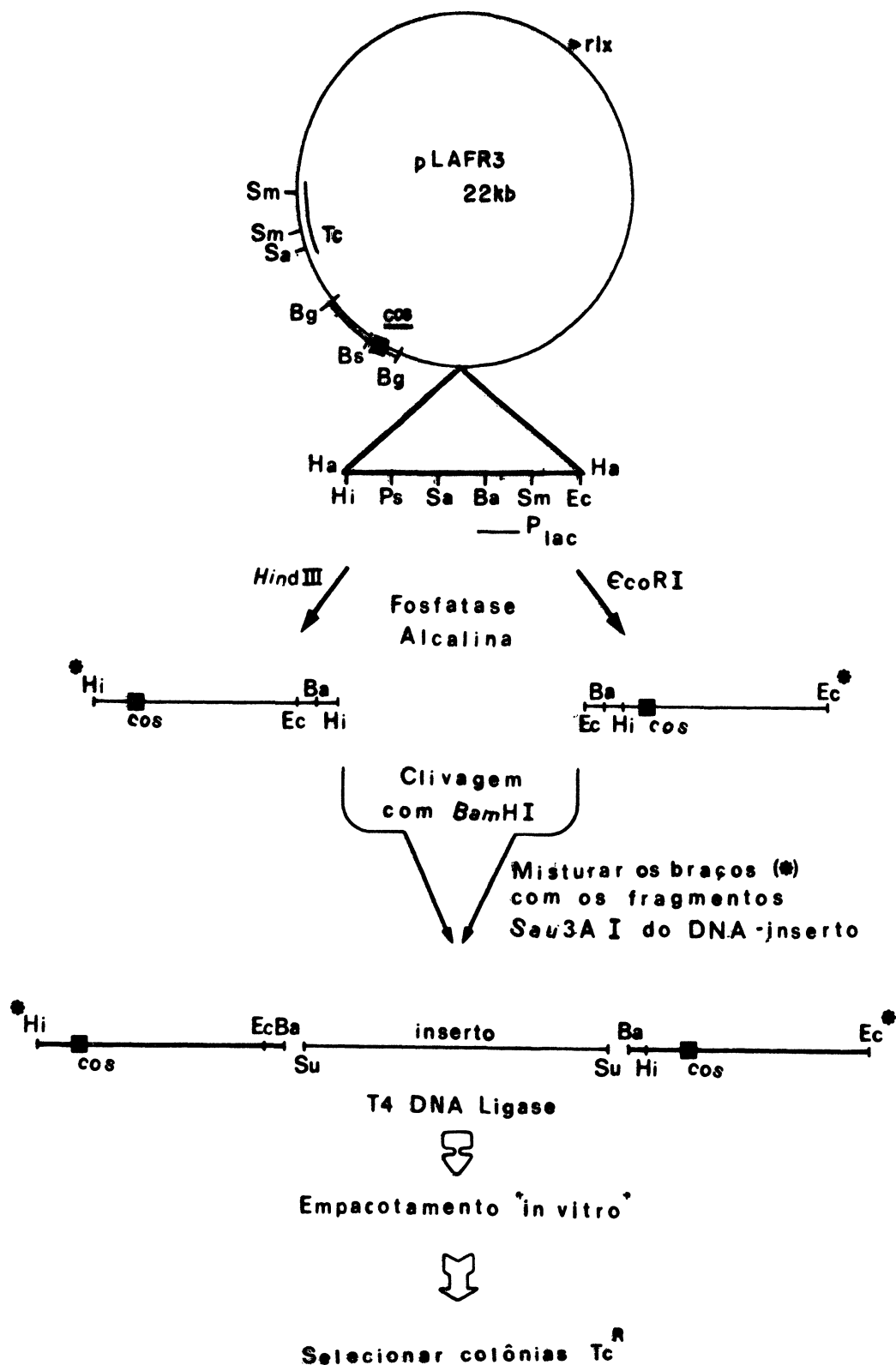


FIGURA 2: DESENHO ESQUEMÁTICO DA CONSTRUÇÃO DO BANCO GENÔMICO (223)

Símbolos das endonucleases de restrição: Ba, *Bam*H I; Bg, *Bgl* II; Bs, *Bst* I; Ec, *Eco*R I; Ha, *Hae* II; Hi, *Hind* III; Ps, *Pst* I; Sa, *Sal* I; Sm, *Sma* I e Su, *Sau* 3A.

O DNA total de *A. brasiliense* FP2 foi parcialmente clivado com a endonuclease de restrição *Sau*3A I e os fragmentos maiores (20 kpb) foram purificados por gel de agarose de baixo ponto de fusão (BPF) e misturados com os braços do plasmídeo pLAFR3. As enzimas *Sau*3A I e *Bam*H I apresentam semelhanças nos seus sítios de reconhecimento, permitindo a associação das bases expostas pelas duas clivagens. Os DNAs foram ligados por ação da enzima T4 DNA ligase. A ligação de dois sítios de reconhecimento não idênticos ocasionou o surgimento de um novo sítio de restrição não reconhecido por *Sau*3A I e *Bam*H I. Os cosmídeos recombinantes foram empacotados no capsídeo do fago λ e a bactéria *Escherichia coli* DH5 foi infectada com a mistura de empacotamento. A biblioteca genômica foi mantida nesta estirpe de *E. coli* devido à sua deficiência nos sistemas de recombinação (*recA*⁻) e restrição/metilação do DNA (*r*⁻*m*⁻), evitando que o plasmídeo se integrasse ao DNA cromossomal da bactéria (*recA*) ou a eliminação do plasmídeo (sistema *r/m*), o que impossibilitaria a seleção dos clones.

Os clones foram selecionados mediante o crescimento do banco genômico em meio LA contendo os antibióticos NaI¹⁰, resistência da estirpe DH5, e Tc¹⁵, resistência conferida pelo plasmídeo pLAFR3. As colônias foram divididas em grupos e conservadas em glicerol 50% a -20°C. Este conjunto constitui o banco genômico de *A. brasiliense* FP2 no plasmídeo pLAFR3.

A representatividade do banco genômico foi calculada pela relação (160):

$$N = \frac{\ln (1 - P)}{\ln (1 - f)}$$

calculando para P,

$$P = 1 - e^{N \cdot \ln (1 - f)}$$

onde N é o número necessário de recombinantes, P é a probabilidade, f é a relação entre a fração do genoma representado em um único recombinante e o tamanho total do genoma do microrganismo.

2.19 MAPA DE RESTRIÇÃO

2.19.1 Padrão de restrição dos plasmídeos pMAK1 - pMAK8

Os plasmídeos pMAK1 - pMAK8 dos transformantes foram tratados com as enzimas de restrição *Sal* I, *Eco*R I, *Hind* III e *Bgl* II / *Hind* III a fim de se determinar o tamanho dos fragmentos de restrição e comparar os perfis de clivagem existentes nos insertos dos diversos plasmídeos. As amostras foram submetidas a corrida eletroforética como descrito em 2.16.2.

2.19.2 Mapa de restrição do plasmídeo pMAK7

O plasmídeo pMAK7 foi tratado com as enzimas de restrição *EcoR* I, *Hind* III, *BamH* I, *Bgl* II, *Xho* I ou *Sac* I e combinações binárias das mesmas.

A montagem do mapa físico foi realizada a fim de se obter a localização aproximada dos sítios de clivagem no plasmídeo pMAK7. Os tamanhos dos fragmentos obtidos nas diversas clivagens foram comparados simultaneamente. O tamanho dos fragmentos foi estimado graficamente por interpolação na reta (160), obtida plotando-se os valores logarítmicos do tamanho dos fragmentos de DNA padrão ("1 kpb ladder") contra a migração eletroforética correspondente. O padrão "1 kpb ladder" é uma mistura de fragmentos de DNA que diferem entre si em 1018 pares de bases e vem sendo utilizado para avaliar o tamanho de fragmentos de DNA linear em α -hélice, os quais variem de 0,5 a 12 kpb, apresentando os seguintes fragmentos, em ordem decrescente: 12,215; 11,193; 10,180; 9,162; 8,144; 7,126; 6,103; 5,090; 4,072; 3,054; 2,035; 1,835; 1,013; 0,516; 0,394; 0,344; 0,298; 0,22 e 0,2 kpb. Utilizou-se, também, o DNA λ clivado com *Hind* III, a fim de facilitar a determinação do tamanho dos fragmentos maiores. Os fragmentos deste DNA apresentam: 23,4; 9,6; 6,6; 4,4; 2,3; 2,1; 0,4 e 0,2 kpb.

2.20 HIBRIDIZAÇÃO

As hibridizações foram realizadas como descrito por Maniatis e colaboradores (160) e Boehringer Mannheim Company (23). As condições dos ensaios de clivagem obedeceram as recomendações dos fabricantes. Os padrões eletroforéticos de tamanho utilizados foram: "1 kpb ladder" e DNA λ clivado com *Hind* III.

Os DNAs clivados foram submetidos a corrida eletroforética. Os géis foram lavados do EtBr e tratados com 30 ml de HCl 0,25 N a 25°C, até a cor azulada do corante eletroforético ABF ser substituída por uma cor amarelada (5-8 min), a fim de permitir a hidrólise do DNA. Os géis foram lavados exaustivamente com água destilada e posteriormente submersos em solução desnaturante (NaCl 1,5 M em NaOH 0,5 N) e aí mantidos sob agitação durante 30 min até as manchas ficarem novamente azuis. Após submersão em solução neutralizante (Tris-HCl 0,5 M pH 7,2 contendo EDTA 0,001 M e NaCl 1,5 M durante 20 min a 25°C, os fragmentos foram transferidos do gel de agarose para a membrana de nylon Hybond-C por capilaridade em presença de tampão SSC 20x (NaCl 3 M, Na₂-citrato 0,3 M, pH 7,0) durante 20 a 30 horas (23, 160). As hibridizações, propriamente ditas, foram efetuadas em estufa, à temperatura controlada de 60 - 62°C ou 66°C, por 18 horas.

As sondas utilizadas foram: o domínio central do gene *nifA* de *H. seropedicae* presente no fragmento *Sal* I/*Bgl* II de 0,60 kpb extraído do plasmídeo pEMS300 (221); a extremidade

carboxi-terminal e o domínio D do gene *nifA* de *H. seropedicae* presente no fragmento *Sal* I/*Pst* I de 1,15 kpb extraído do plasmídeo pEMS300 (221); o gene *nifB* de *H. seropedicae* presente no fragmento *Pst* I de 1,80 kpb do plasmídeo pEMS101 (221) e o operon *nifHDK* (operon inteiro) de *A. brasilense* presente no fragmento *EcoR* I de 6,70 kpb do plasmídeo pAB35 (131).

Os DNAs-sonda *nifA* e *nifB* foram marcados com digoxigenina 11-dUTP, como recomendado pelo fornecedor (23). Os DNAs foram desnaturados por incubação em banho fervente durante 10 min e rapidamente resfriados em banho de gelo. O volume foi completado com água até 15 μ l e aos tubos, mantidos em gelo, foram sequencialmente adicionados: 2 μ l de hexadesoxinucleotídeos e 2 μ l de mistura de marcação dNTP 10x (dATP 1 mM, dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, dTTP 0,65 mM e digoxigenina 11-dUTP 0,35 mM pH 8,5) e a 37°C: 1 μ l do fragmento Klenow da DNA polimerase (2 U. μ l⁻¹). A mistura foi incubada a 37°C durante 20 horas. A reação foi parada pela adição de 2 μ l de EDTA 0,2 M pH 8,0 e o DNA foi precipitado pela adição de 2 μ l de LiCl 4 M e 60 μ l de etanol 95% v/v pré-resfriado a -20°C. Após centrifugação a 12000 rpm (10000 xg) e lavagens com etanol 80%, os DNAs-sonda foram secos em estufa a 37°C e dissolvidos em 20 μ l de T₁₀E₁.

O DNA-sonda *nifHDK* de *A. brasilense* foi marcado com ³²P, utilizando ³²P α -dATP como descrito por Maniatis e colaboradores (160). O DNA foi desnaturado por incubação em banho fervente durante 8 min e rapidamente resfriado em banho de gelo. A reação de marcação foi efetuada pela

adição, em ordem, dos seguintes elementos: 6 μ l de H_2O , 5 μ l de tampão OLB (tampões A : B : C misturados na proporção 10 : 25 : 15) pré-resfriado a $-20^\circ C$, 1 μ l de solução de soroalbumina bovina (estoque a 10 mg.ml^{-1}), 10 μ l de DNA, 2,5 μ l de ^{32}P α -dATP ($10 \mu\text{Ci}.\mu\text{l}^{-1}$) e 0,5 μ l do fragmento Klenow da DNA polimerase (2 unidades). A mistura de marcação foi homogeneizada por centrifugação a 12000 rpm (10000 xg) por 2 s e incubada a $37^\circ C$ por 16 horas.

O DNA, contido no gel de agarose, foi visualizado com EtBr e fotografado, sob transiluminador de luz ultra-violeta de longo comprimento de onda ($DO_{900 \text{ nm}}$) como descrito em 2.16, antes da transferência dos fragmentos de DNA para a membrana de nylon. A membrana de nylon com os DNAs hibridizados foi fotografada em ISO/ASA 400 em abertura mínima sob transiluminador de luz visível e exposição de 1/64 e 1/128 ou em KODAK ISO/ASA 100 em abertura mínima e exposição 1/250 e 1/500.

2.20.1 Hibridizações pelo método de marcação por digoxigenina 11-dUTP

O DNA pode ser marcado pela incorporação ao acaso de digoxigenina marcada com desoxiuridina trifosfato. O desoxinucleotídeo dUTP se liga à digoxigenina. As moléculas híbridas de DNA são detectadas pelo método de imunoensaio com um anticorpo conjugado (antidigoxigenina conjugada à fosfatase alcalina), o qual se incorpora ao complexo digoxigenina 11-dUTP. Subseqüentemente, a reação de cor é

catalisada pela adição de X-fosfato (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) e NBT (azul de nitrotetrazolium), originando manchas púrpura-azuladas nas regiões de hibridização.

As membranas de nylon foram cuidadosamente lavadas com tampão SSC 2x com a finalidade de remover a agarose eventualmente aderida à mesma. Após este tratamento, a membrana foi seca à temperatura ambiente e exposta ao transiluminador de ultra-violeta ($DO_{250\text{ nm}}$) durante 5 min, a fim de promover o "cross-linking" do DNA e permitir a monitoração da transferência dos fragmentos de DNA para a membrana. A membrana foi submersa em 70 ml de tampão de hibridização (reagente bloqueador 0,5% e SDS 0,02% m/v em tampão SSC 5x) e aí mantida por 8 horas a 60°C para bloquear os sítios livres da membrana de nylon. Finalmente, a membrana foi inserida em um invólucro plástico contendo 30 ml de tampão de hibridização, ao qual foram adicionados 400 μ l do DNA-sonda marcado com digoxigenina 11-dUTP recém-fervido por 8 - 10 min e rapidamente resfriado em banho de gelo. A incubação foi de 12-18 horas à temperatura indicada.

Retirada do invólucro, a membrana foi lavada duas vezes por submersão em 50 ml de tampão SSC 2x contendo SDS 0,1% durante 15 min à temperatura ambiente. Após essas lavagens, a membrana foi submetida a dois tratamentos com tampão SSC 2x ou SSC 5x contendo SDS 0,1% a 60-62°C durante 15 min. O SDS foi utilizado por auxiliar na diminuição do "background" e facilitar a lavagem.

As hibridizações com os DNAs-sonda de *nifA* e *nifB* foram realizadas sob condições de média estringência: a 60 ou 62°C com lavagens em tampões SSC 5x (NaCl 0,75 M, Na₂-citrato 75 mM pH 7,0).

A membrana, após submersão por 1 min em tampão 1 (Tris-HCl 100 mM pH 7,5 contendo NaCl 150 mM) a 25°C, foi incubada em 100 ml do tampão 2 (Tris-HCl 100 mM pH 7,5 contendo NaCl 150 mM e reagente bloqueador 0,5% m/v) a 25°C durante 30 min. Este tratamento foi realizado com o intuito de eliminar o excesso de DNA-sonda e evitar a incorporação do anticorpo a sítios inespecíficos. Após breve lavagem com o tampão 1, a membrana foi recolocada em um invólucro plástico contendo 3 ml de tampão 1, ao qual foi adicionado o anticorpo-conjugado (antidigoxigenina conjugada à fosfatase alcalina) diluído 1 : 5000 (150 mU.ml⁻¹) e incubado à temperatura ambiente durante 30 a 40 min. A solução contendo o complexo anticorpo-conjugado foi retirada e a membrana foi lavada com 2,5 ml do tampão 1 por 15 min, a fim de remover completamente aquela solução. A membrana foi equilibrada com 5 ml do tampão 3 (Tris-HCl 100 mM pH 9,5 contendo NaCl 100 mM e MgCl₂ 50 mM) à temperatura ambiente por 2 min.

A reação de coloração foi efetuada mediante a adição de 15 µl NBT (azul de nitrotetrazolium) e de 12 µl de solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (X-fosfato) a 3,5 ml do tampão 3, mantida em repouso no escuro à temperatura ambiente. A reação foi interrompida após 12-18 horas, quando as manchas estavam suficientemente nítidas, lavando-se com o tampão 4 (T₁₀E₁).

2.20.2 Hibridização pelo método de marcação com ^{32}P

A hibridização com o DNA-sonda de *nifHDK* de *A. brasilense*, por sua vez, foi realizada em condições de alta estringência: a 66°C e a baixas concentrações salinas (SSC 0,1x).

A transferência de DNA para a membrana de nylon foi efetuada durante 30 horas como descrito acima. Após lavagem rápida com tampão SSC 5x, a membrana foi seca à temperatura ambiente e o DNA foi fixado por exposição sob transiluminador de UV de longo comprimento de onda ($\text{DO}_{300\text{ nm}}$) durante 5 min. A membrana foi introduzida em um invólucro plástico contendo 3 ml de solução de pré-hibridização (solução de Denhardt 5x, formamida 50%, SDS 0,5% e 100 μg de DNA de timo de boi em tampão SSC 6x), à qual foram adicionados 120 μl de DNA-sonda e incubada a 37°C durante 24 horas. O DNA-sonda preparado foi adicionado de 100 μl de água e desnaturado através de incubação em banho fervente durante 10 min e utilizado imediatamente para a hibridização. A membrana foi retirada do plástico e lavada duas vezes por 15 min a 25°C com tampão SSC 0,1x pH 7,0 contendo SDS 0,1%. A terceira lavagem com o mesmo tampão foi realizada a 66°C. A membrana foi seca à temperatura ambiente e colocada em contacto com um filme para raios-X KODAK X-OMAT K a fim de ser impregnada e assim mantida por 24 horas a -20°C. O filme foi revelado como convencionalmente e fotografado como anteriormente descrito.

3 RESULTADOS

3.1 BANCO GENÔMICO DE *A. brasilense* FP2

Cerca de 3732 colônias independentes de *E. coli* DH5, carregando plasmídeos recombinantes, foram isoladas e agrupadas em 12 grupos de aproximadamente 300 colônias cada. Considerando-se que o tamanho médio dos insertos foi de 22 kpb e que o tamanho do genoma de *A. brasilense* perfaz possivelmente 7714 kpb (242), a aplicação da fórmula de Clarke e Carbon (47) indicou a representatividade do banco genômico como da ordem de 99,99% do genoma de *A. brasilense*.

3.2 ISOLAMENTO DE PLASMÍDEOS RECOMBINANTES CAPAZES DE COMPLEMENTAR O MUTANTE *nifA*⁻ DE *A. brasilense*

O mutante regulatório de *A. brasilense* FP10 (*nifA*⁻) (192) foi utilizado para isolar, por complementação genética, plasmídeos recombinantes carregando o gene *nifA* de *A. brasilense* FP2. Para tanto, o mutante FP10 foi conjugado com um banco de *A. brasilense* FP2 construído no plasmídeo PLAFR3 e mantido em *E. coli* DH5 e designado por *E. coli* DH5 (pLAFR3 :: DNA de *A. brasilense* FP2) (223).

A frequência de aparecimento de transconjugantes *A. brasilense* FP10 (pLAFR3 :: DNA de *A. brasilense* FP2) foi da ordem de 10^{-5} , indicando a alta eficiência do método utilizado.

Aproximadamente mil e quinhentas colônias desses transconjugantes de *A. brasilense* FP10 foram escolhidas ao acaso e testadas para fixação de nitrogênio. Foram isolados inicialmente oito transconjugantes capazes de fixar N_2 , dos quais, após purificação em meio semi-sólido livre de nitrogênio, apenas um, *A. brasilense* FP10 (pMAKB), deixou de apresentar essa característica. Os transconjugantes diazotróficos de *A. brasilense* FP10 e a estirpe selvagem *A. brasilense* FP2 (Nif^+) formaram uma fina película, inicialmente no fundo do meio semi-sólido, a qual foi notoriamente subindo até a superfície do meio. Esse aerotropismo é típico de *Azospirillum* e é verificado à medida que se observa o crescimento das bactérias (53, 83). A película se tornou espessa a 1 mm da superfície do meio. Os plasmídeos recombinantes presentes nos sete transconjugantes fixadores de nitrogênio foram então denominados pMAK1-pMAK7. O plasmídeo contido no transconjugante Nif^- , por sua vez, foi designado como pMAKB. As atividades nitrogenásicas dos transconjugantes selecionados, *A. brasilense* (pMAK1-pMAKB), e de *A. brasilense* FP2 e FP10 estão quantificadas e os resultados estão expressos na Tabela 4.

A frequência de aparecimento de transconjugantes complementados na mutação foi da ordem de 10^{-9} - 10^{-10} ,

TABELA 4: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE DOS
TRANSCONJUGANTES DE *Azospirillum brasilense* FP10
COMPLEMENTADOS POR PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

ESTIRPES DE <i>A. brasilense</i>	Atividade específica da nitrogenase (nmol C ₂ H ₄ .min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹)
FP2 (selvagem)	4,06
FP10 (nifA ⁻)	ZERO
FP10 (pMAK1)	2,53
FP10 (pMAK2)	5,30
FP10 (pMAK3)	5,36
FP10 (pMAK4)	6,04
FP10 (pMAK5)	5,42
FP10 (pMAK6)	2,54
FP10 (pMAK7)	3,16
FP10 (pMAK8)	ZERO

Os organismos foram crescidos em meio NFbHP semi-sólido a 30°C e ensaiados para redução de acetileno após 48-72 horas de crescimento, conforme descrito no item 2.7 de Materiais e Métodos.

Indicando a representatividade do gene *nifA* no banco genômico.

A presença de plasmídeos recombinantes derivados do plasmídeo PLAFR3, contendo inserto de DNA de *A. brasilense* FP2, foi confirmada por eletroforese em gel de agarose (Figura 3). O tamanho dos plasmídeos foi estimado pelo método de interpolação na reta conforme descrito em 2.16.1 e 2.19 apresentando, aproximadamente: pMAK1 e pMAK3 com 43,40 kpb, pMAK2 e pMAK7 com 50,12 kpb, pMAK4 e pMAK5 com 42,67 kpb, pMAK6 com 47,31 kpb e pMAK8 com 35,30 kpb.

3.3 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS TRANSCONJUGANTES DE *A. brasilense* FP10 (pMAK1-pMAK8)

3.3.1 Cura dos transconjugantes de *A. brasilense* FP10 dos plasmídeos recombinantes (pMAK1-pMAK8)

Os plasmídeos pR68.45 e PLAFR3 pertencem ao mesmo grupo de incompatibilidade plasmidial (IncP-1) e, portanto, não podem coexistir na mesma célula, provavelmente por competirem pelo mesmo sítio de ligação da membrana durante sua replicação (104). Em vista disso, os transconjugantes foram curados dos plasmídeos PLAFR3 :: DNA de *A. brasilense* FP2, através de conjugação com *E. coli* 1230 (pR68.45) e seleção para Tc (marca de resistência do pR68.45).

Todos os transconjugantes perderam a capacidade de crescer diazotroficamente com a eliminação dos plasmídeos

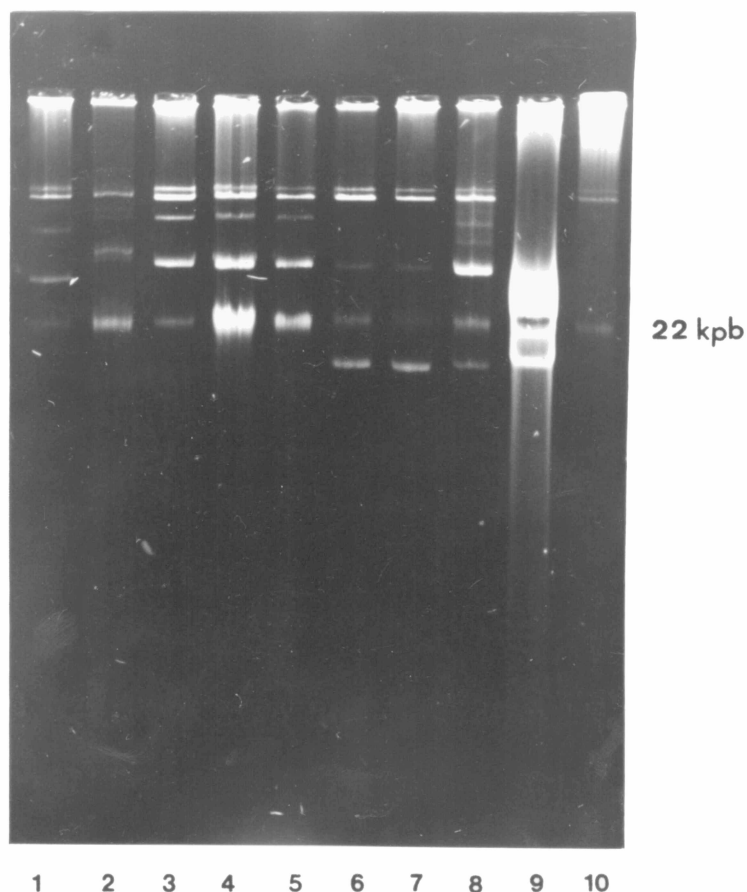


FIGURA 3: PERFIL ELETROFORÉTICO DE PLASMÍDEOS DE TRANSCONJUGANTES DE *A. brasilense* (FP10)

As células de *A. brasilense* FP10 e de seus transconjugantes foram crescidas em meio NFBHPN Sm^{100} e $\text{Sm}^{100} \text{ Tc}^{15}$, respectivamente, e as de *E. coli* MC1061 (pLAFR3) foram crescidas em meio LB Tc^{15} . O perfil eletroforético dos plasmídeos foi determinado em gel de agarose 0,6% após isolamento pelo método de lise alcalina, como descrito em Materiais e Métodos (item 2.15). Distribuição das estirpes: 1, *A. brasilense* FP10 (pMAK8); 2, *A. brasilense* FP10 (pMAK7); 3, *A. brasilense* FP10 (pMAK6); 4, *A. brasilense* FP10 (pMAK5); 5, *A. brasilense* FP10 (pMAK4); 6, *A. brasilense* FP10 (pMAK3); 7, *A. brasilense* FP10 (pMAK2); 8, *A. brasilense* FP10 (pMAK1); 9, *E. coli* MC1061 (pLAFR3); 10, *A. brasilense* FP10.

pMAK1-pMAK7, indicando a presença de genes tipo-*nifA* nestes plasmídeos. A recuperação do fenótipo Nif^- , apresentada pelos transconjugantes curados (pR68.45) (Tabela 5, colunas a e b), mostrou que a capacidade de fixação de nitrogênio apresentada pelos transconjugantes *A. brasilense* FP10 (pMAK1-pMAK7) não foi devido à uma simples reversão da mutação no gene *nifA*, mas sim à complementação genética. A análise eletroforética permitiu visualizar a ausência dos plasmídeos pMAKs nos transconjugantes curados (Figuras 4, 5 e 6).

3.3.2 Recuperação da atividade nitrogenásica em transconjugantes de *A. brasilense* FP10

Os DNAs plasmidiais (pMAK1-pMAK8) dos transconjugantes de *A. brasilense* FP10 foram isolados pelo método de lise alcalina (205) e utilizados para transformar *E. coli* MC1061. Os objetivos desse experimento foram: 1) manter os plasmídeos pMAKs em uma estirpe *recA^-* e de baixa homologia, evitando a recombinação do DNA contido no inserto com o DNA homólogo de *A. brasilense* FP2 e 2) transferir esses plasmídeos, por conjugação, novamente para o mutante FP10.

A frequência de transformação foi de $3 \cdot 10^{-7}$.

Os transformantes de *E. coli* MC1061 (pMAK1-pMAK8) foram conjugados com o mutante *A. brasilense* FP10. A presença destes plasmídeos nos novos transconjugantes foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose. A figura 7 ilustra o perfil eletroforético dos

TABELA 5: EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DE NITROGENASE EM
TRANSCONJUGANTES DE *Azospirillum brasilense*

ESTIRPES DE <i>A. brasilense</i>	Atividade específica da nitrogenase (nmol C ₂ H ₄ .min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹)		
	- <i>a</i>	pR68.45 <i>b</i>	- <i>c</i>
FP2	7,54	nd	nd
FP10	ZERO	nd	nd
FP10 (pMAK1)	8,70	ZERO	9,52
FP10 (pMAK2)	4,82	ZERO	5,30
FP10 (pMAK3)	4,40	ZERO	7,47
FP10 (pMAK4)	8,23	ZERO	7,62
FP10 (pMAK5)	7,67	ZERO	5,29
FP10 (pMAK6)	6,34	ZERO	9,27
FP10 (pMAK7)	8,20	ZERO	6,63
FP10 (pMAK8)	ZERO	ZERO	ZERO

Os organismos foram crescidos em meio NFbHP semi-sólido e incubados a 30°C. A atividade da nitrogenase foi determinada como descrito em Materiais e Métodos (item 2.12).

a representa os valores encontrados para os transconjugantes obtidos da conjugação com o banco genômico.

b indica atividade nitrogenásica dos transconjugantes curados com o plasmídeo pR68.45.

c indica os níveis de atividade nitrogenásica determinados para os transconjugantes obtidos da conjugação dos transformantes *E. coli* MC1061 (pMAK1 - pMAK8) com *A. brasilense* FP10.

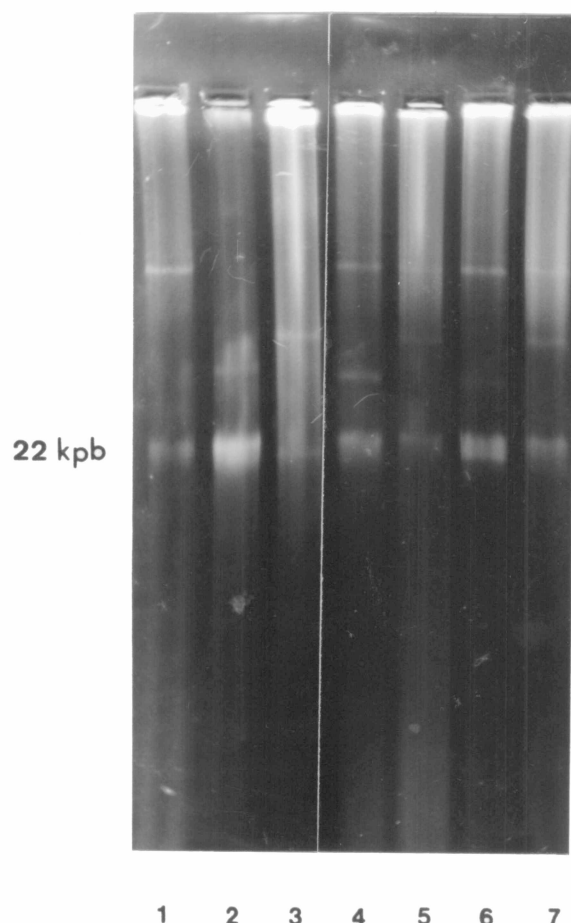


FIGURA 4: PERFIL ELETROFORÉTICO DE PLASMÍDEOS DOS TRANSCONJUGANTES DE *A. brasilense* FP10 (pMAK1) E (pMAK2)

As células de *A. brasilense* FP10 e seus transconjugantes foram crescidas em meio NFBHPN contendo Sm^{100} e $\text{Sm}^{100} \text{ Tc}^{15}$, respectivamente e as de *E. coli* MC1061 (pLAFR3) e 1230 (pR68.45) em meio LB Tc^{15} . O perfil eletroforético dos plasmídeos foi determinado em gel de agarose 0,6% após o isolamento pelo método de lise alcalina (205), como descrito em Materiais e Métodos (item 2.15). Distribuição das estirpes: 1, *A. brasilense* FP10; 2, *E. coli* MC1061 (pLAFR3); 3, *E. coli* 1230 (pR68.45); 4, *A. brasilense* FP10 (pMAK1); 5, *A. brasilense* FP10 (pR68.45)^a; 6, *A. brasilense* FP10 (pMAK2); 7, *A. brasilense* FP10 (pR68.45)^b. ^a e ^b correspondem, respectivamente, à cura dos transconjugantes *A. brasilense* FP10(pMAK1) e (pMAK2) pelo plasmídeo pR68.45.

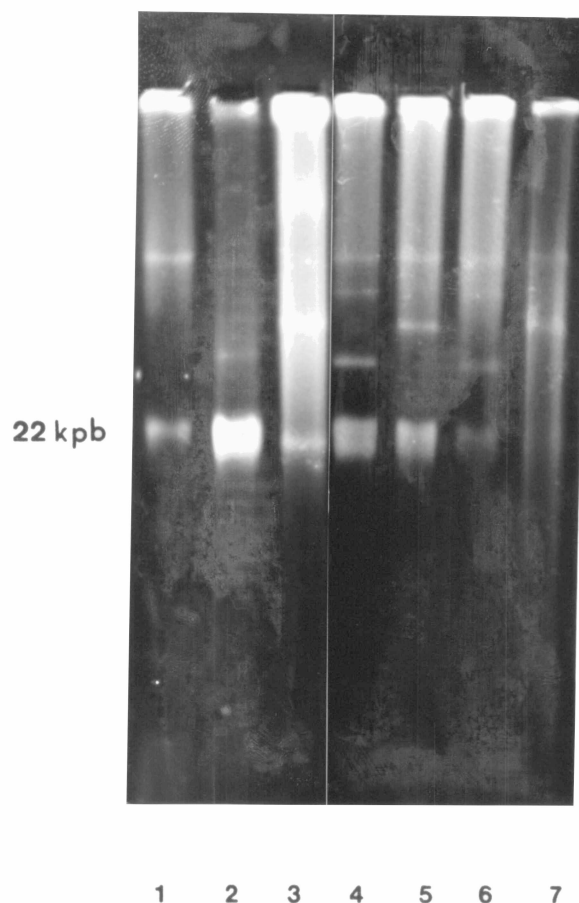


FIGURA 5: PERFIL ELETROFORÉTICO DE PLASMÍDEOS DOS TRANSCONJUGANTES DE *A. brasilense* FP10 (pMAK4) E (pMAK5)

As células de *A. brasilense* FP10 e seus transconjugantes foram crescidas em meio NFbHPN contendo Sm^{100} e $\text{Sm}^{100} \text{ Tc}^{15}$, respectivamente e as de *E. coli* MC1061 (pLAFR3) e 1230 (pR68.45) em meio LB Tc^{15} . O perfil eletroforético dos plasmídeos foi determinado em gel de agarose 0,6% após isolamento pelo método de lise alcalina (205), como descrito em Materiais e Métodos (item 2.15). Distribuição das estirpes: 1, *A. brasilense* FP10; 2, *E. coli* MC1061 (pLAFR3); 3, *E. coli* 1230 (pR68.45); 4, *A. brasilense* FP10 (pMAK4); 5, *A. brasilense* FP10 (pR68.45)^a; 6, *A. brasilense* FP10 (pMAK5); 7, *A. brasilense* FP10 (pR68.45)^b. ^a e ^b correspondem à cura dos transconjugantes *A. brasilense* FP10 (pMAK4) e (pMAK5), respectivamente, pelo plasmídeo pR68.45.

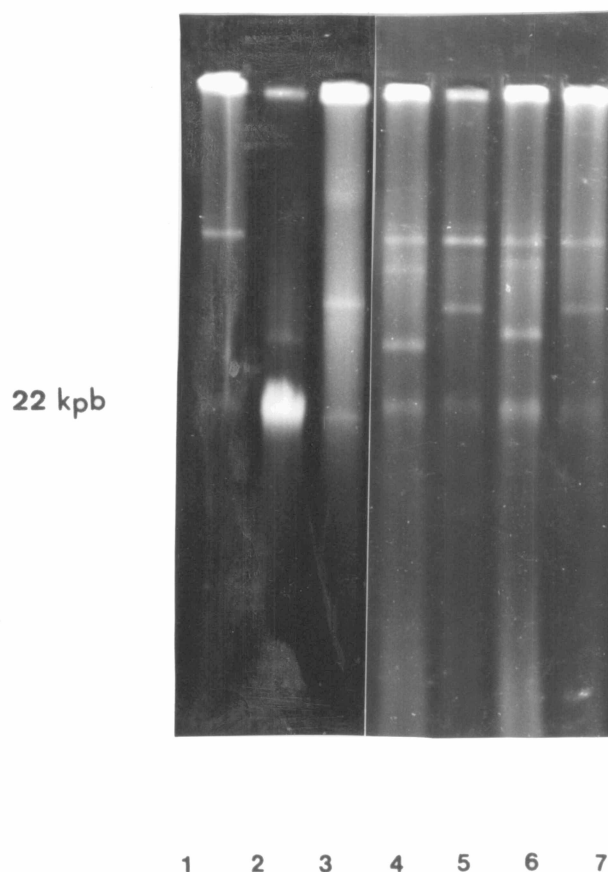


FIGURA 6: PERFIL ELETROFORÉTICO DE PLASMÍDEOS DOS TRANSCONJUGANTES DE *A. brasilense* FP10 (pMAK6) E (pMAK7)

As células de *A. brasilense* FP10 e seus transconjugantes foram crescidas em meio NFbHPN contendo Sm^{100} e $\text{Sm}^{100} \text{ Tc}^{15}$, respectivamente e as de *E. coli* MC1061 (pLAFR3) e 1230 (pR68.45) em meio LB Tc^{15} . O perfil eletroforético dos plasmídeos foi determinado em gel de agarose 0,8% após isolamento pelo método de lise alcalina (205), como descrito em Materiais e Métodos (item 2.15). Distribuição das estirpes: 1, *A. brasilense* FP10; 2, *E. coli* MC1061 (pLAFR3); 3, *E. coli* 1230 (pR68.45); 4, *A. brasilense* FP10 (pMAK6); 5, *A. brasilense* FP10 (pR68.45)^a; 6, *A. brasilense* FP10 (pMAK7); 7, *A. brasilense* FP10 (pR68.45)^b. ^a e ^b correspondem à cura dos transconjugantes *A. brasilense* FP10 (pMAK6) e (pMAK7), respectivamente, pelo plasmídeo pR68.45.

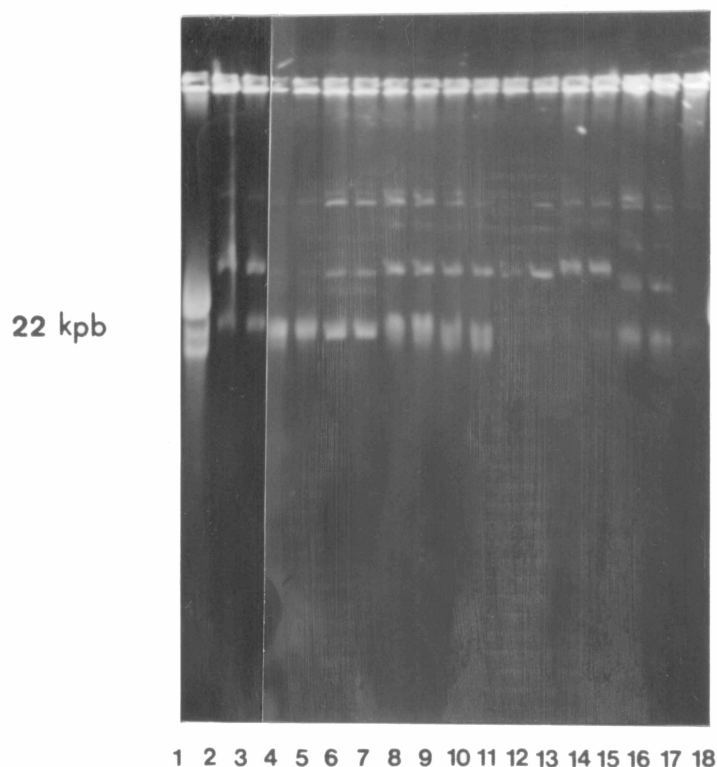


FIGURA 7: PERFIL ELETROFORÉTICO DE PLASMÍDEOS DOS TRANSCONJUGANTES DE *A. brasilense* FP10 (pMAK4) E (pMAK7)

As células de *A. brasilense* FP10 e seus transconjugantes foram crescidas em meio NFBHPN contendo Sm^{100} e $\text{Sm}^{100} \text{ Tc}^{15}$, respectivamente, e as de *E. coli* MC1061 (pLAFR3) em meio LB Tc^{15} . O perfil eletroforético dos plasmídeos foi determinado em gel de agarose 0,6% após isolamento pelo método de lise alcalina, como descrito em Materiais e Métodos (item 2.15). Distribuição das estirpes: 1, *A. brasilense* FP10 (pMAK1); 2, *A. brasilense* FP10 (pMAK1)^a; 3, *A. brasilense* FP10 (pMAK2); 4, *A. brasilense* FP10 (pMAK2)^a; 5, *A. brasilense* FP10 (pMAK3); 6, *A. brasilense* FP10 (pMAK3)^a; 7, *A. brasilense* FP10 (pMAK4); 8, *A. brasilense* FP10 (pMAK4)^a; 9, *A. brasilense* FP10 (pMAK5); 10, *A. brasilense* FP10 (pMAK5)^a; 11, *A. brasilense* FP10 (pMAK6); 12, *A. brasilense* FP10 (pMAK6)^a; 13, *A. brasilense* FP10 (pMAK7); 14, *A. brasilense* FP10 (pMAK7)^a; 15, *A. brasilense* FP10 (pMAK8); 16, *A. brasilense* FP10 (pMAK8)^a; 17, *E. coli* MC1061 (pLAFR3); 18, *A. brasilense* FP10.

a. corresponde à recuperação da capacidade de fixação de nitrogênio pelos transconjugantes de *A. brasilense* FP10 (pMAK1) a (pMAK8), respectivamente, obtidos da conjugação dos transformantes de *E. coli* MC1061 (pMAK1) e (pMAK8) com *A. brasilense* FP10.

transconjugantes *A. brasilense* FP10 (pMAK1 a pMAK8). Esses novos transconjugantes recuperaram a capacidade de crescer diazotroficamente e reduzir acetileno (tabela 5, coluna c).

3.3.3 Determinação do padrão de clivagem dos plasmídeos recombinantes (pMAK1-pMAK8)

Os plasmídeos pMAK1 a pMAK8 foram isolados e tratados com as endonucleases de restrição *Sal* I, *Eco*R I, *Hind* III e *Bgl* II / *Hind* III. Os produtos de clivagem foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

A figura 8 mostra os perfis de clivagem dos plasmídeos pMAK1 e pMAK4-pMAK7 com a enzima *Eco*R I e a figura 9 os perfis de clivagem dos plasmídeos pMAK1, pMAK2 e pMAK5-pMAK8 com a enzima *Sal* I. Nessas figuras foram mostrados somente os perfis de clivagem dos plasmídeos diferentes entre si ou dos que necessitavam de confirmação dos resultados para permitir a diferenciação mais precisa dos oito plasmídeos. Os plasmídeos pMAK1 e pMAK3, pMAK2 e pMAK7, pMAK4 e pMAK5 apresentaram, aos pares, as mesmas bandas eletroforéticas, indicando similaridade entre os respectivos insertos (Figuras 8 e 9, Tabelas 6 e 7). O pMAK6 apresentou padrão único de clivagem. Desta forma, dos sete transconjugantes Nif^+ isolados haviam quatro grupos diferentes de plasmídeos capazes de complementar a mutação $nifA^-$.

Os perfis de clivagem dos plasmídeos foram comparados entre si e com o plasmídeo pLAFR3, a fim de se estimar que

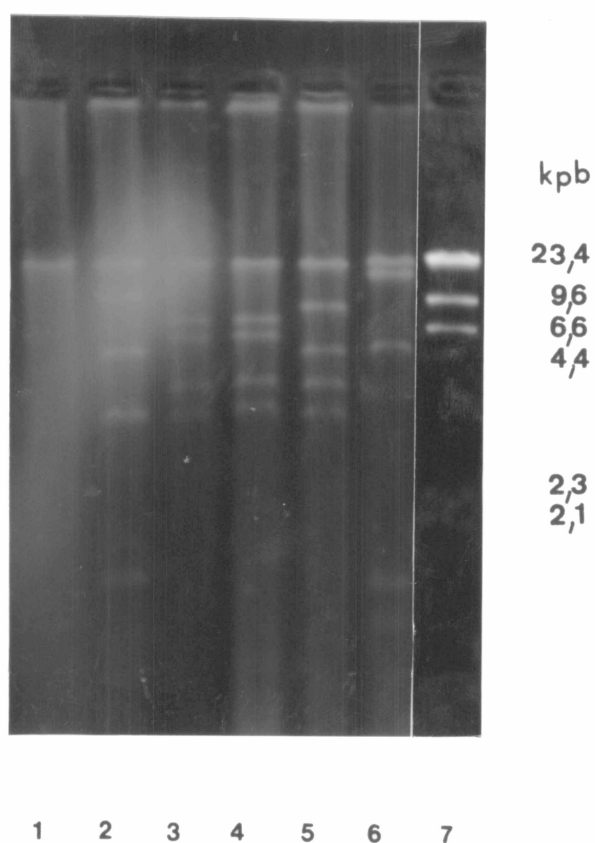


FIGURA 8: PERFIL DA CLIVAGEM DOS PLASMÍDEOS pMAKs COM A ENZIMA *EcoR* I

Os plasmídeos foram isolados de *E. coli* MC1061 (pMAK1 e pMAK4 - pMAK7) pelo método de lise alcalina (19) e submetidos a clivagem com a enzima *EcoR* I conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.6). Distribuição dos DNAs: 1, pLAFR3; 2, pMAK1; 3, pMAK4; 4, pMAK5; 5, pMAK6; 6, pMAK7; 7, λ / *Hind* III.

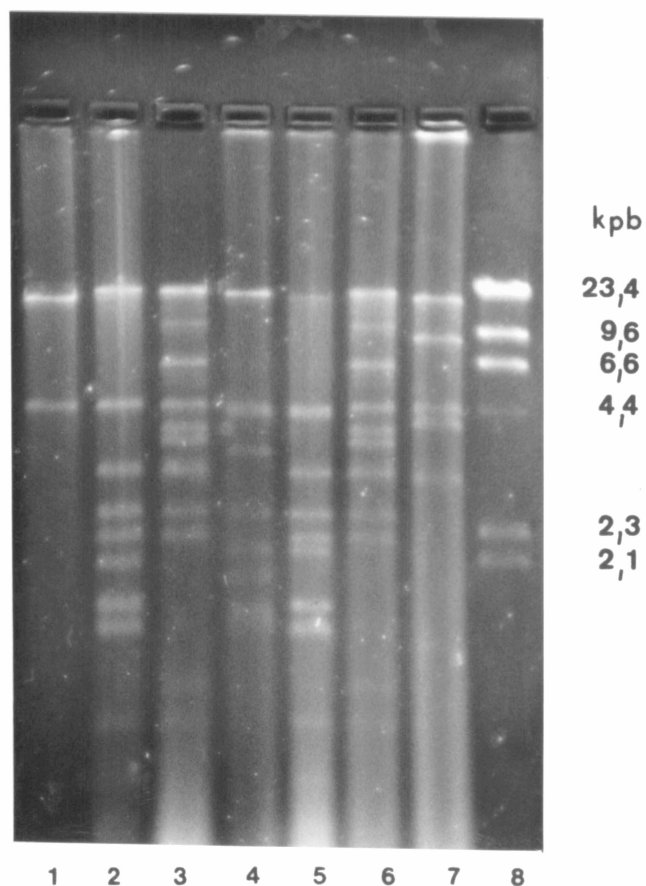


FIGURA 9: PERFIL DA CLIVAGEM DOS PLASMÍDEOS pMAKs COM A ENZIMA *Sal* I

Os plasmídeos foram isolados de *E. coli* MC1061 (pMAK1, pMAK2, pMAK5 - pMAK8) pelo método de lise alcalina (19) e submetidos a clivagem com a enzima *Sal* I conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.6). Distribuição dos DNAs: 1, pLAFR3; 2, pMAK1; 3, pMAK2; 4, pMAK5; 5, pMAK6; 6, pMAK7; 7, pMAK8; 8, λ / *Hind* III.

TABELA 6: CLIVAGEM E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS *Sal* I E *Eco*R I DOS PLASMÍDEOS pMAK1 A pMAK8

SISTEMA DE CLIVAGEM COM <i>Eco</i> R I								
pLAFR3	pMAK1	pMAK2	pMAK3	pMAK4	pMAK5	pMAK6	pMAK7	pMAK8
22,00	0,68	0,83	0,68	3,47	3,47	3,47	0,83	1,06
	1,62	1,39	1,62	4,17	4,17	4,17	1,39	1,55
	3,47	1,62	3,47	6,02	6,02	5,25	1,62	1,73
	5,25	1,62	5,25	7,08	7,08	9,46	1,62	1,95
	10,46	5,25	10,46	22,40	22,40	23,00	5,25	3,66
	22,12	15,62	22,12				15,62	22,95
SISTEMA DE CLIVAGEM COM <i>Sal</i> I								
pLAFR3	pMAK1	pMAK2	pMAK3	pMAK4	pMAK5	pMAK6	pMAK7	pMAK8
4,46	0,30	0,30	0,30	1,74	1,74	0,30	0,30	3,16
17,54	0,78	0,99	0,78	1,75	1,75	0,78	0,99	3,86
	0,99	1,29	0,99	1,89	1,89	0,99	1,29	4,46
	1,31	2,19	1,31	2,16	2,16	1,73	2,19	7,40
	1,73	2,59	1,73	2,59	2,59	1,80	2,59	17,02
	1,80	3,16	1,80	3,36	3,36	2,16	3,16	
	1,99	3,56	1,99	4,46	4,46	2,19	3,56	
	2,19	3,80	2,19	4,46	4,46	2,59	3,80	
	2,59	4,46	2,59	20,37	20,37	3,16	4,46	
	3,16	6,45	3,16			4,46	6,45	
	4,46	22,22	4,46			4,46	22,22	
	22,04		22,04			20,25		

As células de *E. coli* MC1061 (pMAK1 - pMAK8) e (pLAFR3) foram crescidas em meio LB Tc^{as} e incubadas a 37°C até DO_{540 nm} de aproximadamente 1,8. Os plasmídeos foram purificados pelo método de lise alcalina (19) e clivados com as enzimas de restrição *Eco*R I ou *Sal* I. Os sistemas de clivagem foram realizados de acordo com Material e Métodos (Item 2.6). O tamanho dos fragmentos foi estimado graficamente por interpolação da migração relativa (cm) na reta-padrão obtida plotando-se os valores logarítmicos do tamanho (\log_{kpb}) contra a migração eletroforética correspondente (cm).

TABELA 7: DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DOS PLASMÍDEOS
pMAK1-pMAK8

PLASMÍDEO	Tamanho do plasmídeo (kpb)	Tamanho do inserto (kpb)	
		<i>Sal</i> I	<i>EcoR</i> I
pLAFR3	22,00	ZERO	ZERO
pMAK1	43,40	21,34	21,60
pMAK2	50,12	29,01	30,96
pMAK3	43,40	21,34	21,60
pMAK4	42,67	20,78	21,14
pMAK5	42,67	20,78	21,14
pMAK6	47,31	22,87	23,35
pMAK7	50,12	29,01	30,94
pMAK8	33,50	13,90	10,90

Os transformantes *E. coli* MC1061 (pMAK1-pMAK8) foram crescidos em meio LB Tc¹⁵ e incubados a 37°C até DO_{540 nm} de aproximadamente 1,8. Os plasmídeos foram purificados pelo método de lise alcalina (19), eletroforetizados e clivados com as enzimas de restrição indicadas. O tamanho dos pMAKs foi estimado graficamente por interpolação da migração relativa na reta-padrão obtida, plotando-se os logaritmos do tamanho (\log_{kpb}) dos DNAs-padrão contra a migração eletroforética correspondente (cm).

fragmentos possivelmente continham o gene *nifA*. A análise eletroforética dos produtos da clivagem *EcoR* I (Figura 8 e Tabela 6) mostrou semelhanças nos seguintes fragmentos: de 5,25 kpb, excetuando os plasmídeos pMAK4, pMAK5 e pMAK8 e de 3,47 kpb, excetuando os plasmídeos pMAK2 e pMAK7. O fragmento de 5,25 kpb da clivagem com a enzima de restrição *EcoR* I está ausente nos plasmídeos pMAK4 e pMAK5, indicando que estes dois plasmídeos não contêm porções gênicas presentes nos demais plasmídeos. Os fragmentos *Bgl* II/*Hind* III de 1,74 e 1,36 kpb, por sua vez, devem fazer parte do vetor pois estão presentes em todos os plasmídeos, incluindo o do transconjugante não fixador de nitrogênio (pMAK8). Clivagem com *Hind* III originou fragmentos de 33,20 e 19,90 kpb nos plasmídeos pMAK2 e pMAK7, enquanto os demais plasmídeos capazes de complementar a mutação *nifA*⁻ mostraram apenas uma banda eletroforética, indicando conter apenas um a dois sítios de reconhecimento para essa enzima. O plasmídeo pMAK8 apresentou sete fragmentos quando clivado com essa enzima. Os perfis de clivagem com as enzimas *Hind* III e *Bgl* II / *Hind* III não foram mostrados, pois o número de fragmentos verificado não contribuiu para a diferenciação dos plasmídeos recombinantes.

A figura 9 e a tabela 6 mostram as semelhanças entre os fragmentos *Sal* I. O fragmento *Sal* I de 2,59 kpb está ausente na clivagem do vetor pLAFR3, bem como em clivagens realizadas no transconjugante não fixador de nitrogênio (pMAK8). O fragmento *Sal* I de 2,19 kpb está presente nas clivagens dos plasmídeos pMAK1, pMAK2, pMAK3, pMAK6 e pMAK7,

mas ausente no plasmídeo-vetor. O fragmento de 3,16 kpb está presente nos plasmídeos pMAK1, pMAK2, pMAK3, pMAK6, pMAK7 e pMAK8, mas ausente no pLAFR3. O fragmento *Sal* I de 4,46 kpb está presente em todos os plasmídeos, incluindo o do transconjugante não fixador de nitrogênio (pMAK8), indicando fazer parte do vetor pLAFR3. O fragmento *Sal* I de 10,25 kpb, por sua vez, presente nos plasmídeos pMAK2 e pMAK7 é resultante de clivagem parcial e é a soma dos fragmentos 6,45 e 3,80 kpb (Figura 9).

O plasmídeo pMAK7 foi selecionado para os estudos posteriores devido à sua capacidade de complementar eficientemente o mutante *nifA⁻* de *A. brasilense* (FP10) e por conter os fragmentos de 5,25 kpb da clivagem com *EcoR* I e os de 2,19 e 2,59 kpb da clivagem com *Sal* I, os quais são observados na clivagem de outros plasmídeos pMAKs e estão ausentes nos plasmídeos pMAK8 e pLAFR3.

O tamanho dos insertos dos plasmídeos pMAK1-pMAK8 foi deduzido pela soma de todos os fragmentos de cada clivagem separadamente, diminuído do tamanho do vetor pLAFR3 (Tabela 7).

3.3.4 Mapa de restrição do plasmídeo pMAK7

O perfil de clivagem do plasmídeo pMAK7 com várias endonucleases de restrição foi determinado em gel de agarose, visando a construção do mapa físico de restrição e planejar os experimentos de hibridização.

O plasmídeo pMAK7 foi clivado com as enzimas de

restrição *Bam*H I, *Bgl* II, *Hind* III, *Eco*R I, *Sac* I ou *Xho* I e com as combinações binárias das mesmas e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose (Tabelas 8 e 9). O padrão "1 kpb ladder" foi concomitantemente submetido à migração eletroforética.

A análise eletroforética dos produtos de clivagem mostrou os seguintes fragmentos: 0,83; 1,39; 1,62; 1,62; 5,25; 15,62 e 26,63 kpb na clivagem com a enzima *Eco*R I; 0,20; 0,28; 3,47; 5,40 e 43,75 kpb com *Xho* I; 24,80 e 28,20 kpb da clivagem *Bam*H I; 0,41; 0,79; 1,74; 6,00; 16,80 e 27,20 kpb de *Bgl* II; 19,90 e 33,20 kpb com a enzima *Hind* III e 1,95; 3,83 e 47,04 kpb com *Sac* I.

A análise da Tabela 9 mostrou que os fragmentos 0,41; 0,79 e 1,74 kpb da clivagem com *Bgl* II permaneceram intactos, sugerindo que esses fragmentos não contêm sítios de reconhecimento para as outras enzimas utilizadas para a construção do mapa físico.

O fragmento *Bgl* II de 6,00 kpb, por sua vez, aparentemente é clivado pela enzima *Hind* III, originando um fragmento de 4,70 e outro de 1,36 kpb e pela enzima *Bam*H I, originando fragmentos de 4,60 e 1,38 kpb. A presença de um fragmento de 1,38 kpb com *Bam*H I / *Bgl* II e de um de 1,36 kpb com *Hind* III / *Bgl* II sugeriu que os sítios de reconhecimento para *Bam*H I e *Hind* III poderiam estar muito próximos entre si nessa região do plasmídeo pMAK7 e praticamente equidistantes de um dos sítios de *Bgl* II.

Os fragmentos *Eco*R I de 0,83 e 1,39 kpb permaneceram intactos em todos os sistemas de clivagem, enquanto os dois

TABELA 8: CLIVAGEM E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS DO PLASMÍDEO pMAK7 EM SISTEMAS DE RESTRIÇÃO SIMPLES

FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (kpb)					
<i>Bam</i> H I	<i>Bgl</i> II	<i>Eco</i> R I	<i>Hind</i> III	<i>Sac</i> I	<i>Xho</i> I
24,80	0,41	0,83	19,90	1,95	0,20
28,20	0,79	1,39	33,20	3,83	0,26
	1,74	1,62		47,04	3,47
	6,00	1,62			5,40
	16,80	5,25			43,75
	27,20	15,62			
		26,63			

As células de *E. coli* MC1081 (pMAK7) foram crescidas em meio LB Tc¹⁵ e incubadas a 37°C até DO_{540 nm} de aproximadamente 1,8. O plasmídeo pMAK7 foi purificado pelo método de lise alcalina (19), eletroforetizado e clivado com as enzimas de restrição indicadas. Os sistemas de clivagem foram ensaiados de acordo com Materiais e Métodos (item 2.6). O tamanho dos fragmentos foi estimado graficamente por interpolação da migração relativa na reta-padrão obtida, plotando-se os logaritmos do tamanho (\log_{kpb}) dos DNAs-padrão contra a migração eletroforética correspondente (cm).

TABELA 9: CLIVAGEM E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS DO PLASMÍDEO pMAK7 E
SISTEMAS DE RESTRIÇÃO BINÁRIA

SISTEMAS DE CLIVAGEM BINÁRIA							
<i>Bam</i> H I / <i>Bgl</i> II	<i>Bam</i> H I / <i>Eco</i> R I	<i>Bam</i> H I / <i>Hind</i> III	<i>Bam</i> H I / <i>Sac</i> I	<i>Bam</i> H I / <i>Xho</i> I	<i>Bgl</i> II / <i>Eco</i> R I	<i>Bgl</i> II <i>Hind</i> III	
0,41 (*)	0,54	5,60	1,40	0,20 (●)	0,41 (*)	0,41 (*)	
0,79 (*)	0,83 (▽)	19,40	1,95 (■)	0,26 (●)	0,79 (*)	0,79 (*)	
1,38	1,39 (▽)	28,00	3,83 (■)	0,60	0,83 (▽)	1,36	
1,74 (*)	1,62 (▽)		17,60	3,47 (●)	1,39 (▽)	1,60	
2,30	1,62 (▽)		29,05	4,73	1,62 (▽)	1,74 (*)	
4,60	4,60			20,10	1,62 (▽)	4,70	
16,80	5,25 (▽)			23,55	1,74 (*)	14,90	
25,00	15,08				2,90	27,20 (*)	
	22,05				5,25 (▽)		
					6,00 (*)		
					11,60		
					18,86		

<i>Bgl</i> II / <i>Sac</i> I	<i>Bgl</i> II / <i>Xho</i> I	<i>Eco</i> R I / <i>Hind</i> III	<i>Eco</i> R I / <i>Sac</i> I	<i>Eco</i> R I / <i>Xho</i> I	<i>Hind</i> III / <i>Sac</i> I	<i>Hind</i> III / <i>Xho</i> I	<i>Sac</i> I / <i>Xho</i> I
0,41 (*)	0,20 (●)	0,83 (▽)	0,83 (▽)	0,20 (●)	1,95 (■)	0,20 (●)	0,20 (●)
0,79 (*)	0,26 (●)	1,39 (▽)	1,39 (▽)	0,26 (●)	3,83 (■)	0,26 (●)	0,26 (●)
0,90	0,41 (*)	1,62 (▽)	1,62 (▽)	0,83 (▽)	17,62	0,32	0,60
1,50	0,79 (*)	1,62 (▽)	1,62 (▽)	1,29	29,40	3,47 (●)	1,95 (■)
1,74 (*)	0,90	4,65	1,90	1,39 (▽)		5,40 (●)	1,95 (■)
1,95 (■)	1,74 (*)	5,25 (▽)	1,95 (■)	1,39		19,90 (▲)	3,40
6,00 (*)	2,96	5,80	3,83 (■)	5,25 (▽)		23,50	3,47 (●)
13,00	3,47 (●)	10,60	5,25 (▽)	5,38			44,04
26,40	6,00 (*)	22,00	8,05	10,90			
	15,60		26,63 (▽)	26,63 (▽)			
	20,40						

As células de *E. coli* MC1061 (pMAK7) foram crescidas em meio LB Tc¹⁵ incubadas a 37°C até $DO_{540\text{ nm}}$ de aproximadamente 1,8. O plasmídeo foi purificado pelo método de lise alcalina (19), eletroforetizado e clivado com as enzimas de restrição indicadas. Os sistemas de clivagem foram realizados de acordo com Material e Métodos (item 2.6). O tamanho dos fragmentos foi estimado graficamente por interpolação da migração relativa (cm) na reta-padrão obtida plotando-se os valores logarítmicos do tamanho ($\log_{k_{pb}}$) contra a migração eletroforética correspondente (cm). Os símbolos entre parênteses indicam os fragmentos iguais aos observados nas clivagens simples, bem como as respectivas enzimas que os originam: *, *Bgl* II, *Eco*R I; ▲, *Hind* III; ■, *Sac* I e ●, *Xho* I (ver Tabela 8).

fragmentos de 1,62 kpb apresentaram sítios de reconhecimento para a enzima *Xho* I, originando fragmentos de 1,39 e 1,29 kpb. O fragmento *Xho* I de 3,47 kpb, por sua vez, foi clivado somente no sistema de restrição *Xho* I / *EcoR* I. Esse fragmento, bem como os fragmentos *Xho* I de 0,20 e 0,26 kpb parecem estar localizados na mesma porção do pMAK7 que contém os fragmentos *EcoR* I de 1,62 e o de 0,83 kpb. A banda eletroforética na região correspondente à do fragmento *Xho* I de 5,40 kpb manteve-se presente na clivagem *Xho* I / *EcoR* I, sugerindo não estar relacionado com a clivagem dos dois fragmentos *EcoR* I de 1,62 kpb simultaneamente.

O fragmento *EcoR* I de 5,25 kpb apareceu em todas as clivagens com as demais enzimas em sistemas binários, sugerindo que se fosse clivado por alguma delas deveria manter-se intacto ou ser clivado em uma de suas extremidades.

O mapa físico mostrou a localização do inserto no vetor pLAFR3, separados pelos sítios *Hind* III e *EcoR* I, bem como os sítios de restrição (Figura 10). O plasmídeo pMAK7, portanto, contém uma região de 22,00 kpb correspondente ao vetor pLAFR3 e outra de aproximadamente 30,00 kpb correspondente ao inserto do DNA de *A. brasiliense*. Os fragmentos de mesmo tamanho foram determinados através da análise da intensidade das bandas eletroforéticas e das clivagens parciais.

O vetor pode ser completamente liberado pela clivagem *Hind* III / *EcoR* I, como um fragmento de 22,00 kpb. Ao vetor ficam ligados: a) um fragmento de 4,63 kpb quando o pMAK7 é

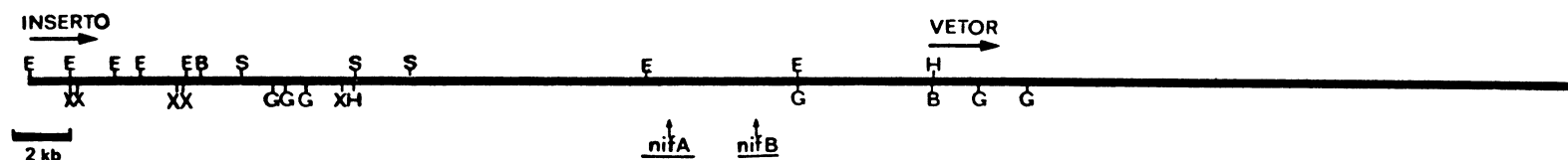


FIGURA 10. MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pMAK7

O plasmídeo pMAK7 foi clivado com as endonucleases de restrição B, *Bam*H I; G, *Bgl* II; E, *Eco*R I; H, *Hind* III; S, *Sac* I e X, *Xho* I em sistemas de clivagem simples e composta. As amostras foram submetidas a corrida eletroforética em gel de agarose 0,8 % e o tamanho dos fragmentos do pMAK7 clivado foi estimado conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.19.2). O mapa físico foi montado através da comparação dos perfis de clivagem observados nos sistemas de clivagem simples e composta.

clivado pela *EcoR* I; b) de 11,20 kpb quando tratado com *Hind* III; c) de 8,20 kpb quando clivado por *BamH* I; d) de 8,36 kpb por *Bgl* II; e) de 25,04 kpb por *Sac* I ou f) de 21,75 kpb por *Xho* I. O fragmento *Bgl* II de 27,20 kpb contém 18,86 kpb do vetor e 8,36 kpb do inserto. Esse fragmento de 27,20 kpb não contém o sítio λ *cos* do vetor pLAFR3.

3.3.5. Regiões do pMAK7 homólogas ao gene *nifA* de *H. seropedicae*

A fim de investigar o conteúdo genético do inserto contido no plasmídeo pMAK7, os produtos de clivagem com as enzimas de restrição foram submetidos a hibridizações com DNAs-sonda de genes integrantes do sistema de fixação de nitrogênio.

Inicialmente, o plasmídeo pMAK7 foi clivado por sistemas de restrição simples com as enzimas de restrição *EcoR* I ou *Bgl* II e de restrição composta com as enzimas *BamH* I / *Hind* III e *Bgl* II / *Hind* III. Paralelamente, o DNA total de *A. brasilense* estirpe FP2 foi clivado com *EcoR* I a fim de comparar o seu perfil de hibridização com o perfil de hibridização do plasmídeo pMAK7 clivado com a mesma enzima. As amostras dos DNAs clivados foram submetidas a corrida eletroforética e a hibridização foi efetuada com o DNA-sonda contendo o domínio central na região próxima à região amino-terminal (N-terminal) do gene *nifA* de *H. seropedicae*. Houve hibridização entre os fragmentos de 5,25 kpb da clivagem com *EcoR* I, de 16,80 kpb das clivagens com *Bgl* II e

Bgl II / *Hind* III e de 28,00 kpb da clivagem com *Bam*H I / *Hind* III do pMAK7 e o DNA-sonda. A sonda do gene *nifA* também hibridizou com um fragmento de 5,25 kpb da clivagem com a enzima *Eco*R I realizada no DNA total de *A. brasilense* FP2 (Figura 11).

A hibridização com o DNA-sonda contendo o domínio D e a extremidade carboxi-terminal do gene *nifA* de *H. seropedicae* foi realizada após a clivagem do plasmídeo pMAK7 com as enzimas de restrição *Eco*R I, *Xho* I, *Bgl* II ou *Sal* I e do DNA cromossomal de *A. brasilense* FP2 com *Eco*R I. Verificou-se, uma vez mais, a hibridização do fragmento *Eco*R I de 5,25 kpb derivado do pMAK7 e do DNA total de *A. brasilense* FP2 com o DNA-sonda (Figura 12). Esse experimento mostrou ainda que o fragmento *Eco*R I de 5,25 kpb está incluído no fragmento *Xho* I de 43,75 kpb. Esse fragmento compreende todo o vetor pLAFR3 utilizado na construção do banco genômico mais um fragmento do inserto com aproximadamente 22,00 kpb. Dois fragmentos *Sal* I de 2,59 e 3,16 kpb também hibridizaram com essa sonda, sendo que o primeiro apresentou mancha de hibridização mais intensa, sugerindo conter a maior parte do gene. As hibridizações com os fragmentos *Bgl* II de 6,00 kpb e *Eco*R I de 26,63 kpb, exibiram manchas de hibridização de baixa intensidade.

3.3.6 Regiões do pMAK7 homólogas ao gene *nifB* de *H. seropedicae*

Os fragmentos *Sal* I de 3,16 kpb, *Bgl* II de 16,80 kpb

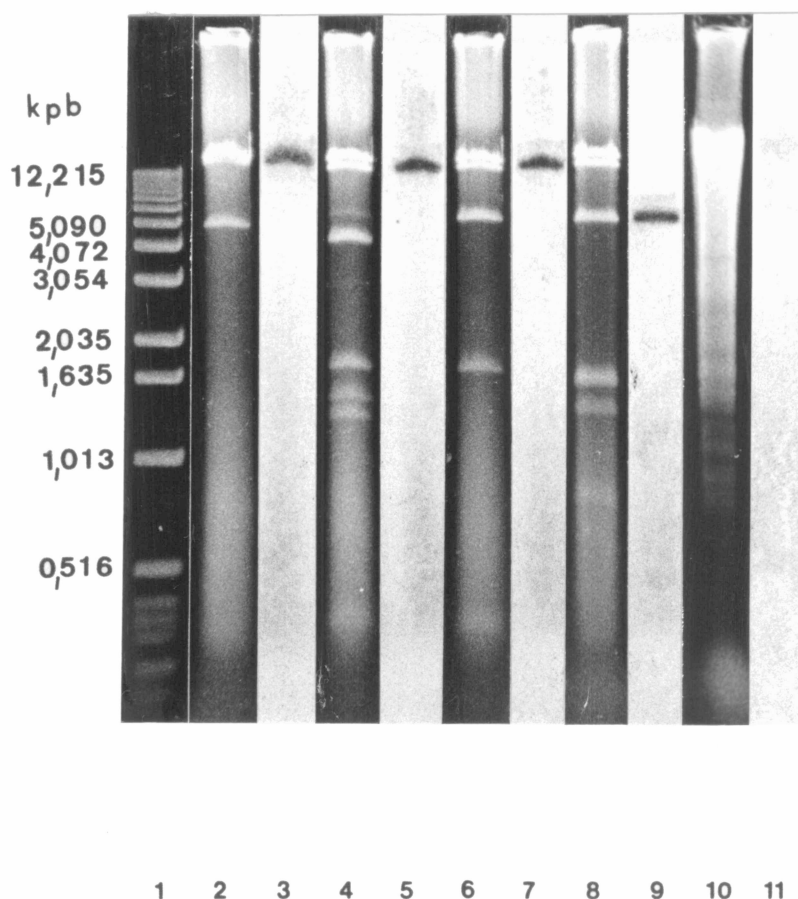


Figura 11. PERFIS ELETROFORÉTICO E DE HIBRIDIZAÇÃO DO PLASMÍDEO pMAK7 COM O DNA-SONDA *nifA* DE *Herbaspirillum seropedicae* (DOMÍNIO CENTRAL)

Os produtos de clivagem dos DNAs plasmidial e cromossomal foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.16.2). O DNA-sonda do gene *nifA* foi marcado não-radioativamente com digoxigenina 11-dUTP. Os produtos de restrição foram submetidos a hibridização após a transferência dos fragmentos de DNA para membrana de nylon Hybond-C. Após coloração do material, a membrana foi fotografada. Distribuição dos fragmentos: 1, "1 kpb ladder"; 2, pMAK7 clivado com *Bam*H I/*Hind* III; 4, pMAK7 clivado com *Bgl* II/*Hind* III; 6, pMAK7 clivado com *Bgl* II; 8, pMAK7 clivado com *Eco*R I; 10, DNA de *A. brasilense* estirpe FP2 clivado com *Eco*R I. Os números 3, 5, 7, 9 e 11 são os perfis de hibridização correspondentes aos perfis eletroforéticos 2, 4, 6, 8 e 10, respectivamente.

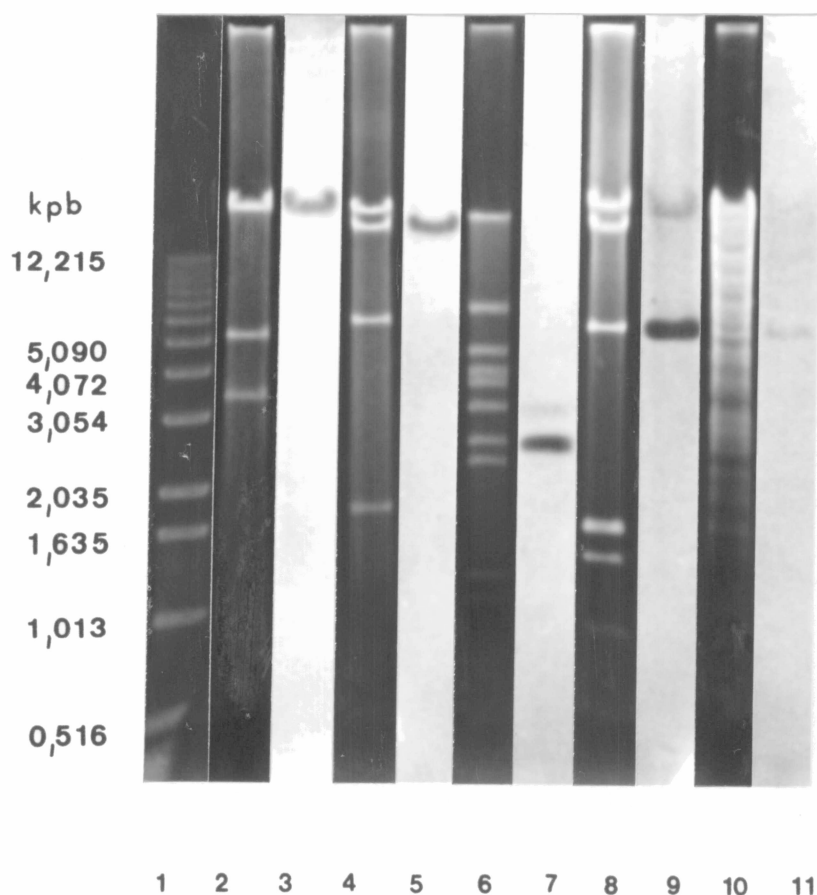


Figura 12. PERFIS ELETROFORÉTICO E DE HIBRIDIZAÇÃO DO PLASMÍDEO pMAK7 COM O DNA-SONDA *nifA* DE *H. seropedicae* (DOMÍNIO D E EXTREMIDADE C-terminal).

Os produtos de clivagem dos DNAs plasmidial e cromossomal foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.16.2). O DNA-sonda do gene *nifA* de *H. seropedicae* foi marcado não-radioativamente com digoxigenina 11-dUTP. Os produtos de clivagem foram submetidos a hibridização após a transferência do material para a membrana de nylon Hybond-C. Após a coloração do material, a membrana foi fotografada. Distribuição dos fragmentos: 1, "1 kpb ladder"; 2, pMAK7 clivado com *Xho* I; 4, pMAK7 clivado com *Bgl* II; 6, pMAK7 clivado com *Sal* I; 8, pMAK7 clivado com *EcoR* I; 10, DNA total de *A. brasilense* FP2 clivado com *EcoR* I. Os números 3, 5, 7, 9 e 11 são os perfis de hibridização correspondentes aos perfis eletroforéticos 2, 4, 6, 8 e 10, respectivamente.

e *EcoR* I de 5,25 e de 26,63 kpb do plasmídeo pMAK7 hibridizaram intensamente com o gene *nifB* de *H. seropedicae* (Figura 13), sugerindo que esse gene está presente no plasmídeo pMAK7. Por outro lado, o gene *nifB* de *H. seropedicae* hibridizou fracamente com os fragmentos *Bgl* II de 6,00 kpb e *Sal* I de 4,46 e 22,22 kpb, sugerindo que o gene está principalmente localizado nos fragmentos *Sal* I de 3,16 kpb, *Bgl* II de 16,80 kpb e *EcoR* I de 5,25 kpb.

3.3.7 Regiões do pMAK7 homólogas ao operon *nifHDK* de *A. brasilense*

A hibridização com o DNA-sonda dos genes *nifHDK* de *A. brasilense* somente foi visualizada em uma banda eletroforética correspondente a 6,70 kpb de clivagem *EcoR* I do DNA total de *A. brasilense* FP2. Não houve hibridização do DNA-sonda com quaisquer fragmentos do plasmídeo pMAK7, indicando que os genes estruturais do sistema de fixação de nitrogênio, *nifHDK*, não estão presentes no inserto do DNA circular.

3.3.8 Caracterização preliminar do conteúdo gênico do plasmídeo pMAK7

Comprovada a presença dos genes *nifA* e *nifB*, buscou-se averiguar se outros genes integrantes do sistema de fixação de nitrogênio estariam presentes no inserto do plasmídeo pMAK7.

O plasmídeo pMAK7 foi transferido por conjugação de

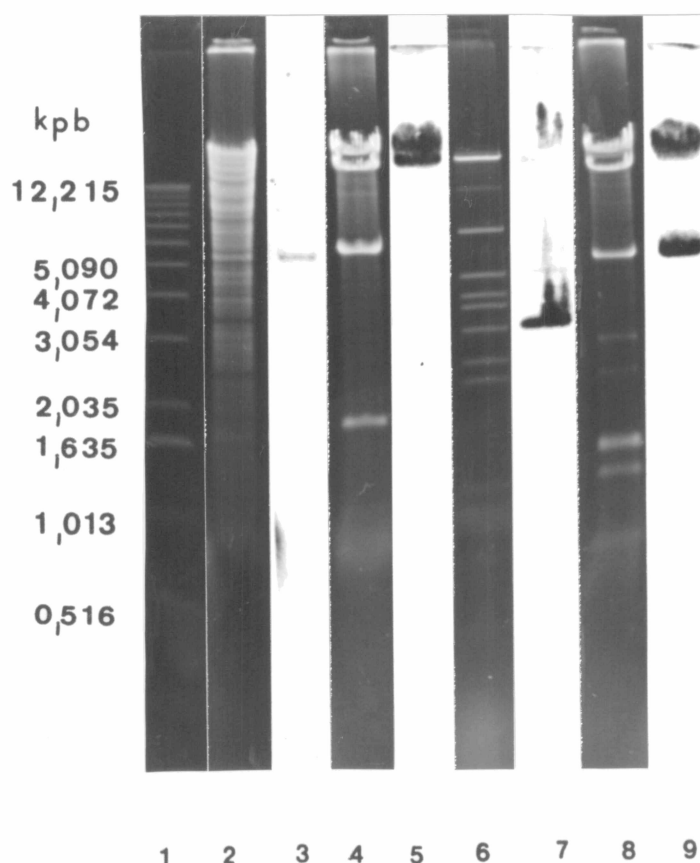


Figura 13. PERFIS ELETROFORÉTICO E DE HIBRIDIZAÇÃO DO PLASMÍDEO pMAK7 COM O DNA-SONDA *nifB* DE *H. seropedicae*

Os produtos de clivagem dos DNAs plasmidial e cromossomal foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% conforme o descrito em Materiais e Métodos (item 2.16.2). O DNA-sonda do gene *nifB* de *H. seropedicae* foi marcado não-radioativamente com digoxigenina 11-dUTP. Os produtos de restrição foram transferidos para membrana de nylon Hybond-C e submetidos a hibridização. Após a coloração do material, a membrana foi fotografada. Distribuição dos fragmentos: 1, "1 kpb ladder"; 2, DNA total de *A. brasilense* FP2 clivado com *EcoR* I; 4, pMAK7 clivado com *Bgl* II; 6, pMAK7 clivado com *Sal* I; 8, pMAK7 clivado com *EcoR* I. Os números 3, 5, 7 e 9 são os perfis de hibridização correspondentes aos perfis eletroforéticos 2, 4, 6 e 8.

E. coli MC1081 (pMAK7) para os mutantes *A. brasilense* FP8 e FP9 (*ntrC*⁻). Os transconjugantes *A. brasilense* FP8 (pMAK7) e FP9 (pMAK7) não apresentaram complementação genética da mutação, sugerindo a ausência desse gene no plasmídeo pMAK7.

O plasmídeo pMAK7 foi também transferido para o mutante de *A. brasilense* estirpe FP3 (*nifHDK*⁻) por conjugação. Não houve complementação genética, sugerindo a ausência desses três genes estruturais no inserto de pMAK7 e confirmando os resultados obtidos na hibridização.

Experimento semelhante foi realizado com o mutante *A. brasilense* FP6 (proteína FeMoco⁻). A incapacidade de crescimento diazotrófico também se manteve nesses mutantes.

A presença do plasmídeo pMAK7 nos transconjugantes de cada estirpe mutante de *A. brasilense* foi comprovada através de eletroforese em gel de agarose 0,6% (Figura 14). Os resultados sugeriram que, dos genes testados, somente *nifA* e *nifB* estão presentes no plasmídeo pMAK7.

3.4 REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE

3.4.1 Efeito dos íons amônio sobre a atividade da nitrogenase

A adição de NH_4^+ (2 mM final) a culturas fixando nitrogênio em meio NFbHPG provocou completa inibição da atividade da nitrogenase na estirpe selvagem, FP2, e no transconjugante *A. brasilense* FP10 (pMAK7) (Figura 15).

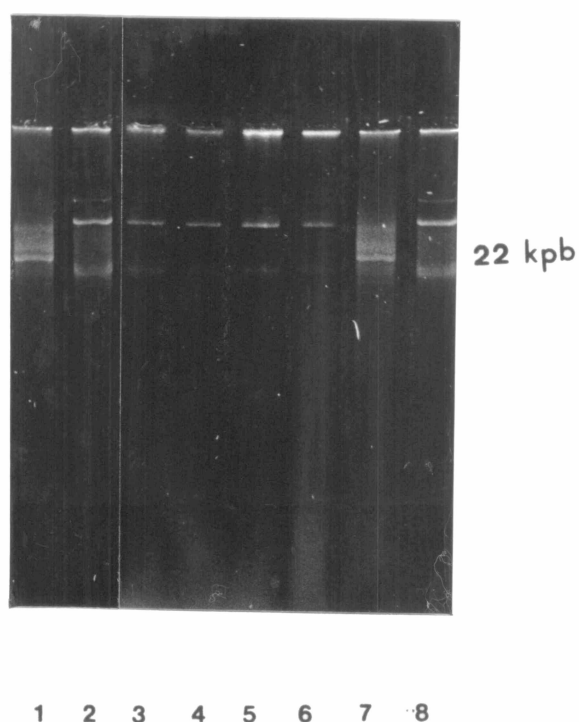


Figura 14. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS TRANSCONJUGANTES DE *A. brasilense* CONTENDO O PLASMÍDEO pMAK7

As culturas dos transconjugantes de *A. brasilense* foram crescidas em meio NFbHPN Sm¹⁰⁰ Tc¹⁵ e as de *E. coli* MC1061 (pLAFR3) e MC1061 (pMAK7) em meio LB Tc¹⁵ (item 2.3). O perfil eletroforético dos plasmídeos foi determinado em gel de agarose 0,8% após isolamento pelo método de lise alcalina (19) como descrito em Materiais e Métodos (item 2.16). Distribuição das estirpes: 1, *E. coli* MC1061 (pLAFR3); 2, *E. coli* MC1061 (pMAK7); 3, *A. brasilense* FP3 (pMAK7); 4, *A. brasilense* FP6 (pMAK7); 5, *A. brasilense* PF8 (pMAK7); 6, *A. brasilense* FP9 (pMAK7); 7, *E. coli* MC1061 (pMAK7); 8, *E. coli* MC1061 (pMAK7).

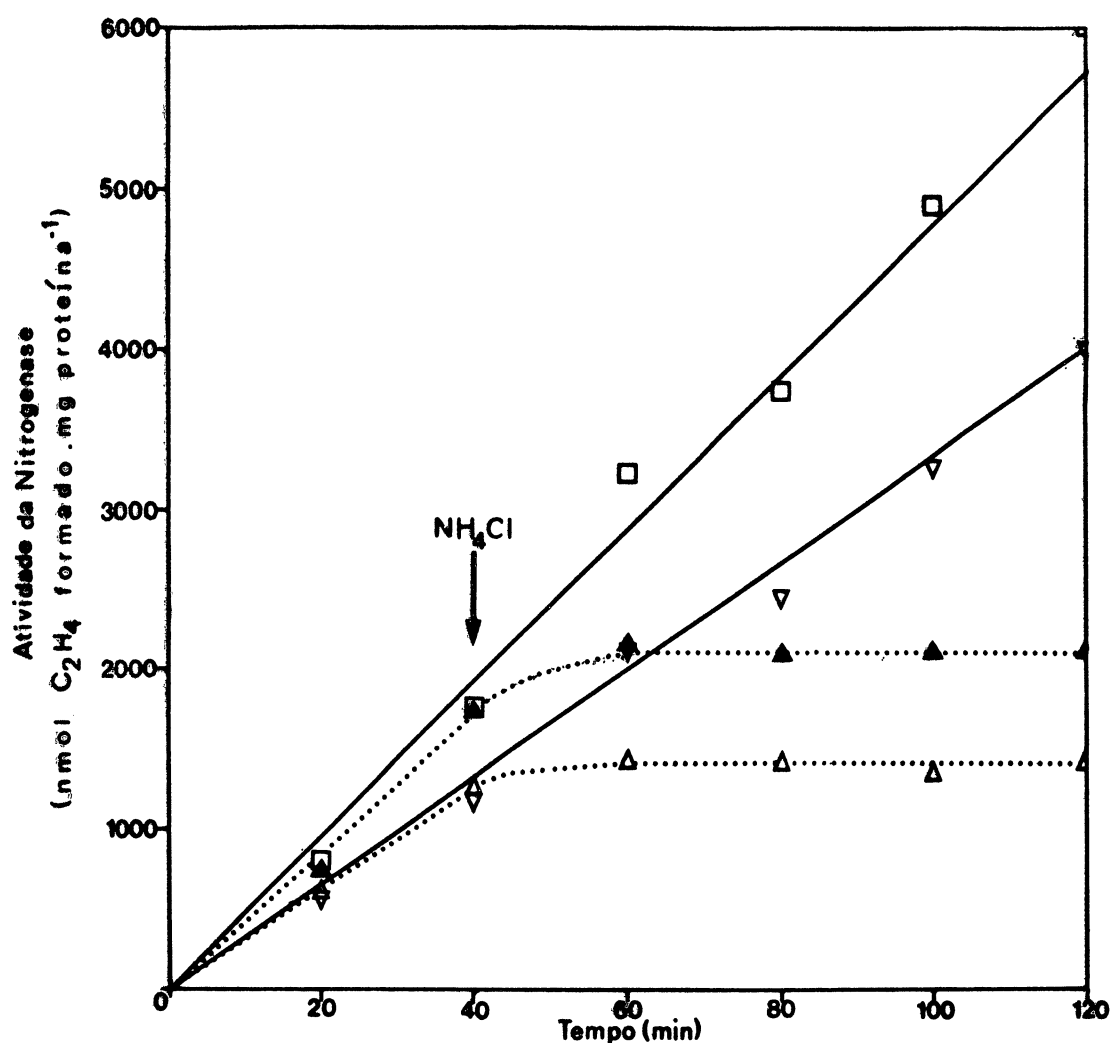


Figura 15. EFEITO DE NH_4^+ SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE DO TRANSCONJUGANTE *A. brasilense* FP10 (pMAK7)

As células foram crescidas em meio NFbHPG até $\text{OD}_{540 \text{ nm}}$ em torno de 2 e ensaiadas para a atividade da nitrogenase (ver item 2.12). A seta indica o momento da adição de NH_4Cl (2 mM final). Símbolos: □, frasco controle contendo cultura de *A. brasilense* FP2; ▲, cultura de *A. brasilense* FP2 à qual foi adicionado NH_4Cl aos 40 min de ensaio; ▽, frasco controle contendo cultura de *A. brasilense* FP10 (pMAK7); △, cultura de *A. brasilense* FP10 (pMAK7) à qual foi adicionada NH_4Cl aos 40 min de ensaio.

As amostras da fase gasosa foram coletadas nos tempos indicados.

Entretanto, a adição de amônia em baixas concentrações (0,1 mM final) a culturas de *A. brasilense* FP2 e de *A. brasilense* FP10 (pMAK7) causou inibição reversível da atividade nitrogenásica (Figura 16). As estirpes apresentaram diminuição da atividade da nitrogenase durante 20 min após a adição de amônia. Após a amônia ter sido esgotada do meio, a atividade da nitrogenase retornou à sua velocidade inicial. Tanto o transconjugante quanto a estirpe selvagem voltaram a fixar nitrogênio, aproximadamente 30 a 40 min após a adição de amônia. Esse transconjugante apresenta, portanto, o mesmo perfil de resposta da nitrogenase que o observado para a estirpe selvagem.

Os transconjugantes de *A. brasilense* FP10 com plasmídeo contendo gene *nifA* de *A. brasilense* (pMAK1 ou pMAK7) e *A. brasilense* FP2 foram incapazes de fixar nitrogênio em presença de amônia (10 mM), enquanto o transconjugante com plasmídeo contendo gene *nifA^C* de *K. pneumoniae* (pCK3) apresentou desrepressão parcial da nitrogenase nas mesmas condições (Tabela 10). Esses resultados sugeriram que o gene *nifA* contido nos plasmídeos pMAK1 e pMAK7 não é expresso constitutivamente, pois está sob regulação de outros genes envolvidos na fixação de nitrogênio.

3.4.2 Efeito da temperatura sobre a atividade da nitrogenase

A atividade da nitrogenase foi determinada nos

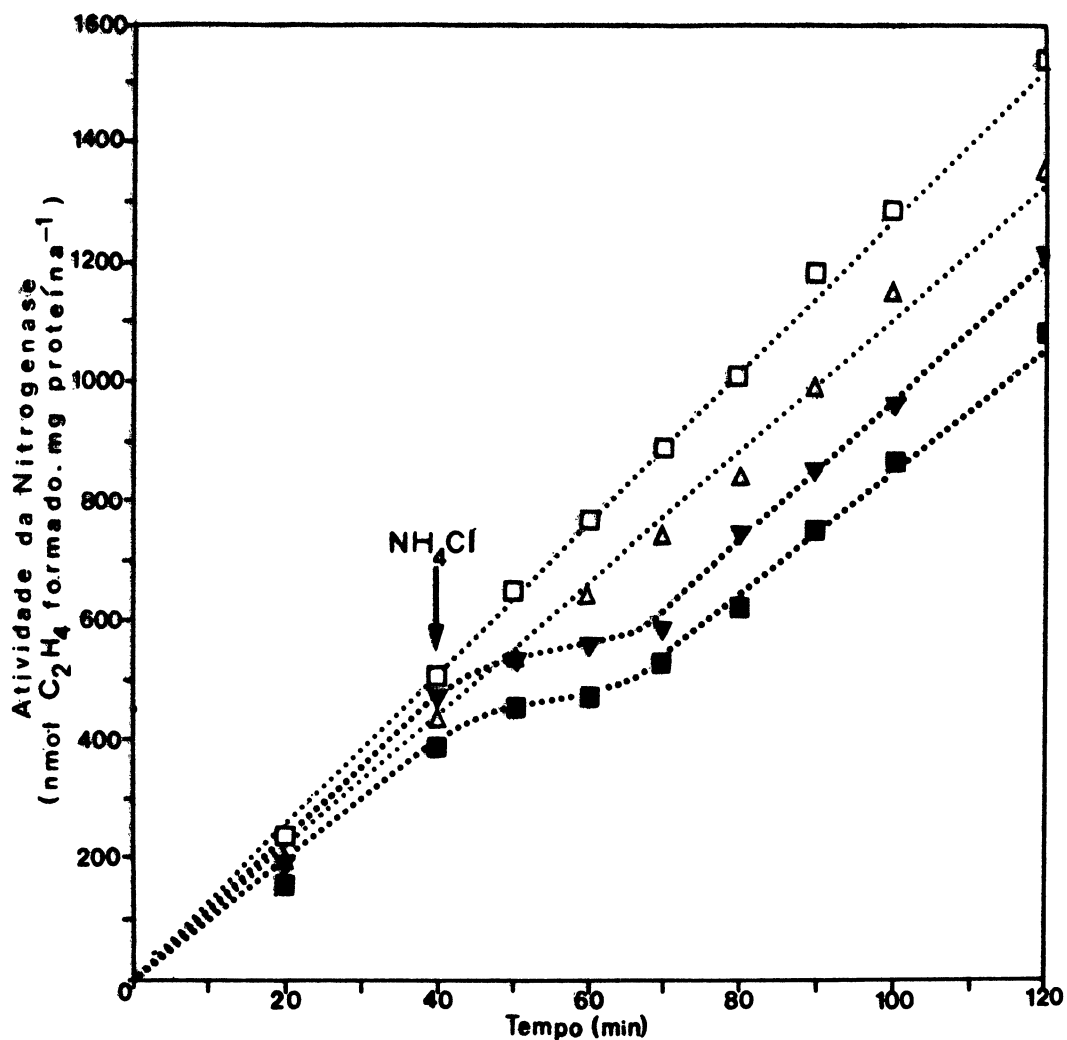


Figura 16. EFEITO REVERSÍVEL DE NH_4^+ SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE DO TRANSCONJUGANTE *A. brasilense* FP10 (pMAK7)

As células foram crescidas em meio NFbHPG até $\text{DO}_{540 \text{ nm}}$ em torno de 2 e ensaiadas para atividade da nitrogenase (ver Item 2.12). A seta indica o momento da adição de NH_4Cl (0,1 mM final). Símbolos: □ , frasco controle contendo cultura de *A. brasilense* FP2; ▼ , cultura de *A. brasilense* FP2 à qual foi adicionada NH_4Cl aos 40 min de ensaio; △ , frasco controle contendo cultura de *A. brasilense* FP10 (pMAK7); ■ , cultura de *A. brasilense* FP10 (pMAK7) à qual foi adicionada NH_4Cl aos 40 min de ensaio.

As amostras da fase gasosa foram coletadas nos tempos indicados.

TABELA 10: DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA AMÔNIA SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE DOS TRANSCONJUGANTES DE *A. brasilense* FP10.

Estirpe de <i>A. brasilense</i>	Atividade Específica da Nitrogenase (nmol C ₂ H ₄ .min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹)	
	- NH ₄ Cl	+ NH ₄ Cl
FP2	8,6	ZERO
FP10	ZERO	ZERO
FP10 (pMAK1)	10,5	ZERO
FP10 (pMAK7)	8,5	ZERO
FP10 (pCK3)	5,6	0,35

Os organismos foram crescidos em meio NFbHP semi-sólido na presença ou na ausência de NH₄Cl (10 mM) a 30°C, sem agitação, por 24 horas. As estirpes foram crescidas em duplicata e a atividade da nitrogenase determinada como descrito em Materiais e Métodos (item 2.12).

transconjugantes *A. brasilense* FP10 (pMAK1 e pMAK7) crescidos a 30°C ou a 37°C. Estes transconjugantes, apresentaram, atividade nitrogenásica semelhante àquela observada na cepa selvagem (FP2) em ambas temperaturas (Tabela 11). Entretanto, o transconjugante *A. brasilense* FP10 (pCK3), que contém plasmídeo com o gene *nifA* de *K. pneumoniae* somente cresceu diazotroficamente e fixou nitrogênio a 30°C, como demonstrado previamente (192). Os resultados sugeriram que há diferenças entre os produtos NifA dos dois microrganismos.

3.5 COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE *nifB*⁻ DE *K. pneumoniae* (50581) PELO PLASMÍDEO pMAK7

O mutante *nifB*⁻ de *K. pneumoniae* 50581 (*nifB*⁻) foi transformado em presença de CaCl₂ com o plasmídeo pMAK7 purificado pelo método da lise alcalina e plaqueado em meio LA contendo Tc¹⁵.

A frequência de transformação foi de $3 \cdot 10^{-8}$.

Somente duas colônias de *K. pneumoniae* 50581 (pMAK7) foram obtidas. Uma dessas colônias resistentes a Tc foi testada e apresentou capacidade de fixar nitrogênio em meio NFDM anaeróbico (Tabela 12), sugerindo a presença do gene *nifB* no plasmídeo pMAK7.

A presença do plasmídeo pMAK7 foi confirmada através da eletroforese em gel de agarose 0,8% (dado não mostrado).

Tabela 11: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE NITROGENÁSICA DOS TRANSCONJUGANTES DE *A. brasilense* A DIFERENTES TEMPERATURAS.

Estirpe de <i>A. brasilense</i>	Atividade Específica da Nitrogenase (nmol C ₂ H ₄ .min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹)	
	30°C	37°C
FP2	15,5	15,7
FP10	ZERO	ZERO
FP10 (pMAK1)	7,4	7,1
FP10 (pMAK7)	7,2	9,2
FP10 (pCK3)	8,7	ZERO

Os organismos foram crescidos em meio NFbHP semi-sólido (ver item 2.7) e ensaiados para a redução de acetileno (ver item 2.12) após 24 horas de crescimento. Os ensaios foram realizados em duplicata, nas temperaturas indicadas.

TABELA 12: COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE DE *K. pneumoniae* (50581)

Estirpe de <i>K. pneumoniae</i>	Atividade Específica da Nitrogenase (nmol C ₂ H ₄ .min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹)	
50581	ZERO	(0%)
50581 (pMAK7)	1,8	(17,79%)
M5a1	10,12	(100%)

Os organismos foram crescidos em meio NFDM líquido a 30°C e ensaiados para a redução de acetileno conforme descrito em Materiais e Métodos (itens 2.7 e 2.12).

4 DISCUSSÃO

O isolamento de mutantes deficientes nos genes *nif* e *ntr* é extremamente importante para a compreensão da fisiologia da fixação de nitrogênio. Mutantes *nifA*⁻, isto é, deficientes no gene regulador positivo do sistema específico de fixação de nitrogênio, têm sido isolados em diversos organismos. Merrick e colaboradores isolaram os mutantes de *Klebsiella pneumoniae* UNF1139 e UNF2047 através de mutagenização sítio-dirigida com os transposons *Tn7* e *Tn10*, respectivamente (186). Por esta técnica, foram também isolados mutantes *nifA*⁻ em *Bradyrhizobium japonicum* A9 (227), *Rhizobium meliloti* RM1354 (229) e RM4000 (121) usando o transposon *Tn5*. Pedrosa e Yates (1984) isolaram um mutante *nifA*⁻ de *A. brasilense* (FP10) após mutagenização com nitrosoguanidina (192). O mutante de *A. brasilense* FP10 foi caracterizado como *nifA*⁻ (191, 192) por reverter ao fenótipo Nif⁺ quando complementado pelo gene *nifA* de *K. pneumoniae*, contido no plasmídeo pCK3 (192, 193). Em vista disto, utilizamos o mesmo mutante, *A. brasilense* FP10 (*nifA*⁻) (192), para isolar o gene *nifA* de *A. brasilense*.

A conjugação de um banco genômico, representativo do DNA total de um organismo com mutantes, por sua vez, têm sido muito utilizada como estratégia para o isolamento de clones capazes de complementar mutações específicas (193).

Recentemente, esta estratégia foi utilizada em nosso laboratório a fim de isolar o gene *nifA* de *Herbaspirillum seropedicae* (193), que foi posteriormente subclonado, mapeado e seqüenciado (221). Utilizando a mesma estratégia, obtivemos oito transconjugantes diazotróficos como resultado da conjugação de *A. brasilense* FP10 com o banco genômico de *A. brasilense* FP2 mantido na estirpe *E. coli* DH5 (pLAFR3 :: DNA de *A. brasilense* FP2) (Tabela 4). Os plasmídeos recombinantes contidos nesses transconjugantes foram denominados pMAK1 a pMAK8.

Os plasmídeos pLAFR3 e pR68.45 são incluídos no mesmo grupo de incompatibilidade plasmidial, IncP-1, provavelmente competindo entre si pelo mesmo sítio de ligação da membrana durante a replicação e, portanto, os dois DNAs circulares estão impossibilitados de coexistir na mesma célula (104), principalmente pela imposição de pressão seletiva para permanência de um deles. Os transconjugantes de *A. brasilense* FP10 (pMAKs) perderam completamente a capacidade diazotrófica quando estes plasmídeos (pMAKs) foram eliminados pelo plasmídeo pR68.45 (Tabela 5). A capacidade diazotrófica dos transconjugantes foi confirmada como decorrente da presença do inserto no plasmídeo, pois a reversão ao fenótipo Nif^- com pR68.45 não deveria ocorrer caso o carácter diazotrófico fosse decorrente de reversão do mutante *nifA*. Este resultado confirmou que o carácter diazotrófico dos transconjugantes era proporcionada pelos plasmídeos recombinantes, pLAFR3 contendo inserto do DNA total de *A. brasilense* FP2, e que estes plasmídeos eram

oriundos do banco genômico contido na estirpe *E. coli* DH5 (Figura 3). A perda da atividade nitrogenásica foi decorrente da entrada do plasmídeo pR68.45 nas células, a qual ocasionou a eliminação dos plasmídeos recombinantes do pLAFR3 (Figuras 4, 5 e 6). As figuras 4, 5 e 6, porém, mostraram que os plasmídeos recombinantes estão na mesma altura que um concatâmero de 44 kpb do vetor pLAFR3. Os plasmídeos recombinantes apresentaram um tamanho intermediário entre o do plasmídeo pR68.45 (aproximadamente 60 kpb) e o do plasmídeo pLAFR3 sem inserto (22 kpb), que migra junto com o DNA cromossomal. As formas concatâmeras representam a associação de moléculas circulares de DNA e são comumente verificadas de acordo com as condições de conservação do DNA ou das concentrações de antibióticos utilizadas para o crescimento das bactérias das quais são isolados (160).

Os plasmídeos pMAKs dos transconjugantes foram isolados e utilizados para transformar *E. coli* MC1061. Quando os transformantes *E. coli* MC1061 (pLAFR3 :: DNA total de *A. brasilense* FP2) foram conjugados com o mutante *A. brasilense* FP10 (*nifA*⁻), a atividade nitrogenásica dos transconjugantes obtidos, FP10 (pMAK1 a pMAK7) foi totalmente recuperada (Tabela 5) e o crescimento diazotrófico em meio semi-sólido livre de N-fixado foi novamente observado. Além disso, todos os transconjugantes diazotróficos apresentaram resistência a tetraciclina, conferida pelo vetor, e a presença física dos plasmídeos pMAKs. A restauração do fenótipo *Nif*⁺, simultânea com a

aquisição de resistência a tetraciclina pelos transconjugantes, praticamente elimina a possibilidade de reversão da mutação do gene *nifA*. A frequência teórica para mutação simultânea em dois genes é de aproximadamente 10^{-10} - 10^{-12} (149) o que é improvável. Portanto, a complementação da mutação somente foi possível pela presença do plasmídeo adequado nos transconjugantes, contendo o elemento genético capaz de fornecer um alelo não mutado e/ou ativo. Desta forma, concluímos que o gene *nifA* está presente nos insertos dos plasmídeos pMAK1 a pMAK7, uma vez que foram capazes de complementar o mutante *nifA*⁻ de *A. brasilense*, FP10.

A atividade nitrogenásica dos transconjugantes, após crescimento em meio NFbHP semi-sólido sem fonte de nitrogênio fixado, mostrou-se com valores muito discrepantes de um transconjugante para outro (Tabelas 4 e 5). A discrepância nos níveis de atividade nitrogenásica observado pode ser atribuída a diferenças: a) entre os plasmídeos, b) entre as células hospedeiras ou c) entre as células (estágios de crescimento) no momento do ensaio da nitrogenase. Os transconjugantes apresentaram atividade nitrogenásica semelhante àquela da estirpe selvagem, quando crescidos em meio NFbHPG líquido, suplementado com glutamato, indicando não haver diferença na expressão do gene *nifA* dos plasmídeos pMAKs entre si e com o gene cromossomal e exclui também possivelmente eventuais diferenças entre as células hospedeiras (FP10). As diferenças observadas em meio semi-sólido possivelmente ocorreram devido a diferenças fisiológicas (estágio de

crescimento) no momento do ensaio da nitrogenase.

Os plasmídeos pMAK1 - pMAK8 foram isolados de *E. coli* e clivados por enzimas de restrição, identificando-se cinco grupos de plasmídeos: I- pMAK1 e pMAK3, II- pMAK2 e pMAK7, III- pMAK4 e pMAK5, IV- pMAK6 e V- pMAK8. O isolamento dos plasmídeos a partir de *E. coli* facilitou a interpretação dos resultados de clivagem, pois esta estirpe de *E. coli* é *recA*⁻ e não contém qualquer plasmídeo. Ao contrário, a espécie *A. brasilense* possui quatro plasmídeos naturais (63), os quais poderiam contaminar as preparações dos plasmídeos recombinantes pMAK1 - pMAK8. Em vista disso, optou-se por trabalhar com *E. coli*, a fim de evitar que o perfil de clivagem dos plasmídeos naturais de *A. brasilense* se confundisse com o perfil de clivagem dos plasmídeos de interesse.

O plasmídeo pMAK7 foi escolhido para análise mais pormenorizada por apresentar os fragmentos *EcoR* I de 5,25 kpb (Figura 8 e Tabela 6) e *Sal* I de 2,19 kpb (Figura 9 e Tabela 6) também presentes em quatro outros plasmídeos recombinantes (pMAK1, pMAK2, pMAK3 e pMAK6), bem como o fragmento *Sal* I de 2,59 kpb presente em todos os plasmídeos pMAKs (excetuando o pMAK8). Estes três fragmentos poderiam conter o gene *nifA*, por aparecerem repetitivamente nos diversos plasmídeos dos transconjugantes, mas ausentes no plasmídeo pMAK8 que é incapaz de complementar o mutante FP10, bem como no vetor pLAFR3. A banda representativa do fragmento de 2,59 kpb da clivagem *Sal* I foi considerada a de maior probabilidade de conter o gene *nifA* por estar presente

em todos os plasmídeos recombinantes presentes nos transconjugantes diazotróficos. Outro fragmento *Sal I*, de 3,16 kpb, também estava presente em outros cinco plasmídeos (excetuando pMAK4 e pMAK5), bem como no transconjugante incapaz de apresentar atividade nitrogenásica (pMAK8), indicando não ser um fragmento de interesse para a complementação do mutante FP10. Os fragmentos de 1,74 e 1,36 kpb da clivagem *Bgl II* / *Hind III*, apesar de presentes na maioria dos transconjugantes, foram encontrados também no plasmídeo pMAK8, sugerindo não conterem o gene *nifA*. A clivagem *Hind III*, por sua vez, não permitiu conclusões quanto à possível localização do gene *nifA*, por gerar apenas um a dois fragmentos de grande tamanho.

O pMAK7 apresentou um inserto de DNA de *A. brasilense* FP2 de aproximadamente 30,00 kpb (Tabela 7). A localização do gene *nifA* no inserto foi determinada por meio de clivagens com enzimas de restrição em sistemas simples e associados e por hibridização com sondas *nifA*-específicas.

O tamanho dos produtos de clivagem do pMAK7 foi estimado e utilizado na montagem do mapa de restrição (Figura 10). Assim, o fragmento *EcoR I* de 15,82 kpb foi posicionado ao lado do fragmento *EcoR I* de 5,25 kpb em decorrência de resultados de clivagem parcial que indicaram a presença de um fragmento *EcoR I* de aproximadamente 21,00 kpb. Esta determinação foi confirmada pelos resultados obtidos com sistemas de restrição composta. O fragmento *EcoR I* de 5,25 kpb entretanto, não apresentou sítios de clivagem para quatro das enzimas utilizadas, como constatado

pela permanência de uma banda intacta nessa região nos sistemas de clivagem composta contendo *EcoR* I. Entretanto, sítios únicos para *Sal* I e *Bgl* II foram encontrados nesse fragmento. A fim de estabelecer a posição relativa dos fragmentos *Bgl* II de 6,00 kpb e *EcoR* I de 5,25 kpb, clivagens *Bgl* II, *EcoR* I ou *Bgl* II / *EcoR* I foram analisadas através de eletroforese lenta e prolongada. Foi observado um fragmento *Bgl* II / *EcoR* I ligeiramente menor que o de *EcoR* I de 5,25 kpb e outro ligeiramente menor que o de *Bgl* II de 6,00 kpb, sugerindo que um dos sítios de reconhecimento *Bgl* II do fragmento de 6,00 kpb está no interior do fragmento *EcoR* I de 5,25 kpb, a poucos pares de base da extremidade. A localização dos fragmentos *EcoR* I de 1,62, 1,62, 1,39 e 0,83 kpb foi determinada pela análise de clivagens parciais com a enzima *EcoR* I. A posição relativa dos fragmentos foi obtida pela análise combinatória de fragmentos totalmente clivados que resultassem nos fragmentos parcialmente clivados. A análise dos produtos das clivagem *EcoR* I / *Xho* I confirmou a posição relativa desses fragmentos.

A existência dos fragmentos *Xho* I de 0,20 e 0,26 kpb foi sugerida pela análise de fragmentos de clivagem parcial de 3,67 e 3,73 kpb, cuja clivagem total leva ao aparecimento de um único fragmento de 3,47 kpb. Aqueles fragmentos não foram visualizados nas eletroforeses por serem muito pequenos e, conseqüentemente, ficarem mascarados pelo corante ou por se difundirem durante a eletroforese ou ainda por se encontrarem em baixas concentrações. A presença

desses fragmentos *Xho* I foi confirmada pela análise combinatória dos fragmentos *EcoR* I / *Xho* I. Convém lembrar que a corrida eletroforética foi interrompida antes que os fragmentos menores fossem eluídos, permitindo a visualização do fragmento de 0,20 kpb do padrão "1 kpb ladder", mesmo assim nenhum desses fragmentos *Xho* I (0,20 e 0,26 kpb) foi observado. Os fragmentos *Xho* I de 3,47 e 5,40 kpb foram colocados ao lado do fragmento de 0,26 kpb devido ao fragmento de aproximadamente 9,10 kpb visualizado em clivagem parcial. O fragmento *Xho* I de 43,75 kpb inclui o plasmídeo-vetor pLAFR3 e ambas extremidades do inserto, uma vez que não há sítio *Xho* I no vetor (223) e as extremidades contêm sítios híbridos *Sau*3A I / *Bam*H I.

Os fragmentos de 1,74 e 1,36 kpb da clivagem *Bgl* II / *Hind* III foram determinados como integrantes do pLAFR3, visto estarem presentes em todos os plasmídeos recombinantes analisados, pMAK1 a pMAK8. Os fragmentos *Bgl* II e *Bgl* II / *Hind* III correspondem ao sítio λ *cos* e ao fragmento contíguo, respectivamente. O mapa físico do plasmídeo pMAK7 (Figura 10) apresentou a localização dos sítios de restrição na região do vetor pLAFR3 em perfeita concordância com aquela publicada pelos construtores do plasmídeo-vetor (223).

A hibridização efetuada com o DNA-sonda contendo o domínio central do gene *nifA* de *H. seropedicae* mostrou que o gene *nifA* de *A. brasilense* poderia estar integralmente contido em fragmento *EcoR* I de 5,25 kpb, presente tanto no plasmídeo pMAK7 quanto no DNA cromossomal de *A. brasilense*.

FP2 (Figura 11).

Por outro lado, a hibridização com a porção C-terminal do *nifA* ocorreu nos fragmentos *EcoR* I de 5,25 e 26,63 kpb, indicando a possibilidade de um sítio de clivagem para a enzima *EcoR* I no interior do gene *nifA* (Figura 12). Desta forma, o fragmento de 26,63 kpb provavelmente conteria a porção final do gene, além de conter o vetor. A hibridização desse DNA-sonda *nifA* ocorreu intensamente com os fragmentos *EcoR* I de 5,25 kpb, *Bgl* II de 16,80 kpb e *Sal* I de 2,59 kpb e mais fracamente com os fragmentos *EcoR* I de 26,63 kpb, *Bgl* II de 6,00 kpb e *Sal* I de 3,16 kpb, sugerindo hibridização inespecífica para os últimos três fragmentos. Esse experimento mostrou que grande parte do gene *nifA* está localizado no fragmento *EcoR* I de 5,25 kpb, contido no fragmento *Bgl* II de 16,80 kpb. A banda de baixa intensidade observada no fragmento *EcoR* I de 26,63 kpb poderia ser decorrente de: 1) uma pequena porção do gene *nifA* contida nesse fragmento; 2) hibridizações inespecíficas ou 3) baixa homologia como geralmente observado em hibridizações interespecíficas. A última hipótese implicaria em baixa intensidade de hibridização também nos fragmentos *Bgl* II de 16,80 kpb e *EcoR* I de 5,25 kpb. As bandas de fraca intensidade foram consideradas inespecíficas e não afetaram nos resultados finais da análise das hibridizações.

Hibridização com a sonda *nifB* de *H. seropedicae* ocorreu intensamente com os fragmentos *EcoR* I de 5,25 e 26,63 kpb, *Bgl* II de 16,80 kpb e *Sal* I de 3,16 kpb e fracamente com o fragmento *Bgl* II de 6,00 kpb (Figura 13). A

hibridização com o fragmento *Bgl* II de 6,00 kpb foi considerada inespecífica por apresentar intensidade muito baixa. A alta intensidade da mancha na região *EcoR* I de 26,63 kpb indicou homologia verdadeira, possivelmente devido à presença do fragmento *EcoR* I de 5,25 kpb não clivado. A região correspondente ao fragmento *EcoR* I de 26,63 kpb parece conter também os fragmentos de 15,62 e 5,25 kpb não clivados e a correspondente ao fragmento *Bgl* II de 27,20 kpb provavelmente contém os fragmentos de 6,00 e 16,80 kpb não clivados.

As hibridizações efetuadas com os DNAs-sonda dos genes *nifA* e *nifB* de *H. seropedicae* comprovaram a presença desses genes no inserto do pMAK7. A presença desses genes no fragmento *EcoR* I de 5,25 kpb mostrou que, em *A. brasilense*, o gene *nifB* se encontra muito próximo do gene *nifA*, como ocorre em *H. seropedicae* e *K. pneumoniae*.

Os resultados de hibridização confirmaram a localização preliminar dos diversos fragmentos proposta no mapa físico de restrição do pMAK7. A determinação do tamanho dos fragmentos permitiu-nos verificar quais os pedaços de DNA que se ladelam no inserto intacto. Este aspecto deve ser observado pois as hibridizações ocorreram, algumas vezes, com mais de um fragmento de DNA clivado, fato que só permitiria a funcionalidade dos genes se estes fossem contíguos.

Os resultados permitiram a localização de grande parte dos genes *nifA* e *nifB* nos fragmentos *EcoR* I de 5,25 kpb e *Bgl* II de 16,8 kpb. Os genes *nifA* e *nifB* estão

localizados, portanto, no fragmento *EcoR* I de 5,25 kpb, embora a extremidade N-terminal ou promotor do gene *nifA* possa estar no fragmento de 15,62 kpb. O plasmídeo pMAK8, apesar de ser incapaz de complementar os mutantes *nifA*⁻ de *A. brasilense* (FP10), possivelmente contém o gene *nifB* pois possui o fragmento *Sal* I de 3,16 kpb (Tabela 6), o qual está presente no plasmídeo pMAK7 e que hibridiza com o DNA-sonda contendo o gene *nifB*.

A presença do gene *nifB* e a averiguação de sua funcionalidade foram confirmadas através da transferência do plasmídeo pMAK7 para o mutante *K. pneumoniae* 50581 (*nifB*⁻). A presença do plasmídeo pMAK7 nos transformantes, após confirmada eletroforeticamente indicou ser suficiente para complementar a mutação. A complementação, entretanto, atingiu níveis de aproximadamente 18% da atividade nitrogenásica observada para a estirpe selvagem de *K. pneumoniae* M5a1 (*Nif*⁺). O baixo nível de complementação do mutante *nifB* de *K. pneumoniae* (50581) pelo gene *nifB* de *A. brasilense* é possivelmente devido a diferenças interespecíficas entre os produtos dos genes *nifB* e seus possíveis sítios de interação ou ainda a diferenças entre os produtos dos genes ativadores (*NifA*) da transcrição do gene *nifB*. A homologia interespecífica foi, porém, suficiente para resultar em significativa capacidade diazotrófica em relação àquela observada no mutante *K. pneumoniae* 50581 (*nifB*⁻). Os resultados (Tabela 12) mostraram que o gene *nifB* está presente e ativo no plasmídeo pMAK7.

A fim de investigar a presença de outros genes *nif*

e/ou de genes regulatórios envolvidos na fixação de nitrogênio no plasmídeo pMAK7, o DNA circular foi submetido à hibridização com o DNA-sonda contendo o operon *nifHDK* de *A. brasilense*. Não houve qualquer hibridização, apesar do emprego de genes *nifHDK* da mesma estirpe de *A. brasilense*. As condições de hibridização foram de alta estringência com o intuito de possibilitar a detecção de seqüências de DNA altamente homólogas aos genes *nifHDK* de *A. brasilense*. A hibridização poderia ser considerada obrigatória se os genes estivessem presentes no inserto, mesmo sob condições de alta estringência, visto que o DNA-sonda dos genes *nifHDK* e o inserto contido no plasmídeo pMAK7 são de mesma origem. O elevado grau de homologia interespecífica que os genes *nifHDK* apresentam não permitiria explicar a ausência de hibridização como advinda de erros nas condições de estringência empregadas. Dessa forma, concluímos que os genes *nifHDK* não estão presentes no plasmídeo pMAK7.

O plasmídeo pMAK7 foi incapaz de complementar a mutação *nifHDK*⁻ presente em *A. brasilense* estirpe FP3, confirmando a ausência destes genes no pMAK7, como previamente revelado pelos experimentos de hibridização com a sonda específica.

Da mesma forma, o plasmídeo pMAK7 foi incapaz de complementar os mutantes *ntrC*⁻ de *A. brasilense* FP8 e FP9 o que sugeriu a ausência do gene *ntrC* nesse plasmídeo. Os mutantes FP8 e FP9 foram classificados como mutantes regulatórios *ntrC*⁻ (192) por serem complementados pelo gene *ntrC* de *K. pneumoniae* contido no plasmídeo pGE10 ou pelo

gene *nifA* de *K. pneumoniae* expresso constitutivamente no plasmídeo pCK3 (79, 192). O gene *nifA* só é capaz de complementar mutações *ntrC*⁻ (142, 163) quando expresso constitutivamente uma vez que sua expressão é regulada pela proteína NtrC (163).

Os resultados sugeriram semelhanças na organização *nif* de *A. brasilense* e *K. pneumoniae* aonde os genes reguladores específicos (*nifA* e *nifL*) do sistema não se encontram agrupados aos genes do sistema geral de regulação do metabolismo de nitrogênio (*ntrC*, *ntrA* e *ntrB*). Por outro lado, nossos resultados confirmaram que, contrariamente ao verificado para *K. pneumoniae*, os genes *nifA* e *nifB* de *A. brasilense* não estão próximos ao operon *nifHDK* (76).

A estirpe *A. brasilense* FP10 foi recentemente utilizada para isolar o gene *nifA* de *H. seropedicae*. O gene *nifA* de *H. seropedicae* foi capaz de complementar a mutação daquela estirpe (221), indicando homologia entre as duas espécies, inicialmente incluídas no mesmo gênero (9). Os genes *nifA* e *nifB* de *H. seropedicae* foram clonados, mapeados e seqüenciados (221). Aqueles experimentos indicaram a possibilidade de utilização dos genes *nifA* e *nifB* dessa estirpe como DNAs-sonda para nossos experimentos de hibridização, bem como serviram como mais uma comprovação de que a incapacidade diazotrófica de *A. brasilense* estirpe FP10 é decorrente de mutação no gene *nifA*. Adicionalmente, nossos resultados confirmaram a organização contígua dos genes *nifL*, *nifA* e *nifB*, os quais, por sua vez, encontram-se distanciados dos genes *nifHDK*, *ntrC* e *ntrAB* de *A. brasilense*.

(76), assemelhando-se à descrita anteriormente para *H. seropedicae* (221).

O mutante *A. brasilense* FP6 (FeMoco^-) também não foi complementado pelo plasmídeo pMAK7, sugerindo a ausência de outros genes, que não o *nifB*, envolvidos na síntese do cofator. O gene *nifB*, por sua vez, apesar de envolvido na biossíntese do cofator, não foi capaz de complementar o mutante FeMoco^- de *A. brasilense* sem a presença de outros genes (110, 201). A mutação de *A. brasilense* FP6, não bem caracterizada ainda, deve envolver outro gene responsável pela biossíntese do cofator que não o gene *nifB*.

O transconjugante *A. brasilense* FP10 (pMAK7) foi testado para o crescimento em meio contendo NH_4Cl e glutamato, apresentando crescimento semelhante ao da estirpe selvagem. A adição de NH_4^+ a culturas de *A. brasilense* fixando nitrogênio causa inativação reversível da nitrogenase (109, 154, 206). A atividade da nitrogenase desse transconjugante foi totalmente inibida por amônia ("switch-off"), como observado para a estirpe selvagem (FP2). Esses resultados indicaram que o carácter de fixação de nitrogênio não se expressou de forma constitutiva e que a expressão do gene *nifA* contido no plasmídeo pMAK7 estava sob controle (Figura 15).

A inibição da nitrogenase foi reversível sob baixas concentrações de amônia no transconjugante e na estirpe selvagem de *A. brasilense*, FP2 ("switch-on") (Figura 16). Essa inibição ocorre por modificação covalente da proteína-Fe (38, 137, 138, 152), disparada pelos íons

amônio. Essa modificação é revertida quando a amônia é esgotada em decorrência da assimilação metabólica pelas bactérias. Observou-se que, tanto no transconjugante quanto no tipo selvagem, a capacidade de fixar nitrogênio foi recuperada no mesmo instante, indicando uma mesma velocidade de metabolização da amônia (Figura 16).

Os transconjugantes de *A. brasilense* FP10 (pMAK1 ou pMAK7) não apresentaram atividade nitrogenásica quando crescidos em presença de amônia (10 mM) (Tabela 10). Por outro lado, o transconjugante FP10 (pCK3), que contém *nifA* de *K. pneumoniae* expresso constitutivamente (192), apresentou atividade nitrogenásica menor em presença de amônia, mas ainda assim maior que a observada nos transconjugantes *A. brasilense* (pMAK1 ou pMAK7) nas mesmas condições. Esses resultados indicam que o gene *nifA* dos plasmídeos pMAKs estão sob controle do promotor, não se expressando constitutivamente. Além disso, a expressão constitutiva do gene *nifA* carregado pelo plasmídeo pCK3 não é suficiente para permitir níveis elevados de fixação de nitrogênio em presença de amônia, sem que mutações nos genes *ntrC* ou *nifL* estejam presentes (142, 192).

Esta é a primeira descrição da clonagem de um gene *nifA* de *A. brasilense*, capaz de complementar o mutante *nifA*⁻ de *A. brasilense* (FP10). Além disso, os transconjugantes *A. brasilense* FP10 (pMAK1) e (pMAK7) apresentaram atividade nitrogenásica a 30°C e a 37°C (Tabela 11). Contrariamente, o transconjugante *A. brasilense* FP10 (pCK3) apresentou expressão *nif* a 30°C, mas não a 37°C. A expressão *nif* nos

transconjugantes *A. brasilense* FP10 (pCK3) não ocorre a 37°C devido à termossensibilidade do produto do gene *nifA* de *K. pneumoniae* contido no plasmídeo pCK3 (32, 192, 248). O produto do gene *nifA* de *A. brasilense*, portanto, é termoestável a 37°C. Investigações quanto aos fatores moleculares que conferem termoestabilidade ao produto do gene *nifA* de *A. brasilense* são de interesse.

Os resultados apresentados permitiram comprovar a existência do gene *nifA* em *A. brasilense* estirpe FP2 bem como algumas de suas propriedades fisiológicas. Experimentos de subclonagem seriam de grande valia para complementar a localização dos genes *nifA* e *nifB* no mapa físico apresentado na figura 10. Isolamos ainda diversos mutantes *A. brasilense* FP10 (pMAK7 *nifA* : *Tn5*) através de mutagenização sítio-dirigida com o transposon *Tn5* : 20 (transposon inserido no promotor do gene *lacZ*), os quais devem ainda ser caracterizados quanto à posição da inserção, permitindo a delimitação das regiões imprescindíveis para a atividade gênica do *nifA*. O seqüenciamento do gene *nifA*, bem como a inativação insercional por transposon poderiam facilitar a identificação das seqüências dos genes *nifA* codificantes do produto NifA estável a 37°C.

5 CONCLUSÕES

1 A restauração do fenótipo Nif^+ do mutante *Azospirillum brasilense* FP10 ($nifA^-$) foi possível mediante a complementação genética pelos plasmídeos recombinantes pMAK1-pMAK7.

2 O plasmídeo pMAK7 foi capaz de complementar a mutação $nifB^-$ de *Klebsiella pneumoniae* 50581. Por outro lado, o plasmídeo pMAK7 não foi capaz de complementar os mutantes FP3, FP8 e FP9 de *A. brasilense* e, portanto, é destituído dos genes $nifHDK$ e $ntrC$.

3 A presença dos genes $nifA$ e $nifB$ foi confirmada em um fragmento *EcoR* I de 5,25 kpb, através de hibridizações com DNAs-sonda de *Herbaspirillum seropedicae*.

4 Os transconjugantes *A. brasilense* FP10 (pMAK1) e (pMAK7) apresentaram repressão da atividade nitrogenásica em presença de NH_4^+ , confirmando a presença de promotor nif no sistema de genes de fixação de nitrogênio desse microrganismo.

5 O produto do gene $nifA$ de *A. brasilense* ao contrário do de *K. pneumoniae* é termoestável a 37°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALEF, K.; ARP, D. J.; ZUMFT, W. G. Nitrogenase switch-off by ammonia in *Rhodopseudomonas palustris*: loss under nitrogen deficiency and independence from the adenylylation of glutamine synthetase. *Arch. Microbiol.*, **130**: 138-42, 1981.
- 2 ANTHAMATTEN, D. & HENNECKE, H. Identification and functional analysis of *fixLJ*-like genes in *Bradyrhizobium japonicum*. In: GRESSHOFF, P. M.; ROTH, L. E.; STACEY, G. & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. Proc. 8th Intl. Congress Nitrogen Fixation. Knoxville, Chapman and Hall, 1990. p.508.
- 3 APPLEBY, C. A. Leghaemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**:443-78, 1984.
- 4 ARNOLD, W., RUMP, A., KLIPP, W., PRIEFER, U. B. & PÜHLER, A. Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Mol. Biol.*, **203**:715-38, 1988.
- 5 AUSTIN, S.; HENDERSON, N. & DIXON, R. Characterization of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogen-fixation regulatory proteins NifA and NifL "in vitro". *Eur. J. Biochem.*, **187**:353-60, 1990.

- 6 AUSTIN, S.; HENDERSON, N. & DIXON, R. A. Requirements for transcriptional activation "in vitro" of the nitrogen-regulated *glnA* and *nifLA* promoters from *Klebsiella pneumoniae*: dependence on activator concentration. *Mol. Microbiol.*, **1**: 92-100, 1987.

- 7 AUSUBEL, F. M.; BUIKEMA, W. J.; EARL, C. D.; KLINGENSMITH, J. A.; NIXON, B. T. & SZETO, W. W. Organization and regulation of *Rhizobium meliloti* and *Parasponia Bradyrhizobium* nitrogen fixation genes. In: EVANS, H. J., BOTTOMLEY, P. J. & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation Research Progress*. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.165-71.

- 8 BACHHAWAT, A. K. & GHOSH, S. Iron transport in *Azospirillum brasilense*: Role of the siderophore spirillobactin. *J. Gen. Microbiol.*, **133**: 1759-65, 1987.

- 9 BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L. & DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**: 86-93, 1986.

- 10 BARAK, R.; NUR, I. & OKON, Y. Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. *J. Appl. Bacteriol.*, **54**: 399-403, 1983.

- 11 BARAK, R.; NUR, I.; OKON, Y. & HENIS, Y. Aerotatic response of *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.*, **152**: 643-49, 1982.

- 12 BASHAN, Y.; LEVANDLY, H. & KLEIN, E. Evidence for weak active external adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.*, **132**: 3069-73, 1986.

- 13 BATUT, J.; DAVERAN-MINGOT, M-L.; DAVID, M.; JACOBS, J.;
GANERONE, A. M. & KAHN, D. *fixK*, a gene homologous
with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates
nitrogen fixation genes both positively and
negatively in *Rhizobium meliloti*. *EMBO J.*, **8**:
1279-86, 1989.

- 14 BEIJERINCK, M. W. *Azotobacter chroococcum* als
Indikatorwan de vruchtbaarheid van den grond.
K. Ned. Akad. Wet. Versl. Gewone Vergad Afd.
Natuurkd., **30**:431-8, 1922.

- 15 BEIJERINCK, M. W. Über ein *Spirillum*, welches
freien Stickstoffbinden Kann? *Zentrabl. Bakteriöl.*
Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 2, **63**:353-9,
1925.

- 16 BERGERSEN, F. J. Oxygen and the physiology of
diazotrophic microorganisms. In: VEEGER, C. & NEWTON,
W. E., eds. *Advances in Nitrogen Fixation Research*.
The Hague, Nijhoff/Junk Publishers, 1984. p. 171-80.

- 17 BETHESDA RESEARCH LABORATORIES. The catalogue of
products for molecular biology. Glasgow, 1988. 124 p.

- 18 BEYNON, J.; CANNON, M.; BUCHANAN-WOLLASTON, V. &
CANNON, F. The *nif* promoters of *Klebsiella pneumoniae*
have a characteristic primary structure. *Cell*, **34**:
665-71, 1983.

- 19 BIRNBOIM, H. & DOLY, J. A rapid alkaline extraction
procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucl. Acid. Res., **7**:1513-25, 1979.

- 20 BISHOP, P. E.; JARLENSKI, D. M. L. & HETHERINGTON,
D. R. Evidence for an alternative nitrogen fixation
system in *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Natl. Acad.*
Sci. USA, **77**:7342-6, 1980.

- 21 BISHOP, P. E.; JARLENSKI, D. M. L. & HETHERINGTON, D. R. Expression of an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **150**: 1244-51, 1982.
- 22 BODDEY, R. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* on the nitrogen assimilation of field-grown wheat *Plant and Soil*, **95**:109-21, 1986.
- 23 BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICALS. Genius nonradioactive DNA labelling and detection kit. Indianapolis, s. ed. n.p.
- 24 BOGUSZ, D.; HOUMARD, J. & AUBERT, J-P. Electron transport to nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. Purification and properties of the *nifJ* protein. *Eur. J. Biochem.*, **120**:421-6, 1981.
- 25 BOLIVAR, F.; RODRIGUEZ, R. L.; GREENE, P. J.; BETLACH, M. C.; HEYNEKER, H. L.; BOYER, H. W.; GROSA, J. H. & FALKOW, S. Construction and characterization of new cloning vehicles. II A multipurpose cloning system. *Gene*, **2**:95-113, 1977.
- 26 BOYER, H. W. & ROULLARD-DUSSOIX, D. Complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **41**:459-72, 1969.
- 27 BOZOUKLIAN, H. & ELMERICH, C. Nucleotide sequence of the *Azospirillum brasilense* Sp7 glutamine synthetase structural gene. *Biochimie*, **68**:1181-7, 1986.
- 28 BOZOUKLIAN, H.; FOGHER, C. & ELMERICH, C. Cloning and characterization of the *glnA* gene of *Azospirillum brasilense* Sp7. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, **137B**:3-18, 1986.

- 29 BRIGLE, K. E.; NEWTON, W. E. & DEAN, D. R. Complete Nucleotide Sequence of the *Azotobacter vinelandii*. Nitrogenase structural gene cluster. *Gene*, **37**:37-44, 1985.
- 30 BRUIJN, F. J. De & AUSUBEL, F. M. The Cloning and Characterization of the *glnF* (*ntrA*) gene of *Klebsiella pneumoniae* role in *glnF* (*ntrA*) in the regulation of nitrogen fixation (*nif*) and other nitrogen assimilating genes. *Mol. Gen. Genet.*, **192**: 342-53, 1983.
- 31 BRUIJN, F. J. De; PAWLOWSKI, K.; RATET, P.; HILGERT, U.; WONG, C. H.; MEYER Z. A. H. & SCHELL, J. Molecular genetics of nitrogen fixation by *Azorhizobium caulinodans* ORS571, the diazotrophic stem nodulation symbiotic of *Sesbania rostrata*. In: BOTHE, H.; BRUIJN, F. J. de & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation: hundred years after*. Proc. 7th Intl. Cong. on N₂-Nitrogen Fixation. Köln (Cologne), 1988. New York, Fisher, 1988. p.351-5.
- 32 BUCHANANN-WOLLASTON, V.; CANNON, M. C.; BEYNON, J. L. & CANNON, F. C. The role of the *nifA* gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*, **294**:776-8, 1981.
- 33 BUCK, M. Deletion analysis of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase promoter: Importance of spacing between conserved sequences around positions -12 and -24 for activation by *nifA* and *ntrC* (*glnG*) products. *J. Bacteriol.*, **166**:545-51, 1986.
- 34 BUCK, M.; CANNON, W. & WOODCOCK, J. Transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase promoters may involve DNA loop formation. *Mol. Microbiol.*, **1**:243-9, 1987.

- 35 BUCK, M.; KHAN, H. & DIXON, R. A. Site-directed mutagenesis of the *Klebsiella pneumoniae* *nifL* and *nifH* promoters and "in vivo" analysis of promoter activity. *Nucl. Acids. Res.*, **13**:7621-38, 1985.
- 36 BUCK, M.; MILLER, S.; DRUMMOND, M. & DIXON, R. Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature*, **320**:374-8, 1986.
- 37 BUCK, M.; WOODCOCK, J.; CANNON, W.; MITCHENALL, L. & DRUMMOND, M. Positional requirements for the function of *nif*-specific upstream activator sequences. *Mol. Gen. Genet.*, **210**:140-1, 1987.
- 38 BUENO, R.; PAHEL, G. & MAGASANIK, B. Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **164**:818-22, 1985.
- 39 BUIKEMA, W. J.; KLINGENSMITH, J. A.; GIBBONS, S. L. & AUSUBEL, F. M. Conservation of structure and location of *Rhizobium meliloti* and *Klebsiella pneumoniae* *nifB* genes. *J. Bacteriol.*, **169**:1120-6, 1987.
- 40 BUIKEMA, W. J.; SZETO, W. W.; LEMLEY, P. V.; ORME-JOHNSON, W. H. & AUSUBEL, F. M. Nitrogen fixation specific regulatory genes of *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* share homology with the general nitrogen regulatory gene *ntrC* of *Klebsiella pneumoniae*. *Nucl. Acids. Res.*, **13**:4539-55, 1985.
- 41 BURTON, G. W. & INGOLD, K. U. β -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, **224**:589-73, 1984.
- 42 CANNON, F. C. Genetic studies with diazotrophs. In: BERGERSEN, F. J., ed. *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. England, John Wiley & Sons, ARC Unit of Nitrogen Fixation. p.367-413, 1980.

- 43 CASADABAN, M. & COHEN, S. N. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **138**:179-207, 1980.
- 44 CHEN, J-S.; WANG, S-Z. & JOHNSON, J. L. Nitrogen fixation genes of *Clostridium pasteurianum*. In: GRESSHOFF, P. M.; ROTH, L. E.; STACEY, G. & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. Proc. 8th Intl. Congress Nitrogen Fixation. Knoxville, Chapman and Hall, 1990. p.483-90.
- 45 CHEN, Y-M.; BACKMAN, K. & MAGASANIK, B. Characterization of a gene, *glnL*, the product which is involved in the regulation of nitrogen utilization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **150**: 214-20, 1982.
- 46 CHISNELL, J. R.; PREMAKUMAR, R. & BISHOP, P. E. Purification of a second alternative nitrogenase from a *nifHDK* deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **170**:27-33, 1988.
- 47 CLARKE, L. & CARBON, J. A colony bank containning synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell*, **9**:91, 1976.
- 48 COLONNA-ROMANO, S.; SCHLÖTER, A.; ARNOLD, W.; PUHLER, A. & PRIEFER, U. B. A *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* protein homologous to *Escherichia coli* Fnr is involved in regulation of nitrogen fixation. In: GRESSHOFF, P. M.; ROTH, L. E.; STACEY, G. & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. Proc. 8th Intl. Congress Nitrogen Fixation. Knoxville, Chapman and Hall, 1990. p.525.

- 49 CORDEWENER, J.; HAAKER, H.; EWIJK, P. Van & VEEGER, C. Properties of the MgATP and MgADP binding sites on the Fe protein of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Eur. J. Biochem.*, **148**: 499-508, 1985.
- 50 DAS, A. & MISHRA, A. K. Effect of yeast extract, casamino acids, pepton & various L-amino acids on growth & acetylene reduction in *Azospirillum brasilense*. *Indian J. Experim. Biol.*, **20**:751-55, 1982.
- 51 DAS, A. & MISHRA, A. K. Utilization of fructose by *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.*, **29**: 1213-17, 1983.
- 52 DAVID, M.; DAVERAN, M. L.; BATUT, J.; DEDIEU, A.; DOMERGUE, O.; GHA, J.; HEDRTIG, C.; BOISTARD, P. & KAHN, D. Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell*, **54**:671-83, 1988.
- 53 DAY, J. M. & DÖBEREINER, J. Physiological aspects of N_2 -fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil. Biol. Biochem.*, **8**:45-50, 1976.
- 54 DEISTUNG, J.; CANNON, F. C.; CANNON, M. C.; HILL, S. & THORNELEY, R. N. F. Electron-transfer to nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae nifF* gene cloned and the gene product, a flavodoxin purified. *Biochem. J.*, **231**:743-53, 1985.
- 55 DeLEO, A. B. & MAGASANIK, B. Identification of the structural gene for glutamine synthetase in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **121**:313-9, 1975.

- 56 DILWORTH, M. J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Acta*, 127:285-94, 1966.
- 57 DILWORTH, M. J.; EADY, R. R.; ROBSON, R. L. & MILLER, R. W. Ethane formation from acetylene as a potential test for vanadium nitrogenase "in vivo". *Nature*, 327: 167-8, 1987.
- 58 DITTA, G.; STANFIELD, S.; CORBIN, D. & HELINSKI, D. R. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:7347-51, 1980.
- 59 DITTA, G.; VIRTIS, E.; PALOMARES, A. & KIM, C-H. The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated. *J. Bacteriol.*, 169:3217-23, 1987.
- 60 DIXON, R. A. Genetic regulation of nitrogen fixation. In: COLE, J. A. & FERGUSON, S., eds. *The nitrogen and sulphur cycles*. Society for General Microbiology Symposium 42. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1987. p.417-38.
- 61 DIXON, R. A. The genetic complexity of nitrogen fixation. *J. Gen. Microbiol.*, 130:2745-55, 1984.
- 62 DIXON, R. A. & POSTGATE, J. R. Transfer of nitrogen fixation genes by conjugation in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* (London), 234:47-8, 1971.
- 63 DÖBEREINER, J. & PEDROSA, F. O. *Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants*. Madison, Science Tech. Publishers, 1987. 155p.

- 64 DRETZEN, G.; BELLARD, M.; SASSONE-CORSI, P. & CHAMBON, P. A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **112**:295-8, 1981.
- 65 DRUMMOND, M.; CLEMENTS, J.; MERRICK, M. & DIXON, R. Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*, **301**:302-7, 1983.
- 66 DRUMMOND, M.; WHITTY, P. & WOOTTON, J. Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologues to other regulatory proteins. *EMBO J.*, **5**:441-7, 1986.
- 67 DRUMMOND, M. H. & WOOTTON, J. C. Sequence of *nifL* from *Klebsiella pneumoniae*: mode of action and relationship to two families of regulatory proteins. *Mol. Microbiol.*, **1**:37-44, 1988.
- 68 EADY, R. R. Enzymology of free-living diazotrophs. In: BROUGHTON, W. J. & PÜHLER, A., eds. *Nitrogen fixation*. Oxford, v. 4. Clarendon Press, 1986. p.1-49.
- 69 EADY, R. R. & SMITH, B. E. Physico-chemical properties of nitrogenase and its components. In: HARDY, R. W. F.; BOTTOMLEY, F. & BURNS, R. G., eds. *A treatise on dinitrogen fixation*. New York, John Wiley & Sons, 1979. p.399-490.
- 70 EADY, R. R.; ISSACK, R.; KENNEDY, G.; POSTGATE, J. R. & RATCLIFFE, H. D. Nitrogenase synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. Comparison of ammonium and oxygen regulation. *J. Gen. Microbiol.*, **104**:277-86, 1978.

- 71 EADY, R.; ROBSON, R. L.; RICHARDSON, T. H.; MILLER, R. W. & HAWKINS, M. The vanadium nitrogenase of *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.*, **244**:197-207, 1987.
- 72 EADY, R. R.; SMITH, B. E; COOK, K. A.; POSTGATE, J. R. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. Purification and properties of the component proteins. *Biochem. J.*, **128**:655-75, 1972.
- 73 EARL, C. D.; ROBSON, C. W. & AUSUBEL, F. M. Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti* *fixA*, *fixB*, *fixC* and *fixX* genes. *J. Bacteriol.*, **169**: 1127-36, 1987.
- 74 EBRIGHT, R. H. Proposed amino-acid base pair contacts for thirteen sequence-specific DNA-binding proteins. In: *Protein structure folding and desing*, Oxender, 1987. New York, Liss, 1987.
- 75 ELMERICH, G.; GALLIMAND, M.; VIEILLE, C.; DELORME, F. & ZAMAROCZY, M. Nitrogen fixation genes of *Azospirillum*. In: BOTHE, H.; de BRUIJN, F. J. & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation: hundred years after*. Proc. 7th Intl. Cong. on N≡Nitrogen Fixation. Köln (Cologne), 1988. New York, Fisher, 1988. p.327-31.
- 76 ELMERICH, G.; ZAMAROCZY, M.; VIEILLE, C.; DELORME, F.; ONYECIOA, I.; LIANG, Y. Y. & ZIMMER, W. *nif* and *nod* genes in *Azospirillum*. In: *Fifth International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-legumes*. Florence, 1990. p.9.
- 77 ESKEW, D. L.; FOCHT, D. D; TING, I. P. Nitrogen fixation, denitrification and pleomorphic growth in a highly pigmented *Spirillum lipoferum*. *Appl. Environ. Microbiol*, **34**:582-5, 1977.

- 78 ESPIN, G.; ALVAREZ-MORALES, A.; CANNON, F. G.; DIXON, R. A. & MERRICK, M. Cloning of the *glnA*, *ntrB* and *ntrC* genes of *Klebsiella pneumoniae* and studies of their role in regulation of the nitrogen fixation (*nif*) gene cluster. *Mol. Gen. Genet.*, **186**:518-24, 1982.
- 79 ESPIN, G.; ALVAREZ-MORALES, A. & MERRICK, M. Complementation analysis of *glnA*-linked mutations which affect nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.*, **184**:213-17, 1981.
- 80 EYERS, M.; VANDERLEYDEN, J. & Van GOOL, A. Attachment of *Azospirillum* to isolated plant cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, **49**:435-9, 1988.
- 81 FAHSOLD, R.; SINGH, M. & KLINGMULLER, W. Cosmid cloning of nitrogenase structural genes of *Azospirillum lipoferum*. In: KLINGMULLER, W., ed. *Azospirillum III: Genetics, Physiology, Ecology*. Berlin, Springer-Verlag. p.30-40, 1985.
- 82 FANI, R.; ALLOTTA, G.; BAZZICALUPO, M.; RICCI, F.; SCHIPANI, C. & POLSINELLI, M. Nucleotide sequence of the gene encoding the nitrogenase iron-protein (*nifH*) of *Azospirillum brasilense* and identification of a region controlling *nifH* transcription. *Mol. Gen. Genet.*, **220**:81-7, 1989.
- 83 FIGURSKI, D. H. & HELINSKI, D. R. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in "trans". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**:1648-52, 1979.

- 84 FILLER, W. A.; KEMP, R. M.; NE, J. C.; HAWKES, T. R.; DIXON, R. A. & SMITH, B. E. The *nifH* gene product is required for synthesis or stability of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase from *Klebsiella pneumoniae*. *Eur. J. Biochem.*, **160**:371-7, 1986.
- 85 FISCHER, H. M.; BRUDERER, T. & HENNECKE, H. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. *Nucl. Acids. Res.*, **16**:2207-24, 1988.
- 86 FISCHER, H. M. & HENNECKE, H. Direct response of *Bradyrhizobium japonicum* *nifA*-mediated *nif* gene regulation to cellular oxygen status. *Mol. Gen. Genet.*, **209**:621-6, 1987.
- 87 FOOR, F.; CEDERGREN, R. J.; STREICHER, S. L.; RHEE, S. G. & MAGASANIK, B. Glutamine synthetase of *Klebsiella aerogenes*: properties of *glnD* mutants lacking uridylyltransferase. *J. Bacteriol.*, **134**: 562-8, 1978.
- 88 FU, H.; HARTMANN, A.; LOWERY, R. G.; FITZMAURICE, W. P.; ROBERTS, G. P. & BURRIS, R. H. Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.*, **171**:4679-85, 1989.
- 89 FU, H.; FITZMAURICE, W. P.; LEHMAN, L. J.; ROBERTS, G. P. & BURRIS, R. H. Regulation of nitrogenase activity in azospirilla, herbaspirilla and acetobacter: and cloning of *draG* and *draT*-homologous genes of *A. lipoferum* SpBR17. In: BOTHE, H.; BRUIJN, F. J. & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen fixation: hundred years after*. Proc. 7th Intl. Cong. on N≡Nitrogen Fixation. Köln (Cologne), 1988. New York, Fischer, 1988. p.336.

- 90 GALIMAND, M.; VIELLE, C.; PERROUD, B.; ONYEOCHA, I. & ELMERICH, C. Advances in genetics of *Azospirillum brasilense* Sp7: use of *Tn5* mutagenesis for gene mapping and indentification. In: KLINGMULLER, W., ed. *Azospirillum IV: Genetics, Physiology, Ecology*. Berlin, Springer-Verlag, 1988. p.1-9.
- 91 GALLORI, E. & BAZZICALUPO, M. Effect of nitrogen components on nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 28: 35-8, 1985.
- 92 GAUTHIER, D. & ELMERICH, C. Relationship between glutamine synthetase and nitrogenase in *Spirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2:101-4, 1977.
- 93 GOLDBERG, I.; NADLER, L. & HOCHMAN, A. Mechanism of nitrogenase switch-off by oxygen. *J. Bacteriol.*, 169:874-9, 1987.
- 94 GOLDBERG, R.B. & HANAU, R. Relation between the adenylylation state of glutamine synthetase and the expression of other genes involved in nitrogen metabolism. *J. Bacteriol.*, 137:1282-9, 1979.
- 95 GOSINK, M.; FRANKLIN, N. & ROBERTS, G. Initial characterization of *nifX* and *nifY* mutants in *Klebsiella pneumoniae*. In: BOTHE, H.; BRUIJN, F. J. & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation: Hundred Years After*. Proc. 7th Intl. Cong. on N≡Nitrogen Fixation. Köln (Cologne), 1988. New York, Fischer, 1988. p.308.
- 96 GOSINK, M. M.; FRANKLIN, N. M. & ROBERTS, G. P. The product of the *Klebsiella pneumoniae nifX* is a negative regulator of the nitrogen fixation (*nif*) regulon. *J. Bacteriol.*, 172:1441-7, 1990.

- 97 GRÖNGER, P.; MANIAN, S. S.; REILANDER, H.; O'CONNEL, M.; PRIEFER, U. B. & PÜHLER, A. Organization and partial sequence of a DNA region of the *Rhizobium leguminosarum* symbiotic plasmid pRL6J1 containing the genes *fixABC*, *nifA*, *nifB* and a novel open reading frame. *Nucl. Acids. Res.*, **15**:31-49, 1987.
- 98 GUTH, J. W. & YOCH, D. C. Purification and Mn^{2+} activation of *Rhodospirillum rubrum* nitrogenase activating enzyme. *J. Bacteriol.*, **152**:714-21, 1982.
- 99 HAAKER, H. & KLUGKIST, J. The bioenergetics of electron transport to nitrogenase. *FEMS Microb. Rev.*, **46**: 57-71, 1987.
- 100 HAAKER, H.; BRAAKSMA, A.; CORDEWENER, J.; KLUGKIST, J.; WASSINK, H.; GRANDE, H.; EADY, R. & VEEGER, C. Iron-sulfide content and ATP binding properties of nitrogenase component II from *Azotobacter vinelandii*. In: VEEGER, C. & NEWTON, W. E., eds. *Advances in Nitrogen Fixation Research*. The Hague, Nijhoff/Junk Publishers, 1984. p.123-31.
- 101 HAAS, D. & HOLLOWAY. Chromosome mobilization by the plasmid R68.45: a tool in *Pseudomonas* genetics. *Mol. Gen. Genet.*, **158**:229-37, 1978.
- 102 HAGEMAN, R. V. & BURRIS, R. H. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 2699-702, 1978.
- 103 HALL, P. G. & KRIEG, N. R. Swarming of *Azospirillum brasilense* on solid media. *Can. J. Microbiol.*, **29**:1592, 1983.

- 104 HARDY, K. *Bacterial Plasmids*. In: COLE, J. A. & KNOWLES, C. J., eds. *Aspects of microbiology*, v.4. Surrey, Thomas Nelson & Sons Ltd., 1981. p.104.
- 105 HARTMANN, A. Iron acquisition properties of *Azospirillum* spp. In: BOTHE, H.; BRUIJN, F. De & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation: Hundred Years After*. Proc. 7th Intl. Cong. on N \equiv Nitrogen Fixation. Köln (Cologne), 1988. New York, Fischer, 1988. p.772.
- 106 HARTMANN, A. & BURRIS, R. H. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.*, **169**:944-8, 1987.
- 107 HARTMANN, A. & HUREK, T. Effect of carotenoid overproduction on oxygen tolerance of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7. *J. Gen. Microbiol.*, **134**:2449-55, 1988.
- 108 HARTMANN, A.; FU, H. & BURRIS, R. H. Influence of amino acids on nitrogen fixation ability and growth of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 87-93, 1988.
- 109 HARTMANN, A.; FU, H. & BURRIS, R. H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.*, **165**:864-70, 1986.
- 110 HAWKES, T. R. & SMITH, B. E. The inactive MoFe protein (NifB⁻-Kp1) of the nitrogenase from *nifB* mutants of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem. J.*, **223**: 783-92, 1984.
- 111 HAWKES, T. R.; McLEAN, P. A. & SMITH, B. E. Nitrogenase from *nifV* mutants of *Klebsiella pneumoniae* contains an altered form of the iron-molybdenum cofactor. *Biochem. J.*, **217**:317-21, 1984.

- 112 HERTIG, C.; LI, R. Y.; LOUARN, A-M.; GARNERONE, A-M.; DAVID, M.; BATUT, J.; KAHN, D. & BOISTARD, P. *Rhizobium meliloti* regulatory gene *fixJ* activates transcription of *R. meliloti nifA* and *fixK* genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **171**:1736-8, 1989.

- 113 HIGUTI, I. H. & PEDROSA, F. O. Mutant of *Azospirillum brasilense* Sp7 that over-produces catalase. In: EVANS, H. J.; BOTTOMLEY, P. J. & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation Research Progress*. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.532.

- 114 HILL, S. How is nitrogenase regulated by oxygen? *FEMS Microbiol. Rev.*, **54**: 111-30, 1988.

- 115 HILL, S. Influence of oxygen concentration on the colony type of *Derxia gummosa* grown on nitrogen-free media. *J. Gen. Microbiol.*, **67**:77-83, 1971.

- 116 HIRSCHMANN, J.; WONG, P-K.; SEI, K.; KEENER, J. & KUSTU, S. Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription "in vitro": evidence that the *ntrA* product is a factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 7525-9, 1985.

- 117 HOARE, S. & DAS, H. K. Expression from symbiotic promoters of *Rhizobium meliloti* in *Azotobacter vinelandii* and *Azospirillum brasilense*. *J. Biosciences*, **13**:317-21, 1988.

- 118 HOCHMAN, A.; REICH, I. & NADLER, V. Effect of oxygen on nitrogenase of *Rhodopseudomonas capsulata* and *Klebsiella pneumoniae*. In: EVANS, H. J.; BOTTOMLEY, P. J. & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation Research Progress*. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.442.

- 119 HOLTEL, A. & MERRICK, M. J. The *Klebsiella pneumoniae* P_{II} protein (*glnB* gene product) is not absolutely required for nitrogen regulation and is not involved in NifL-mediated *nif* gene regulation. *Mol. Gen. Genet.*, **217**:474-80, 1989.
- 120 HOWARD, K. S.; MCLEAN, P. A.; HANSEN, F. B.; LEMLEY, P. V.; KOBLAN, K. S. & ORME-JOHNSON, W. H. *Klebsiella pneumoniae nifM* gene product is required for stabilization and activation of nitrogenase iron protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **261**: 772-8, 1986.
- 121 HUALA, E. & AUSUBEL, F. M. The central domain of *Rhizobium meliloti nifA* is sufficient to activate transcription from the *R. meliloti nifH* promoter. *J. Bacteriol.*, **171**:3354-65, 1989.
- 122 HUNT, T. P. & MAGASANIK, B. Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG*, and *glnL*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**:8453-7, 1985.
- 123 HUREK, T.; REINHOLD, B.; FENDRIK, I. & NIEMANN, E-G. Root-zone specific oxygen tolerance of *Azospirillum* spp. and diazotrophic rods closely associated with kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 163-9, 1987.
- 124 IMPERIAL, J.; UGALDE, R. A.; SHAH, V. K. & BRILL, W. J. Role of *nifQ* gene in the incorporation of molybdenum into nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **158**:187-94, 1984.
- 125 IOANNADIS, I. & BUCK, M. Nucleotide sequence of the *Klebsiella pneumoniae nifD* gene and predicted aminoacid sequence of the subunit of nitrogenase MoFe protein. *Biochem. J.*, **247**:287-91, 1987.

- 126 JACOBITZ, S. & BISHOP, P. E. Factors regulating transcription of the structural genes for nitrogenase-2 in *Azotobacter vinelandii*. In: GRESSHOFF, P. M.; ROTH, L. E.; STACEY, G. & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. Proc. 8th Intl. Congress Nitrogen Fixation. Knoxville, Chapman and Hall, 1990. p.828.
- 127 JACOBSON, M. R.; BRIGLE, K. E.; BENNETT, L. T.; SETTERQUIST, R. A.; WILSON, M. S.; CASH, V. L.; BEYNON, J.; NEWTON, W. E. & DEAN, D. R. Physical and genetic map of the major *nif* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **171**:1017-27, 1989.
- 128 JACOBSON, M. R.; PREMAKUMAR, R. & BISHOP, P. E. Transcriptional regulation of nitrogen fixation by molybdenum nitrogenase in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **167**:480-6, 1986.
- 129 JAIN, D. K. & PATRIQUIN, D. G. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can. J. Microbiol.*, **31**:206-10, 1985.
- 130 JANSSEN, K. A. & MAGASANIK, B. Glutamine synthetase of *Klebsiella aerogenes*: genetic and physiological properties of mutants in the adenylylation system. *J. Bacteriol.*, **129**:993-1000, 1977.
- 131 JARA, P.; QUIVIGER, B.; LAURENT, P. & ELMERICH, C. Isolation and genetic analysis of *Azospirillum brasilense nif⁻* mutants. *Can. J. Microbiol.*, **29**: 968-72, 1983.

- 132 JAYAKUMAR, A.; SCHULMAN, I.; MacNEIL, D. & BARNES Jr., E. M. Role of the *Escherichia coli* *glnALG* operon in regulation of ammonium transport. *J. Bacteriol.*, **166**: 281-4, 1986.
- 133 JAYARAMAN, J.; COTMAN, C.; MAHLER, H. R. & SHARP, C. V. Biochemical correlation of respiratory deficiency. VII Glucose repression. *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**: 224-51, 1986.
- 134 JOERGER, R. D.; JACOBSON, M. R. & BISHOP, P. E. Two *nifA*-like genes required for expression of alternative nitrogenases by *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **171**:3258-67, 1989.
- 135 JOERGER, R. D.; JACOBSON, M. R.; PREMAKUMAR, R.; WOLFINGER, E. D. & BISHOP, P. E. Nucleotide sequence and mutational analysis of the structural genes (*anfHDGK*) for the second alternative nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **171**:1075-86, 1989.
- 136 JONES, B. L. & MONTY, K. J. Glutamine as a feed-back inhibitor of the *Rhodopseudomonas sphaeroides* nitrogenase system. *J. Bacteriol.*, **139**:1007-13, 1979.
- 137 JOUANNEAU, Y.; MEYER, C. & VIGNAIS, P. M. Regulation of nitrogenase activity through iron protein interconversion into an active and inactive form in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Biochem. Biophys. Acta.*, **749**: 318-28, 1983.
- 138 KANEMOTO, R. H. & LUDDEN, P. W. Effect of ammonia, darkness, and phenazine methosulfate on whole-cell nitrogenase activity and Fe protein modification in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.*, **158**:713-20, 1984.

- 139 KAPULNIK, Y.; FELDMAN, M.; OKON, Y. & HENIS, Y. Contribution of nitrogen fixed by *Azospirillum* to the N nutrition of spring wheat in Israel. *Soil Biol. Biochem.*, **17**:509-15, 1985.
- 140 KHAMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D. & KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res. Microbiol.*, **140**: 679-94, 1989.
- 141 KHAN, H.; BUCK, M. & DIXON, R. Deletion loop mutagenesis of the *nifL* promoter from *Klebsiella pneumoniae*: role of the -26 to -12 region in promoter function. *Gene*, **45**:281-8, 1986.
- 142 KIM, Y-M.; HIDAKA, M.; MASAKI, H.; BEPPU, T. & UOZUMI, T. Constitutive expression of nitrogenase system in *Klebsiella oxytoca* by gene targeting mutation to the chromosomal *nifLA* operon. *J. Biotech.*, **10**:293-302, 1989.
- 143 KLIPP, W. Organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*. In: GRESSHOFF, P. M.; ROTH, L. E.; STACEY, G. & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. Proc. 8th Intl. Congress Nitrogen Fixation. Knoxville, Chapman and Hall, 1990. p.467-74.
- 144 KLIPP, W.; MASEPOHL, B. & PÜHLER, A. Identification and mapping of nitrogen fixation genes of *Rhodobacter capsulatus*: duplication of a *nifA-nifB* region. *J. Bacteriol.*, **170**:693-9, 1988.

- 145 KREY, R.; SHARYPOVA, L.; KLIPP, W. & PUHLER, A. Isolation and characterization of oxygen tolerant *Rhizobium meliloti nifA* mutants. In: GRESSHOFF, P. M.; ROTH, L. E.; STACEY, G. & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. Proc. 8th Intl. Congress Nitrogen Fixation. Knoxville, Chapman and Hall, 1990. p.549.
- 146 KRIEG, N. R. & DÖBEREINER, J. Genus *Azospirillum*. In: HOLT, J. G. & KRIEG, N. R., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9ed. Baltimore, Williams & Wilkins Press, 1984. v.1. p.94-104.
- 147 KRINSKY, N. I. Carotenoid protection against oxidation. *Pure and Applied Chem.*, 51:649-60, 1979.
- 148 LAMM, R. B. & NEYRA, C. A. Characterization and cyst production of *Azospirilla* isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York-USA. *Can. J. Microbiol.*, 27: 1320-5, 1981.
- 149 LEWIN, B. *Genes IV*. Oxford, Oxford University Press, 1990. p.857.
- 150 LJUNGSTRÖM, E.; YATES, M.G. & NORDLUND, S. Purification of the activating enzyme for the Fe-protein of nitrogenase from *Azospirillum brasilense*. *Biochem. Biophys. Acta.*, 994:210-4, 1989.
- 151 LOWE, D. J.; THORNELEY, R. N. F. & SMITH, B. E. Nitrogenase. In: HARRISON, P.M., ed. *Metalloproteins, I* Metal proteins with redox roles. London, Macmillan Press. 1985. p.207-49.
- 152 LOWERY, R. G.; SAARI, L. L. & LUDDEN, P. W. Reversible regulation of the nitrogenase iron protein from *Rhodospirillum rubrum* by ADP-ribosylation "in vitro". *J. Bacteriol.*, 166:513-8, 1986.

- 153 LOWRY, O. M.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Mol. Chem.*, **193**:265-75, 1951.
- 154 LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P.; LOWERY, R. G.; FITZMAURICE, W. P.; SAARI, L. L.; LEHMAN, L.; LIES, D.; WOEHLER, D.; WIRT, H.; MURREL, S. A.; POPE, R. R. & KANEMOTO, R. H. Regulation of nitrogenase activity by reversible ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase. In: BOTHE, H.; BRUIJN, F. J. De & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation: Hundred Years After*. Proc. 7th Intl. Cong. on N_2 Nitrogen Fixation. Köln (Cologne), 1988. New York, Fischer, 1988. p. 157-62.
- 155 MacFARLANE, S. A. & MERRICK, M. Analysis of the *Klebsiella pneumoniae ntrB* gene by site-directed "in vitro" mutagenesis. *Mol. Microbiol.*, **1**:133-42, 1987.
- 156 MacNEIL, T.; MacNEIL, D. & TYLER, B. L. Fine-structure deletion map and complementation analysis of the *glnA-glnL-glnG* region in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **150**:1302-13, 1982.
- 157 MacNEIL, T.; ROBERTS, G. P.; MacNEIL, D. & TYLER, B. The products of *glnL* and *glnG* are bifunctional regulatory proteins. *Mol. Gen. Genet.*, **188**:325-33, 1982.
- 158 MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R. & DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *Ann. Acad. Bras. Cienc.*, **55**: 417-30, 1983.

- 159 MALIK, K. A. & ZAFAR, Y. Quantification of root associated nitrogen fixation in kallar grass as estimated by ^{15}N isotope dilution. In: MALIK, K. A., ed. *Proc. Intl. Symp. Nitrogen and the Environment*. Pakistan, Nuclear Institute for Agriculture and Biology, Faisalabad, 1985. p.161-71.
- 160 MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. & SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545p.
- 161 MARTÍNEZ-DRETS, G.; FABIANO, E. & CARDONA, A. Carbohydrate catabolism in *Azospirillum amazonense*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50:183-5, 1985.
- 162 MEERS, I. L.; TEMPEST, D. W. & BROWN, C. M. Glutamine (amide): 2-oxoglutarate amino transferase oxido redutase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 64:187-94, 1970.
- 163 MERRICK, M. J. Nitrogen control of *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*: involvement of the *ntrA* gene and analogies between *ntrC* and *nifA*. *EMBO J.*, 2: 39-44, 1983.
- 164 MERRICK, M. J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella* and *Azotobacter*. In: BOTHE, H.; BRUIJN, F. J. De & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation: Hundred Years After*. Proc. 7th Int. Cong. on $\text{N}\equiv\text{N}$ Nitrogen Fixation. Köln (Cologne), 1988. New York, Fischer, 1988. p.293-302.
- 165 MERRICK, M. J. & STEWART, W. D. P. Studies on the regulation and function of the *Klebsiella pneumoniae ntrA* gene. *Gene*, 35:297-303, 1985.

- 166 MERRICK, M. J.; FILSER, M.; KENNEDY, G. & DIXON, R. A. Polarity of mutations induced by insertion of transposons *Tn5*, *Tn7* and *Tn10* into the *nif* gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.*, **165**:103-11, 1978.
- 167 MERRICK, M. J.; GIBBINS, J. R. & POSTGATE, J. R. A rapid and efficient method for plasmid transformation of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **133**:2053-7, 1987.
- 168 MICHIELS, K., VANDERLEYDEN, J. & Van GOOL, A. *Azospirillum* - plant root associations: A review. *Biol. Fertil. Soils*, **8**: 356-8, 1989.
- 169 MINCHIN, S.D.; AUSTIN, S. & DIXON, R.A. Transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae nifLA* promoter by NtrG is face-of-the-helix dependent and the activator stabilizes the interaction of sigma 54-RNA polymerase with the promoter. *EMBO J.*, **8**: 3491-9, 1989.
- 170 MOORE, E. R. B.; NORROD, E. P. & JURTSCHUK, P. Superoxide dismutases of *Azotobacter vinelandii* and aerobic, free-living nitrogen-fixing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **24**:261-5, 1984.
- 171 NEES, D. W.; STEIN, P. A. & LUDWIG, R. A. The *Azorhizobium caulinodans nifA* gene: identification of upstream-activating sequences including a new element, the "anaerobox". *Nucl. Acids. Res.*, **16**: 9839-53, 1988.
- 172 NEWTON, W. E.; GHELLER, S. F.; FELDMAN, B. J.; DUNHAM, W. R. & SCHULTZ, F. A. Isolated iron-molybdenum cofactor of nitrogenase exists in multiple forms in its oxidized and semi-reduced states. *J. Biol. Chem.*, **264**:1924-7, 1989.

- 173 NINFA, A. J. & MAGASANIK, B. Covalent modification of *glnG* product, NR_I , by the *glnL* product, NR_{II} , regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 5909-13, 1986.

- 174 NUR, I.; OKON, Y. & HENIS, Y. Effect of dissolved oxygen tension on production of carotenoids, $poli-\beta$ -hidroxybutyrate, succinate oxidase and superoxide dismutase by *Azospirillum brasilense*. *J. Gen. Microbiol.*, **122**: 27-32, 1981.

- 175 OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends. Biotechn.*, **3**:223-8, 1985.

- 176 OKON, Y.; ALBRECHT, S. L. & BURRIS, R. H. Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.*, **128**:592-7, 1976.

- 177 OKON, Y.; ALBRECHT, S. L. & BURRIS, R. H. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.*, **127**:1248-54, 1976.

- 178 OKON, Y.; CAKMAKCI, L.; NURS, I. & GHET, I. Aerotaxis and chemotaxis of *Azospirillum brasilense*: A note. *Microbiol. Ecology*, **6**:277-83, 1980.

- 179 OKON, Y.; HOUGHINS, J. P.; ALBRECHT, S. L. & BURRIS, R. H. Growth of *Spirillum lipoferum* at constant partial pressures of oxygen, and the properties of its nitrogenase in cell-free extracts. *J. Gen. Microbiol.*, **98**:87-93, 1977.

- 180 OKON, Y.; NUR, I. & HENIS, Y. Effect of oxygen concentration on electron transport components and microaerobic properties of *Azospirillum brasilense*. In: KLINGMULLER, W., ed. *Azospirillum II*: Genetics, Physiology, Ecology. Basel, Birkhäuser-Verlag, 1983. p.115-26.
- 181 OLIVEIRA, R. G. B. & DROZDOWICZ, A. Are *Azospirillum* bacteriocins produced and active in soil? In: KLINGMULLER, W., ed. *Azospirillum IV*: Genetics, Physiology, Ecology. Berlin, Springer-Verlag, 1988. p.101-8.
- 182 ORME-JOHNSON, W. H. Molecular basis of biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Biophys. and Biophys. Chem.* , **14**:419-59, 1985.
- 183 OW, D. W. & AUSUBEL, F. M. Regulation of nitrogen metabolism genes by *nifA* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* (London), **301**:307-13, 1983.
- 184 OW, D. W.; XIONG, Y.; GU, Q. & SHEN, S-C. Mutational analysis of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase promoter: sequences essential for positive control by *nifA* and *ntrC* (*glnG*) products. *J. Bacteriol.* , **161**: 869-74, 1985.
- 185 PAHEL, G.; ZELENETZ, A. D. & TYLER, B. M. *gltB* gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* , **133**: 139-48, 1978.
- 186 PAREJKO, R. A. & WILSON, P. W. Regulation of nitrogenase synthesis by *Klebsiella pneumoniae*. *Can. J. Microbiol.* , **16**:681-5, 1970

- 187 PAU, R. N.; MITCHENALL, L. A & ROBSON, R. L. Genetic evidence for an *Azotobacter vinelandii* nitrogenase lacking molybdenum and vanadium. *J. Bacteriol.*, **171**: 124-9, 1989.
- 188 PAUL, W. & MERRICK, M. The nucleotide sequence of the *nifM* gene of *Klebsiella pneumoniae* and identification of a new *nif* gene: *nifZ*. *Eur. J. Biochem.*, **170**: 259-65, 1987.
- 189 PAUL, W. & MERRICK, M. The roles of the *nifW*, *nifZ* and *nifM* genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Eur. J. Biochem.*, **178**:675-82, 1989.
- 190 PEDROSA, F. O. Physiology, biochemistry and genetics of *Azospirillum* and other root-associated nitrogen-fixing bacteria. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*, **6**:345-84, 1988.
- 191 PEDROSA, F. O. & YATES, M. G. Nif mutants of *Azospirillum brasilense*: evidence for a *nifA*-type regulation. In: KLINGMULLER, W., ed. *Azospirillum II: Genetics, Physiology, Ecology*. Basel, Birkhäuser-Verlag, 1983. p.66-77.
- 192 PEDROSA, F. O. & YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. *FEMS Microbiol. Lett.*, **23**:95-101, 1984.
- 193 PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; MACHADO, H. B.; RIGO, L. U. & FUNAYAMA, S. Regulation of *nif* genes expression in *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*. In: SKINNER, F. A.; BODDEY, R. M. & FENDRIK, I., eds. *Nitrogen Fixation with non-legumes*. Kluwer Academic Publishers, 1989. p.155-63.

- 194 PERROUD, B.; BANDHARI, S. K. & ELMERICH, C. The *nifHDK* operon of *Azospirillum brasilense* Sp7. In: KLINGMULLER, W., ed. *Azospirillum III: Genetics, Physiology, Ecology*. Berlin, Springer-Verlag, 1985. p.10.
- 195 PIENKOS, P. T.; BODMER, T. & TABITA, F. R. Oxygen inactivation and recovery nitrogenase activity in cyanobacteria. *J. Bacteriol.*, **153**:182-90, 1983.
- 196 POSTGATE, J. R. *The fundamentals of nitrogen fixation*. Cambridge, Cambridge University Press, 1982. p.252.
- 197 QUIVIGER, B.; FRANCHE, G.; LUTFALLA, G.; HASELHORN, R. & ELMERICH, C. Cloning of a nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of *Azospirillum brasilense*. *Biochimie*, **64**:495-502, 1982.
- 198 RATET, P.; PAWLOWSKI, K.; SCHELL, J. & BRUIJN, F. J. De The *Azorhizobium caulinodans* nitrogen fixation regulatory gene, *nifA*, is controlled by the cellular nitrogen and oxygen status. *Mol. Microbiol.*, **3**: 825-38, 1989.
- 199 REINHOLD, B.; HUREK, T. & FENDRIK, I. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a diazotroph associated with roots of *Leptochloa fusca* (Linn.) Kunth. In: EVANS, H. J.; BOTTOMLEY, P. J. & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation Research Progress*. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.427.
- 200 RIEDEL, G. E.; AUSUBEL, F. M. & CANNON, F. C. Physical map of chromosomal nitrogen fixation (*nif*) genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**:2866-70, 1979.

- 201 ROBERTS, G. P.; MacNEIL, T.; MacNEIL, D. & BRILL, W. J. Regulation and characterization of protein products coded by the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **136**: 267-79, 1978.
- 202 ROBINSON, A. C.; DEAN, D. R. & BURGESS, B. K. Iron-molybdenum cofactor biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* requires the iron protein of nitrogenase. *J. Biol. Chem.*, **262**:14327-32, 1987.
- 203 ROBSON, R. L. Characterization of an oxygen-stable nitrogenase complex isolated from *Azotobacter chroococcum*. *Biochem. J.*, **181**:569-75, 1979.
- 204 ROBSON, R. L. & POSTGATE, J. R. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Microbiol.*, **34**: 183-1207, 1980.
- 205 ROBSON, R. L.; CHESSHYRE, J. A.; WHEELER, C.; JONES, R.; WOODLEY, P. E. & POSTGATE, J. R. Genome size and complexity in *Azotobacter chroococcum*. *J. Gen. Microbiol.*, **130**:1603-12, 1984.
- 206 SAARI, L. L.; TRIPLETT, E. W. & LUDDEN, P. W. Purification and properties of the activating enzyme for iron protein of nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.*, **259**:15502-8, 1984.
- 207 SADASIVAN, L. & NEYRA, C. A. Cyst production and brown pigment formulation in aging cultures of *Azospirillum*. *J. Bacteriol.*, **169**:1670-7, 1987.

- 208 SANTERO, E.; HOOVER, T.; KEENER, J. & KUSTU, S.
"In vitro" activity of the nitrogen fixation
regulatory protein NifA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,
86: 7346-50, 1989.
- 209 SANTERO, E.; TOUKDARIAN, A.; HUMPHREY, R. &
KENNEDY, C. Identification and characterization
of two nitrogen fixation regulatory regions,
nifA and *nfrX*, in *Azotobacter vinelandii* and
A. chroococcum. *Mol. Microbiol.*, 2:303-14, 1988.
- 210 SCHERINGS, G.; HAAKER, H.; WASSINK, H. & VEEGER, C. On
the formation of an oxygen-tolerant three-component
nitrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*. *Eur.*
J. Biochem., 135:591-9, 1983.
- 211 SCHOLLHORN, R. & BURRIS, R. H. Acetylene as a
competitive inhibitor of N_2 fixation. *Proc. Natl.*
Acad. Sci. USA., 58 :213-6, 1967.
- 212 SCHRANK, I. S.; ZAHA, A.; ARAÚJO, E. F. de &
SANTOS, D. S. Construction of a gene library
from *Azospirillum brasilense* and characterization
of a recombinant containing the *nif* structural
genes. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 20:321-30,
1987.
- 213 SETTERQUIST, R.; BRIGLE, K.; BEYNON, J.; CANNON, M.;
CANNON, F. & DEAN, D. Nucleotide sequence of
the *nifTYEN* regions from *Azotobacter vinelandii*
and *Klebsiella pneumoniae*. In: BOTHE, H.; BRUIJN,
F. J. De; NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation:*
Hundred Years After. Proc. 7th Intl. Cong. on
 $N\equiv N$ Nitrogen Fixation. Köln (Cologne), 1988. New York,
Fischer, 1988. p.324.

- 214 SHAH, V. K.; HOOVER, T. R.; IMPERIAL, J.; PAUSTIAN, T. D.; ROBERTS, G. P. & LUDDEN, P. W. Role of the *nif* products and homocitrate in the biosynthesis of iron-molybdenum cofactor. In: BOTHE, H.; BRUIJN, F. J. De & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation: Hundred Years After*. Proc. 7th Intl. Cong. on N≡Nitrogen Fixation. Köln (Cologne), 1988. New York, Fischer, 1988. p.115-20.
- 215 SHAW, D. J.; RICE, D. W. & GUEST, J. R. Homology between Gap and Fnr, a regulator of anaerobic respiration in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **166**: 241-7, 1982.
- 216 SHEN, S-C.; XUE, Z-T.; KONG, Q-T. & WU, Q-L. An open reading frame upstream from the *nifH* gene of *Klebsiella pneumoniae*. *Nucl. Acids Res.*, **11**:4241-50, 1983.
- 217 SINGH, M.; TRIPATHI, A. K. & KLINGMÜLLER, W. Identification of a regulatory *nifA* type gene and physical mapping of cloned new *nif* regions of *Azospirillum brasilense*. *Mol. Gen. Genet.*, **219**: 235-40, 1989.
- 218 SMITH, B. E.; BUCK, M.; EADY, R. R.; LOWE, D. J.; THORNELEY, R. N. F.; ASHBY, G.; DEISTUNG, J.; ELDRIDGE, M.; FISHER, K.; GORMAL, C.; IOANNIDIS, I.; KENT, H.; ARBER, J.; FLOOD, A.; GARNER, C. D.; HASNAIN, S. & MILLER, R. Recent studies on the structure and function of molybdenum nitrogenase. In: BOTHE, H.; BRUIJN, F. J. De & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation: Hundred Years After*. Proc. 7th Intl. Cong. on N≡Nitrogen Fixation. Köln (Cologne), 1988. New York, Fischer, 1988. p.91-100.

- 219 SMITH, B. E., CAMPBELL, F., EADY, R. R.; ELDRIDGE, M.; FORD, L. M.; HILL, S., KAVANAGH, E. P.; LOWE, D. J.; MILLER, R. W.; RICHARDSON, T. H., ROBSON, R. L.; THORNELEY, R. N. F. & YATES, M. G. Biochemistry of nitrogenase and physiology of related metabolism. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 317:131-46, 1987.
- 220 SONG, S-D.; HARTMANN, A. & BURRIS, R. H. Purification and properties of the nitrogenase of *Azospirillum amazonense*. *J. Bacteriol.*, 164:1271-7, 1985.
- 221 SOUZA, E. M. Clonagem, caracterização e seqüenciamento dos genes *nifA* e *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae*. Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Bloquímica da UFPR. Curitiba, 1990. 264p.
- 222 STADTMAN, E. R.; GINSBURG, A.; GIARDI, J. E.; YEH, J.; HENNING, S. B. & SHAPIRO, B. M. Multiple molecular forms of glutamine synthetase produced by enzyme adenylylation and deadenylylation reactions. *Adv. Enz. Regul.*, 8:99-118, 1970.
- 223 STASKAWICZ, B.; DAHLBECK, D.; KEEN, N. & NAPOLI, C. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J. Bacteriol.*, 169:5789-94, 1987.
- 224 STEINBAUER, J.; WENZEL, W. & HESS, D. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *Klebsiella pneumoniae nifK* gene coding for the β -subunit of nitrogenase MoFe-protein. *Nucl. Acids. Research*, 16:7199, 1988.
- 225 STEWART, W. D. P. Some aspects of structure and function in N_2 -fixing cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 34:497-536, 1980.

- 226 STIGTER, J.; PAWLOWSKI, K.; KLOSSE, U.; RATET, P. & BRUIJN, F. J. De. Regulation of *nifA* expression in *Azorhizobium caulinodans* ORS571. In: GRESSHOFF, P. M.; ROTH, L. E.; STACEY, G. & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. Proc. 8th Intl. Congress Nitrogen Fixation. Knoxville, Chapman and Hall, 1990. p.587.
- 227 STUDER, D.; GLOUDEMAN, S. T.; FRANSSEN, H. J.; FISHER, H.-M.; BISSELING, T. & HENNECKE, H. Involvement of the bacterial nitrogen fixation regulatory gene (*nifA*) in control of nodule-specific host-plant gene expression. *Eur. J. Cell. Biol.*, 45:177-84, 1987.
- 228 SUNDARESAN, V. & AUSUBEL, F. M. Nucleotide sequence of the gene coding for the nitrogenase iron protein from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biol. Chem.*, 256: 2808-12, 1981.
- 229 SZETO, W. W.; ZIMMERMAN, J. L.; SUNDARESAN, V. & AUSUBEL, F. M. A *Rhizobium meliloti* symbiotic regulatory gene. *Cell*, 36:1035-43, 1984.
- 230 SZETO, W. W.; NIXON, B. T.; RONSON, C. W. & AUSUBEL, F. M. Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti* *ntrC* gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activating nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. *J. Bacteriol.*, 169:1423-32, 1987.
- 231 TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R. & DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*, 24:967-80, 1978.

- 232 THÖNY, B.; ANTHAMATTEN, D. & HENNECKE, H.
Dual control of the *Bradyrhizobium japonicum*
symbiotic nitrogen fixation regulatory operon
fixR nifA: analysis of "cis" and "trans"
acting elements. *J. Bacteriol.*, **171**:4182-9,
1989.
- 233 THORNELEY, R. N. F., BERGSTRÖM, N. H. J.; EADY,
R. R. & LOWE, D. J. Vanadium nitrogenase from
Azotobacter chroococcum MgATP-dependent electron
transfer with the protein complex. *Biochem. J.*, **257**:
789-94, 1989.
- 234 THORNELEY, R. N. F. & CORNISH-BOWDEN, A.
Kinetics of nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*.
Heterotrophic interactions between magnesium-
adenosine 5'-diphosphate and magnesium-adenosine
5'-triphosphate. *Biochem. J.*, **165**:255-62, 1977.
- 235 TIEN, T. M.; GASKINS, M. H. & HUBBEL, D. H. Plant
growth substances produced by *Azospirillum brasilense*
and their effect on the growth of pearl
millet (*Pennisetum americanus* L.). *Appl. Environ.*
Microbiol., **37**:1016-24, 1979.
- 236 TUBB, R. S. & POSTGATE, J. R. Control of
nitrogenase synthesis in *Klebsiella pneumoniae*.
J. Gen. Microbiol., **79**:103-17, 1973.
- 237 UOZUMI, T.; WANG, P-L.; TONOUCI, N.; NAM, J. H.;
KIM, Y. M. & BEPPU, T. Cloning and expression
of the *nifA* gene of *Klebsiella oxytoca* in
K. pneumoniae and *Azospirillum lipoferum*. *Agric.*
Biol. Chem., **50**: 1539-44, 1986.

- 238 WANG, Y. P.; BIRKENHEAD, K.; DOBSON, A.; BOESTEN, B. & O'GARA, F. Sequences downstream from the transcriptional start site are essential for microaerobic, but not symbiotic, expression of the *Rhizobium meliloti* *nifHDK* promoter. *Mol. Microbiol.*, **5**:157, 1991.
- 239 WATT, G. D. Redox properties of the nitrogenase proteins from *Azotobacter vinelandii*. In: EVANS, H. J.; BOTTOMLEY, P. J. & NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation Research Progress*. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.585-90.
- 240 WESTBY, C. A.; CUSTSHALL, D. S. & VIGIL, G. V. Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.*, **156**:1369-72, 1983.
- 241 WONG, P-K.; POPHAM, D.; KEENER, J. & KUSTU, S. "In vitro" transcription of the nitrogen fixation regulatory operon *nifLA* of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **169**:2876-80, 1987.
- 242 WOOD, A. G.; MENEZES, E. M.; DYKSTRA, C. & DUGGAN, D. E. Methods to demonstrate the megaplasmids (or minichromosomes) in *Azospirillum*. In: KLINGMULLER, W., ed. *Azospirillum I: Genetics, Physiology, Ecology*. Berlin, Springer-Verlag. p.18-34, 1982.
- 243 YATES, M. G. Biochemistry of nitrogen fixation. In: MIFFIN, B., ed. *The biochemistry of plants*. New York, Acad. Press, 1980. v.5. p.1-64.
- 244 YATES, M. G. & PLANQUE, K. Nitrogenase from *Azotobacter chroococcum* purification and properties of the component proteins. *Eur. J. Biochem.*, **60**:467-76, 1975.

- 245 YOGH, D. G.; ZHANG, Z-M. & CLAYBROOK, D. L. Methylamine metabolism and its role in nitrogenase "switch-off" in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.*, **134**:45-8, 1983.
- 246 ZAMAROCZY, M.; DELORME, F. & ELMERICH, C. Regulation of transcription and promoter mapping of the structural genes from nitrogenase (*nifHDK*) of *Azospirillum brasilense* Sp7. *Mol. Gen. Genet.*, **220**: 88-94, 1989.
- 247 ZHU, J. & BRILL, W. J. Temperature sensitivity of the regulation of nitrogenase synthesis by *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **145**:1116-8, 1981.
- 248 ZHU, J-B.; LI, Z-G; WANG, L-W; SHEN, S-S & SHEN, S-C. Temperature sensitive of a *nifA*-like gene in *Enterobacter cloacae*. *J. Bacteriol.*, **166**:357-9, 1986.
- 249 ZUMFT, W. G.; ALEF, K. & MUMMLER, S. Regulation of nitrogenase activity in Rhodospirillaceae. In: GIBSON, A. H. & NEWTON, W. E., eds. *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. Canberra, Australian Acad. Sci., 1981. p.190-3.
- 250 ZUMFT, W. G. & CASTILLO, F. Regulatory properties of the nitrogenase from *Rhodopseudomonas palustris*. *Arch. Microbiol.*, **117**:53-60, 1978.
- 251 ZUMFT, W. G. & NORDLUND, S. Stabilization and partial characterization of the activating enzyme for dinitrogenase reductase (Fe protein) from *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Lett.*, **127**:79-82, 1981.