

GISELI KLASSEN

CONTRIBUIÇÃO À FISIOLOGIA DA FIXAÇÃO DE  
NITROGÊNIO EM ESTIRPES DE  
*Herbaspirillum seropedicae*

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

CURITIBA  
1994

GISELI KLASSEN

CONTRIBUIÇÃO À FISIOLOGIA DA FIXAÇÃO DE  
NITROGÊNIO EM ESTRIPES DE  
*Herbaspirillum seropedicae*

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores :

Dra Liu Un Rigo (Orientadora)

Universidade Federal do Paraná

Dr. Manoel Francisco Guimarães

Universidade Federal do Paraná

Dr. Emanuel Maltempo de Souza

Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 9 de dezembro de 1994



**ORIENTADORES:-**

**Dra. Liu Un Rigo**

**Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa**

Aos meus pais Valter e Iracy  
e ao meu irmão Rubens

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Dra. Liu Un Rigo, e ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa, orientadores desta tese, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Fixação de Nitrogênio e Biologia Molecular, e principalmente pelo incentivo, confiança, e amizade adquirida no decorrer deste trabalho.

Ao Dr. Shigehiro Funayama pela atenção e confiança demonstradas.

Aos coordenadores do Curso de Pós-graduação, na pessoa da Dra. Fani Reicher.

Aos coordenadores que estiveram à frente do Departamento de Bioquímica, na pessoa da Dra. Momoyo Nakano.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica em especial a Marilza, Dona "Ju" e a Ivone pela colaboração e atenção dispensadas.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica.

Ao Dr. Aguinaldo J. Nascimento pela ajuda na análise estatística.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Às bibliotecárias Telma T; Stresser e Mariza Kampfert, pela colaboração e atenção dispensadas.

Aos amigos e colegas de laboratório, Elaine, Maria Lucia, Marcos, Berenice, Hidevaldo, Ana Cláudia, Ana Paula, pelo apoio e amizade que nunca serão esquecidos.

A Janyce, Eneida, Marlene, Marcos, Rosemeri, Sofia, Regina, Eliana, Sofia Tsuneta e Marisa, queridos companheiros em todos os momentos, para sempre guardados com carinho em meu coração.

A Cristina, Ricardo, Raquel, Suhaila, Ronaldo, Adriano e Pedro pelo carinho, apoio e incentivo.

A Liliane, pelo carinho e dedicação em todos os momentos.

A meus pais, pelo amor e dedicação e pelo tanto que fizeram proporcionando a conquista desse momento em minha vida.

Ao meu irmão, pelo amor e estímulo.

A Deus.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	1
1.2 BIOQUÍMICA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.....	2
1.2.1 Nitrogenases Alternativas.....	7
1.3 GENÉTICA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.....	8
1.4 REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.....	12
1.4.1 Regulação da Transcrição dos genes <i>nif</i> .....	12
1.4.2 Regulação da Atividade da Nitrogenase.....	18
1.5 FISILOGIA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.....	20
1.5.1 Influência de Fontes de Carbono.....	20
1.5.2 Influência do Oxigênio.....	21
1.5.3 Influência de Compostos Nitrogenados.....	23
1.5.4 Efeito da Temperatura .....	24
1.6 <b><i>Herbaspirillum seropedicae</i> - DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE E AVANÇOS NO ESTUDO FISIOLÓGICO E GENÉTICO.....</b>	<b>26</b>
1.7 OBJETIVOS.....	31

2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
2.1	MICROORGANISMOS E PLASMÍDEOS.....	32
2.2	MEIOS DE CULTURA.....	32
2.3	ANTIBIÓTICOS.....	34
2.4	REAGENTES QUÍMICOS.....	34
2.5	CONDIÇÕES DE CULTURA.....	36
2.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE.....	37
2.7	CRESCIMENTO E DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DUPLICAÇÃO EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	37
2.8	EFEITO DO pH SOBRE O CRESCIMENTO E ATIVIDADE DA NITROGENASE EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	38
2.9	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO SOBRE O CRESCIMENTO E NA ATIVIDADE DA NITROGENASE EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	39
2.10	EFEITO DE COMPOSTOS NITROGENADOS SOBRE O CRESCIMENTO E EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	39
2.11	UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO POR ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	40
2.12	EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO EM MEIO SEMI- SÓLIDO SOBRE A EXPRESSÃO DA NITROGENASE EM ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> .....	40
2.13	EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE A EXPRESSÃO DA NITROGENASE EM <i>H. seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	41



2.14	ATIVIDADE DA NITROGENASE EM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	41
2.15	EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO EM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> .....	42
2.16	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS AMÔNIO PRESENTES NO CRESCIMENTO SOBRE A DESREPRESSÃO DA NITROGENASE EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	42
2.17.	EFEITO DA DENSIDADE DA CULTURA SOBRE A DESREPRESSÃO DA NITROGENASE EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.	43
2.18	EFEITO DE ÍONS AMÔNIO SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE EM ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	44
2.18.1	Efeito de íons amônio sobre a atividade da nitrogenase em <i>H.seropedicae</i> estirpe SMR1.....	44
2.18.2	Efeito de íons amônio sobre a atividade da nitrogenase em diferentes estirpes de <i>H. seropedicae</i> cultivadas em glutamato.....	44
2.19	DESREPRESSÃO E INATIVAÇÃO DA NITROGENASE EM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	45
2.20	EFEITO DA METILAMINA SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	45
2.20.1	Efeito da metilamina sobre a atividade da nitrogenase em células crescidas em meio contendo amônia 2 mM.....	45
2.20.2	Efeito da metilamina sobre a atividade da nitrogenase em células crescidas em meio contendo glutamato 5 mM.....	46
2.21	EFEITO DE COMPOSTOS NITROGENADOS SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1..	46
2.22	DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE PLASMÍDEOS DE DIFERENTES ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	47

2.22.1	Eletrforese de DNA.....	48
2.23	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	49
3	<b>RESULTADOS</b> .....	50
3.1	CRESCIMENTO E DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DUPLICAÇÃO EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	50
3.2	EFEITO DO pH SOBRE O CRESCIMENTO E ATIVIDADE DA NITROGENASE EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> estirpe SMR1.....	50
3.3	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO SOBRE O CRESCIMENTO E NA ATIVIDADE DA NITROGENASE EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	51
3.4	EFEITO DE COMPOSTOS NITROGENADOS SOBRE O CRESCIMENTO E EXPRESSÃO DA NITROGENASE EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	51
3.5	UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO POR ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	52
3.6	EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO EM MEIO SEMI- SÓLIDO SOBRE A EXPRESSÃO DA NITROGENASE EM ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> .....	52
3.7	EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE A EXPRESSÃO DA NITROGENASE EM <i>H. seropedicae</i> estirpe SMR1...	53
3.8	ATIVIDADE DA NITROGENASE EM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	53
3.9	EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO EM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> .....	54

3.10	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS AMÔNIO PRESENTES NO CRESCIMENTO SOBRE A DESREPRESSÃO DA NITROGENASE EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	54
3.11	EFEITO DA DENSIDADE DA CULTURA SOBRE A DESREPRESSÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	55
3.12	EFEITO DE ÍONS AMÔNIO SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE EM ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	55
3.12.1	Efeito de íons amônio sobre a atividade da nitrogenase em <i>H.seropedicae</i> estirpe SMR1.....	55
3.12.2	Efeito de íons amônio sobre a atividade da nitrogenase em diferentes estirpes de <i>H. seropedicae</i> cultivadas em glutamato.....	56
3.13	DESREPRESSÃO E INATIVAÇÃO DA NITROGENASE EM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	56
3.14	EFEITO DA METILAMINA SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	56
3.15	EFEITO DE COMPOSTOS NITROGENADOS SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1...	57
3.16	DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE PLASMÍDEOS DE DIFERENTES ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	57
4	DISCUSSÃO.....	84
5	CONCLUSÕES.....	92
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94



## LISTA DE FIGURAS

1	ESQUEMA DE OXIDAÇÃO-REDUÇÃO DA PROTEÍNA FERRO DA NITROGENASE.....	5
2	CICLO CATALÍTICO PARA REDUÇÃO DE NITROGÊNIO PELA NITROGENASE DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	6
3	ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>nif</i> EM <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	9
4	ESQUEMA DE REGULAÇÃO DAS PROTEÍNAS NtrC E GLUTAMINA SINTETASE EM <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	14
5	MODELO DE REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES <i>nif</i> EM <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	17
6	CRESCIMENTO E DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DUPLICAÇÃO EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> estirpe SMR1.....	59
7	EFEITO DO pH SOBRE CRESCIMENTO DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	60
8	EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	61
9	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	62
10	ATIVIDADE DA NITROGENASE POR ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	63
11	EFEITO DA DENSIDADE DA CULTURA SOBRE A DESREPRESSÃO DA NITROGENASE DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1	64
12	EFEITO DE ÍONS AMÔNIO SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	65

13	EFEITO DE ÍONS AMÔNIO SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE EM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE CULTIVADAS EM GLUTAMATO.....	66
14	DESREPRESSÃO E INATIVAÇÃO DA NITROGENASE EM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	67
15	EFEITO DA METILAMINA SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1 CULTIVADA EM AMÔNIA 2 mM.....	68
16	EFEITO DA METILAMINA SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1 CULTIVADA EM GLUTAMATO.....	69
17	EFEITO DE COMPOSTOS NITROGENADOS SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	70
18	DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE PLASMÍDEOS EM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	71
19	DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DE PLASMÍDEOS DAS ESTIRPES ZA95 E Z152 DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	72

## LISTA DE TABELAS

I	BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.....	35
II	EFEITO DE COMPOSTOS NITROGENADOS SOBRE O CRESCIMENTO E EXPRESSÃO DA NITROGENASE DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	73
IIIa	UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO POR ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	74
IIIb	UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO POR ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	75
IV	EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO EM MEIO SEMI SÓLIDO SOBRE A EXPRESSÃO DA NITROGENASE EM ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	76
V	EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE A EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	77
VI	EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	78
VII	EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE ZA95.....	79
VIII	EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE Z152.....	80
IX	EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO EM ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	81

X	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS AMÔNIO PRESENTES NO CRESCIMENTO SOBRE A DESREPRESSÃO DA NITROGENASE EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	82
XI	EFEITO DE COMPOSTOS NITROGENADOS SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ESTIRPE SMR1.....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	= 5'-difosfato de adenosina
ATP	= 5'-trifosfato de adenosina
°C	= grau Celsius
cm	= centímetro
DNA	= ácido desoxiribonucleico
D.O. <sub>550</sub>	= densidade óptica a 550 nm
EDTA	= ácido etilenodiamino-tetra-acético
g	= grama
mg	= miligrama
µg	= micrograma
x g	= força centrífuga
KDa	= quilodalton
MDa	= megadalton
L	= litro
ml	= mililitro
µl	= microlitro
min	= minuto
M	= molar
mM	= milimolar
µM	= micromolar

mm	= milímetro
N	= normal
NADP	= nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH	= nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
Nal <sup>R</sup>	= fenótipo de resistência ao ácido nalidíxico
Nif	= fenótipo para fixação de nitrogênio
nmol	= nanomol
ORF	= open reading frame
Pi	= fosfato inorgânico
pH	= -log (concentração de íons H <sup>+</sup> )
rRNA	= ácido ribonucleico ribossômico
rpm	= rotações por minuto
SDS	= dodecilsulfato de sódio
Sm <sup>R</sup>	= fenótipo de resistência a estreptomicina
Tc <sup>R</sup>	= fenótipo de resistência a tetraciclina
Tris	= tris(hidroximetil)-aminometano



## RESUMO

Em *Herbaspirillum seropedicae* SMR1 a faixa de pH inicial ótima para crescimento foi entre 4,5 e 8,0, sendo que para atividade da nitrogenase a faixa ideal foi entre 4,5 e 6,5. A densidade de cultura ótima para expressão da nitrogenase para a estirpe SMR1 foi entre 1,5 e 1,8 em 550 nm. Todas as estirpes utilizadas (Z67, ZA69, ZA76, SMR1, ZA95 e Z152) apresentaram atividades da nitrogenase em meio líquido NFbHP com DL-malato e L-glutamato. As estirpes Z67, ZA69, ZA76, SMR1, ZA95 e Z152 crescem utilizando DL-malato, DL-lactato, L-rhamnose ou D-glucose como fontes únicas de carbono. A utilização de D-rafinose, D-manose ou D-maltose é lenta e  $\text{NH}_4$  dependente. Estas estirpes crescem diazotroficamente em meio semi-sólido NFbHP isento de nitrogênio fixado utilizando DL-malato, DL-lactato, L-rhamnose ou D-glucose como fontes de carbono. A estirpe SMR1 foi capaz de fixar nitrogênio em meio líquido utilizando DL-malato ou DL-lactato como fontes de carbono, mas não com D-glucose, L-rhamnose, D-manose, D-rafinose, D-maltose ou L-glutamato. Não foi observado crescimento ou atividade da nitrogenase pela estirpe SMR1 em meio NFbHP contendo metilamina ou L-histidina como fontes de nitrogênio. A utilização de DL-serina e L-cisteína foram deficientes. As estirpes SMR1, ZA95 e Z152 possuem temperatura ótima de crescimento a 30°C. Concentrações superiores a 5mM de cloreto de amônio no meio de cultura reprimem a nitrogenase da estirpe SMR1 de forma irreversível. Amônia, L-glutamato, metilamina, DL-serina e L-cisteína produzem desligamento parcial da nitrogenase na estirpe SMR1. Foram observados desrepressão após crescimento em cloreto de amônio 2 mM e desligamento da nitrogenase por amônia também para as estirpes Z67, ZA69, ZA76, ZA95 e Z152. Entre as estirpes utilizadas somente ZA95 apresentou um plasmídeo com aproximadamente 70 MDa, enquanto a estirpe Z152 apresentou dois plasmídeos com 60 e 70 MDa; as demais estirpes Z67, ZA69, ZA76 e SMR1 não apresentaram plasmídeos naturais.

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A necessidade de expansão da agricultura nas últimas décadas, em decorrência do aumento da população mundial, tem levado ao incentivo do estudo da fixação biológica de nitrogênio. Por este processo o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) é reduzido enzimaticamente à amônia (BENEMANN e VALENTINE, 1972). Os microrganismos capazes de conduzir esse processo são chamados diazotrofos e somente alguns gêneros de procariontes possuem essa capacidade, incluindo diversos gêneros de bactérias, cianobactérias (também conhecidas como algas verde-azuladas) e actinomicetos do gênero *Frankia* (POSTGATE, 1982). Entre eles ocorrem as mais diversas características fisiológicas tais como microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos, aeróbios, simbióticos ou de vida livre, autótrofos, heterótrofos, etc (LOWE et al., 1985). Alguns microrganismos fixadores de nitrogênio podem se associar a plantas colonizando a superfície das raízes, ocupando espaços inter ou intracelulares ou mesmo causando mudanças morfológicas e fisiológicas nas plantas através da formação de nódulos (SIQUEIRA e FRANCO, 1988).

Estima-se que 60% do nitrogênio fixado no planeta é proveniente da fixação biológica enquanto o nitrogênio fixado produzido industrialmente contribui com aproximadamente 25% e os 15% remanescentes provém da ação de relâmpagos, radiação ultravioleta, etc. Portanto os diazotrofos tem papel fundamental para a manutenção do ciclo do nitrogênio na biosfera (BURNS e HARDY, 1975; POSTGATE, 1982).

Com a finalidade de se obter um melhor aproveitamento desse fenômeno biológico têm-se estudado sistemas diazotróficos mais eficientes. O



resultado pode ser então a diminuição da dependência na agricultura de fertilizantes nitrogenados (POSTGATE, 1980; POSTGATE, 1985).

## 1.2. - BIOQUÍMICA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

A fixação biológica de nitrogênio é catalisada pelo sistema enzimático da nitrogenase, o qual consiste de duas metaloproteínas : a proteína ferro (dinitrogenase redutase) e a proteína molibdênio-ferro (dinitrogenase), designações estas provenientes do metal componente das proteínas (DEAN et al., 1993). Juntas estas proteínas conduzem a redução do nitrogênio a amônia dependente de MgATP (KIM e REES, 1994).

A proteína ferro é um dímero de subunidades idênticas ( $\gamma_2$ ) com peso molecular aproximado de 62 KDa (EADY, 1991). Cada subunidade possui um domínio tipo  $\alpha$  hélice/ folha  $\beta$  pregueada (GEORGIADIS et al., 1992) que estão covalentemente ligados por um núcleo [4Fe-4S] simetricamente ligado a 2 cisteínas nas posições 97 e 132 a cada uma das subunidades (HOWARD, 1989 ). Há evidências de mudança conformacional da proteína e também nas propriedades do núcleo [4Fe-4S] devido a ligação de MgATP ocorrendo a transferência de elétrons da proteína-Fe para a proteína-MoFe. A hidrólise de MgATP seguida da produção de  $H^+$  são necessárias para dissociação do complexo (MENSINK e HAAKER, 1992). Estudos espectroscópicos indicam que MgATP se liga a proteína ferro mas não interage diretamente com o núcleo [4Fe-4S] (MORGAN et al., 1990). As sequências de aminoácidos desta proteína isolada de diferentes microrganismos, indicam que ela é altamente conservada (EADY, 1986). As sequências da proteína-Fe de *Azotobacter vinelandii* e *Klebsiella pneumoniae* são 90% idênticas, contudo quando feita comparação entre a proteína-Fe destes acima citados com *Clostridium pasteurianum* ou *Anabaena* observa-se apenas 69% de identidade (HAUSINGER e

HOWARD, 1982).

Em *Klebsiella pneumoniae*, assim como em outros microrganismos os, os elétrons são transferidos à proteína ferro por um sistema que envolve, uma flavodoxina que transfere os elétrons da flavodoxina oxidoreductase até a proteína ferro (DEISTUNG et al., 1983). Flavodoxinas são proteínas que contêm o grupo flavina, que em reações de redução ou oxidação oscilam entre as formas de quinona e hidroquinona. O carreador de elétrons para a proteína Ferro pode ser também uma ferredoxina, dependendo do microrganismo envolvido (DIXON e WHEELER, 1986).

A proteína Mo-Fe é um tetrâmero  $\alpha_2 \beta_2$  com peso molecular aproximado de 220 KDa e que possui aproximadamente 2 átomos de molibdênio, 30 de ferro e 30 enxofre por tetrâmero (Eady, 1991). Estudos espectroscópicos demonstram que estes átomos estão arranjados em dois tipos de centros redox, os quais denominam-se centros-P e cofator Fe-Mo mais comumente designado FeMoco (SMITH e EADY, 1992).

O par de centros-P parecem ter função na transferência de elétrons entre o núcleo [4Fe-4S] da proteína Ferro e o FeMoco e são compostos por 2 núcleos [4Fe-4S] unidos por duas cisteínas (KIM et al., 1993 ; KIM e REES, 1994).

O cofator FeMoco consiste de dois grupamentos cúbicos [4Fe-3S] e [3Fe-3MoS] unidos por dois átomos de enxofre (SELMANN, 1993) e um terceiro componente que pode ser o  $N_2$  e ou  $H^+$  (CHAN et al., 1993), ou ainda pode ocorrer interação entre os dois átomos de ferro adjacentes (KIM et al., 1993). Este cofator possui um componente orgânico, o homocitrato (SMITH e EADY, 1992) que provavelmente tem a função de transferir os elétrons dos centros-P para FeMoco (KIM e REES, 1994).

O cofator FeMoco encontra-se no interior das subunidades  $\alpha$  enquanto o par de centros P encontram-se na interface entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  ( KIM e REES, 1992 ).

A estequiometria da reação catalisada pelo sistema nitrogenase pode ser representada como a seguir (SIMPSON e BURRIS, 1984):-



Esta reação é inibida por MgADP mas não por amônia ou glutamina (EADY, 1986). O hidrogênio é um inibidor competitivo do nitrogênio e produto obrigatório do mecanismo de redução do  $\text{N}_2$  pela nitrogenase(MORTENSON e THORNELEY, 1979).

A redução do nitrogênio pelo sistema nitrogenase envolve etapas de transferência de elétrons ao nitrogênio que são melhor visualizadas nas figuras 1 e 2 .

Ambas proteínas componentes do sistema enzimático nitrogenase são rápida e irreversivelmente inativadas por exposição ao oxigênio (POSTGATE, 1982). A proteína-Fe de *Klebsiella pneumoniae* e *Clostridium pasteurianum* têm um tempo de meia vida de 45 s e 5 min respectivamente com concomitante oxidação de grupos sulfidril. A proteína MoFe é menos sensível já que quando isolada de *C. pasteurianum* ocorre uma diminuição de 30% da atividade após uma hora de exposição ao ar, enquanto que a proteína isolada de *K. pneumoniae* tem um tempo de meia vida de 8 min. Estudos espectroscópicos indicam que a exposição ao oxigênio resulta em uma sequência de mudanças provavelmente associadas com vários estados de oxidação dos átomos de ferro ( ROBSON e POSTGATE, 1980). A proteína piruvato-flavodoxina oxidoreductase também é extremamente sensível ao oxigênio, sendo totalmente inativada em 5 minutos de exposição ao ar (SHAH et al., 1983).



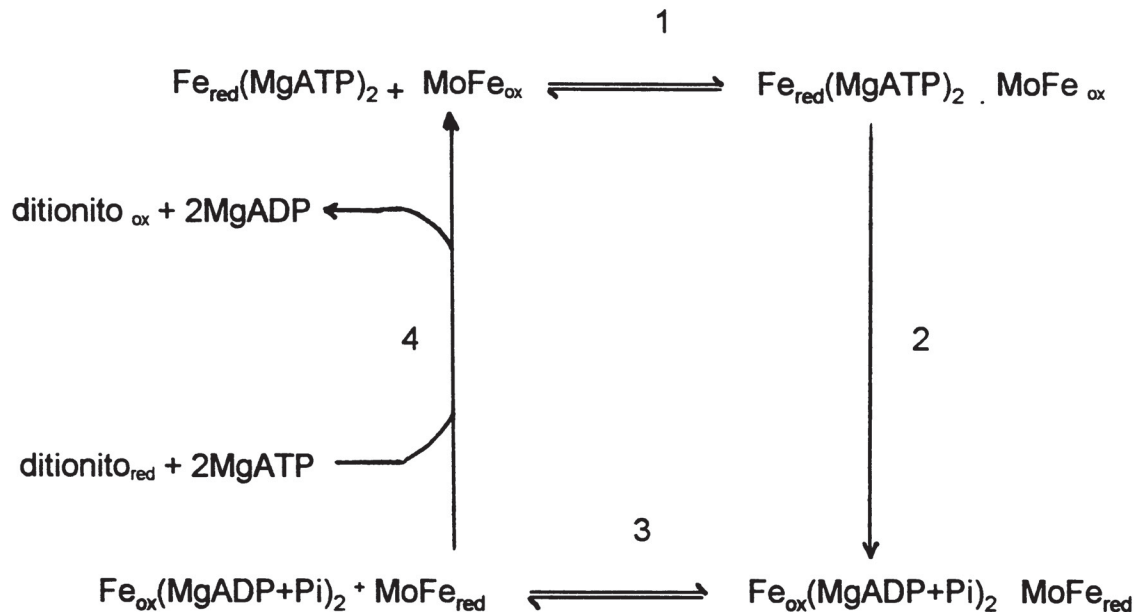


FIGURA 1.- ESQUEMA DE OXIDAÇÃO-REDUÇÃO DA PROTEÍNA-FERRO DA NITROGENASE (SMITH e EADY, 1992).

1- Redução da Proteína-Fe (Fe) por um carreador de elétrons como uma ferredoxina ou flavodoxina "in vivo" ou ditionito de sódio "in vitro" (THORNELEY e LOWE, 1983).

2- Transferência desses elétrons da Proteína-Fe para Proteína MoFe (MoFe), processo este dependente de 2 moléculas de MgATP por elétron transferido (HAGEMAN et al., 1980).

3- Transferência dos elétrons e prótons ao cofator FeMoco da Proteína MoFe.

Cada elétron transferido entre a Proteína-Fe e a Proteína-MoFe envolve um ciclo obrigatório de associação e dissociação do complexo e a etapa de dissociação tem sido identificada como determinante da velocidade da reação (HAGEMAN e BURRIS, 1978 ; THORNELEY e LOWE, 1983 e 1984)

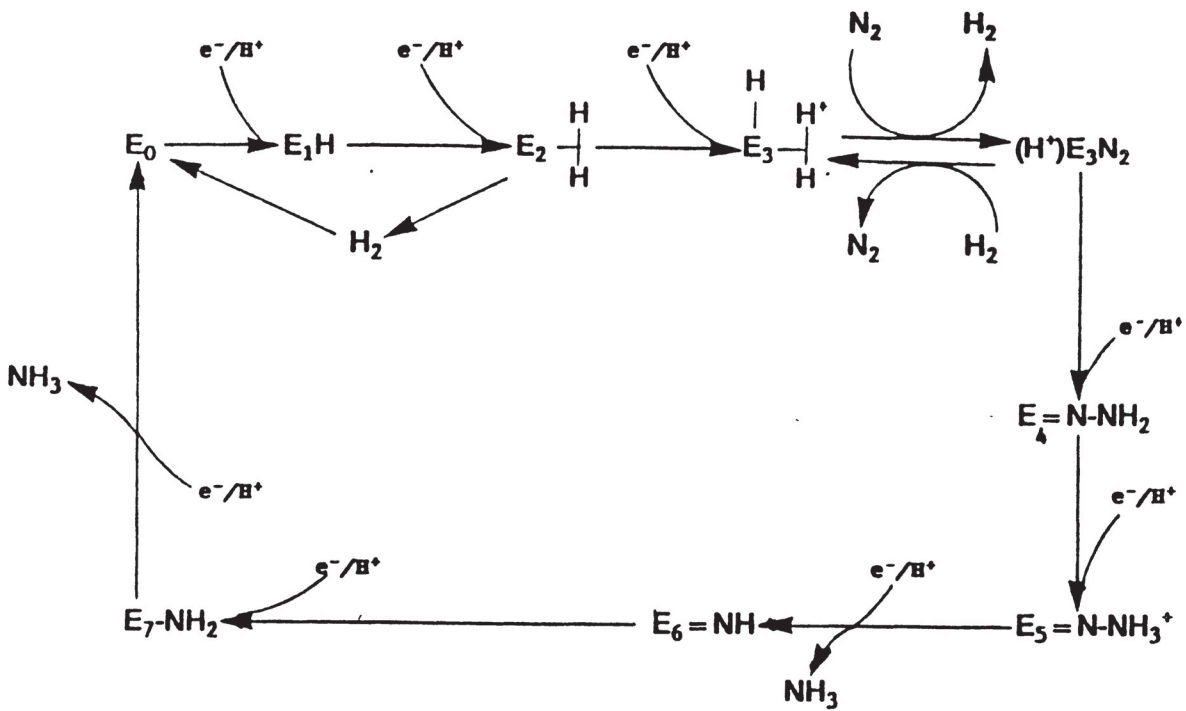


FIGURA 2.- CICLO CATALÍTICO PARA REDUÇÃO DE NITROGÊNIO PELA NITROGENASE DE *Klebsiella pneumoniae*. (SMITH e EADY, 1992)

Cada etapa (representada por E) corresponde a um ciclo de transferência de 1 elétron como ilustrado na figura 1. E<sub>0</sub> representa o estado inicial da proteína MoFe. Entre E<sub>1</sub> e E<sub>7</sub> ocorre a transferência sequencial de oito elétrons da proteína Fe para a proteína MoFe. No estado E<sub>3</sub> o nitrogênio (N<sub>2</sub>) liga-se a proteína MoFe deslocando o hidrogênio (H<sub>2</sub>). No sexto e no oitavo ciclos de redução ocorre a formação de duas moléculas de NH<sub>3</sub>, respectivamente.

O sistema nitrogenase não possui alta especificidade pelo substrato podendo reduzir uma série de compostos análogos ao nitrogênio com dupla a tripla ligação, tais como acetileno, cianogênio, óxido nitroso, ciclopropeno, etc , (POSTGATE, 1982). Todas as reduções necessitam de MgATP (EADY, 1986). Destaca-se a importância da redução do acetileno a etileno, que tem sido o método preferido de dosagem quantitativo de atividade da nitrogenase por sua rapidez e simplicidade (DILWORTH, 1966 ; SCHOLLHORN e BURRIS, 1967).

### 1.2.1.- Nitrogenases Alternativas

A existência de um sistema alternativo da nitrogenase foi sugerido por Bishop et al.(1980) que observaram que mutantes *nif* de *Azotobacter vinelandii* poderiam utilizar N<sub>2</sub> para crescimento em condições de ausência de molibdênio.

Estudos posteriores revelaram a existência de sistemas alternativos da nitrogenase em espécies de *Azotobacter* (EADY , 1991). Num destes sistemas vanádio substitui molibdênio no cofator FeMoco e num outro ferro substitui molibdênio. Estas nitrogenases alternativas ou Mo-independentes são sintetizadas dependendo da disponibilidade de molibdênio ou vanádio no meio de crescimento. Quando molibdênio é disponível, somente a Mo-nitrogenase é sintetizada. Por outro lado sob condições de deficiência de Mo, mas com quantidades suficientes de vanádio e ferro a nitrogenase contendo vanádio é sintetizada. Finalmente quando ambos Mo e V são deficientes a terceira nitrogenase alternativa é então sintetizada (EADY, 1991). Deste modo, mutantes de *A. chroococcum* com deleções nos genes estruturais de ambas Mo-nitrogenase e V-nitrogenases são incapazes de crescer diazotroficamente ( ROBSON et al., 1989), em contraste com mutantes de *A. vinelandii* os quais podem crescer na ausência de Mo ou V no meio de crescimento sugerindo a síntese da terceira nitrogenase (PAU et al., 1989). Estudos espectroscópicos tem indicado que as proteínas vanádio-ferro isoladas de

*Azotobacter vinelandii* (MORNINGSTAR e HALES, 1987) e *A. chroococcum* (HARVEY et al., 1990) possuem centros redox estruturalmente similares ao da proteína MoFe e que o cofator (FeVaco) parece ser análogo ao cofator FeMoco encontrado na proteína MoFe. Em muitos aspectos as proteínas isoladas (inclusive a proteína-Fe) de *Azotobacter chroococcum* e *A. vinelandii* são semelhantes (peso molecular das subunidades e conteúdo em metais) quando comparadas com as proteínas isoladas de *Klebsiella pneumoniae*. A principal diferença é a presença de uma pequena subunidade  $\delta$  na proteína V-Fe, que possui uma estrutura  $\alpha_2\beta_2\delta_2$ . As seqüências de aminoácidos destas subunidades demonstraram estreita relação com as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  isoladas da proteína MoFe. Possivelmente, esta subunidade extra, tenha papel de estabilização da estrutura quaternária da proteína VFe (EADY, 1991).

### 1.3.- GENÉTICA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

Os genes responsáveis pela fixação de nitrogênio são chamados genes *nif*. Estudos desses genes vem sendo realizados a mais de duas décadas tendo sido iniciados em *Klebsiella pneumoniae*. Neste microrganismo foram identificados, clonados e sequenciados 20 genes que se encontram agrupados numa região de aproximadamente 25 Kb do genoma (ver figura 3). Paralelamente, outros diazotrofos de vida livre tais como *Azotobacter vinelandii*, *A. chroococcum*, *Rhodobacter capsulatus* e *Enterobacter agglomerans* tem sido comparados com *K. pneumoniae*, e esses estudos sugerem que existem pelo menos 14 genes em comum entre eles que seriam : *nif H, D, K, E, N, X, U, S, V, Z, W, M, B, Q*, dos quais os produtos são necessários para a biossíntese efetiva da nitrogenase (MERRICK, 1992).



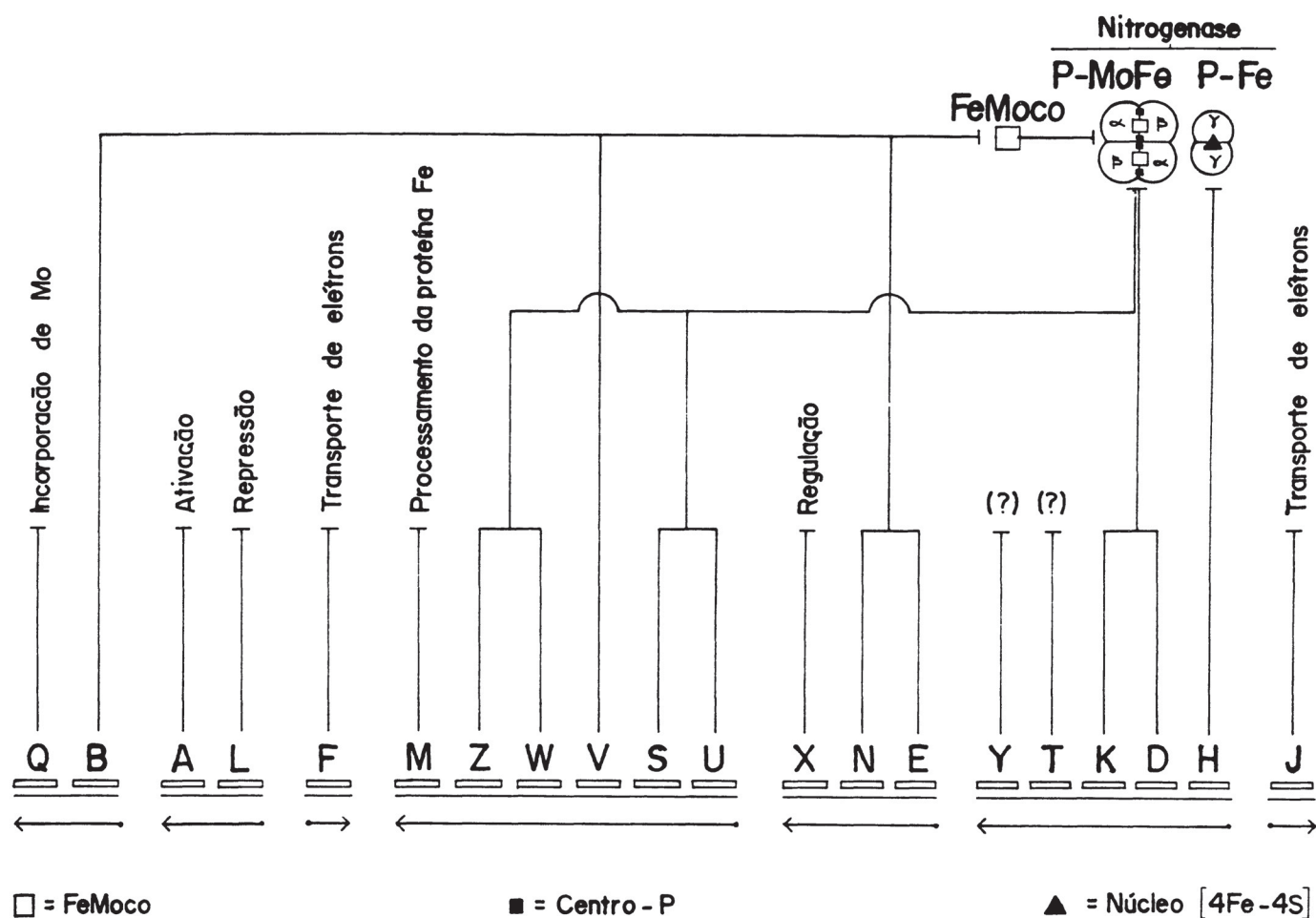


FIGURA 3.- ORGANIZAÇÃO DOS GENES *nif* EM *Klebsiella pneumoniae*  
(MERRICK, 1992)

Os genes *nif* em *Klebsiella pneumoniae* encontram-se agrupados em sete operons. As setas indicam a direção da transcrição em cada operon. Os genes *nifYT*, permanecem ainda com função desconhecida. O tetrâmero representa a proteína MoFe (P-MoFe) e o dímero a proteína Ferro (P-Fe), respectivamente. A legenda representa os centros redox da proteína MoFe (FeMoco e Centro-P) e da proteína Ferro (núcleo [4Fe-4S]).



Os genes *nifHDK* são responsáveis pela biossíntese das subunidades  $\gamma$  da proteína ferro (SUNDARESAN e AUSUBEL 1981), e das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da proteína MoFe, respectivamente (IOANNIDIS e BUCK, 1987; ROBERTS et al., 1978) sendo os chamados genes estruturais da nitrogenase.

Mutantes *nifB*<sup>-</sup> de *Klebsiella pneumoniae* possuem proteína MoFe inativa que pode ser reativada pela adição "in vitro" do FeMoco isolado de proteínas ativas. Esta complementação "in vitro" indica o envolvimento do produto do gene *nifB* na biossíntese do cofator FeMoco (ROBERTS et al., 1978; HAWKES e SMITH, 1984). UGALDE et al. (1984) também comprovaram o envolvimento deste gene na biossíntese do cofator FeMoco além dos genes *nifEN* (ROBERTS et al., 1978).

Mutantes *nifQ*<sup>-</sup> necessitam de altas concentrações de molibdênio para crescerem diazotroficamente. Somente nestas condições ocorre acúmulo de molibdênio sugerindo a presença de intermediários para produzir o cofator em forma ativa. Portanto este gene é importante para incorporação deste elemento na proteína MoFe (Imperial et al., 1984).

O gene *nifV* parece também estar envolvido na biossíntese do cofator da proteína MoFe já que mutantes deficientes neste gene são capazes de reduzir acetileno a etileno, mas incapazes de reduzir N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub> (HAWKES et al., 1984). Mutantes de *Azotobacter vinelandii* nesse mesmo gene apresentam redução do crescimento diazotrófico também exibindo baixa atividade da proteína MoFe e atividade normal da proteína Ferro, indicando que este gene tem a mesma função tanto em *K. pneumoniae* quanto em *A. vinelandii* (JACOBSON et al., 1989). PAUSTIAN et al. (1989) verificaram que a adição de homocitrato ao meio de cultura corrigia o fenótipo *nifV*<sup>-</sup> e HOOVER et al. (1989) demonstraram ser a homocitrato sintase o produto desse gene.

O produto do gene *nifJ* é a piruvato flavodoxina oxidoreductase que juntamente com o produto do gene *nifF* uma flavodoxina conduzem a transferência de elétrons do piruvato para a proteína ferro (BOGUSZ et al., 1981; HILL e KAVANAGH, 1980 ; DEISTUNG et al., 1983).

Estirpes de *Azotobacter vinelandii* estudadas por JACOBSON et al. (1989) com deleções específicas nos genes *nifUS* apresentaram baixa atividade da proteína MoFe, talvez como resultado indireto da acumulação da proteína ferro inativa.

JACOBSON et al. (1989) estudaram estirpes com mutações localizadas nos genes *nifWZ*, evidenciando uma diminuição do crescimento diazotrófico desses mutantes, além da necessidade dos produtos destes genes para a estabilidade e processamento da proteína MoFe, envolvendo possivelmente a biossíntese do cofator FeMoco. Estudos desses mesmos genes realizados em *Klebsiella pneumoniae* por (PAUL e MERRICK, 1989) levaram-os a concluir que os genes *nifW* ou *nifZ* não são essenciais para fixação de nitrogênio nesse microrganismo, embora a desrepressão da atividade da nitrogenase seja mais lenta nesses mutantes. Os autores sugerem que as atividades relacionadas com os produtos desses genes, poderiam ser substituídas parcialmente por outras proteínas.

Mutantes *nifM*<sup>-</sup> possuem proteína Ferro inativa expressando, portanto, um fenótipo Nif<sup>-</sup> (JACOBSON et al., 1989; ROBERTS et al., 1978). HOWARD et al. (1986) sugeriram a ocorrência de uma falha na biossíntese e inserção do grupo Fe:S da proteína Ferro nesses mutantes.

Estudos em mutantes *nifX*<sup>-</sup> de *Klebsiella pneumoniae* sugerem que o produto deste gene é um regulador negativo reprimindo a transcrição dos demais genes *nif* em resposta aos níveis de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou O<sub>2</sub> (GOSINK et al., 1990).

Os genes *nifLA* são genes regulatórios (POSTGATE, 1982) e serão melhor detalhados no próximo tópico.

Os genes envolvidos na regulação, biossíntese e atividade das nitrogenases alternativas são chamados genes *vnf* (fixação de nitrogênio vanádio-dependente) e *anf* (fixação de nitrogênio alternativa) e apresentam homologia com os genes *nif* (EADY, 1991). Entre os genes *vnfD* e *vnfK* foi identificado o gene *vnfG* responsável pela biossíntese da subunidade  $\delta$  da proteína VFe. Tem sido demonstrado que os mesmos genes essenciais para a produção de polipeptídeos da nitrogenase molibdênio dependente são também necessários para síntese das vanádio-nitrogenases e terceira nitrogenase, assim *nifM* é essencial para atividade dos três sistemas, bem como *nifB* e *nifV*, (EADY, 1991). EVANS et al. (1988) observaram complementação entre os genes *nifUSVMB* de mutantes de *Klebsiella pneumoniae* e *Azotobacter chroococcum*, com alto grau de homologia funcional destes genes nos dois microrganismos.

#### 1.4.- REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

A fixação de nitrogênio é um processo com alto gasto energético já que são necessárias 16 moléculas de MgATP por molécula de  $N_2$  reduzido (SIMPSON e BURRIS, 1984). Em face a essa demanda energética os diazotrofos desenvolveram mecanismos de controle da síntese e atividade da nitrogenase quando nitrogênio fixado, principalmente  $NH_4^+$  é disponível.

##### 1.4.1.- Regulação da Transcrição dos genes *nif*

A repressão na síntese da nitrogenase ocorre a nível de transcrição dos genes responsáveis pela fixação de nitrogênio. A complexidade da regulação da expressão dos genes *nif* tem sido estudada em resposta a disponibilidade de fontes de nitrogênio fixado e ao oxigênio (MERRICK, 1988). Um microrganismo



intensamente estudado é a *Klebsiella pneumoniae* na qual a fixação de nitrogênio é regulada em dois níveis : 1)- pelo sistema de regulação geral de nitrogênio (*ntr*) e 2)- pelo sistema de regulação (*nif*) específico mediado pelos produtos dos genes *nifA* (ativador) e *nifL* (repressor). Em condições não repressoras ou seja, em presença de concentrações limitantes de amônia, a proteína NtrC fosforilada ativa a transcrição do operon *nifLA*, mas não dos outros operons *nif*. A proteína NifA por sua vez é ativadora específica da transcrição de todos os outros operons *nif* (DRUMMOND et al., 1983; OW e AUSUBEL, 1983). O produto do gene *ntrA* ou também designado *rpoN*, é o fator  $\sigma^{54}$  da RNAPolimerase que reconhece os promotores dos genes *nif* e *ntr* além de operons de outros genes não relacionados com o metabolismo do nitrogênio (KUSTU et al., 1989). O gene *ntrA* é transcrito constitucionalmente, não sendo portanto, sujeito às variações do nível de  $\text{NH}_4^+$  (De BRUIJN e AUSUBEL, 1983).

O primeiro nível de regulação da transcrição dos genes *nif* ocorre em altos níveis de amônia (> 10 mM) através do sistema *ntr* a nível de transcrição (CANNON et al., 1985). Em *Klebsiella pneumoniae* os genes *ntrBC* e *glnA* são contíguos e seus produtos : proteínas NtrB, NtrC e glutamina sintetase (GS), respectivamente, são alvo de regulação em um modelo tipo cascata de acordo com a relação  $\alpha$ -cetogluturato/glutamina (BUENO et al., 1985). Uma alta relação  $\alpha$  cetogluturato/glutamina ou seja em condições de baixa amônia, o produto do gene *glnD*, a uridililtransferase (UTase), acrescenta um grupamento UMP (uridililação) ao produto do gene *glnB*, a proteína PII (PII-UMP). Esta por sua vez interage com a proteína NtrB a qual fosforila a proteína NtrC (NtrC-P)(BUENO et al., 1985; KEENER e KUSTU, 1988). A proteína NtrC fosforilada ativa os promotores dependentes de NtrC como o dos genes *nifLA* (HAWKES et al., 1985).

A proteína PII também é responsável pela regulação da adenililação/desadenililação da glutamina sintetase através da adenililtransferase (Atase) produto do gene *glnE*. Em condições de alta  $\text{NH}_4^+$  a ATase catalisa a

adenililação da glutamina sintetase (GS-AMP) inativando-a. Porém, na condição de baixa amônia permanece na forma desadenilada ativa (GS) (JANSSEN e MAGASANIK, 1977; MAGASANIK, 1988). A glutamina sintetase, é portanto, juntamente com a uridililtransferase e NtrC, regulada em resposta a disponibilidade de fontes de nitrogênio.

Com uma baixa relação  $\alpha$ -cetoglutarato/glutamina ou seja em condições de alta amônia, a uridililtransferase remove o grupo UMP da proteína PII, que, nesta forma permite que a proteína NtrB desfosfatise a proteína NtrC, evitando a ativação dos promotores NtrC dependentes (HOLTEL e MERRICK, 1989). No esquema a seguir ficam melhor visualizados os efeitos da variação dos níveis de nitrogênio celular:

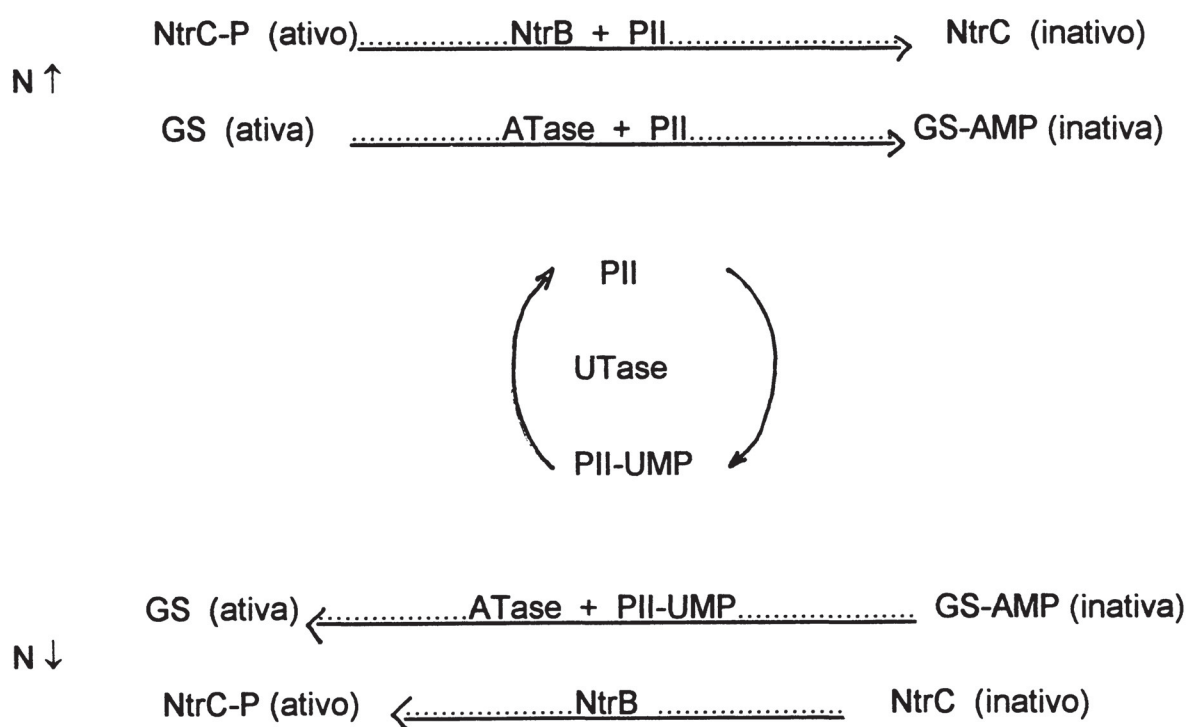


FIGURA 4.- ESQUEMA DE REGULAÇÃO DAS PROTEÍNAS NTRC E GLUTAMINA SINTETASE EM *Klebsiella pneumoniae*. (HOLTEL e MERRICK, 1989)

Contudo HOLTEL e MERRICK (1989) concluíram através do estudo de mutantes de *Klebsiella pneumoniae glnB<sup>-</sup>*, que a proteína PII não é absolutamente necessária para regulação de promotores NtrC ativados em resposta aos níveis de nitrogênio celular. Sendo proposto, a existência de um outro sistema sensível aos níveis de nitrogênio celular além da proteína PII.

A repressão da biossíntese da nitrogenase em *Klebsiella pneumoniae*, por níveis intermediários de amônia ou ainda pela presença de oxigênio envolve o produto do gene *nifL*, o qual em condições não repressoras assume uma conformação neutra inativa (MERRICK et al., 1982; KONG et al., 1986). A proteína NifL inibe a atividade da proteína NifA em resposta ao aumento dos níveis de oxigênio e nitrogênio fixado. A sequência de aminoácidos da proteína NifL demonstrou homologia com a proteína histidina quinase que faz parte de uma família de proteínas "sensoras". Não está claro ainda, qual seria o modo exato de ação dessa proteína, que parece possuir domínios responsáveis pela sensibilidade a mudanças no ambiente intracelular e de interação com a proteína NifA (SIDOTI et al., 1993). LEE et al., (1993) purificaram a proteína NifL de células crescidas aerobicamente em condições de repressão observando inibição da atividade da proteína NifA "in vitro" na ausência de oxigênio molecular ou nitrogênio combinado. Estes dados indicam que a proteína NifL necessita de algum tipo de alteração ou sinalização para ser convertida em uma forma não inibitória.

A proteína NifA se liga a uma sequência ativadora localizada a aproximadamente 100 pares de bases acima do início de transcrição, enquanto que a RNA polimerase e o fator  $\sigma^{54}$ , se ligam em sequências específicas localizadas a -24/-12. Para que ocorra transcrição, a proteína NifA complexada ao DNA faz contato com a RNA polimerase e o fator  $\sigma^{54}$  complexada à região -24/-12 formando uma alça de DNA com início da transcrição do gene envolvido (MORETT e BUCK, 1988).



Em *Klebsiella pneumoniae* a proteína NifA é necessária para a transcrição de todos os operons de genes *nif* exceto o próprio operon *nifLA*. O domínio central da proteína NifA de *Klebsiella pneumoniae* possui atividade de NTPase termo-lábil a 37°C, não sensível à proteína NifL, que parece interferir no contato entre a proteína NifA e o fator  $\sigma^{54}$  (BERGER et al., 1994). A sequência de regulação dos genes *nif* fica melhor visualizado na figura 5.

O estudo de mutantes *nif*<sup>-</sup> de *Azospirillum brasilense* revelou que o funcionamento do sistema de regulação neste microrganismo parece ser semelhante ao de *Klebsiella pneumoniae* (PEDROSA e YATES, 1984). Entre os mutantes obtidos as estirpes FP8 e FP9 foram complementados com gene *ntrC* e o mutante FP10 com o gene *nifA* de *K. pneumoniae*. A estirpe FP9 tem sido utilizada em alguns trabalhos recentemente publicados nos quais tem sido evidenciada a restauração do fenótipo Nif<sup>+</sup> através de plasmídeos contendo o gene *glnB* (Proteína PII) expresso constitutivamente, indicando papel essencial dessa proteína na modulação da atividade da proteína NifA em *A. brasilense* (ZAMAROCZY et al., 1993). LIANG et al. (1992) também propuseram que a proteína PII e a glutamina sintetase estão envolvidas na modificação pós-traducional da proteína NifA, sob a qual o envolvimento da glutamina sintetase poderia ser indireto, isto é, através do controle dos níveis de nitrogênio celular. Deste modo a proteína PII, através da cascata de fosforilação, levaria a uma forma modificada da proteína NifA. Estes mesmos autores em 1993 utilizando entre outras, a estirpe FP9, observaram que o gene *ntrC* não é o principal regulador da expressão de *nifA*, sendo contudo necessário para o mecanismo de desligamento da nitrogenase.

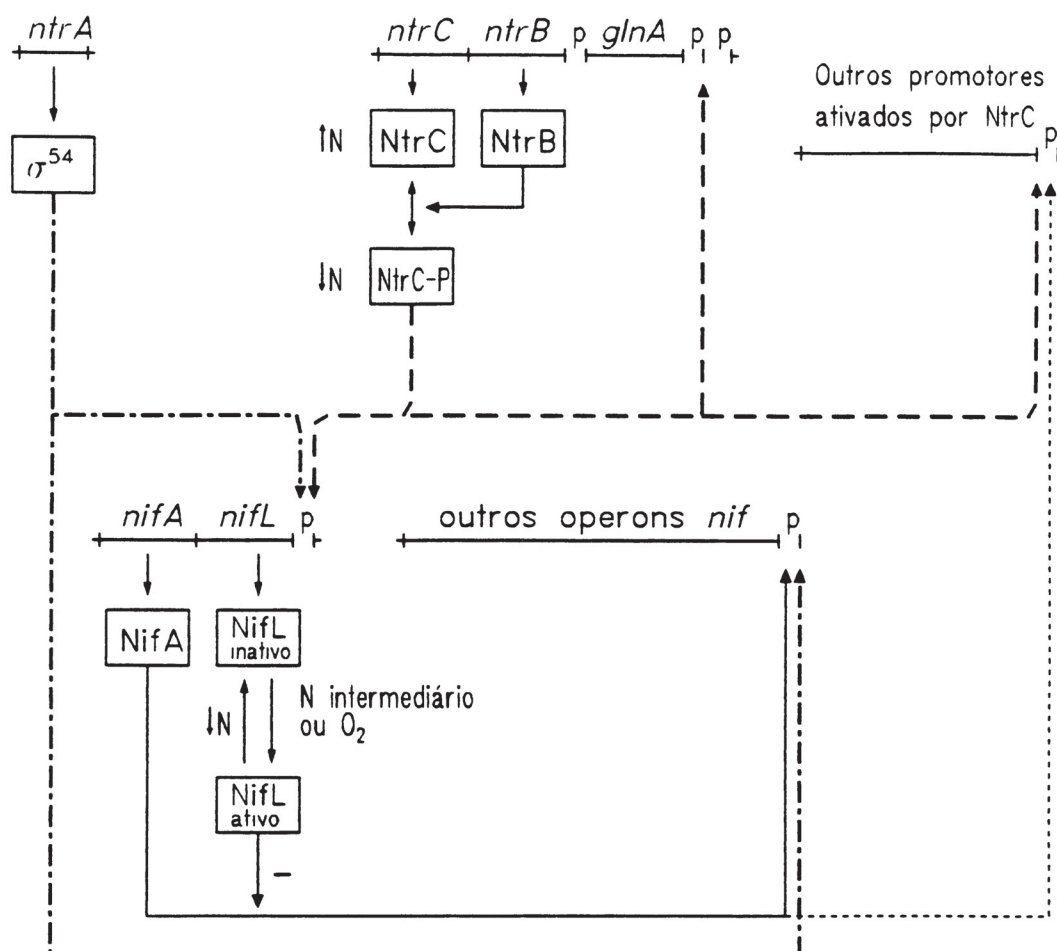


FIGURA 5.- MODELO DE REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES *nif* EM *Klebsiella pneumoniae*. (DIXON, 1984)

O produto do gene *ntrA* (fator  $\sigma^{54}$ ) é transcrito constitucionalmente e juntamente com a RNapolimerase e a proteína NtrC fosforilada (NtrC-P) (em condições limitantes de íons amônio) ativam o promotor dos genes *nifLA*. A proteína NifA ativa todos os outros operons *nif* exceto o próprio operon *nifLA*. A proteína NifL permanece inativa enquanto os níveis de oxigênio e nitrogênio fixado forem limitantes.



### 1.4.2.- Regulação da Atividade da Nitrogenase

A amônia é assimilada pelos microrganismos preferencialmente via glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT), ou ainda pela glutamato desidrogenase (GDH) (KLEINER, 1981):

#### Via GS/GOGAT



#### Via GDH



Em resposta aos níveis de amônia celular o sistema enzimático nitrogenase pode ser inibido reversivelmente em alguns microrganismos. Este processo de inibição tem sido denominado desligamento ("switch off") por amônia (ZUMFT e CASTILLO, 1978; PEDROSA e YATES, 1983). O estudo desse processo em *Rhodopseudomonas capsulata* (atualmente *Rhodobacter capsulatus*) e em *Rhodospirillum rubrum* em extratos de células demonstrou que esta inibição reversível da nitrogenase era decorrente da ligação covalente de um grupo ADP-ribosilil, doado do  $\text{NAD}^+$ , a uma das duas subunidades idênticas da proteína Ferro (JOUANNEAU et al., 1983; LOWERY et al., 1986). Este parece ser o processo envolvido no desligamento da nitrogenase em *A. brasilense* e *A. lipoferum*, mas não para *A. amazonense* (HARTMANN et al., 1986).

O grupamento ADP-ribosilil é transferido por ação da enzima dinitrogenase redutase ADP-ribosilil transferase (DRAT) à uma arginina específica (Arg 100) da proteína Ferro e removido pela enzima glicohidrolase ativadora da

dinitrogenase redutase (DRAG) ((LOWERY et al., 1986; ZHANG et al., 1993). Este processo de reativação da nitrogenase tem sido referido como ligação ("switch on") ( ZUMFT e CASTILLO, 1978; LUDDEN et al., 1988). Em *A. brasilense* condições de anaerobiose e adição de  $\text{NH}_4^+$  levam a uma rápida ativação da enzima DRAT cuja resposta varia com a concentração de amônia. A enzima DRAG por outro lado parece estar continuamente ativa, favorecendo a fixação de nitrogênio. Deste modo as atividades destas duas enzimas parecem não ser coordenadamente reguladas (ZHANG et al., 1993). Os genes que codificam as enzimas DRAT e DRAG de *A. brasilense* foram recentemente clonados e sequenciados (ZHANG et al., 1992). Estes genes são contíguos no cromossomo e apresentam extensa similaridade com os genes homólogos de *Rhodospirillum rubrum* (LUDDEN et al., 1988).

Mutações nos genes *draT* e *draG* de *Rhodospirillum rubrum* tem sido utilizadas para elucidar a regulação da nitrogenase por ADP-ribosilação. Mutantes *draT*<sup>-</sup> não possuem atividade detectável da enzima DRAG, sugerindo cotranscrição dos genes *draT* e *draG*. Mutantes *draG*<sup>-</sup> acumulam a proteína Ferro na sua forma ativa em condições não repressoras (LIANG.,1991).

Outras fontes de nitrogênio como glutamina, em culturas de *Azospirillum* spp (HARTMANN et al., 1986) ou metilamina em culturas de *Rhodopseudomonas capsulata* ( YOCH et al., 1983) são capazes de produzir desligamento da atividade da nitrogenase. Estes resultados levaram a sugestão de que a glutamina direta ou indiretamente tivesse participação na inibição reversível da atividade da nitrogenase, ou ainda que a glutamina sintetase atua-se como provedora de glutamina para o processo de inibição (JONES e MONTY, 1979). KANEMOTO e LUDDEN (1987) porém, observaram que não ocorre mudança significativa nos níveis de glutamina intracelular em *Rhodospirillum rubrum* durante as condições de desligamento da nitrogenase.

O oxigênio também exerce efeito inibidor sobre a atividade da nitrogenase. Este efeito é parcialmente reversível, dependendo da concentração

de oxigênio e do tempo de exposição (ROBSON e POSTGATE, 1980; HARTMANN e BURRIS, 1987). Em *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum* um pequeno aumento da concentração de oxigênio em culturas fixando nitrogênio inibe parcial e reversivelmente a atividade sem alteração da proteína ferro. Entretanto concentrações maiores provocam inativação irreversível da nitrogenase (HARTMANN e BURRIS, 1987). O desligamento reversível da nitrogenase promovido por oxigênio pode ter como causa o desvio do fluxo de elétrons para o oxigênio (GOLDBERG et al., 1987).

## 1.5.- FISILOGIA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

Alguns fatores como: fontes de energia, molibdênio, ferro, enxofre, oxigênio em níveis ótimos, ausência de nitrogênio fixado, temperatura apropriada, etc, são importantes para a fixação de nitrogênio. O estudo desses fatores fisiológicos podem ajudar a esclarecer e melhorar a fixação de nitrogênio em diferentes microrganismos através da sua correlação com estudos genéticos.

### 1.5.1. - Influência de Fontes de Carbono

A utilização de diferentes fontes de carbono pode proporcionar condições fisiológicas apropriadas para a expressão da nitrogenase. O metabolismo da frutose em *A. brasilense* quando comparado com o metabolismo de ácidos orgânicos como malato, succinato, piruvato ou lactato ocasiona períodos mais longos de crescimento e redução de acetileno (DAS e MISHRA, 1983, 1984). OKON et al. (1976) estudando *A. lipoferum* observaram decréscimo rápido dos níveis de acetileno reduzido quando o pH final da cultura estava acima de 7,8 em



meio com 0,05% de ágar utilizando malato, succinato, lactato, piruvato e galactose como fontes de carbono.

O metabolismo de fontes de carbono pode ser utilizado para diferenciar espécies do gênero *Azospirillum* (DOBEREINER e PEDROSA, 1987). Deste modo ácidos orgânicos são as fontes de carbono preferenciais para as quatro espécies de *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*) entretanto o metabolismo de diferentes açúcares é variável. *A. amazonense* é a única espécie que utiliza dissacarídeos (DRETS-MARTINEZ et al. 1985), *A. lipoferum* cresce em D-glucose (OKON et al. 1976), enquanto *A. brasilense* e *A. halopraeferans* não a utilizam.

*Azospirillum* tal como outros microrganismos pode estocar carbono em grânulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (OKON et al., 1976). O acúmulo deste polímero ocorre quando o oxigênio e outros aceitadores de elétrons são limitantes. Em *Azospirillum brasilense* este composto possui algumas funções fisiológicas importantes tais como, fonte de energia para fixação de nitrogênio além da resistência choque osmótico e barométrico, e também proteção contra radiação ultra-violeta (TAL e OKON, 1985).

### 1.5.2.- Influência do Oxigênio

O oxigênio é um importante fator limitante da fixação de nitrogênio já que pode reprimir a síntese da nitrogenase e inibir a atividade do sistema já sintetizado (EADY, 1981). A concentração ideal de oxigênio, capaz de associar crescimento diazotrófico é variável e tem a influência de fatores tais como, temperatura, pressão, tamanho e geometria do frasco de cultura, modo e intensidade de agitação, bem como a relação volume de cultura e frasco, as quais podem alterar a difusão do oxigênio, além do estado fisiológico e densidade de células (PEDROSA, 1988). OKON et al. (1976) verificaram para *A. lipoferum* que,



apesar de ser um microrganismo aeróbico, a redução do acetileno só ocorria sob condições de microaerofilia, condição esta associada a densidade de células da cultura, além do que, agitação da cultura de células passando-as sucessivamente de um frasco para outro, inativava temporariamente a nitrogenase sendo que a reativação era inibida por cloranfenicol. Os microrganismos aeróbicos necessitam portanto, conciliar a respiração e a fixação de nitrogênio e isto envolve mecanismos de proteção da síntese e atividade da nitrogenase. Os mecanismos atualmente conhecidos são : proteção respiratória, proteção conformacional, compartimentalização , proteção enzimática através da superóxido dismutase, catalase e peroxidase, proteção química por carotenóides, agregação celular, aerotaxia, etc (PEDROSA, 1988). DALTON e POSTGATE (1969) estudando *Azotobacter chroococcum* sugeriram que a proteção da nitrogenase contra o oxigênio pode ocorrer por ajuste da cadeia respiratória mantendo níveis apropriados para função do sistema. Em *A. vinelandii* a maior estabilidade da nitrogenase parece ser devido a associação com uma proteína ferro cujo centro Fe:S é mais estável ao oxigênio (HAAKER e VEEGER, 1977; ROBSON, 1979).

A atividade da hidrogenase também parece atuar como mecanismo de proteção. A produção de hidrogênio é uma característica intrínseca da reação da nitrogenase (SIMPSON e BURRIS ,1984). A hidrogenase ocorre em todos os microrganismos fixadores de nitrogênio. Atua na oxidação do hidrogênio contribuindo para baixar os níveis de oxigênio intracelular aumentando a proteção respiratória (ROBSON e POSTGATE, 1980). Entretanto em *Azospirillum brasilense* a oxidação do hidrogênio não conferiu maior proteção à atividade da nitrogenase devido a sensibilidade da hidrogenase ao oxigênio (PEDROSA et al., 1982).

A síntese de carotenóides parece proteger a nitrogenase em algumas estirpes de *Azospirillum brasilense* contra danos oxidativos, nas quais também observou-se a formação de agregados celulares sendo este último um fator que propiciaria um ambiente microaerófilo (NUR et al., 1981).

Através da aerotaxia diazotrofos aeróbios móveis se deslocam para regiões onde as concentrações de oxigênio são ótimas para fixação de nitrogênio (DAY e DOBEREINER, 1976). Estudos de REINER e OKON (1985) sugerem que em *Azospirillum brasilense* o citocromo  $c$  seria o provável sensor para interação com oxigênio durante a resposta aerotáctica.

### 1.5.3 - Metabolismo de compostos nitrogenados

A biossíntese da nitrogenase pode sofrer regulação por íons amônio, aminoácidos, nitratos e nitritos que atuam como repressor em diferentes microrganismos (EADY, 1981). Em *Clostridium pasteurianum* a adição de amônia a culturas fixando nitrogênio leva a uma imediata interrupção da síntese da nitrogenase, porém mantendo ativa e estável por pelo menos seis horas a enzima pré-existente (DAESCH e MORTENSON, 1972). O comportamento frente as diferentes fontes de nitrogênio varia conforme o microrganismo. Em *Klebsiella pneumoniae* (YOCH e PENGRA, 1966), e em *Aerobacter aerogenes* (PATIL et al., 1967), casaminoácidos estimulam a desrepressão da atividade provavelmente por aumentar a razão de síntese da nitrogenase. Em *Azospirillum brasilense* casaminoácidos inibem a desrepressão da nitrogenase, bem como alanina, glicina, glutamina, ácido glutâmico e cisteína (DAS e MISHRA, 1982). O papel de aminoácidos como possíveis repressores da biossíntese da nitrogenase também tem sido avaliado haja visto a interconversão desses compostos liberando amônia (DAESCH e MORTENSON, 1972; TUBB e POSTGATE, 1973). O estudo do efeito de vários aminoácidos e outras fontes orgânicas de nitrogênio sob a atividade da nitrogenase de *Azospirillum brasilense* revelou estimulação da atividade mesmo em altas concentrações como 8 mM por asparagina, ácido aspártico, lisina e tirosina (DAS e MISHRA, 1982). Também tem sido observado que diferentes estirpes de

*Azospirillum brasilense* estudadas por HARTMANN et al, (1988) crescem deficientemente na presença de aspartato, serina, histidina, e glutamato 10 mM não sendo observada repressão na biossíntese da nitrogenase. O mesmo não foi observado em diferentes estirpes de *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum amazonense* que utilizam estes aminoácidos prontamente. HARTMANN et al. evidenciaram portanto diferenças quantitativas e qualitativas na metabolização desses aminoácidos entre as espécies estudadas podendo ser utilizadas para caracterização taxonômica.

Em *Azotobacter chroococcum* a inibição da nitrogenase por amônia mostra-se proporcional a densidade da cultura, também foi observada repressão por íons nitrato. Glutamato, glutamina e aspartato não reprimem a síntese da nitrogenase e não são metabolizados pelo microrganismo (DROZD et al., 1972).

O estudo de mutantes de *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense*, nitrito e nitrato redutase negativos levaram MAGALHÃES et al. (1978) a concluir que a inibição da atividade da nitrogenase por nitratos depende da atividade redutora destas enzimas, além de que o inibidor efetivo na verdade é o nitrito. GALLORI e BAZZICALUPO (1985) observaram que a adição de DL-metionina-DL-sulfoximina (MSX) previne o efeito inibitório da amônia e glutamina sob atividade da nitrogenase em *A. brasilense*, o mesmo não ocorrendo com nitrito de potássio, indicando que o nitrito afeta a atividade por um mecanismo distinto, talvez similar ao efeito regulatório imposto pelo oxigênio, onde o nitrato poderia atuar como aceitador alternativo de elétrons (EADY, 1981).

#### 1.5.4 - Efeito da Temperatura

A temperatura é o terceiro parâmetro de controle de síntese da nitrogenase (HENNECKE e SHANMUGAM, 1979). Os estudos com *Klebsiella*



*pneumoniae* revelaram que este microrganismo cresce na temperatura de 37°C, mas não sintetiza o sistema nitrogenase e que não ocorre inativação da enzima pré-existente em células crescidas a 30°C quando incubadas por 3 horas a 39°C (HENNECKE e SHANMUGAM, 1979). A partir destas observações, e estudos com o gene *nifA* clonado levaram BUCHANAN-WOLLASTON et al. (1981), a concluir que esse fenômeno estava relacionado à termolabilidade da proteína produto do gene *nifA*. Estudos mais recentes revelam termolabilidade à 37°C do domínio central da proteína NifA de *Klebsiella pneumoniae*, região responsável pela atividade de ATPase (BERGER et al., 1994).

Estudos em diferentes espécies de *Azospirillum* mostraram que *A. brasilense* e *A. lipoferum* possuem atividade ótima da nitrogenase a 25°C e 30°C respectivamente, embora ambas apresentem crescimento ótimo até 35°C. Estas são também as temperaturas ótimas para proteína NifA a qual foi avaliada por ativação heteróloga *nifA*-dependente através fusão *nifH-lacZ*. Já *A. halopraeferens* apresenta ótimo crescimento e atividade da nitrogenase a 40-41°C (TRIPATHI e KLINGMULLER, 1992).

A temperatura também parece interferir no mecanismo de ligação do nitrogênio (N<sub>2</sub>) aos cofatores FeMoco e FeVaco das nitrogenases de *Azotobacter chroococcum*. DILWORTH et al. (1993) mostraram que a 50°C ocorrem alterações na interação entre FeMoco e a proteína MoFe alterando a capacidade de redução do nitrogênio e de acetileno. Observaram, também, que o cofator FeVaco da V-nitrogenase, a esta temperatura não mais reduz nitrogênio devido a interferências na interação do cofator com resíduos de aminoácidos da subunidade  $\alpha$  da proteína VFe.



### 1.6.- *Herbaspirillum seropedicae* - Descrição da espécie e avanços no estudo fisiológico e genético

Recentes descobertas demonstram o potencial de fixação de nitrogênio na cultura de cana-de-açúcar. Atualmente esta cultura consome 20% do total de adubos nitrogenados vendidos no Brasil. Contudo certas áreas do país a mais de 70 anos vem produzindo razoavelmente bem, sem ou com baixa adubação. Estudos utilizando-se a técnica de diluição do  $^{15}\text{N}$  indicam que mais de 60% do nitrogênio da planta são provenientes do ar, mostrando que em certas variedades de cana-de-açúcar a fixação biológica de nitrogênio, pode ser suficiente para garantir a produção atual brasileira. Tendo em vista estes resultados, tem se intensificado o estudo dos microrganismos diazotróficos associados às raízes, colmos e folhas que pudessem explicar as altas taxas de fixação de nitrogênio observadas para algumas variedades de cana-de-açúcar. (FRANCO e DOBEREINER, 1994).

Dentre estes microrganismos destacamos a bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, isolada em 1986 por BALDANI et al., da rizosfera ou da superfície de raízes de milho, sorgo e arroz. Este diazotrofo tem sido também isolado de cana-de-açúcar (PIMENTEL et al. 1991; BALDANI et al. 1992). Esta bactéria é gram negativa, apresenta forma vibrióide com diâmetro de 0,6 a 0,7  $\mu\text{m}$  e tamanho variando de 1,5 a 5  $\mu\text{m}$  conforme o meio de cultivo utilizado. São microrganismos aeróbicos, fixando nitrogênio em condições de microaerofilia, sendo aparentemente menos sensíveis ao  $\text{O}_2$  que *Azospirillum brasilense*. São móveis possuindo de 1 a 3 flagelos em um ou ambos os polos (BALDANI et al., 1986). O isolamento deste e de outros microrganismos tem sido facilitado pela utilização de meio semi-sólido isento de nitrogênio fixado. Os microrganismos sem proteção respiratória da nitrogenase, como *Herbaspirillum* spp e *Azospirillum* spp podem ser facilmente visualizados neste meio de cultura formando um tênue película que se

movimenta até a superfície do meio por movimentos aerotáticos, buscando o equilíbrio para as necessidades de respiração e fixação de nitrogênio (DOBEREINER, 1989 e 1991).

*Herbaspirillum seropedicae* foi inicialmente descrito como uma nova espécie do gênero *Azospirillum* (BALDANI, 1984). Estudos de hibridização rRNA/DNA entretanto, revelaram apenas 9 a 22 % de homologia com as espécies de *Azospirillum* (*A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*) (FALK et al., 1986). Posteriormente também foi evidenciado diferenças significativas no padrão de proteínas de membrana entre espécies de *Azospirillum* e *Herbaspirillum seropedicae* (DIANESE et al., 1989). Estudos recentes de hibridização rRNA/DNA, revelaram alto grau de homologia entre *H. seropedicae* e *Pseudomonas rubrisubalbicans* (GILLIS et al., 1990), um diazotrofo fitopatígeno de cana-de-açúcar (PIMENTEL et al. 1991), que foi finalmente renomeado como *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI et al., comunicação pessoal).

*Herbaspirillum seropedicae* está sendo descrito ultimamente como um diazotrofo endofítico, isolado de folhas e colmos de diferentes variedades de cana-de-açúcar e de macerado de diversas plantas que tiveram a superfície previamente esterilizadas (DOBEREINER, 1992b; DOBEREINER, 1993). Esta afirmação tem sido confirmada pela evidência de que ao contrário do observado com *Azospirillum brasilense*, este microrganismo não sobrevive em solos isentos de raízes (BALDANI et al., 1992). Este tipo de associação diazotrofo-planta tem mudado os conceitos clássicos e talvez explique os altos níveis de fixação de nitrogênio obtidos com diferentes gramíneas (DOBEREINER, 1992a; 1992b; 1993). O mecanismo envolvido na colonização das diferentes plantas, ainda permanece desconhecido, embora tenha sido evidenciado a possível translocação de *Acetobacter diazotrophicus*, para as partes aéreas de plantas inoculadas com a bactéria acrescida de esporos de VA (vesicular arbuscular) micorriza (DOBEREINER, 1993). Micorrizas são associações mutualistas (vida em simbiose) entre raízes e certos



grupos de fungos do solo os quais vivem em biotrofismo obrigatório após terem evoluído, perdendo sua capacidade patogênica. Mais especificamente, VA micorriza se refere a um dos vários tipos de endomicorrizas as quais penetram nas células corticais das raízes sem causar danos (SIQUEIRA e FRANCO, 1988)

A importância atribuída ao gênero *Herbaspirillum* provém da sua capacidade de fixação de nitrogênio em associação com gramíneas de interesse econômico (DOBEREINER, 1992a). Nesse sentido vários estudos vem sendo realizados. PEREIRA et al. (1989) observou que a inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em cultivos de sorgo e arroz não produz qualquer efeito sob o crescimento das plantas, entretanto foi comprovado o aumento da germinação das sementes.

BALDANI et al. (1992) utilizaram parâmetros para diferenciação entre *Herbaspirillum seropedicae* e *Pseudomonas rubrisubalbicans* (atualmente incluído no gênero *Herbaspirillum*) através de modificações no meio de cultivo. *H. rubrisubalbicans* torna-se alongado em meio utilizando glucose como fonte de carbono. Também foi observado que ambas espécies crescem fixando nitrogênio em meio contendo sacarose em concentração de até 100 g/l.

A inibição da atividade da nitrogenase, por íons amônio sugere o envolvimento por modificação covalente da proteína ferro por ADP-ribosilação como descrito para *Rhodospirillum rubrum* (KANEMOTO e LUDDEN, 1984) e *Azospirillum lipoferum* (HARTMANN et al., 1986). Entretanto em hibridização do DNA de *Herbaspirillum seropedicae* com sondas dos genes *draT-draG* (genes da ADP-ribosilil transferase e da glicohidrolase ativadora da proteína ferro, respectivamente) não detectaram a presença destes genes em *H. seropedicae* confirmando que a nitrogenase deste microrganismo não é inativada por modificação covalente dependente dos produtos desses genes (FU e BURRIS, 1989).

MATHIAS et al. (1989) determinaram em *Herbaspirillum seropedicae* a via metabólica da L-arabinose a qual é convertida a  $\alpha$ -cetoglutarato. As enzimas

chaves do metabolismo oxidativo da L-arabinose foram encontradas nas estirpes Z78, Z67, ZA69, ZA76, ZA95, ZM136 e Z152.

Além de estudos de fisiologia, a análise genética dos genes reguladores da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* vem sendo também descrita. PEDROSA et al., 1989 obtiveram os primeiros resultados sugerindo a presença do gene *nifA* em *Herbaspirillum seropedicae* através da complementação da estirpe *nifA*<sup>-</sup> (FP10) de *Azospirillum brasilense* com um plasmídeo recombinante contendo um fragmento de DNA de *H. seropedicae*. Posteriormente mostrou-se que aquele gene era estrutural e funcionalmente relacionado ao gene *nifA* de *Klebsiella pneumoniae* e *Azospirillum brasilense*, respectivamente (SOUZA, 1990).

O sequenciamento da região do gene *nifA* revelou uma ORF cuja sequência de aminoácidos possui alta homologia com a proteína NifA de outros microrganismos. Cerca de 900 pares de bases da região 3' ao gene *nifA* foram sequenciados e parte de uma ORF foi identificada e a sequência de aminoácidos dessa região é homóloga a sequência de aminoácidos da proteína NifB de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azotobacter vinelandii* (SOUZA et al., 1991).

Os genes *glnA* e *ntrBC* de *Herbaspirillum seropedicae* foram clonados e caracterizados revelando que a organização deste genes neste microrganismo é contígua como o observado em *Klebsiella pneumoniae* e *Azotobacter vinelandii* (TEIXEIRA, 1992).

A expressão do gene *nifA* é reprimida por nitrogênio fixado, mas não é afetada por oxigênio contrastando com a expressão do gene *nifB* que é afetada por ambos, íons amônio ou oxigênio. Não foi observada expressão do gene *nifB* em presença de íons amônio mesmo quando a proteína NifA é produzida constitutivamente mostrando que a atividade dessa proteína pode ser regulada em *Herbaspirillum seropedicae*. Estudos utilizando os promotores dos genes *nifA* e *nifB*, com o gene *lacZ* (codificador de  $\beta$ -galactosidase) tem revelado que a proteína NifA de *H. seropedicae* é estável a temperatura de 37°C ao contrário do observado em



*Klebsiella pneumoniae* (SOUZA et al., 1994). Em estudos mais recentes foram encontradas seqüências homólogas ao promotor tipo -24/-12, juntamente com os sítios de ligação para as proteínas NifA e NtrC. Fusões *lacZ* com promotor do gene *nifA* com seqüência deletada indica que o sítio de ligação para a proteína NtrC é importante para expressão do gene *nifA*. O sítio de ligação do produto do gene *nifA* de *H. seropedicae* só é funcional quando seqüências situadas na sua região 5' são removidos. Além disso evidências de "footprinting" de DNA sugerem a ligação da proteína NifA em *Herbaspirillum seropedicae* (SOUZA et al., 1994 - no prelo).

Os genes *nifHDK* de *Herbaspirillum seropedicae* foram isolados por hibridização utilizando como sonda genes de *Azospirillum brasilense*. A caracterização e o sequenciamento destes genes estão em andamento (MACHADO et al., 1994).

Foi isolado e caracterizado um gene estruturalmente homólogo ao gene *recA* de *E. coli* em *H. seropedicae*. A proteína RecA de *H. seropedicae* foi capaz de suprimir a sensibilidade das estirpes mutantes de *E. coli recA<sup>-</sup>* ao agente alquilante metanosulfonato de metila e à radiação ultravioleta, indicando a indução da resposta SOS e restaurou também a capacidade de recombinação homóloga de *E. coli*. Foi portanto caracterizado em *H. seropedicae* um sistema de reparo e recombinação. A mutagênese do gene *recA* de *H. seropedicae* estirpe Z78, poderá futuramente propiciar a obtenção de estirpes *recA<sup>-</sup>* incapazes de recombinação homóloga e portanto, de integrar genes clonados (STEFFENS, 1994).

## 1.7 - OBJETIVOS

As características fisiológicas das bactérias fixadoras de nitrogênio podem contribuir para correlação entre o estudo genético e seu significado a nível fisiológico. O estudo detalhado da fisiologia e genética de *Herbaspirillum seropedicae* poderá proporcionar de modo mais significativo o aproveitamento deste microrganismo como biofertilizante na agricultura. Deste modo visando a obtenção de condições ideais de crescimento e atividade da nitrogenase reprodutíveis foi iniciado este trabalho com os seguintes objetivos:

- 1- Determinação das condições ideais de crescimento para estirpes de *H. seropedicae* em meio NFbHP líquido utilizando fontes alternativas de carbono e nitrogênio bem como efeito da temperatura e pH .
- 2- Determinação das condições ideais para a expressão da atividade da nitrogenase em meio NFbHP líquido utilizando fontes alternativas de carbono e nitrogênio ; variação no pH inicial do meio de cultivo; densidade da cultura. Desrepressão e efeito de íons amônio e diferentes fontes de nitrogênio sobre a atividade da nitrogenase.
- 3- Isolamento e visualização de plasmídeos das estirpes de *H. seropedicae*.

## 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MICRORGANISMOS E PLASMÍDEOS

As estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* listadas na tabela I foram gentilmente cedidas pela Dra. Johanna Dobereiner, do Programa Nacional de Pesquisas em Agrobiologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Seropédica, Rio de Janeiro.

Os microrganismos foram estocados em glicerol 50% a - 20°C, condições estas que permitem manutenção da viabilidade das células durante pelo menos 1 ano.

### 2.2 MEIOS DE CULTURA

O meio de cultura utilizado para crescimento das estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* foi o meio NFbHP (PEDROSA e YATES, 1984) utilizando malato de sódio como fonte de carbono. O meio apresenta a seguinte composição:-

	gramas/litro
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,0
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	6,0
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{NaCl}$	0,1
$\text{CaCl}_2$	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Ácido nitrilo triacético	$5,6 \cdot 10^{-2}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$

Biotina	1,0.10 <sup>-4</sup>
Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,0.10 <sup>-3</sup>
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2,4.10 <sup>-3</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8.10 <sup>-3</sup>
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	8,0.10 <sup>-3</sup>
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2,4.10 <sup>-4</sup>
Malato de sódio	5,0

Os fosfatos foram autoclavados separadamente e adicionados no momento de uso, bem como as fontes de nitrogênio. Usualmente utilizou-se 5 mM de glutamato de sódio ou 20 mM de NH<sub>4</sub>Cl como fontes de nitrogênio, sendo o meio então denominado NFbHPG ou NFbHPN, respectivamente. Experimentos nos quais utilizou-se diferentes fontes de nitrogênio e/ou carbono, ou diferentes concentrações dos acima citados estão indicados oportunamente. O meio apresenta pH final de 6,8 ou ajustado como indicado em cada experimento.

As estirpes de *Escherichia coli* foram crescidas em meio Luria-Broth (LB) (SAMBROOK et al., 1989 ) e apresenta a seguinte composição: -

	gramas/litro
Triptona	10
Extrato de Levedura	5
NaCl	10

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

Para obtenção de meios sólidos e semi-sólidos, os meios líquidos foram acrescidos de 12,0 g / l e 2,0 g / l de ágar, respectivamente. Todos os meios



foram esterilizados em autoclave a 120° C e a 1 atmosfera de pressão por 20 minutos.

### 2.3 ANTIBIÓTICOS

As soluções estoques de antibióticos utilizadas nos meios de cultura foram preparadas nas concentrações a seguir especificadas :-

		mg / ml
Ácido Nalidíxico	(Nal)	10
Ampicilina	(Amp)	40
Canamicina	(Km)	20
Estreptomicina	(Sm)	20
Tetraciclina	(Tc)	10

A solução de tetraciclina foi preparada em etanol 50%, e as soluções de ampicilina, canamicina e estreptomicina foram preparadas em água destilada e esterilizadas por filtração em filtro millipore HAWP (0,45µm) A solução de ácido nalidíxico foi preparada em água destilada, neutralizada com hidróxido de sódio 1N para completa solubilização e esterilizada por filtração. As soluções estoque de antibióticos foram mantidas a 0° C.

### 2.4 REAGENTES QUÍMICOS

Ampicilina, ácido nalidíxico, canamicina, estreptomicina, tetraciclina, agarose, soroalbumina bovina, L-histidina, DL-serina, metilamina, glutamato

TABELA I BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

Bactérias e Plasmídeos	Genótipo/Fenótipo Relevante	Fonte/Referência
<i>Azospirillum brasilense</i> FP2	Sp7 ATCC 29145 Nif <sup>+</sup> Nal <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup>	PEDROSA e YATES, 1984
<i>Escherichia coli</i> HB 101  1230	F <sup>-</sup> <i>hsdS20 proA2</i> Sm <sup>R</sup> <i>recA13</i> <i>recA<sup>-</sup> r<sup>m</sup> Sm<sup>R</sup></i> <i>pro met recA<sup>-</sup></i>	BOYER e ROULLAND- DUSSOIX, 1969 A.W. B JOHNSTON
<i>Herbaspirillum</i> <i>seropedicae</i> SMR1 Z67 ZA69 ZA76 ZA95 Z152	Z78 ATCC 35893 Nif <sup>+</sup> Sm <sup>R</sup> Nif <sup>+</sup> ATCC 35892 Nif <sup>+</sup> Nif <sup>+</sup> ATCC 35892 Nif <sup>+</sup> Nif <sup>+</sup>	SOUZA et al., 1994 BALDANI et al., 1986 BALDANI et al., 1986 BALDANI et al., 1986 BALDANI et al., 1986 BALDANI et al., 1986
Plasmídeos pBMR26.2 R68.45	pBMR5 <i>recA::Tn5</i> IncP-1 Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> <i>tra<sup>+</sup>mob<sup>+</sup></i>	STEFFENS ,1993 HAAS e HOLLOWAY, 1978

monossódico foram adquiridos de Sigma Chemical Company. L-cisteína e biotina foram adquiridos de E. Merck.

Os demais reagentes foram provenientes de diversas fontes todos pré-análise e tidos como puros. Os gases nitrogênio super seco, acetileno, etileno padrão (96 ppm), hidrogênio e ar comprimido foram adquiridos de White Martins S.A.

## 2.5 CONDIÇÕES DE CULTURA

Para as culturas das estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* foram utilizados frascos tipo penicilina de 60 ml contendo 20 ml de meio NFbHP líquido ou conforme especificado. Foi mantida a relação de 1:3 ou de 1:4 entre o volume de meio e o volume total do frasco empregado em experimentos nos quais foi medida a atividade da nitrogenase ou somente para crescimento respectivamente. Para as estirpes de *Escherichia coli* foram utilizados os mesmos frascos citados contendo 10 ml de meio Luria Broth. A aeração das culturas foi realizada em agitador rotatório a 120 rpm a 30° C até a densidade de células atingir absorvância de aproximadamente 1,70 em 550 nm.

As culturas em meio semi-sólido foram crescidas estaticamente em frascos tipo penicilina de 10 ml contendo 4 ml de meio de cultura e incubados em estufa a 30° C.

Para a obtenção do pré-inóculo as células das diferentes estirpes foram transferidas de uma suspensão de glicerol a 50% a -20°C, ou através de repique de células crescidas em meio líquido para novo meio NFbHPG. Foram utilizados antibióticos correspondentes das marcas de resistência das estirpes utilizadas e as culturas foram incubadas a 30°C e agitação de 120 rpm até

densidade de células atingir absorvância de aproximadamente 1,70 em 550 nm ( $10^9$  células / ml).

## 2.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução do acetileno a etileno (DILWORTH, 1966; SCHOLLHORN e BURRIS, 1967).

Os frascos com culturas foram vedados com rolhas de borracha (subba-seal) e então injetado acetileno gasoso (10% do volume de fase gasosa do frasco) e incubados nas mesmas condições para crescimento. No tempo indicado para cada experimento foi coletada uma amostra de 0,5 ml para análise do etileno formado por cromatografia gasosa. Foi utilizado cromatógrafo Varian 2440D equipado com coluna Porapak N e detetor de ionização de chama. As temperaturas do injetor e da coluna foram mantidas a 100° C enquanto que a do detetor foi mantida a 130° C. O gás de arraste foi nitrogênio super seco (20ml / min).

Para o cálculo do etileno formado, foi utilizado o etileno padrão de 96 ppm fornecido pela White Martins S.A. Cada alíquota de 0,5 ml deste padrão contém 2,143 nmoles de etileno a 1 atm e a 25° C segundo a lei dos gases ideais.

A atividade específica da nitrogenase foi expressa como nmol de etileno formado por minuto e por miligrama de proteína total na cultura.

## 2.7 CRESCIMENTO E DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DUPLICAÇÃO EM *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

A estirpe SMR1 de *Herbaspirillum seropedicae* foi inoculada em 500 ml de meio NFbHPG contido em erlenmeyer (2000 ml), a seguir a suspensão de



células foi dividida em volumes de 20 ml para frascos tipo penicilina de 60ml e incubadas a 30°C sob agitação de 120 rpm.

O crescimento foi acompanhado pela determinação da densidade ótica em 550 nm em intervalos de uma hora.

O tempo de duplicação ( $t_d$ ) foi determinado pela equação (MILLER, 1972):

$$t_d = 0,3 \cdot (t_2 - t_1) / (\log N_2 - \log N_1)$$

Onde  $N_2$  e  $N_1$  correspondem ao número de bactérias presentes nos tempos  $t_2$  e  $t_1$  respectivamente. Os valores de  $N$  foram substituídos pela leitura da densidade ótica a 550 nm.

## 2.8 EFEITO DO pH SOBRE O CRESCIMENTO E NA ATIVIDADE DA NITROGENASE EM *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

O efeito do pH no crescimento e na expressão da nitrogenase foi avaliado inoculando-se as células em meio no qual o pH inicial foi previamente ajustado. A estirpe SMR1 de *Herbaspirillum seropedicae* foi crescida em meio NFbHPG com pH inicial ajustado numa faixa de 4,0 a 8,0 com solução estéril de ácido sulfúrico 5N ou hidróxido de sódio 5N, adicionados ao meio estéril no momento de uso. O pH foi acertado com o pHmetro dentro do fluxo laminar, após o ajuste do pH desejado, o meio foi colocado no microondas para evitar uma eventual contaminação. As culturas foram incubadas a 30°C e agitação de 120 rpm. por 16 horas.

A atividade da nitrogenase foi determinada depois de 60 minutos de incubação com acetileno (como descrito em 2.6), bem como pH final da cultura. O crescimento foi avaliado pela determinação de proteínas totais.

## 2.9 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO SOBRE O CRESCIMENTO E ATIVIDADE DA NITROGENASE EM *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

O efeito da densidade da cultura para expressão da atividade da nitrogenase da estirpe SMR1 de *Herbaspirillum seropedicae* foi determinado através de culturas com diferentes valores de densidade ótica obtidas com a inoculação de diferentes volumes de células (2, 5, 50, 75, 100, 250, 350 ou 500 µl) em meio líquido NFbHPG pH 5,5. Utilizou-se um pré-inóculo com D.O.<sub>550</sub>  $\cong$  1,70, e as culturas foram incubadas por 16 horas a 30°C e 120 rpm de agitação .

Após este período a atividade da nitrogenase foi determinada depois de 60 minutos de incubação com acetileno (como descrito em 2.6). O crescimento foi avaliado pela leitura da turbidez da cultura em 550 nm e determinação da concentração de proteínas.

## 2.10 EFEITO DE COMPOSTOS NITROGENADOS SOBRE O CRESCIMENTO E EXPRESSÃO DA NITROGENASE EM *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

A estirpe SMR1 de *Herbaspirillum seropedicae* foi crescida em meio NFbHPG pH 5,5 utilizando como fontes de nitrogênio : DL-serina, L-histidina, L-cisteína ou glutamato (5mM), NH<sub>4</sub>Cl (20 mM) , metilamina (2 ou 5 mM).

Após crescimento a 30°C e agitação de 120 rpm a atividade da nitrogenase dos cultivos foi determinada depois de 60 minutos de incubação com acetileno. Para culturas crescidas em meio contendo L-cisteína e DL-serina foi medida atividade em três tempos diferentes durante o crescimento (16, 24 ou 48 horas ) . O crescimento foi avaliado pela leitura de densidade ótica em 550 nm e

determinação de proteínas totais após 16 horas para os cultivos contendo glutamato ou amônia e 48 horas para os cultivos contendo DL-serina ou L-cisteína.

## 2.11 UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO POR ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

As estirpes Z67, ZA69, ZA76, SMR1, ZA95, Z152 de *H. seropedicae* foram crescidas em meio NFbHP contendo cloreto de amônia 20 mM e utilizando como fontes de carbono:- DL- malato, DL- lactato, D-glucose, D-maltose, L-rhamnose, D-manose e D-rafinose em concentração de 5mg/ml. O pH final foi ajustado para 5,5. Após incubação a 30°C e agitação de 120 rpm por 16 horas para as culturas crescidas em DL-malato, DL-lactato, D-glucose ou L-rhamnose; 48 horas para culturas crescidas em D-maltose e 60 horas para culturas crescidas em D-manose ou D-rafinose, foi avaliado crescimento através da determinação da concentração de proteínas.

## 2.12 EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO EM MEIO SEMI-SÓLIDO SOBRE A EXPRESSÃO DA NITROGENASE EM ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

As estirpes Z67, ZA69, ZA76, SMR1, ZA95, Z152 de *H. seropedicae* foram crescidas em meio NFbHP semi-sólido isento de nitrogênio fixado, utilizando como fontes de carbono : DL-malato, DL-lactato, D-glucose , L-rhamnose , D-maltose, D-manose ou D-rafinose em concentração de 5 mg/ml. As células utilizadas para inocular os frascos com meio semi-sólido foram previamente centrifugadas e ressuspensas em meio NFbHP sem fonte de carbono.

Após 48 horas de crescimento em estufa a 30°C ou após a formação de uma película de células próxima a superfície do meio , foi determinada a atividade da nitrogenase depois de 60 minutos de incubação com acetileno.

### 2.13 EFEITO DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE A EXPRESSÃO DA NITROGENASE EM *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

A estirpe SMR1 de *H. seropedicae* foi crescida em meio líquido NFbHPG pH 5,5, utilizando como fontes de carbono além do glutamato : DL-lactato, DL- malato, D-glucose, D-maltose, L-rhamnose, D-manose e D-rafinose em concentração de 5 mg/ml. Também foi preparado cultivo no mesmo meio utilizando-se somente glutamato como fonte de carbono e nitrogênio.

Após o crescimento a 30°C e agitação de 120 rpm por 16 horas para as culturas crescidas em DL-malato e após 14, 16 e 18 horas para culturas contendo DL-lactato, D-glucose , L-rhamnose ou somente L-glutamato; 48 horas para culturas contendo em D-maltose e 60 horas para culturas crescidas em D-manose ou D-rafinose, foi determinada atividade da nitrogenase, densidade ótica em 550 nm e determinada proteína total dos cultivos.

### 2.14 ATIVIDADE DA NITROGENASE EM DIFERENTES ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

As estirpes Z67, ZA69, ZA76, SMR1, ZA95 e Z152 de *H. seropedicae* foram crescidas em meio NFbHPG pH 5,5. As culturas foram incubadas a 30°C e agitação de 120 rpm e após 16, 18 ou 20 horas em crescimento foi determinada



atividade da nitrogenase depois de 60 minutos de incubação das culturas com acetileno. Também foi determinada a concentração de proteínas.

## 2.15 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO EM DIFERENTES ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

As estirpes SMR1 , ZA95 e Z152 de *Herbaspirillum seropedicae* foram crescidas em meio NFbHPG pH 5,5 e incubadas para crescimento nas temperaturas de: 30°, 35°, 40° e 45° C. Após 16 horas de crescimento foi determinada a densidade ótica das culturas em 550 nm e concentração de proteínas . O número de células foi determinado plaqueando-se alíquotas (0,1ml) de células diluídas que foram espalhadas sobre placas com meio NFBHPG sólido e incubadas a 30°C por 24 horas. O número de colônias foi multiplicado pelo fator de diluição.

## 2.16 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS AMÔNIO PRESENTES NO CRESCIMENTO SOBRE A DESREPRESSÃO DA NITROGENASE EM *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

Com a finalidade de se determinar o efeito de íons amônio no crescimento para desrepressão da nitrogenase em *Herbaspirillum seropedicae*, a estirpe SMR1 foi cultivada em meio com diferentes concentrações de cloreto de amônio. As células foram inoculadas em erlenmeyer (1000 ml) com 250 ml de meio NFbHPN contendo NH<sub>4</sub>Cl 20 mM, 10 mM, 5mM ou 2mM e incubadas por 16 horas a 30°C e agitação de 120 rpm. Após esse período foi determinada densidade ótica em 550 nm e as células foram centrifugadas a 3500xg por 5 minutos a 4°C. Em seguida as células foram ressuspensas em meio NFbHP isento de nitrogênio fixado

para uma  $D.O_{550} \cong 1,4$ . Após 2 horas de incubação a 30°C e agitação de 120 rpm para permitir a desrepressão da nitrogenase esta foi determinada incubando-se a cultura por 60 minutos com acetileno (como descrito em 2.6). Para as culturas crescidas em  $NH_4Cl$  20 mM, 10 mM ou 5 mM o período de incubação foi prorrogado com verificação de atividade de hora em hora. Isto foi feito por 5 horas sendo que a última verificação de atividade foi após 16 horas de incubação. Após o período de incubação foi efetuada a determinação de proteínas totais.

## 2.17 EFEITO DA DENSIDADE DA CULTURA SOBRE A DESREPRESSÃO DA NITROGENASE EM *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

A densidade da cultura como fator para desrepressão da atividade da nitrogenase em células previamente crescidas em meio contendo íons amônio foi determinada utilizando-se a estirpe SMR1 de *Herbaspirillum seropedicae*.

As células foram inoculadas em erlenmeyer (1000 ml) com 250 ml de meio NFbHPN contendo  $NH_4Cl$  2 mM e incubadas por 16 horas a 30°C e agitação de 120 rpm. Após esse período em crescimento foi determinada a densidade ótica em 550 nm, as células foram centrifugadas a 3500xg por 5 minutos a 4° C e então ressuspensas em novo meio NFbHP isento de nitrogênio fixado em uma  $D.O_{550} \cong 2,0$ . A partir dessa suspensão de células, foram feitas diluições com o mesmo meio a fim de se obter suspensões numa faixa de 1,1 a 1.7 de densidade ótica. As culturas foram então incubadas por 2 horas a 30°C e agitação de 120 rpm para permitir a desrepressão da nitrogenase. Decorrido esse tempo foi determinada atividade da nitrogenase depois de 60 minutos de incubação com acetileno (como descrito em 2.6), além da determinação da densidade ótica final em 550 nm e dosagem de proteínas totais.

## 2.18 EFEITO DE ÍONS AMÔNIO SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE EM ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

### 2.18.1 Efeito de íons amônio sobre a atividade da nitrogenase em *H. seropedicae* estirpe SMR1

A cultura foi crescida em erlemeyer (1000 ml) com 250 ml de meio NFbHPN contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2 mM. Após 16 horas em crescimento a 30°C e agitação de 120 rpm foi determinada turbidez da cultura em 550 nm as células foram centrifugadas a 3500xg por 5 minutos a 4° C, e em seguida ressuspensas em meio NFbHP isento de nitrogênio fixado para uma  $\text{D.O.}_{550} \cong 1,40$ . Após 2 horas de incubação a 30°C e agitação de 120 rpm para permitir a desrepressão da nitrogenase a qual foi determinada em intervalos de tempo de 30 minutos de incubação das culturas com acetileno. Aos 60 minutos foi adicionado  $\text{NH}_4\text{Cl}$  :- 50, 100, 150 ou 200 $\mu\text{M}$ .

### 2.18.2 Efeito de íons amônio sobre a atividade da nitrogenase em diferentes estirpes de *H. seropedicae* cultivadas em glutamato

As estirpes Z67, ZA69, ZA76, SMR1, ZA95, Z152 de *H. seropedicae* foram crescidas em meio líquido NFbHPG pH 5,5. Após o crescimento das culturas a 30°C e agitação de 120 rpm foi determinada atividade da nitrogenase em intervalos de tempo de 30 minutos de incubação das culturas com acetileno. Aos 60 minutos foi adicionado cloreto de amônia 2 mM.



## 2.19 DESREPRESSÃO E INATIVAÇÃO DA NITROGENASE EM DIFERENTES ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

As estirpes Z67, ZA69, ZA76, SMR1, ZA95, Z152 de *H. seropedicae* foram crescidas em erlemeyer (1000 ml) com 250 ml de meio NFbHPN contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2 mM. Após 16 horas em crescimento a 30°C e agitação de 120 rpm foi determinada densidade ótica em 550 nm e as células foram centrifugadas a 3500xg por 5 minutos a 4° C e em seguida ressuspensas em meio NFbHP isento de nitrogênio fixado para uma  $\text{D.O.}_{550} \cong 1,40$ . Após 2 horas de incubação a 30°C e agitação de 120 rpm para permitir a desrepressão da nitrogenase a qual foi determinada em intervalos de tempo de 30 minutos de incubação das culturas com acetileno. Aos 60 minutos foi adicionado  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2mM.

## 2.20 EFEITO DA METILAMINA SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE EM *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

O efeito da metilamina sobre a atividade da nitrogenase foi determinado adicionando-se metilamina em diferentes concentrações em culturas fixando nitrogênio previamente crescidas em meio contendo cloreto amônia e em meio contendo glutamato de sódio.

### 2.20.1 Efeito da metilamina sobre a atividade da nitrogenase em células crescidas em meio contendo amônia 2 mM

A estirpe SMR1 de *Herbaspirillum seropedicae* foi crescida em erlenmeyer (1000 ml) com 250 ml de meio NFbHPN contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2 mM e incubadas por 16 horas a 30°C e agitação de 120 rpm. Decorrido este período foi



determinada a turbidez da cultura em 550 nm, as células foram centrifugadas a 3500 x g por 5 minutos a 4° C e em seguida ressuspensas em meio NFbHP isento de nitrogênio fixado para uma D.O.<sub>550</sub>  $\cong$  1,2. As culturas foram incubadas por 4 horas a 30°C com agitação de 120 rpm para permitir a desrepressão da nitrogenase a qual foi determinada em intervalos de tempo de 30 minutos de incubação com acetileno (como descrito em 2.6). Aos 60 minutos de incubação com acetileno foi adicionado :- NH<sub>4</sub>Cl 1 mM, metilamina 1mM , 2mM ou 5mM.

### 2.20.2 Efeito da metilamina sobre a atividade da nitrogenase em células crescidas em meio contendo glutamato 5mM

A estirpe SMR1 de *Herbaspirillum seropedicae* foi crescida em erlemeyer (1000 ml) contendo 250 ml de meio NFbHPG .A cultura foi incubada a 30°C e agitação de 120 rpm. Após 16 horas foi determinada a densidade ótica em 550 nm e as células foram centrifugadas a 3500 x g por 5 minutos a 4° C e em seguida ressuspensas em meio NFbHP isento de nitrogênio fixado para uma D.O.<sub>550</sub>  $\cong$  1,2. As culturas foram incubadas por 4 horas a 30°C e agitação de 120 rpm para permitir a desrepressão da nitrogenase a qual foi determinada em intervalos de tempo de 30 minutos de incubação com acetileno (como descrito em 2.6). Aos 60 minutos de incubação com acetileno foi adicionado NH<sub>4</sub>Cl 1 mM, metilamina 1 mM , 2mM ou 5mM.

### 2.21 EFEITO DE COMPOSTOS NITROGENADOS SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE EM *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

Diferentes fontes de nitrogênio foram adicionadas às culturas da estirpe SMR1 de *Herbaspirillum seropedicae* desreprimidas e fixando nitrogênio.

As células foram crescidas em erlemeyer (1000 ml) com 250 ml de meio NFbHPN contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2 mM e incubadas a 30°C e agitação de 120 rpm.

Após 16 horas de crescimento foi determinada a densidade ótica em 550 nm as células foram centrifugadas a 3500xg por 5 minutos a 4° C e em seguida ressuspensas em meio NFbHP isento de nitrogênio fixado para uma  $D.O_{550} \cong 1,2$ . As culturas foram incubadas por 4 horas a 30°C e agitação de 120 rpm para permitir a desrepressão da nitrogenase e então foi determinada atividade em intervalos de tempo de 30 minutos de incubação com acetileno. Aos 60 minutos foi adicionado 1 mM de :-  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , metilamina, glutamato, DL- serina, L-histidina e L-cisteína (as soluções estoque de aminoácidos foram preparadas no momento de uso e esterilizadas por filtração em filtro Millipore 0,45  $\mu\text{m}$ ).

## 2.22 DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE PLASMÍDEOS DE DIFERENTES ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

Plasmídeos das estirpes Z67, ZA69, ZA76, SMR1, ZA95, Z152 de *H. seropedicae* foram isolados pela técnica de lise alcalina descrita por ROBSON et al. (1984) visualizados por análise eletroforética em gel de agarose.

As células foram crescidas em meio NFbHPG ou LB (*E. coli*) com os antibióticos de acordo com a marca de resistência do plasmídeo e da bactéria.

Alíquotas de 1 a 3 ml de células foram centrifugadas em tubo tipo Eppendorf estéril numa microcentrífuga Spin I. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 50  $\mu\text{l}$  de  $T_{10}E_1$  (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). A esta suspensão foram adicionados 950  $\mu\text{l}$  da mistura de lise (SDS 1% , EDTA 0,05 M em hidróxido de sódio pH 12,6), após misturada suavemente até completa homogeneização seguiu-se incubação a 34° C por 25 minutos. A precipitação do SDS, proteínas e DNA desnaturado foi realizada pela adição de 170  $\mu\text{l}$  de Tris/salt

(Tris 0,7 M , NaCl 3,5 M pH 8,0), novamente suavemente homogeneizado e incubado 15 minutos a -20° C. A preparação foi então centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para novo tubo Eppendorf estéril contendo 770 µl de acetato/etanol (acetato de sódio 3 M em etanol absoluto - 1:10). A mistura foi então incubada por 12 horas a -20° C para precipitação do DNA plasmidial.

Após a precipitação , a mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o DNA precipitado foi cuidadosamente secado por inversão sobre papel absorvente e em seguida em bomba de vácuo, para eliminar o etanol residual. O DNA assim isolado foi então dissolvido em 15 µl de T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> seguido da adição do corante para eletroforese (azul de bromofenol 0,025%, glicerol 50% em tampão TBE- tris borato EDTA), as amostras foram então aplicadas em gel de agarose e eletroforisadas como descrito a seguir.

Todas as soluções e materiais foram esterilizados por autoclavação a 1 atm por 20 minutos. Os plasmídeos de *Azospirillum brasilense* estirpe FP2, *Escherichia coli* estirpe HB101 (pBMR22.6) e *Escherichia coli* estirpe 1230 (R68.45) foram isolados pelo mesmo método e utilizados como padrões de peso molecular.

#### 2.22.1.- Eletroforese de DNA

A determinação do padrão de plasmídeos foi feita por eletroforese em gel de agarose como descrito por SAMBROOK et al. (1989). O gel de agarose foi preparado na concentração de 0,7% em tampão TBE (tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM) em placa de 7,5 cm de comprimento por 5 cm de largura, apresentando 8 poços com capacidade para aplicação de até 20 µl de cada amostra . A corrida eletroforética foi efetuada com o gel submerso em tampão TBE, aplicando-se 5 volts/cm por 4 horas. Após a corrida o gel foi corado com solução de



brometo de etídeo (EBr) (5 $\mu$ l de solução 10 mg/ml em uma cuba com 100 ml de água destilada) por 15 minutos. O excesso de EBr foi removido por lavagens sucessivas em água destilada. A visualização do complexo DNA-EBr foi feita em transiluminador de ultra violeta 300 nm e fotografado com filme preto e branco Kodak 125 ASA abertura 1.8 e exposição de 1/4 e 1/8 de segundo. Os negativos foram revelados com revelador a base de metol-hidroquinona.

O peso molecular das estirpes que apresentaram plasmídeos foi determinado por extrapolação em gráfico (Log peso molecular x distância de migração em mm) utilizando plasmídeos de peso molecular conhecido. Os plasmídeos utilizados como padrões foram provenientes das estirpes:- FP2 de *Azospirillum brasilense* que possui 4 plasmídeos com aproximadamente 370, 350, 130 e 100 MDa respectivamente. (PLAZINSKY et al., 1983) (não visualizados separadamente através desta técnica de eletroforese); estirpe 1230 de *E. coli* com o plasmídeo R68.45 (HAAS e HOLLOWAY, 1978) com aproximadamente 39 Mda, e a estirpe HB101 de *E. coli* com o plasmídeo pBMR26.2 (STEFFENS et al., 1993) com aproximadamente 33 MDa.

## 2.23.- DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação de proteínas foi feita pelo método de LOWRY et al. (1951), usando soroalbumina bovina como padrão. As determinações de proteínas em suspensões de células foram feitas após lise alcalina com NaOH 1N ( ou 3N para células crescidas em meio semi-sólido) por 1 hora a temperatura ambiente. O cromóforo obtido foi determinado a 660 nm no espectrofotômetro Ultraspec II.



### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 CRESCIMENTO E DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DUPLICAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

O perfil de crescimento da estirpe SMR1 de *H. seropedicae* em meio líquido NFbHPG, contendo DL-malato e glutamato como fontes de carbono e nitrogênio é mostrado na figura 6. O crescimento exponencial foi observado até a 15<sup>a</sup>.sendo que a partir da 12<sup>a</sup> hora a velocidade de duplicação diminuiu significativamente até atingir a fase estacionária. O pH inicial do meio de cultivo foi ajustado em 5,5 sendo observada a alcalização gradual crescente chegando ao final do experimento a pH 8,0. O tempo de duplicação foi de aproximadamente 60 min determinado como descrito por MILLER (1972).

#### 3.2 EFEITO DO pH SOBRE O CRESCIMENTO E ATIVIDADE DA NITROGENASE DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

O efeito do pH sobre o crescimento e atividade da nitrogenase da estirpe SMR1 de *H. seropedicae* são mostrados nas figuras 7 e 8 , respectivamente. O crescimento medido pela concentração de proteínas totais nas culturas foi semelhante na faixa de pH entre 4,5 e 8,0. Não foi observado crescimento abaixo de pH 4,5. A atividade da nitrogenase foi máxima em uma faixa de pH inicial do meio de cultivo entre 4,5 a 6,5, a partir do qual observou-se um declínio . O pH final da cultura aumentou ficando entre 6,0 e 8,0 na faixa ótima de atividade da nitrogenase (entre pH 4,5 e 6,5).

### 3.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO SOBRE O CRESCIMENTO E ATIVIDADE DA NITROGENASE DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

Diferentes concentrações de inóculo da estirpe SMR1 de *H. seropedicae* em meio NFbHPG líquido produziram diferentes densidades celulares e atividades da nitrogenase mostradas na figura 9. A atividade específica da nitrogenase aumentou em função da turbidez da cultura na faixa entre 1,5 e 1,8 em 550 nm. O aumento da turbidez da cultura foi também acompanhado pelo aumento da concentração de proteínas.

### 3.4 EFEITO DE COMPOSTOS NITROGENADOS SOBRE O CRESCIMENTO E EXPRESSÃO DA NITROGENASE DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

O crescimento e expressão da nitrogenase utilizando diferentes compostos nitrogenados para *H. seropedicae* estirpe SMR1 está mostrado na tabela II. O crescimento das culturas em meio NFbHP contendo glutamato ou amônia atingiu o final da fase exponencial de crescimento em 16 horas com expressão da nitrogenase para células crescidas em glutamato. Para as culturas utilizando L-cisteína ou DL-serina o crescimento foi lento (em 48 horas) não sendo observada expressão da nitrogenase em diferentes tempos (16, 24 ou após 48 horas em crescimento). Para metilamina e L-histidina não foi observado crescimento mesmo após 72 horas.

### 3.5 UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO POR ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

O crescimento das estirpes Z67, ZA69, ZA76, SMR1, ZA95 ou Z152 de *Herbaspirillum seropedicae* em meio líquido NFbHP utilizando cloreto de amônio 20 mM como fonte de nitrogênio foi avaliado pela determinação de proteínas e está apresentado nas tabelas III.a e III.b

DL-malato, DL-lactato, L-rhamnose e D-glucose foram as fontes de carbono preferidas pelas estirpes. Já com D-maltose, D-manose e D-rafinose o tempo de crescimento foi mais longo. Para todas as estirpes o crescimento em D-maltose e D-manose ou D-rafinose foi mais lento e os dados mostrados nas tabelas foram obtidos somente após 48 horas ou 60 horas de incubação, respectivamente.

### 3.6 EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO EM MEIO SEMI SÓLIDO SOBRE A EXPRESSÃO DA NITROGENASE EM ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

A utilização de fontes alternativas de carbono pelas estirpes Z67, ZA69, ZA76, SMR1, ZA95 ou Z152 de *H. seropedicae* para fixação de nitrogênio, foi avaliada utilizando-se meio NFbHP semi-sólido isento de nitrogênio fixado e os resultados obtidos são mostrados na tabela IV. DL-malato foi a fonte de carbono na qual os valores de atividade da nitrogenase foram mais elevados para todas as estirpes. A única exceção foi a estirpe ZA69 que apresentou maior atividade da nitrogenase com DL-lactato. Para as culturas utilizando D-maltose, D-manose ou D-rafinose a película formada não chegou até a superfície do meio de cultivo mesmo após 96 horas de incubação.

### 3.7 EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE A EXPRESSÃO DA NITROGENASE DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

A utilização pela estirpe SMR1 de diferentes fontes de carbono em meio líquido NFbHPG, para crescimento e fixação de nitrogênio está mostrada na tabela V. Todas as fontes de carbono testadas foram capazes de suportar crescimento superior ao meio contendo unicamente glutamato como fonte de carbono e nitrogênio. Entretanto somente células cultivadas em DL- malato ou DL- lactato foram capazes de expressar atividade da nitrogenase. O crescimento em L-rhamnose ou D-glucose foi semelhante e ocorreu ao mesmo tempo que com os dois ácidos orgânicos citados, contudo sem expressar atividade da nitrogenase mesmo com valores de densidade ótica menores (14, 16 ou 18 horas de incubação para crescimento).

O crescimento com D-manose, D-rafinose e D-maltose foi mais lento sendo que o período de incubação para D-maltose foi de 48 horas e para D-rafinose e D-manose 60 horas.

### 3.8 ATIVIDADE DA NITROGENASE EM DIFERENTES ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

As atividades máximas observadas para as estirpes Z67, ZA69, ZA76, SMR1, ZA95 ou Z152 de *Herbaspirillum seropedicae* meio NFbHP contendo glutamato estão mostradas na figura 10. As atividades variaram de  $6,0 \pm 0,8$  a  $13,5 \pm 1,4$  nmoles de etileno/min/mg proteína, indicando que a estirpe SMR1 tem maior potencial de fixação de nitrogênio.



### 3.9 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO EM DIFERENTES ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

O efeito de diferentes temperaturas sobre o crescimento das estirpes SMR1, ZA95 e Z152 estão mostrados nas tabelas VI, VII, VIII e IX. As estirpes SMR1 e ZA95 cresceram nas temperaturas testadas de 30°C a 45°C sendo que para a temperatura de 30°C foram observados os valores de concentração de proteínas e número de células/ml de cultura (tabela VIII), mais elevados. Para as temperaturas de 35° 40° ou 45° C os valores foram decrescentes. Para a estirpe Z152 o efeito das temperaturas sobre o crescimento da estirpe foi similar, não sendo observado crescimento a temperatura de 45°C.

### 3.10 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS AMÔNIO PRESENTES NO CRESCIMENTO SOBRE A DESREPRESSÃO DA NITROGENASE EM *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

O efeito da concentração de íons amônio no crescimento em meio líquido NFbHP sobre a desrepressão da atividade da nitrogenase em *H. seropedicae* estirpe SMR1 é mostrado na tabela X. Somente células previamente crescidas em amônio 2 mM (após duas horas em jejum em meio NFbHP isento de nitrogênio fixado) foram capazes de desreprimir a nitrogenase. Mesmo após 16 horas as células pré-crescidas em cloreto de amônio 5mM, 10mM ou 20 mM, não desreprimiram a nitrogenase.

### 3.11 EFEITO DA DENSIDADE DA CULTURA SOBRE A DESREPRESSÃO DA NITROGENASE EM *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

O efeito da concentração celular sobre a desrepressão da atividade da nitrogenase em *H. seropedicae* estirpe SMR1 é mostrada na figura 11. A nitrogenase desreprimiu em densidade ótica inicial iguais ou superiores a 1,4, com máximo de atividade em 1,65 a 550 nm. A densidade ótica final foi em cada ponto 1,26, 1,43, 1,59, 1,66, 1,73, 1,78, 1,83 respectivamente. O valor máximo de atividade ( $6,7 \pm 1$  nmol etileno/min/mg proteína) foi obtido quando a densidade inicial da cultura era de 1,4. Alguns experimentos de desrepressão foram feitos utilizando esse dado.

### 3.12 EFEITO DE ÍONS AMÔNIO SOBRE ATIVIDADE DA NITROGENASE EM DIFERENTES ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

#### 3.12.1 Efeito de íons amônio sobre a atividade da nitrogenase em *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SMR1

O efeito de diferentes concentrações ( 50 a 200  $\mu\text{M}$ ) de íons amônio sobre a atividade da nitrogenase de *H. seropedicae* estirpe SMR1 está apresentado na figura 12. A adição de amônia 50  $\mu\text{M}$  ou 100  $\mu\text{M}$  ocasionou uma inibição de 73% e 77%, respectivamente. Após 60 minutos de adição iniciou aumento da atividade , chegando praticamente aos mesmos valores iniciais após 180 minutos. Concentrações entre 150  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  ocasionaram uma maior percentagem de inibição da atividade (86%) e este efeito se manteve por um período mais longo após o que observa-se regressão progressiva da inibição.

### 3.12.2 Efeito de íons amônio sobre a atividade da nitrogenase em estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* cultivadas em glutamato

O efeito de íons amônio sobre a atividade da nitrogenase das estirpes Z67, ZA69, ZA76, SMR1, ZA95 e Z152 de *Herbaspirillum seropedicae* crescidas em meio líquido NFbHPG está mostrado na figura 13. A atividade da nitrogenase de todas as estirpes foi inibida parcialmente por íons amônio com valor médio de 82% 60 min após a adição.

### 3.13 DESREPRESSÃO E INATIVAÇÃO DA NITROGENASE EM DIFERENTES ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

Desrepressão e inativação da nitrogenase nas estirpes Z67, ZA69, Za76, SMR1, ZA95 ou Z152, são mostrados na figura 14. Em todas as estirpes foi observada desrepressão da atividade da nitrogenase bem como inativação após a adição de cloreto de amônia 2 mM. A inibição foi praticamente total (84% a 98%) em todas as estirpes.

### 3.14 EFEITO DA METILAMINA SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

O estudo do transporte ativo de íons amônio tem sido demonstrado em diversos microrganismos através da utilização de um análogo do amônio, o metilamônio (HARTMANN e KLEINER, 1982; BARNES e ZIMNIAK, 1981). Em culturas de *H. seropedicae* estirpe SMR1 a atividade da nitrogenase sofre um decréscimo a partir do momento que se colocam as células em contato com a

metilamina . Os efeitos inibitórios para culturas crescidas em amônia 2mM ou glutamato 5mM são mostrados nas figuras 15 e 16 respectivamente.

O decréscimo foi em torno de 39% nos primeiros 30 minutos após a adição da metilamina para células crescidas em amônia e 17% para células crescidas em glutamato . Nos 60 minutos seguintes a atividade diminuiu 53% e 38% respectivamente com relação ao controle. Todas as concentrações de metilamina testadas provocaram o mesmo grau de inibição. Para as culturas nas quais foi adicionado amônia o decréscimo da atividade foi em torno de 86% já nos primeiros 30 minutos após a adição chegando a diminuir 95% da atividade com relação ao controle após 60 minutos tanto para células crescidas em amônia como para células crescidas em glutamato.

### 3.15 EFEITO DE COMPOSTOS NITROGENADOS SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE EM *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

O efeito de diferentes compostos nitrogenados sobre a atividade da nitrogenase de *H. seropedicae* estirpe SMR1 estão mostrados na figura 17. Todos os compostos nitrogenados, provocaram a diminuição da atividade da nitrogenase. Os dados de inibição estão mostrados na tabela XI. A inibição da atividade da nitrogenase foi mais intensa para amônia, seguido do glutamato, metilamina, DL-serina , L-cisteína ou L-histidina . Em todos os casos a inibição foi parcial.

### 3.16 DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE PLASMÍDEOS DAS ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

O perfil eletroforético de plasmídeos das estirpes de *H. seropedicae* pode ser visualizado na figura 18.



As estirpes de *H. seropedicae* que apresentaram plasmídeos naturais foram : a estirpe ZA95 com um plasmídeo de aproximadamente 70 MDa e a estirpe Z152 com dois plasmídeos com 70 e 60 MDa, valores estes determinados utilizando-se o gráfico mostrado na figura 19. As estirpes Z67, ZA69, ZA76 e SMR1 não possuem plasmídeos naturais.

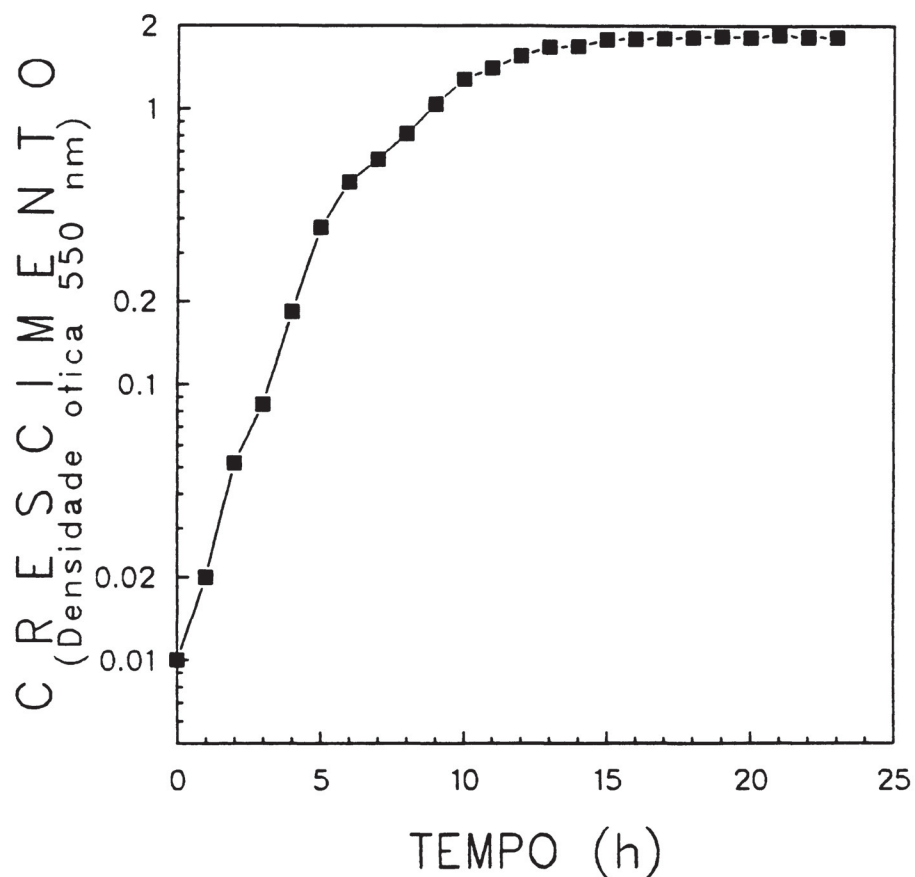


Figura 6.- CRESCIMENTO E DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DUPLICAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

Células foram inoculadas em meio líquido NFbHP contendo 0,1 % de DL-malato e glutamato 5mM. O crescimento foi acompanhado pela leitura de densidade ótica a 550 nm em espectrofotometro em intervalos de uma hora . **Materiais e Métodos 2.7.**

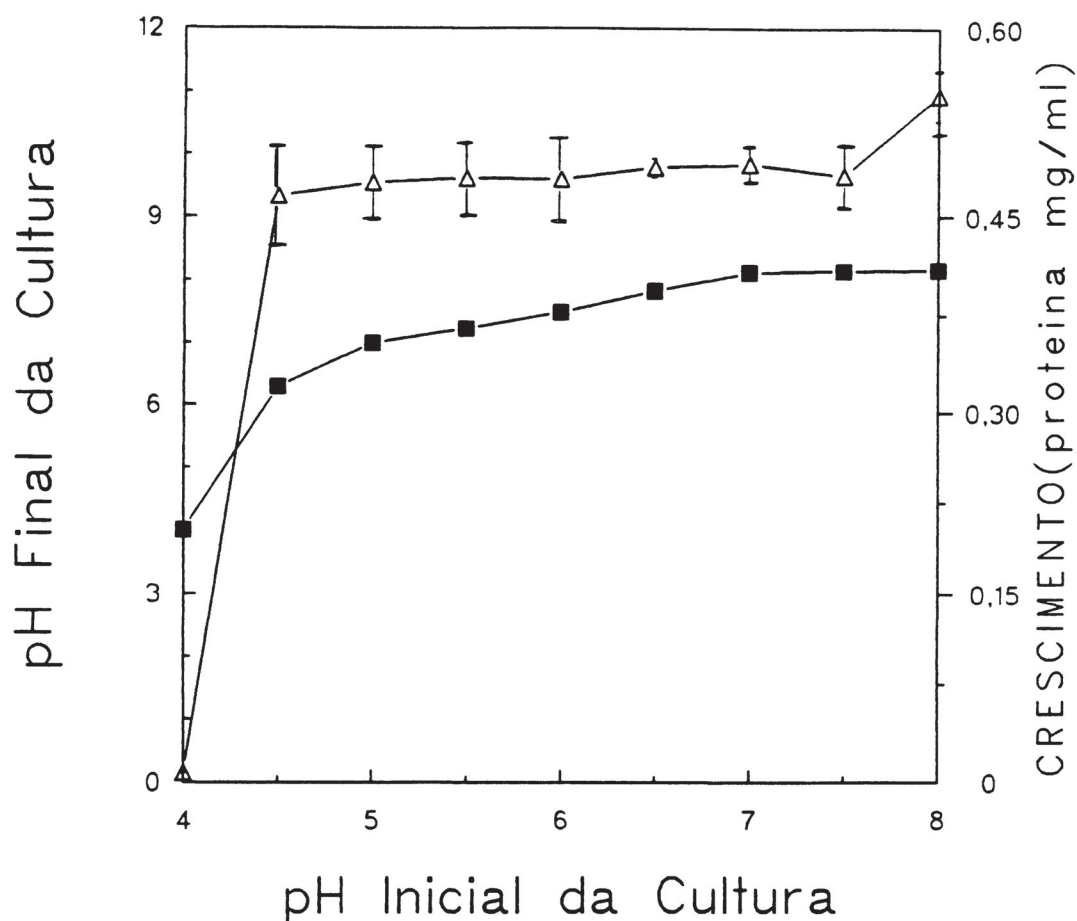


FIGURA 7.- EFEITO DO pH SOBRE O CRESCIMENTO DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1.

As células foram crescidas em meio NFbHPG no qual o pH inicial foi ajustado numa faixa de 4,0 a 8,0 como descrito em Materiais e Métodos 2.8 . Após 16 horas de incubação a 30°C e agitação de 120 rpm foi medido pH final das culturas e concentração de proteínas. (Atividade da nitrogenase consta na figura 8).

■ pH final ;    Δ Proteína (mg/ml)

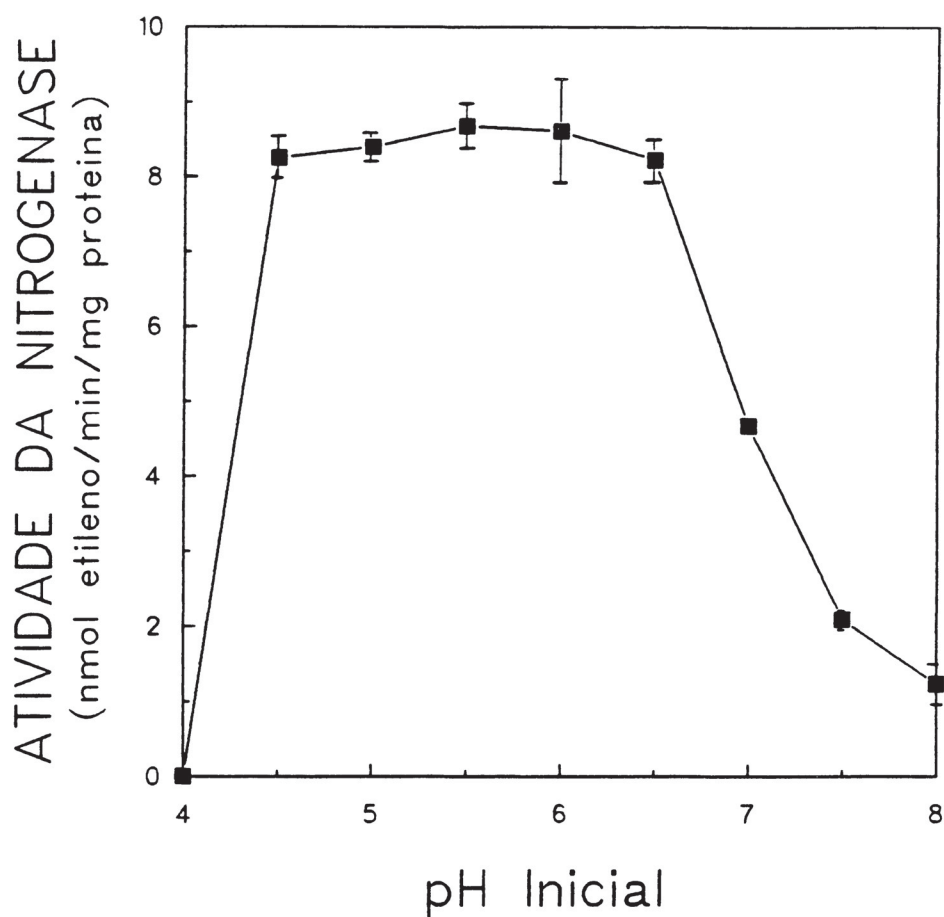
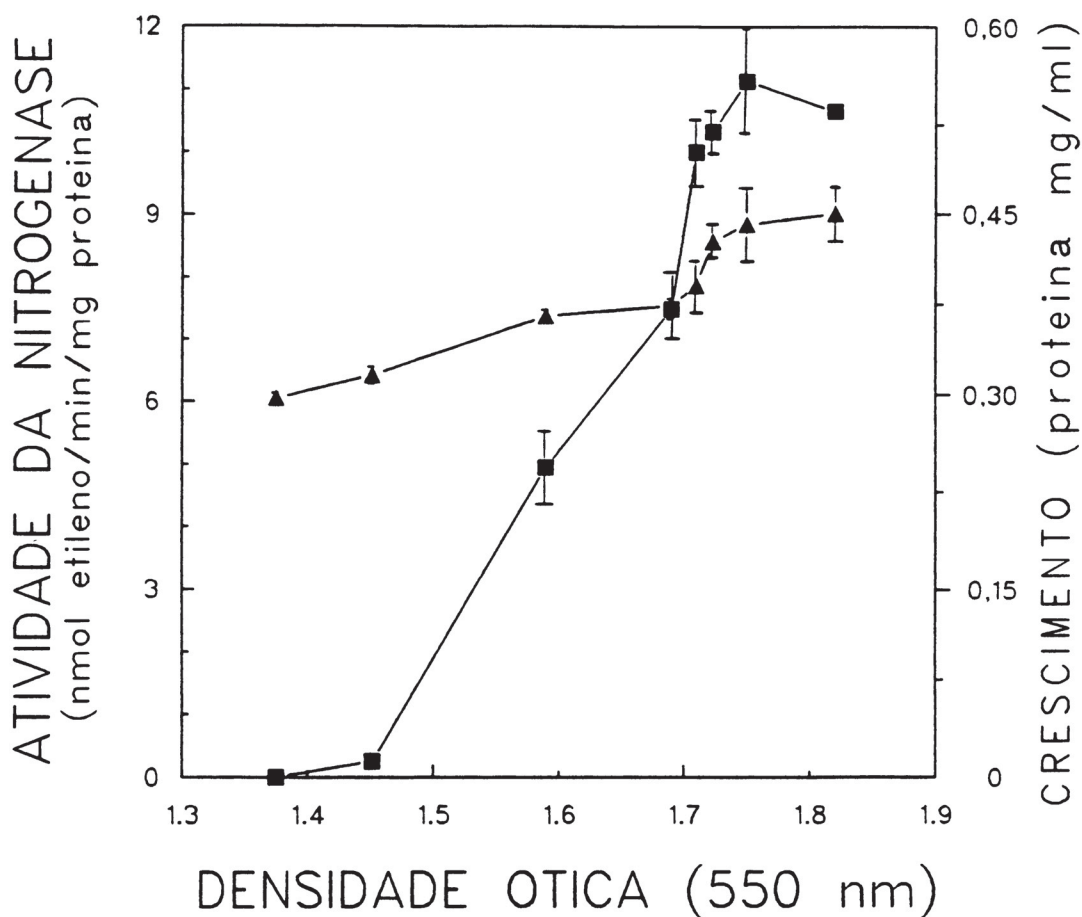


FIGURA 8.- EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE  
DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

Células foram crescidas em meio NFbHPG no qual o pH inicial foi ajustado numa faixa de 4,0 a 8,0 como no experimento da figura 6. Após 16 horas de incubação a 30°C e agitação de 120 rpm de crescimento foi determinada atividade da nitrogenase depois de uma hora de incubação das culturas com acetileno. (Materiais e Métodos 2.8).





**FIGURA 9.- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1**

O meio NFbHPG foi inoculado com diferentes volumes de suspensão de células (2, 5, 50, 75, 100, 250, 350 ou 500  $\mu$ l) a partir de um pré-inóculo com D.O.  $_{550} \cong 1,70$ . Após 16 horas de incubação a 30°C e agitação de 120 rpm foi determinada atividade da nitrogenase, densidade ótica final da cultura e concentração de proteínas. (Materiais e Métodos 2.9). ▲ -Proteínas (mg/ml)

■ - Atividade Específica

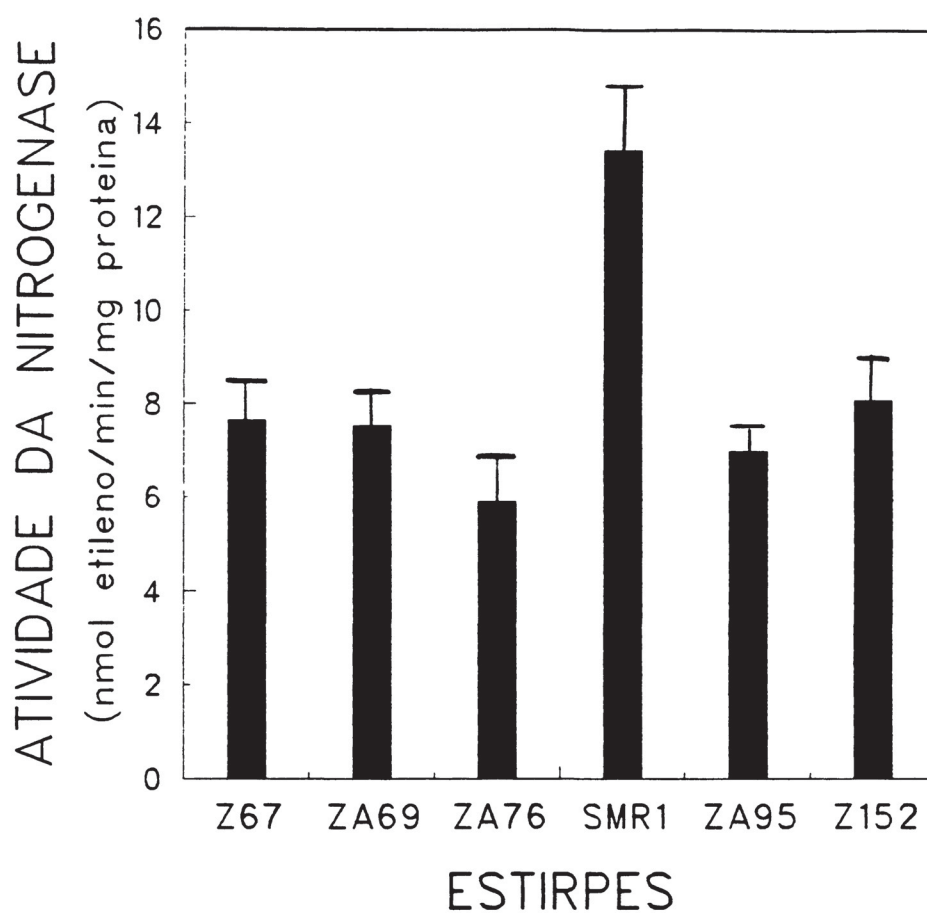
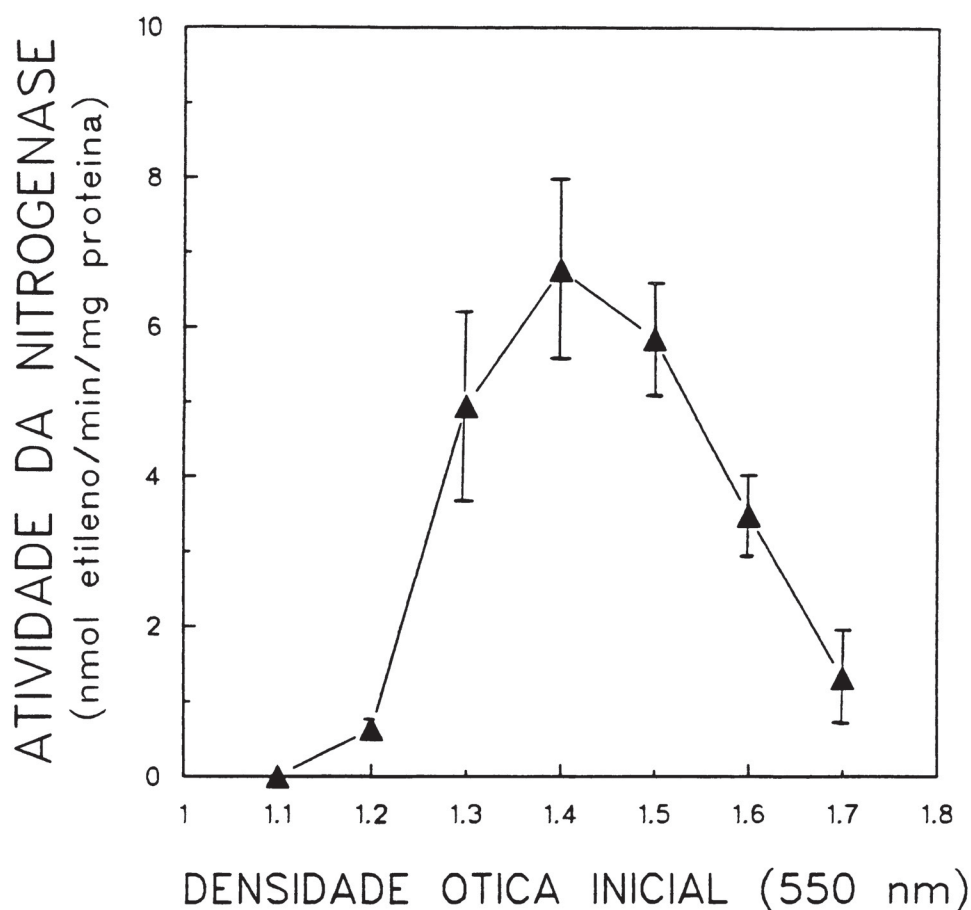


FIGURA 10.- ATIVIDADE DA NITROGENASE POR ESTIRPES DE  
*Herbaspirillum seropedicae*

As células das estirpes foram crescidas em meio NFbHPG pH 5,5. Após crescimento sob incubação a 30°C e agitação de 120 rpm foi determinada atividade da nitrogenase depois de 60 minutos de incubação com acetileno. (Materiais e Métodos 2.14)



**FIGURA 11.- EFEITO DA DENSIDADE DA CULTURA SOBRE A DESREPRESSÃO DA NITROGENASE DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1**

Células foram crescidas em meio NFbHP contendo 2mM de amônia. Após 16 horas as células foram centrifugadas e então ressuspensas em meio NFbHP isento de nitrogênio fixado até uma  $D.O._{550nm} \cong 2,0$ . A suspensão foi diluída numa faixa de D.O. de 1,1 a 1,7 e incubadas a 30°C e agitação de 120 rpm. Após 2 horas foi determinada a atividade da nitrogenase e a densidade ótica final. (Materiais e Métodos 2.17)

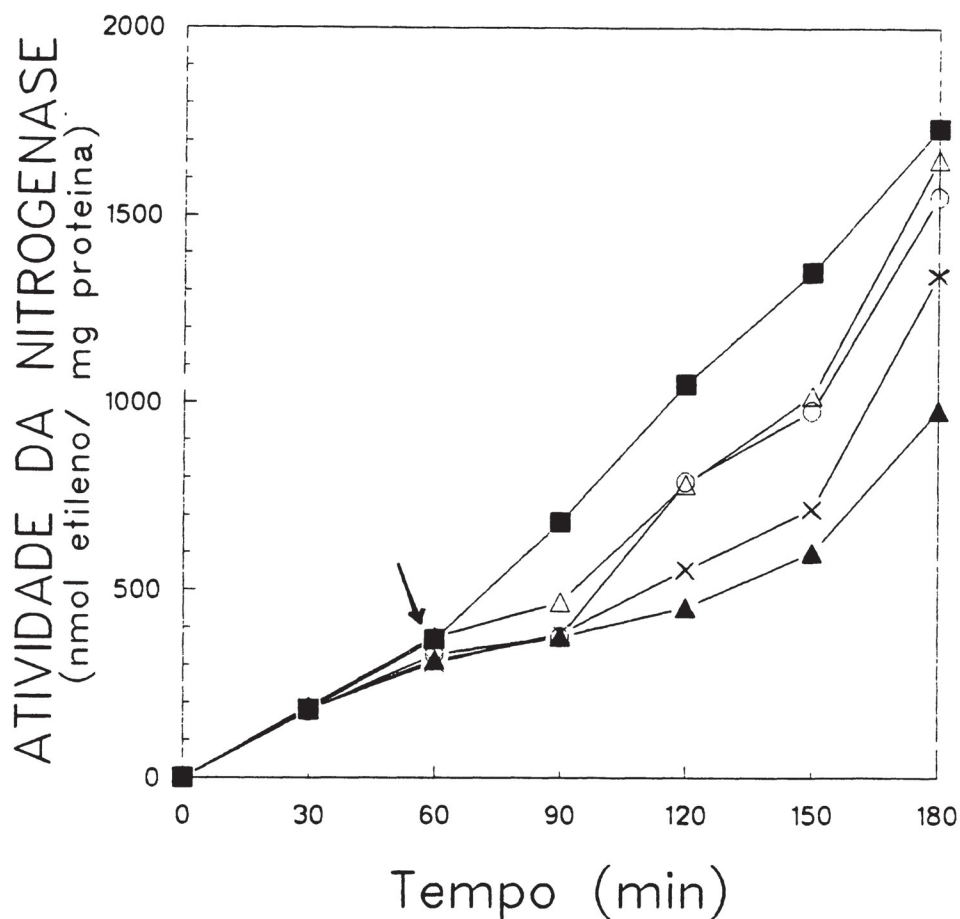


FIGURA 12.- EFEITO DE ÍONS AMÔNIO SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

Células foram crescidas em meio NFbHPN (amônia 2mM) e então centrifugadas e ressuspensas em meio NFbHP até uma D.O.<sub>550</sub>  $\cong$  1,40 e incubadas a 30°C e agitação de 120 rpm (Material e Métodos 2.18.1). Após 2 horas a atividade da nitrogenase foi determinada e aos 60 minutos de incubação com acetileno adicionado cloreto de amônio :- ( $\Delta$ ) 50  $\mu$ M , ( $\circ$ ) 100  $\mu$ M , (x) 150  $\mu$ M, ( $\blacktriangle$ ) 200 $\mu$ M ou Água ( $\blacksquare$ ) 20  $\mu$ l.



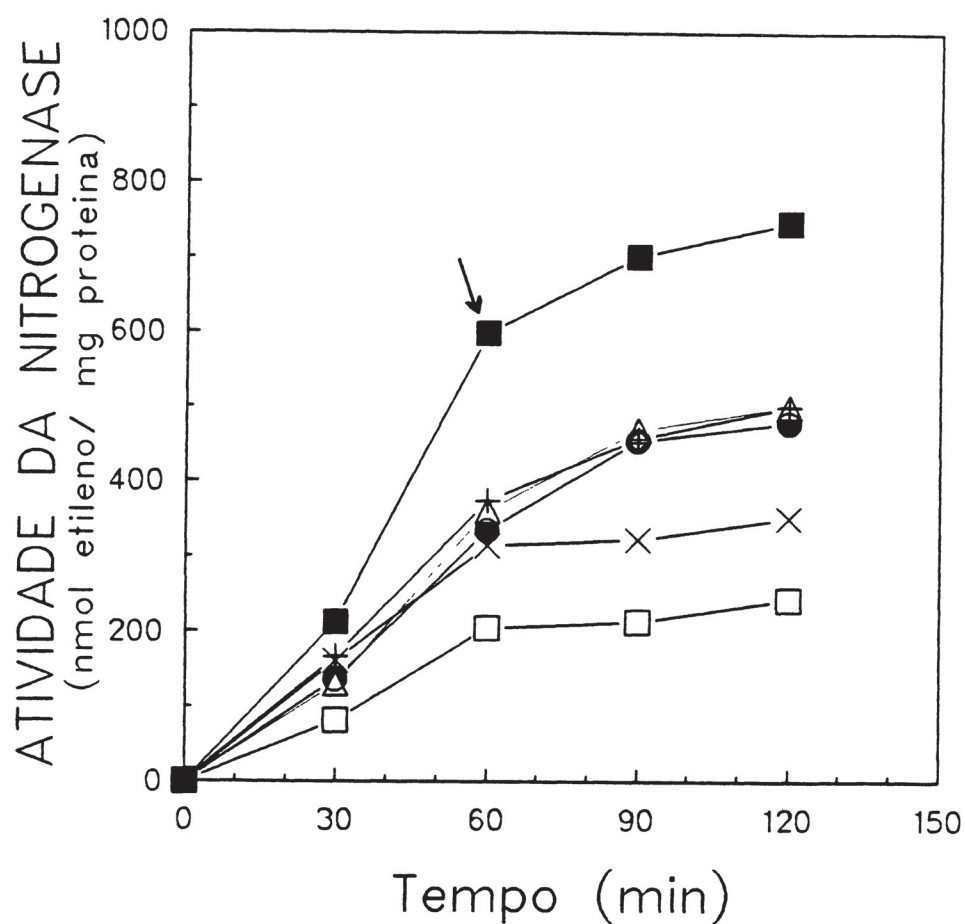


FIGURA 13.- EFEITO DE ÍONS AMÔNIO SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE EM DIFERENTES ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae* CULTIVADAS EM GLUTAMATO

As células foram crescidas em meio NFbHPG pH 5,5 e após o crescimento sob incubação a 30°C e agitação de 120 rpm foi determinada atividade da nitrogenase. Aos 60 minutos de incubação com acetileno como indica a seta foi adicionado cloreto de amônio 2 mM. (Materiais e Métodos 2.18.2)

■ SMR1 ; + Z 152 ● ZA95; X ZA76; Δ Z67; □ ZA69.

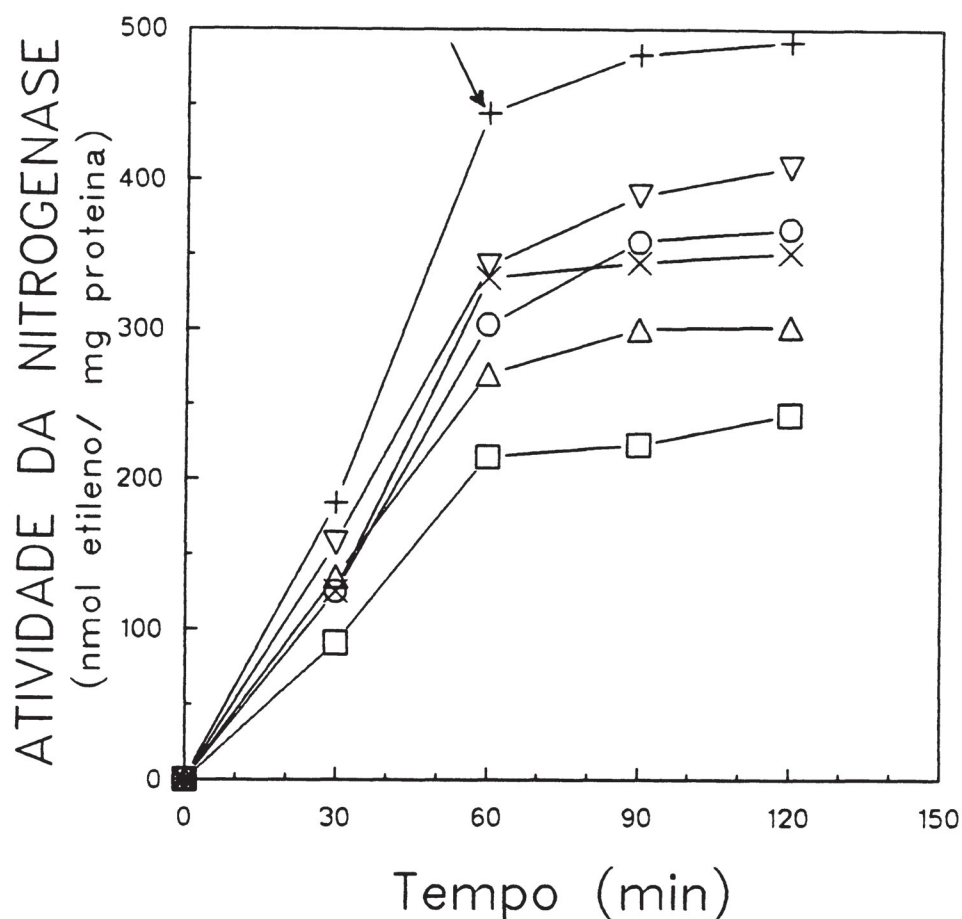


FIGURA 14.- DESREPRESSÃO E INATIVAÇÃO DA NITROGENASE EM DIFERENTES ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

Células foram crescidas em meio NFbHPN (amônia 2mM) e então centrifugadas e ressuspensas em meio NFbHP isento de nitrogênio fixado até uma  $D.O_{550} \cong 1,40$ . Após 2 horas de incubação a 30°C e agitação de 120 rpm foi determinada atividade da nitrogenase. Aos 60 minutos de incubação com acetileno como indica a seta foi adicionado cloreto de amônio 2 mM. (Materiais e Métodos 2.19).

+ SMR1; ▽ Z152; ○ ZA95; X ZA76; △ Z67; □ ZA69.

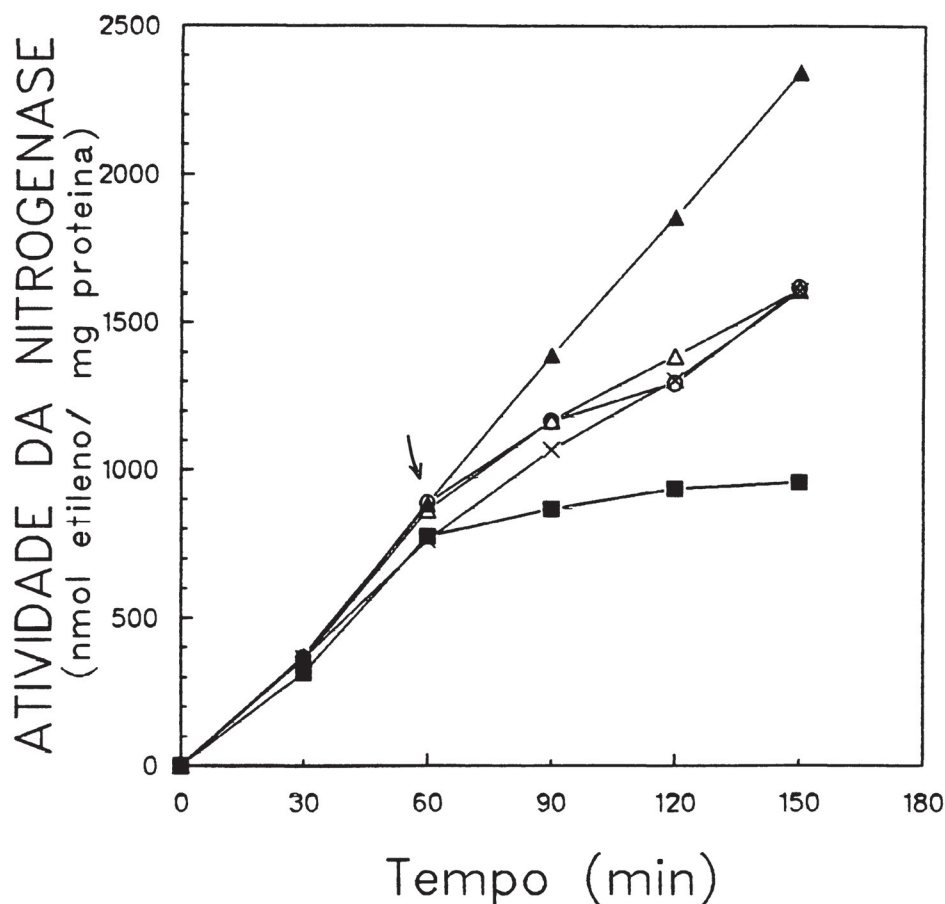


FIGURA 15 - EFEITO DA METILAMINA SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1 CULTIVADA EM AMÔNIA 2 mM

As células foram crescidas em meio NFbHP contendo amônia 2mM como descrito em Material e Métodos 2.20.1, e então centrifugadas e ressuspensas em meio NFbHP até uma  $D.O_{550} \cong 1,2$ . Após 4 horas a 30°C e agitação de 120 rpm foi determinada atividade da nitrogenase. Aos 60 minutos de incubação com acetileno foram adicionados: -Metilamina ( x 1 mM ; Δ 2 mM ; O 5 mM )

Cloreto de Amônio ( ■ 2 mM )

Água ( ▲ 20 μl )

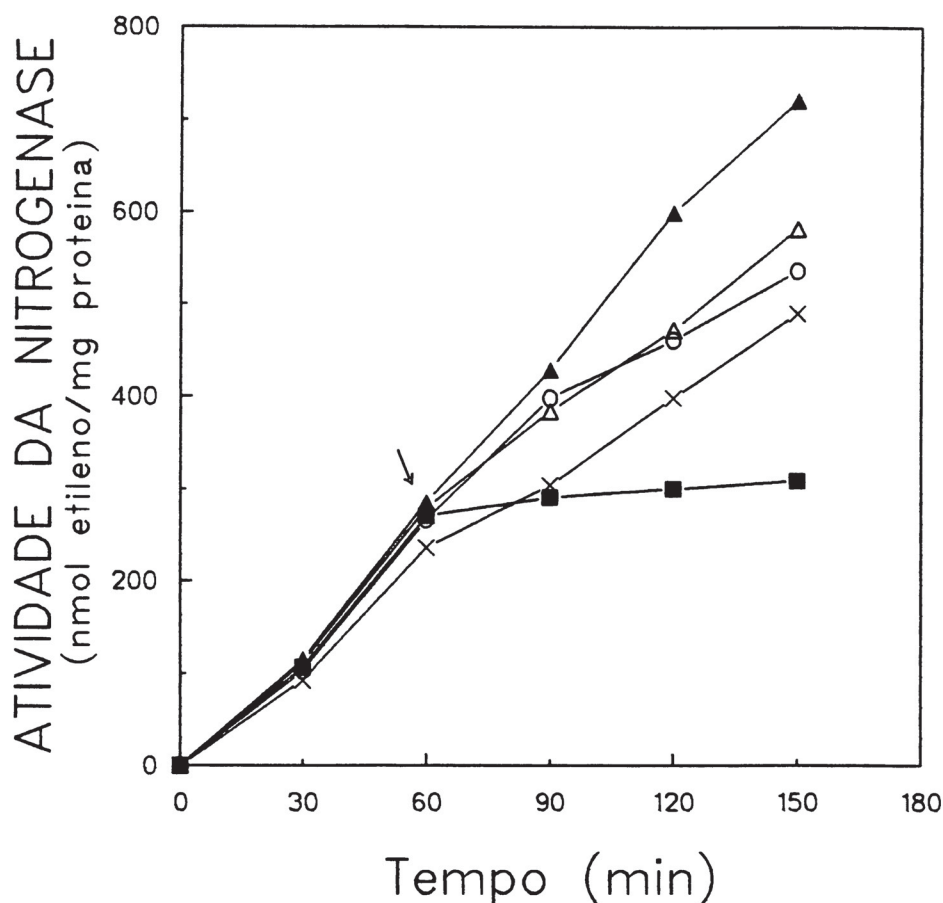


FIGURA 16 - EFEITO DA METILAMINA SOBRE A ATIVIDADE DA NITROGENASE DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1 CULTIVADA EM GLUTAMATO 5 mM

As células foram crescidas em meio NFbHP contendo glutamato 5mM como descrito em Material e Métodos 2.20.2, e então centrifugadas e ressuspensas em meio NFbHP até uma D.O.<sub>550</sub>  $\cong$  1,2. Após 4 horas a 30°C e agitação de 120 rpm foi determinada atividade da nitrogenase. Aos 60 minutos de incubação com acetileno foram adicionados: -Metilamina ( x 1 mM ; Δ 2 mM ; O 5 mM )

Cloreto de Amônio ( ■ 2 mM )

Água ( ▲ 20 μl )



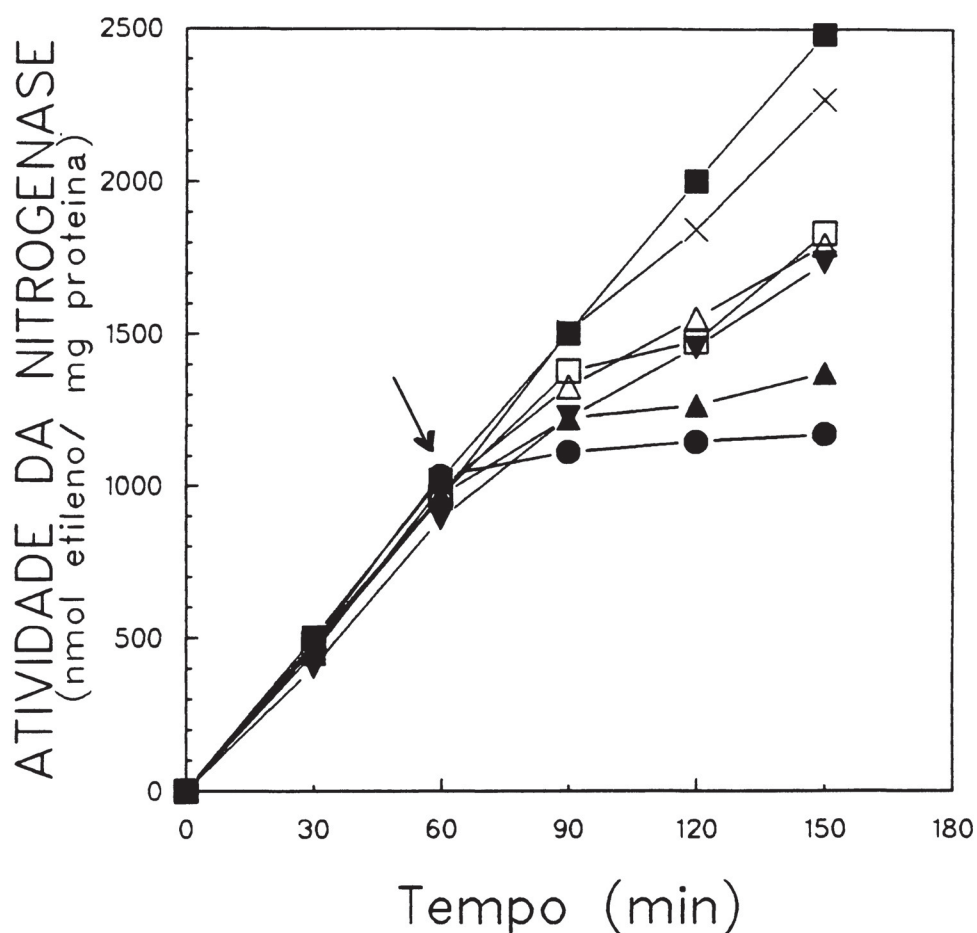


FIGURA 17.- EFEITO DE COMPOSTOS NITROGENADOS SOBRE  
A ATIVIDADE DA NITROGENASE DE *Herbaspirillum*  
*seropedicae* ESTIRPE SMR1

Células foram crescidas em meio NFbHPN contendo amônia 2 mM (Material e Métodos 2.21) e então centrifugadas e ressuspensas em meio NFbHP até uma  $D.O_{550} \approx 1,2$ . As culturas foram incubadas a 30°C e agitação de 120 rpm e após 4 horas foi determinada a atividade da nitrogenase. Aos 60 minutos de incubação com acetileno foi adicionado na concentração de 1mM:- (●) Amônia ; (▲) Glutamato ; (▼) DL-Serina; (Δ) L-Cisteína;(x) L - Histidina ; (□) Metilamina ou (■) 20 μl de água

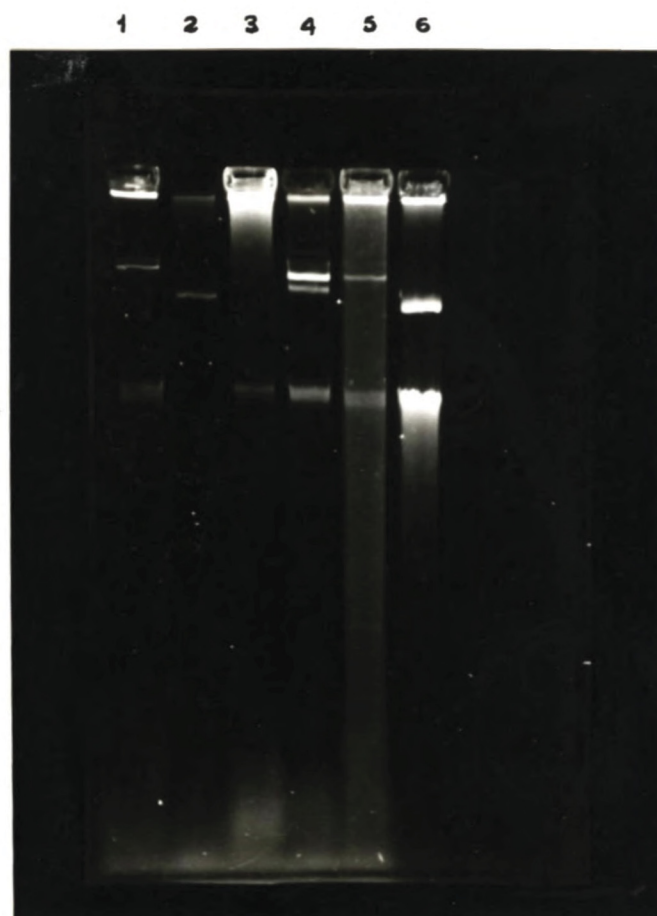
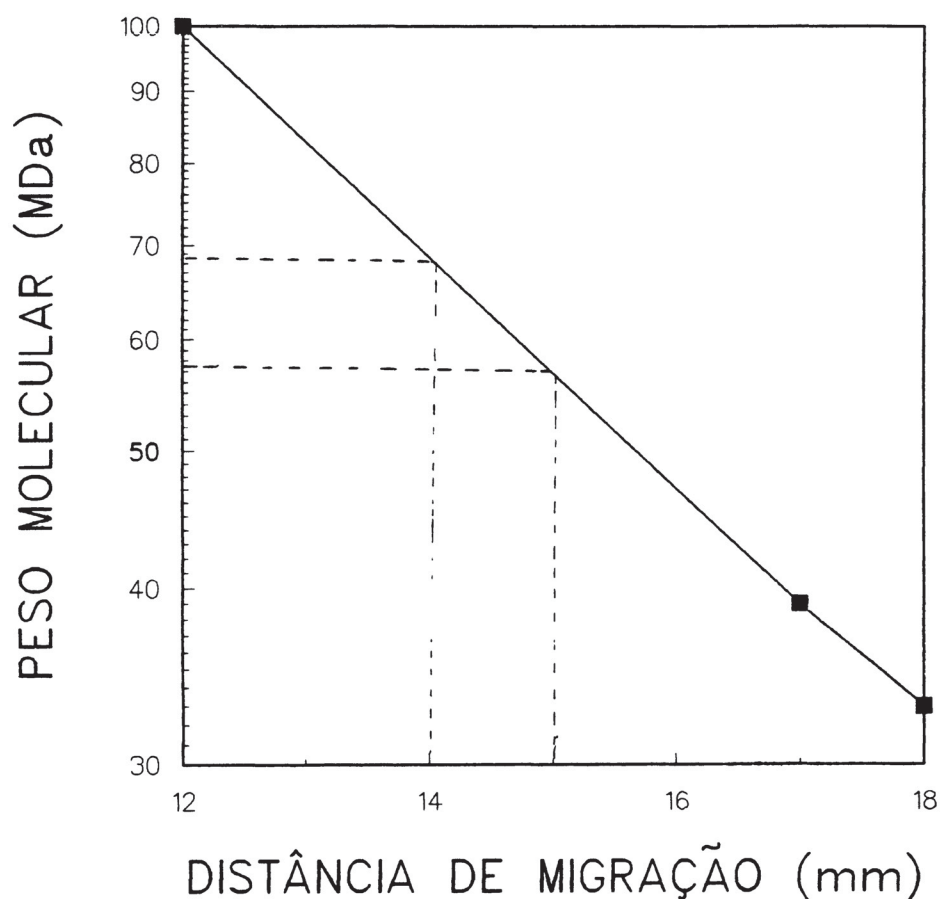


FIGURA 18 - DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE PLASMÍDEOS  
EM DIFERENTES ESTIRPES DE *Herbaspirillum*  
*seropedicae*

Células das estirpes abaixo relacionadas foram crescidas como descrito em Material e Métodos 2.22 e submetidas à lise alcalina pelo método de ROBSON et al (1984) . Os plasmídeos purificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Materiais e Métodos 2.22.1).

Estirpes	1 <i>Azospirillum brasilense</i> FP2
	2 <i>Escherichia coli</i> 1230 (R68.45)
	3 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SMR1
	4 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z152
	5 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ZA95
	6 <i>Escherichia coli</i> HB101 (pBMR 26.2)



**FIGURA 19 - DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DE PLASMÍDEOS DAS ESTIRPES ZA95 E Z152 DE *Herbaspirillum seropedicae***

O peso molecular dos plasmídeos das estirpes ZA95 e Z152 de *Herbaspirillum seropedicae* foi determinado utilizando a distância de migração relacionada ao peso molecular. Foram utilizados os plasmídeos de *Azospirillum brasilense* FP2 (100 MDa), *Escherichia coli* 1230 (39 MDa) e *E. coli* HB101 (33 MDa) como padrões. A distância de migração foi determinada utilizando a figura 18.

TABELA II - EFEITO DE COMPOSTOS NITROGENADOS SOBRE O CRESCIMENTO E EXPRESSÃO DA NITROGENASE EM *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

Fonte de Nitrogênio	D.O. (550nm)*	Proteínas (mg/ml)*	ETILENO(nmoles/min/mg prot)*
Glutamato	1,62 ± 0,02	0,371 ± 0,01	11,0 ± 1
Amônia	1,84 ± 0,02	0,525 ± 0,06	0
L- Cisteína**	1,72 ± 0,02	0,365 ± 0,01	0
DL-Serina**	1,00 ± 0,05	0,194 ± 0,01	0
Metilamina	sc	-	-
L-Histidina	sc	-	-

As células foram crescidas em meio NFbHP pH 5,5, utilizando como fontes de nitrogênio: glutamato de sódio, L-cisteína, DL-serina ou L-histidina (5 mM); amônia (20 mM); metilamina (2 mM ou 5 mM). Após incubação a 30°C e agitação de 120 rpm (por 16 horas para cultivos contendo glutamato) foi determinada atividade da nitrogenase depois de 60 minutos de incubação com acetileno. Para os cultivos contendo DL-serina e L-cisteína a atividade da nitrogenase foi determinada com 16, 24 e 48 horas de incubação para crescimento. (Materiais e Métodos 2.10)

\* Média de 3 resultados independentes. O erro é representado pelo desvio padrão.

\*\* Incubação por 48 horas.

sc - Sem crescimento mesmo após 72 horas



TABELA III.a - UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO  
POR ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

Fonte de Carbono	Crescimento das Estirpes (proteínas mg/ml)		
	Z67*	ZA69*	ZA76*
DL-Malato	0,447 ± 0,04	0,485 ± 0,01	0,492 ± 0,02
DL-Lactato	0,436 ± 0,04	0,427 ± 0,01	0,384 ± 0,01
L-Rhamnose	0,461 ± 0,07	0,447 ± 0,01	0,513 ± 0,01
D-Glucose	0,463 ± 0,05	0,462 ± 0,03	0,476 ± 0,02
D-Maltose	0,198 ± 0,05	0,150 ± 0,01	0,230 ± 0,01
D-Manose	0,192 ± 0,17	0,152 ± 0,02	0,167 ± 0,03
D-Rafinose	0,106 ± 0,01	0,167 ± 0,01	0,112 ± 0,02

Células foram crescidas em meio NFbHPN pH 5,5, utilizando as fontes de carbono listadas na tabela na concentração de 5 mg/ml. As culturas foram incubadas a 30°C e 120 rpm de agitação. A concentração de proteínas foi determinada após incubação de 16 horas para culturas utilizando DL-malato, DL-lactato, L-rhamnose ou D-glucose, 48 horas para culturas utilizando D-maltose e 60 horas para culturas utilizando D-manose ou D-rafinose. (Materiais e Métodos 2.11).

\* Média de 3 resultados independentes. O erro é representado pelo desvio padrão.

TABELA III.b - UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO  
 POR ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

Fonte de Carbono	Crescimento das Estirpes (proteínas mg/ml)		
	SMR1*	ZA95*	Z152*
DL-malato	0,498 ± 0,02	0,484 ± 0,05	0,506 ± 0,01
DL-lactato	0,410 ± 0,03	0,397 ± 0,02	0,424 ± 0,03
L-rhamnose	0,379 ± 0,02	0,439 ± 0,02	0,526 ± 0,06
D-glucose	0,458 ± 0,04	0,493 ± 0,04	0,617 ± 0,05
D-maltose	0,203 ± 0,05	0,175 ± 0,01	0,117 ± 0,01
D-manose	0,160 ± 0,12	0,144 ± 0,01	0,153 ± 0,01
D-rafinose	0,184 ± 0,04	0,107 ± 0,01	0,134 ± 0,01

Células foram crescidas em meio NFbHPN pH 5,5, utilizando as fontes de carbono listadas na tabela na concentração de 5 mg/ml. As culturas foram incubadas a 30°C e 120 rpm de agitação. A concentração de proteínas foi determinada após incubação de 16 horas para culturas utilizando DL-malato, DL-lactato, L-rhamnose ou D-glucose, 48 horas para culturas utilizando D-maltose e 60 horas para culturas utilizando D-manose ou D-rafinose. (Materiais e Métodos 2.11).

\* Média de 3 resultados independentes. O erro é representado pelo desvio padrão.

TABELA IV - EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO EM MEIO SEMI-SÓLIDO SOBRE A EXPRESSÃO DA NITROGENASE EM ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

ESTIRPES	ATIVIDADE DA NITROGENASE (nmol de etileno/min/mg prot)*			
	Fontes de Carbono			
	DL-Malato	DL-Lactato	L-Rhamnose	D-Glucose
Z67	1,19 ± 0,15	0,38 ± 0,08	0,88 ± 0,07	0,74 ± 0,08
ZA69	0,83 ± 0,11	1,20 ± 0,12	0,40 ± 0,08	0,36 ± 0,06
ZA76	1,83 ± 0,14	1,22 ± 0,12	0,42 ± 0,12	0,40 ± 0,05
SMR1	5,04 ± 0,80	1,02 ± 0,06	1,04 ± 0,17	3,41 ± 0,25
ZA95	3,39 ± 0,14	0,84 ± 0,11	1,14 ± 0,09	1,06 ± 0,11
Z152	1,73 ± 0,06	1,21 ± 0,13	1,14 ± 0,09	1,16 ± 0,19

Células foram crescidas em meio NFbHP semi-sólido isento de nitrogênio fixado utilizando as fontes de carbono listadas na tabela em concentração de 5 mg/ml. Após a formação de uma película próxima a superfície do meio, foi determinada a atividade da nitrogenase depois de 60 min de incubação com acetileno. Para as culturas utilizando D-maltose, D-manose ou D-rafinose a película formada não chegou até a superfície do meio de cultivo mesmo após 96 horas de incubação. (Materiais e Métodos 2.20).

\* Média de 3 resultados independentes. O erro é representado pelo desvio padrão.

TABELA V - EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE A EXPRESSÃO DA NITROGENASE DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

FONTE DE CARBONO	CRESCIMENTO		ATIVIDADE DA NITROGENASE
	D.O. (550 nm)*	Proteínas* (mg/ml)	ETILENO(nmol/min/mg proteína)*
DL-Malato	1,68 ± 0,09	0,394 ± 0,02	12,5 ± 1
DL- Lactato	1,74 ± 0,08	0,475 ± 0,02	1,04 ± 0,28
L- Rhamnose	1,51 ± 0,08	0,502 ± 0,06	0
D-Glucose	1,76 ± 0,07	0,495 ± 0,06	0
D-Maltose	1,42 ± 0,02	0,342 ± 0,02	0
D-Manose	1,55 ± 0,06	0,365 ± 0,01	0
D-Rafinose	1,26 ± 0,03	0,364 ± 0,01	0
L-Glutamato**	1,0 ± 0,02	0,210 ± 0,01	0

Células foram crescidas em meio NFbHP contendo glutamato e :- DL-malato, DL-lactato, L-rhamnose, D-glucose, D-maltose, D-manose ou D-rafinose na concentração de 5 mg/ml. As culturas foram incubadas a 30°C e agitação de 120 rpm. A atividade da nitrogenase foi determinada após 14, 16 ou 18 horas de incubação para células crescidas em , DL-lactato, L-ramnose e D-glucose e L-glutamato. Para culturas utilizando D-maltose a atividade da nitrogenase foi determinada após o período de incubação de 48 horas e para , D-manose ou D-rafinose após 60 horas de incubação. (Materiais e Métodos 2.21).

\* Média de 3 repetições, o erro é representado pelo desvio padrão.

\*\* Fonte única de carbono.



TABELA VI .- EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO DE  
*Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

Temperatura (°C)	Proteínas (mg/ml) *	Densidade ótica (550nm)*
30	0,385 ± 0,02	1,68 ± 0,03
35	0,366 ± 0,02	1,49 ± 0,02
40	0,366 ± 0,02	1,49 ± 0,02
45	0,231 ± 0,02	0,90 ± 0,07

As células foram crescidas em meio NFbHPG pH 5,5 e após 16 horas de crescimento sob agitação de 120 rpm nas temperaturas indicadas foi determinada densidade ótica das culturas em 550 nm bem como a concentração de proteínas. (Materiais e Métodos 2.15).

\* Média de 3 resultados independentes. O erro é representado pelo desvio padrão.

TABELA VII .- EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO DE  
*Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE ZA95

Temperatura (°C)	Proteínas (mg/ml) *	Densidade ótica (550nm)*
30	0,444 ± 0,020	1,67 ± 0,025
35	0,420 ± 0,050	1,45 ± 0,100
40	0,416 ± 0,020	1,51 ± 0,030
45	0,244 ± 0,025	0,93 ± 0,145

As células foram crescidas em meio NFbHPG pH 5,5 e após 16 horas de crescimento sob agitação de 120 rpm nas temperaturas indicadas foi determinada densidade ótica das culturas em 550 nm bem como concentração de proteínas. (Materiais e Métodos 2.15).

\* Média de 3 resultados independentes. O erro é representado pelo desvio padrão.

TABELA VIII .- EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO  
DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE Z152

Temperatura (°C)	Proteínas (mg/ml) *	Densidade ótica (550 nm)*
30	0,430 ± 0,025	1,71 ± 0,026
35	0,418 ± 0,025	1,51 ± 0,026
40	0,415 ± 0,005	1,42 ± 0,015
45	sc	-

As células foram crescidas em meio NFbHPG pH 5,5 e após 16 horas de crescimento sob agitação de 120 rpm nas temperaturas indicadas foi determinada densidade ótica das culturas em 550 nm bem como a concentração de proteínas. (Materiais e Métodos 2.15).

\* Média de 3 resultados independentes. O erro é representado pelo desvio padrão.  
sc - sem crescimento.

TABELA IX - EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO  
EM ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

Estirpe	Número de células ( $10^9$ )/ml			
	30°C	35°C	40°C	45°C
SMR1	20	16	16	11
ZA95	28	24	24	15
Z152	32	28	26	0

Células foram crescidas em meio NFbHPG pH 5,5 por 16 horas nas temperaturas de 30°, 35°, 40° ou 45°C. No final do experimento o número de células foi determinado plaqueando-se alíquotas de 0,1 ml de cultura diluída as quais foram espalhadas sobre placas com meio NFbHPG sólido e incubadas a 30°C por 24 horas. O número de colônias foi multiplicado pelo fator de diluição. (Materiais e Métodos 2.15).



TABELA X - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS AMÔNIO PRESENTES NO CRESCIMENTO SOBRE A DESREPRESSÃO DA NITROGENASE EM *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SMR1

NH <sub>4</sub> Cl ( mM )	CRESCIMENTO (proteínas mg/ml)	ATIVIDADE DA NITROGENASE (nmol de etileno/min/mg prot)
2	0,444 ± 0,04	5,26 ± 0,8
5	0,430 ± 0,04	0
10	0,440 ± 0,05	0
20	0,455 ± 0,06	0

Células foram crescidas em meio NFbHP contendo NH<sub>4</sub>Cl nas concentrações acima especificadas (Material e Métodos 2.16). Após 16 horas de crescimento as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio NFbHP isento de nitrogênio fixado. A seguir as culturas foram incubadas a 30°C e agitação de 120 rpm para permitir a desrepressão da síntese da nitrogenase. Após 2 horas foi determinada a atividade da nitrogenase incubando-se as culturas por 60 minutos com acetileno. Para as culturas previamente crescidas em NH<sub>4</sub>Cl 20 mM, 10 mM ou 5 mM o período de incubação foi prorrogado com verificação de atividade de hora em hora por 5 horas.

TABELA XI - EFEITO DE COMPOSTOS NITROGENADOS SOBRE  
A ATIVIDADE DA NITROGENASE DE *Herbaspirillum*  
*seropedicae* ESTIRPE SMR1

FONTE DE NITROGÊNIO	ATIVIDADE DA NITROGENASE (nmol de etileno/mg proteína total)							
	Tempo de Incubação com Acetileno**							
	30 min	60 min	90 min		120 min		150 min	
Controle	502 ± 14	1019 ± 21	1499 ± 62		1975 ± 97		2261 ± 70	
Amônia	485 ± 26	1032 ± 46	1111 ± 58	85%*	1145 ± 7	94%*	1170 ± 14	95%*
Metilamina	452 ± 17	992 ± 11	1323 ± 9	39%*	1550 ± 45	58%*	1791 ± 70	55%*
L-Histidina	467 ± 22	959 ± 12	1506 ± 52	0	1842 ± 17	32%*	2267 ± 70	14%*
Glutamato	471 ± 16	965 ± 53	1222 ± 27	48%*	1263 ± 10	92%*	1359 ± 13	81%*
L-Cisteína	485 ± 81	968 ± 113	1375 ± 124	16%*	1472 ± 161	80%*	1814 ± 19	30%*
DL-Serina	406 ± 43	893 ± 125	1224 ± 146	32%*	1453 ± 188	53%*	1716 ± 22	46%*

As células foram crescidas em meio NFbHP contendo amônia 2 mM como fonte de nitrogênio e então centrifugadas e ressuspensas em meio NFbHP até uma D.O.<sub>550</sub> ≈ 1,2. Após 4 horas de incubação a 30°C e agitação de 120 rpm foi determinada atividade da nitrogenase e aos 60 minutos foi adicionado a concentração de 1 mM de : Amônia ; Glutamato ; DL-Serina ; L-Cisteína ; L - Histidina ; Metilamina ou água. (Materiais e Métodos 2.21)

\* % de inibição da atividade da nitrogenase

\*\* Média de 3 resultados independentes. O erro é representado pelo desvio padrão.

## 4 - DISCUSSÃO

A finalidade deste trabalho foi determinar o comportamento de *Herbaspirillum seropedicae* em diferentes condições fisiológicas utilizando principalmente meio líquido. O crescimento em meio líquido é mais homogêneo (distribuição de nutrientes entre as células) facilitando a obtenção de resultados com maior precisão e rapidez. Em meio semi-sólido as bactérias diazotróficas móveis e aerotáticas como *Herbaspirillum seropedicae*, deslocam-se para regiões de concentração ótima de oxigênio para fixação de nitrogênio. Forma-se assim uma película de fácil visualização. Entretanto, é mais difícil determinar o tempo em que ocorrerá atividade máxima da nitrogenase.

O tempo de duplicação estirpe SMR1 em meio líquido NFbHP contendo DL-malato e L-glutamato foi de 60 minutos com taxa de crescimento específico ( $\mu$ ) de  $11,5 \times 10^{-3}$ . MATHIAS et al. (1989) utilizando a estirpe Z78, encontraram um tempo de duplicação e taxa de crescimento específico para DL-lactato ou L-arabinose da ordem de 90 min e  $7,7 \times 10^{-3}$ , respectivamente. Valores próximos aos obtidos neste trabalho.

O crescimento de *Herbaspirillum seropedicae* em meio NFbHP contendo glutamato como fonte de nitrogênio, provoca alcalinização do meio de cultivo nos diferentes valores de pH inicial e o crescimento nestas condições não foi afetado (figura 7). Não foi observado crescimento de *Herbaspirillum seropedicae* em pH abaixo de 4,5. Isto indica a inexistência nesta bactéria, de mecanismos de proteção da célula para pH inferior a 4,5, como o que foi observado para o diazotrofo *Acetobacter diazotrophicus* que é capaz de crescer e fixar nitrogênio em pH 2,5 (STEPHAN et al., 1991). O pH inicial da cultura ótimo para atividade da nitrogenase, situou-se numa faixa 4,5 a 6,5, onde observa-se que o pH final situa-se numa faixa de 6,0 a 7,5 (figura 8). Com a crescente alcalinização do meio foi observada a diminuição dos valores de atividade da nitrogenase. Isto já havia sido



observado em culturas de *Azospirillum brasilense* observando-se decréscimo rápido dos níveis de acetileno reduzido quando o pH da cultura estava acima de 7,8 (OKON et al., 1976). A alcalinização pode afetar a permeabilidade da célula, interferindo nas atividades fisiológicas do microrganismo. Em bactérias lácticas o pH do meio pode alterar os produtos de fermentação por ação sobre as enzimas envolvidas neste processo (MOAT e FOSTER, 1988).

Somente foram capazes de desreprimir a nitrogenase, culturas com de densidade ótica em 550 nm entre 1,5 e 1,8 (figuras 9 e 11). O efeito da densidade da cultura sobre a expressão da atividade da nitrogenase sugere, indiretamente, a necessidade de baixa tensão de oxigênio no meio de cultura. O aumento da densidade celular está relacionado a um aumento da taxa respiratória por unidade de volume da cultura. Esta maior taxa respiratória leva a uma diminuição do oxigênio dissolvido a níveis compatíveis com a expressão e atividade da nitrogenase.

O efeito de diferentes fontes de nitrogênio na atividade da nitrogenase tem sido estudada em diferentes microrganismos tais como *Klebsiella pneumoniae* (YOCH e PENGRA, 1966), *Azotobacter chroococcum* (DROZD et al., 1972), *Azospirillum brasilense* (HARTMANN et al., 1985). Alguns aminoácidos como alanina, glicina, glutamina, ácido glutâmico e cisteína podem reprimir a biosíntese da nitrogenase em *Azospirillum brasilense*. Como pode também ocorrer estimulação da atividade mesmo em altas concentrações (8mM) de asparagina, ácido aspártico lisina e tirosina (DAS E MISHRA, 1982). HARTMANN et al., (1988) observaram diferenças qualitativas e quantitativas na utilização de glutamato, aspartato, histidina e serina característica de cada espécie de *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. lipoferum* ou *A. amazonense*). Concluíram que a utilização de aminoácidos e seus derivados por estes microrganismos pode ser importante para o seu estabelecimento na rizosfera de uma planta, em particular, e também para a fixação de nitrogênio em associação com raízes. Em *Herbaspirillum seropedicae*



estirpe SMR1 observou-se dificuldade das células para utilizar os aminoácidos DL-serina e L-cisteína como fonte de nitrogênio para o crescimento e fixação de nitrogênio (tabela II). O microrganismo foi incapaz de crescer utilizando L-histidina mesmo com 72 horas de incubação. Estes fatos se devem provavelmente a dificuldade de assimilação e ou metabolização destes aminoácidos. *H. seropedicae* foi também incapaz de utilizar metilamina como fonte de carbono e nitrogênio, fato este já mostrado anteriormente para *Azotobacter vinelandi* e *Klebsiella pneumoniae* (JAYAKUMAR e BARNES, 1984; KLEINER, 1982).

A utilização de açúcares por microrganismos envolve a indução de enzimas necessárias ao seu transporte e metabolização. Assim, por exemplo, a D-maltose quando colocada como única fonte de carbono para *Escherichia coli* requer a indução de uma permease maltose-específica e também das enzimas amilomaltose e maltodextrina fosforilase as quais estão sob controle de um sistema complexo (MOAT e FOSTER, 1988). Em *Rhizobium meliloti* o catabolismo da D-manose envolve um sistema de transporte específico além das enzimas manose quinase e manofosfatase isomerase (ARIAS et al., 1982). O metabolismo da L-rhamnose em *Escherichia coli* envolve a indução de permeases específicas, quinases, isomerases e aldolases que são codificadas por dois grupos de genes distintos no cromossoma. Esta via metabólica converge com a produção de dihidroxiacetona fosfato e L-lactaldeído (MOAT e FOSTER, 1988). Em *Herbaspirillum seropedicae* para todas as estirpes (Z67,ZA69,ZA76,SMR1, ZA95 e Z152) as fontes de carbono preferenciais para crescimento, em meio líquido contendo cloreto de amônio foram DL-malato, DL-lactato, L-rhamnose e D-glucose (tabelas IIIa, IIIb). O crescimento utilizando D-manose, D-rafinose ou D-maltose foi deficiente. Provavelmente a utilização destes açúcares é deficiente neste microrganismo devido a dificuldade de indução de permeases bem como das hidrolases envolvidas na metabolização dos mesmos.

*Herbaspirillum seropedicae* estirpe SMR1 fixa nitrogênio em meio líquido NFbHP contendo glutamato e DL-malato ou DL-lactato. O mesmo não ocorreu com D-glucose, L-rhamnose, D-maltose, D-manose ou D-rafinose. Possivelmente a metabolização destes açúcares não propicie um suprimento de elétrons para a cadeia respiratória suficientes para que ocorra a diminuição dos níveis de oxigênio a níveis compatíveis com a expressão da nitrogenase de células cultivadas em meio líquido. Por outro lado em meio semi-sólido onde a proteção da nitrogenase, contra repressão e inibição por oxigênio ocorre por aerotaxia, isto é o microrganismo se ajusta ao gradiente de oxigênio, observou-se atividade da nitrogenase utilizando D-glucose ou L-rhamnose.

*Herbaspirillum seropedicae* estirpes SMR1, ZA95 e Z152 cresceram na faixa de 30° 40°C (tabelas VI, VII, VIII e IX). Observou-se também a temperatura de 45°C a estirpe Z152 não cresceu e as estirpes SMR1 e ZA95 apresentaram diminuição significativa do crescimento. Os microrganismos variam extensamente na sua habilidade em iniciar crescimento sobre certas faixas de temperatura. Extremos de temperatura provavelmente resultam em inativação de enzimas e outras estruturas celulares. Assim a faixa de temperatura de 40- 45°C pode ser a faixa máxima de crescimento que estes microrganismos suportam. A ausência de crescimento da estirpe Z152 pode ser explicada pela desnaturação de proteínas, alteração da fluidez e permeabilidade de membranas, etc. (DAWES e SUTHERLAND, 1993).

A nitrogenase de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SMR1 não desreprime em presença de amônia. Para células crescidas em presença de amônia, somente aquelas previamente cultivadas em baixas concentrações (2 mM) apresentaram atividade da nitrogenase após um período de 2 horas de jejum das células (tabela X). Concentrações superiores de íons amônio no crescimento aparentemente reprimiram a nitrogenase de forma irreversível, já que não foi detectada redução de acetileno mesmo após 16 horas. Por outro lado em



*Azospirillum brasilense* a desrepressão da síntese da nitrogenase ocorre facilmente mesmo com células crescidas em amônia 20 mM . O período de jejum das células (em meio NFbHP isento de nitrogênio fixado) foi inicialmente de 2 horas com uma densidade ótica de células após a centrifugação próximo a 1,40 . Quando as células foram submetidas a períodos de jejum mais longos (4 horas) , com uma densidade ótica de células próxima a 1,2 (figuras 15, 16 e 17) os valores de atividade específica foram mais elevados, revelando possivelmente a necessidade de um maior tempo para o consumo da amônia residual.

A adição de cloreto de amônio (entre 50 e 200  $\mu$ M) à culturas de *H. seropedicae* estirpe SMR1 ocasionou inibição da atividade da nitrogenase proporcional com a concentração adicionada (figura 12). A atividade contudo retornou rapidamente aos níveis iniciais de atividade de modo inversamente proporcional a amônia adicionada. Esses resultados provavelmente refletem consumo da amônia adicionada e consequente reativação da atividade da nitrogenase quando a concentração de íons amônio atinge níveis limitantes. Este efeito também foi observado em *Azotobacter chroococcum* no qual os autores evidenciaram que este efeito, chamado então de "short-term" por íons  $\text{NH}_4^+$ , é devido aos seus produtos de metabolismo (CEJUDO et al., 1984).

Para todas as estirpes testadas de *Herbaspirillum seropedicae* o desligamento da nitrogenase por íons amônio foi parcial. FU e BURRIS (1989) já haviam observado que a inibição da nitrogenase em *Herbaspirillum seropedicae* é rápida porém parcial. Não foi detectada ADP-ribosilação da proteína Ferro provocada por amônia à culturas da estirpe Z176 de *H. seropedicae*. A ausência deste sistema em *Herbaspirillum seropedicae* foi confirmada pela ausência de hibridização do DNA total de *H. seropedicae* estirpe Z78 , com sondas dos genes *draT-draG* de *Azospirillum lipoferum*. Os autores concluíram que provavelmente a inibição da atividade seja decorrente de um efeito indireto, possivelmente por desvio do fluxo de elétrons já que este é acoplado a força próton-motriz da membrana

celular. É necessário portanto o estudo do sistema de transporte de elétrons para a nitrogenase neste microrganismo para uma melhor compreensão do fenômeno. Em outros microrganismos já havia sido relatado que a amônia pode estar afetando a fosforilação oxidativa em decorrência da despolarização da membrana como proposto para *Azotobacter vinelandii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Clostridium pasteurianum* (GORDON et al., 1981). Em *Rhodobacter capsulatus* tem sido também evidenciado que a regulação da atividade da nitrogenase pode sofrer regulação por um segundo mecanismo talvez envolvendo bloqueio do transporte de elétrons, além do mecanismo de ADP-ribosilação. Foi proposto que há dependência das condições fisiológicas, nas quais ou um ou outro mecanismo é o responsável pelo desligamento da nitrogenase neste microrganismo, questões estas que permanecem para serem elucidadas (PIERRARD et al., 1993).

A metilamina tem sido utilizada em estudos de transporte de amônia por ser um análogo estrutural desta. A utilização de metilamina radioativa tem evidenciado inibição competitiva por  $\text{NH}_4^+$ , chegando-se a conclusão de que íons amônio e metilamônio disputam um mesmo transportador em *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense* (HARTMANN e KLEINER, 1982), e *Azotobacter vinelandii* (BARNES e ZIMNIAK, 1981). Este fato apóia a hipótese de que íons amônio, e não a metilamina, são, na verdade, o substrato natural do transportador (KLEINER, 1982). Alguns autores demonstraram que o produto da metabolização da metilamina seria a  $\gamma$ -glutamilmetilamida por ação da glutamina sintetase (YOCH et al., 1983; JAYAKUMAR e BARNES, 1984; RAPP et al. 1986). Existem ainda evidências de este análogo da glutamina funcionaria diretamente para iniciar a inativação da nitrogenase em *Rhodopseudomonas capsulada* (YOCH et al., 1983). Em *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SMR1 foi observada inibição da atividade da nitrogenase por metilamina em até 39% para células previamente crescidas em amônia 2 mM e 17% para células crescidas em glutamato 5 mM (figuras 15 e 16). Parece que o crescimento das células em meio contendo glutamato ocasiona



menor velocidade de entrada da metilamina. A inibição da atividade da nitrogenase proporcionada pela amônia foi de 86%. A diferença de inibição observada entre cloreto de amônio e metilamina pode ser devido a menor afinidade do transportador pela metilamina, diminuindo a velocidade de entrada desta na célula, ou devido uma metabolização mais lenta. Há portanto a necessidade de testes complementares a fim de se esclarecer melhor o mecanismo de transporte e o efeito da metilamina sobre a inibição da nitrogenase em *Herbaspirillum seropedicae*.

A adição de glutamato, DL-serina, L-cisteína, metilamina ou L-histidina em culturas desreprimidas de *H. seropedicae* estirpe SMR1 produziu inibição parcial da atividade da nitrogenase (figura 17, tabela XI). Provavelmente este efeito observado tenha como causa um mecanismo semelhante a inibição produzida por íons amônio.

A presença de DNA extracromossomal ou elementos extracromossomais em microrganismos tem sido mostrada em diferentes microrganismos. PLAZINSKI et al. (1983) demonstraram através de técnica de lise alcalina, que diferentes estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Azospirillum lipoferum* possuem plasmídeos com pesos moleculares que varia de 20 a 370 MDa. Alguns plasmídeos podem conferir à célula hospedeira resistência à antibióticos e metais pesados, produção de antibióticos, utilização de fontes de carbono, produção de enterotoxinas, fixação de nitrogênio, nodulação em plantas, utilização de hidrogênio, plasmídeos de baixo peso molecular e com poucos sítios de restrição são candidatos potenciais para experimentos de clonagem.(DOBEREINER e PEDROSA, 1987). Deste modo a evidência de plasmídeos de considerável peso molecular nas estirpes ZA95 e Z152 de *H. seropedicae* ( figura 18 ), coloca em questão sua função nestes microrganismos, a qual poderia ser estudada utilizando-se técnicas de cura de plasmídeos. A inexistência de plasmídeos nas estirpes

Z67, ZA69, ZA76, e SMR1 permite concluir que nestes organismos os genes *nif* estão localizados no cromossomo.

## 5 . CONCLUSÕES

1.- *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SMR1 cresce em meio líquido NFbHP contendo glutamato como fonte de nitrogênio numa faixa de pH entre 4,5 e 8,0 e faixa ótima de pH inicial de cultivo para fixação de nitrogênio está entre pH 4,5 a 6,5.

2.- A densidade ótica de cultura ótima para fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* estirpe SMR1 é entre 1,60 e 1,85 em 550 nm.

3.-Concentrações de cloreto de amônio acima de 5 mM em cultivos de células de *H. seropedicae* estirpe SMR1 inibe a desrepressão da nitrogenase.

4.- O glutamato é a fonte de nitrogênio ótima para expressão da nitrogenase em *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. A utilização dos aminoácidos L-cisteína ou DL-serina não permite a expressão da nitrogenase.

5.- As fontes de carbono preferenciais para crescimento das estirpes Z67, ZA69, ZA76, SMR1, ZA95 e Z152, em meio líquido NFbHP utilizando amônia como fonte de nitrogênio são DL-malato, DL-lactato, L-rhamnose e D-glucose. Crescimento em D-maltose, D-manose e D-rafinose foi deficiente .

6.- Em meio NFbHP semi sólido isento de nitrogênio fixado, DL-malato foi a fonte de carbono ótima para a expressão da nitrogenase para as estirpes Z67, ZA76, SMR1, ZA95 e Z152, e DL-lactato para a estirpe ZA69.

7.- Em meio NFbHP líquido contendo glutamato a estirpe SMR1 de *H. seropedicae* utiliza DL-malato ou DL-lactato como fontes de carbono expressando a nitrogenase. O mesmo não foi observado com D-glucose ou L-rhamnose,

8.- A temperatura ótima para crescimento em meio líquido para as estirpes SMR1, ZA95 e Z152 é de 30°C.

9.- As estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* (Z67, ZA69, ZA76, SMR1, ZA95 e Z152) possuem nitrogenase susceptível a inativação parcial por íons amônio.

10.- Os compostos nitrogenados L-glutamato, DL-serina, L-cisteína, metilamina, L-histidina e amônia provocam inibição parcial da nitrogenase quando adicionados a culturas de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SMR1.

11.- A estirpe ZA95 possui um plasmídeo de aproximadamente 70 MDa e a estirpe Z152 possui dois plasmídeos com aproximadamente 60 e 70 MDa, respectivamente.



## 6.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 001 ARIAS, A.; GARDIOL, A.; MARTÍNEZ-DRETS, G. Transport and catabolism of D-manose in *Rhizobium melioli*. J.Bacteriol., v.151, n.3, p.1069-1072, 1982.
- 002 BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DOBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. An. Acad. Bras. Cien., Rio de Janeiro, v.56, p.365, 1984.
- 003 BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L. ; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol., Washington, v.36, p. 86-93, 1986.
- 004 BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.; DOBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. Symbiosis., Rehovot, v.13, p.65-73, 1992.
- 005 BARNES, Jr. E.M.; ZIMINIAK, P. Transport of ammonium and methylammonium ions by *Azotobacter vinelandii* . J. Bacteriol., Washington, v.146, p.512-516, 1981.
- 006 BENEMANN, J. R. VALENTINE, R.C. The Pathways of Nitrogen Fixation. Adv. Microbial. Physiol. , Califórnia. v. 8, p. 59-104, 1972.
- 007 BERGER, D.K.; NARBERHAUS, F.; KUSTU, S. The isolated catalytic of NifA, a bacterial enhancer-binding protein, activates transcription in vitro: Activation is inhibited by NifL. Proc. Natl. Acad.Sci. USA., Washington, v.91, p.103-107, 1994.
- 008 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., Washignton, v.77, n.12, p.7342-7346, 1980.

- 009 - BOGUSZ, D; HOUMARD, J.; AUBERT, J.P. Electron transport to nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae* purification and properties of *nif* J protein. Eur. J. Biochem., Heidelberg, v.120, p.421-426, 1981.
- 010 - BOYER, W.H.; ROULLAND-DUSSOIX, D. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., London, v.41, p.459-472, 1969.
- 011- BUCHANAN-WOLLASTON, V.; CANNON, M.C.; BEYNON, J.C.; CANNON, F. The role of the *nifA* gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. Nature.(Lond), v.294, p.776-778, 1981.
- 012- BUENO, R.; PAHEL, G.; MAGASANIK, B. Role of *gln* B and *glnD* gene products in regulation of the *gln* ALG operon of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., Washington, v. 164, n.2, p.816-822, 1985.
- 013 BURNS, R.C.; HARDY, K.W. Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher plants. Berlin:Springer-Verlag, 1975.
- 014 CANNON, M; HILL, S.; KAVANAUGH, E.; CANNON, F. A molecular genetic study of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae* at the level of transcription, translation and nitrogenase activity. Mol.Gen.Genet., Berlin, v.198, p. 198-206, 1985.
- 015 - CEJUDO, F.J.; TORRE, A.; PANEQUE, A. Short-term ammonium inhibition of nitrogen fixation in *Azotobacter*. Biochem. Biophys. Res. Commun., Duluth, v. 123, n.2, p.431-437, 1984.
- 016 CHAN, M.K.; KIM, J. ; REES, R.C. The nitrogenase FeMo-cofactor and P-cluster pair : 2.2 Å resolution structure. Science (Washington DC), v.260, p. 792-794, 1993.
- 017 - DAESCH, G.; MORTENSON, L.E. Effect of ammonia on the synthesis and function of the N<sub>2</sub> - fixing enzyme system in *Clostridium pasteurianum*. J. Bacteriol., Washington, v.110, n.1, p.103-109, 1972.

- 018 - DALTON, H.; POSTGATE, J.R. Effect of oxygen on growth of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous cultures. J. Gen. Microbiol. Reading, v.54, p.463-473, 1969.
- 019 - DAS, A. MISHRA, A.K. Effect of yeast extract, casamino acids, peptone and various L-amino acids on growth and acetylene reduction in *Azospirillum brasilense*. Ind. J. Exp. Biol., Charleston, v.20, p.751-755, 1982.
- 020 - DAS, A.; MISHRA, A.K. Utilization of fructose by *Azospirillum brasilense*. Can. J. Microbiol., Ottawa, v.29, p.1213, 1983.
- 021 - DAS, A.; MISHRA, A.K. Various physiological aspects associated with metabolism of fructose and malate in *Azospirillum brasilense*. Ind.J.Exps.Biol., Charleston, v.22, p.536, 1984.
- 022- DAWES, I.W.; SUTHERLAND, I.W. Microbial Physiology. 2ed. Oxford: Blackwell, 1992. 289p.
- 023- DAY, J.M.; DOBEREINER, J. Physiological aspects of N<sub>2</sub>-fixation by *Spirillum* from *Digitaria* roots. Soil . Biol. Biochem., v.8, p.45-50, 1976.
- 024 - DEAN, R. D.; BOLIN, J.T.; ZHENG, L. Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis. J. Bacteriol. , Washington, v. 175, n.21, p.6737, 1993.
- 025- DeBRUIJN, F.J.; AUSUBEL, F.M. Cloning and characterization of the *glf* (*ntrA*) gene of *Klebsiella pneumoniae* : role in the regulation of nitrogen fixation (*nif*) and other nitrogen assimilation genes. Mol. Gen. Genet., Berlin, v.192, p.342-353, 1983.
- 026 - DEISTUNG, J.; CANNON, F.C.; CANNON, M.C.; HILL, S.; THORNELEY, R.N.F. Electron transfer to nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. Biochem. J., London, v.231, p. 743-753, 1983.



- 027- DIANESE, J. C. DOBEREINER, J; SANTOS, T.P. Membrane protein patterns of three *Azospirillum* species and *Herbaspirillum seropedicae*. An. Acad. Bras. Cienc., Rio de Janeiro, v.61, n.2, p.223-230, 1989.
- 028 - DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. Bioch. Biophys Acta, Amsterdã, v.127, p.285-94, 1966.
- 029- DILWORTH, M.J.; ELDRIDGE, M.E.; EADY, R.R. The molybdenum and vanadium nitrogenases of *Azotobacter chroococcum*: effect of elevated temperature on N<sub>2</sub> reduction. Biochem. J., London, v.289, p.395-400, 1993.
- 030- DIXON, R.A. The genetic complexity of nitrogen fixation. J. Gen. Microbiol., Reading, v.130, p.2745-2755, 1984.
- 030- DIXON, R.O.D.; WHEELER, C.T. Nitrogen Fixation in Plants. ed. Glasgow: Blackie, 1986. 157 p.
- 031- DOBEREINER, J. Isolation and identification of root associates diazotrophs. Plant. Soil., Dordrecht, v.110, p-207-212, 1989.
- 032 -DOBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In: BALLOWS, A; TRIIPER, H.G.; DWORKIN, M; HARDER, W. (eds). The Prokariotes. Berlin: Springer Ferlag, 1991. p.2236-2253.
- 033 -DOBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non leguminous plants. Symbiosis, Rehovot, v.13, p.1-13, 1992a.
- 034 -DOBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions : Endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. Cienc. Cult. (São Paulo), v.44, p.310-313, 1992b.



- 035 - DOBEREINER, J. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In: PALACIOS, R. et al. (eds). New Horizons in Nitrogen Fixation. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.671-676.
- 036 - DOBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. The genus *Azospirillum*. In:\_\_\_\_\_. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. Madison: Science Tech. Publishers, 1987, 155p.
- 037 - DRETS-MARTÍNEZ, G; FABIANO, E.; CARDONA, A. Carbohydrate catabolism in *Azospirillum amazonense* . App. Environ Microbiol., Washington, v.50, n.1, p.183-185, 1985.
- 038 - DROZD, J.W.; TUBB. R.S.; POSTGATE, J.R. A chemostat study of the effect of fixed nitrogen sources on nitrogen fixation, membranes and free amino acids in *Azospirillum chroococcum*. J. Gen. Microbiol., Reading, v.73, p.221-232, 1972.
- 039 - DRUMMOND, M.; CLEMENTS, J.; MERRICK, M.; DIXON, R. Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. Nature (Lond.), v.301, p.302-307, 1983.
- 040 - EADY, R.R. Regulation of nitrogenase activity. In: GIBSON, A.H.; NEWTON, W.G. eds. Current Perspectives in Nitrogen Fixation. . Canberra: Australian Academy of Science, 1981. p.172-180.
- 041 - EADY, R.R. Enzymology in free-living diazotrophs. In: BROUGHTON, W.J. e PUHLER, S. Nitrogen Fixation, Oxford: Clarendon Press., v.4, 1986. p. 1-49.
- 042 - EADY, R.R. The Mo-, V-, and Fe- Based nitrogenase systems of *Azotobacter*. Adv. in Inorg. Chem., San Diego, v.36, p.77-102, 1991.
- 043 - EADY, R.R.; RICHARDSON, T.H.; MILLER, R. W.; HAWKINS, M. LOWE, D.J. The vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. Biochem. J., London, v.256, p.189-196, 1988.

- 044- EVANS, D; JONES, R.; WOODLEY, P; ROBSON, R. Further analysis of nitrogen fixation (*nif*) genes in *Azotobacter chroococcum*: Identification and expression in *Klebsiella pneumoniae* of *nifS*, *nifV*, *nifM* and *nifB* genes and localization of *nifE/N*<sup>-</sup>, *nifU*<sup>-</sup>, *nifA*<sup>-</sup> and *fixABC*<sup>-</sup> like genes. J. Gen. Microbiol., Reading, v.134, p. 931-942, 1988.
- 045- FALK, E.C.; JOHNSON, J. L., BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J.; KRIEG, N.R. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. Int. J. Syst. Bacteriol., Washington. v.36, n.1, p.80-85, 1986.
- 046- FRANCO, A.A.; DOBEREINER, J. A Biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. Summa Phytopathologica, Jaguariúna. v.20, n.1, p.68-74, 1994.
- 047 FU, H.; BURRIS, R.H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. J. Bacteriol., Washington, v.171, n.6, p.3168-3175, 1989.
- 048 - GALLORI, E; BAZZICALUPO, M. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense*. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc) Microbiol. Lett., Amsterdã, v.28, p.35-38, 1985.
- 049 - GEORGIADIS, M.M.; KOMIYAH, H.; CHAKRABARTI, P; WOO, D.; KORNUC, J.J. REES, D.C. Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. Science (Washington DC), v.257, p.1653-1659, 1992.
- 050 - GILLIS, M.; DOBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EFGRUP 1), *Herbaspirillum seropedicae* and [*Aquaspirillum*] *authotrophicum*. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R; VINCENZINI, M. , ed. Nitrogen Fixation. Dordrecht: Kluwer Acad. Publish., 1990. p. 293-294.

- 051 - GOLDBERG, I.; NADLER, V.; HOCHMAN, A. Mechanism of nitrogenase switch-off by oxygen. J.Bacteriol., Washington, v.169, n.2, p.874-879, 1987.
- 052- GORDON, J.K.; SHAH, V.K.; BRILL, W.J. Feedback inhibition of nitrogenase. J. Bacteriol., Washington, v.148, p.884-888, 1981.
- 053 - GOSINK, M.M., FRANKLIN, N.M.; ROBERTS, G.P. The product of the *Klebsiella pneumoniae nif X* gene is a negative regulator of the nitrogen fixation (*nif*) regulon. J.Bacteriol., Washington, v.172, n.3, p.1441-1447, 1990.
- 054 - HAAHTELA, K.; KARI, K.; SUNDMAN, V. Nitrogenase activity (acetylene reduction) of root-associated, cold-climate *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Pseudomonas* species during growth on various carbon sources and at various partial pressures of oxygen. App. Env. Microbiol. Washington, v.45, n.2, p.563-570, 1983.
- 055 - HAAKER, H.; VEEGER, C. Involvement of the cytoplasmic membrane in nitrogen fixation by *Azotobacter vinelandii*. Eur. J. Biochem., Heidelberg, v.77, p.1-10, 1977.
- 056 - HAAS, D. ; HOLLOWAY. Chromosome mobilization by the plasmid R6845: a tool in *Pseudomonas* genetics. Mol.Gen. Genet., Berlin v.158, p.229-37, 1978.
- 057 - HAGEMAN, R.V. ; BURRIS, R.H. Kinetic studies on electron transfer and interaction between nitrogenase components from *Azotobacter vinelandii*. J. Am.Chem.Soc., Washington, v.17, n.20, p.4117-124, 1978.
- 058 - HAGEMAN, R.V. ; ORMEJOHNSON, W.H.; BURRIS, R.H. Role of magnesium adenosine 5'-triphosphate in the hydrogen evolution reaction catalized by nitrogenase from *Azotobacter vinelandii* Biochemistry., Washington, v.19, p.2333-342, 1980.



- 059- HARTMANN, A.; BURRIS, R.H. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. J. Bacteriol., Washington, v.169, n.3, p.944-948, 1987.
- 060- HARTMANN, A.; FU, H.; BURRIS, R.H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. J.Bacteriol., v. 165, n.3, p.864-870, 1986.
- 061- HARTMANN, A.; FU, H.; BURRIS, R.H. Influence of amino acids on nitrogen fixation ability and growth of *Azospirillum* spp. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v.54, n.1, p.87-93, 1988.
- 062 - HARTMANN, A.; KLEINER, D.; Ammonium (methylammonium) transport by *Azospirillum* spp. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett., Amsterdã, v.15, p.65-67, 1982.
- 063 - HARVEY, I.; ARBER, J.M.; EADY, R.R.; SMITH, B.E.; GARNER, D.; HASNAIN, S.S. Iron K-edge X-ray-absorption spectroscopy of the iron-vanadium cofactor of the vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. Biochem.J., London, v.266, p.929-931, 1990.
- 064 - HAUSINGER, R.P. ; HOWARD, J.B. The amino acid sequence of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. J.Biol.Chem., Baltimore, v.257, n.5, p.2483-90, 1982.
- 065 - HAWKES, T.R.; McLEAN, P.A.; SMITH, B.E. Nitrogenase from *nif V* mutants of *Klebsiella pneumoniae* contains an altered form of the iron-molybdenum cofactor. Biochem. J., London, v.217, p.317-321, 1984.
- 066- HAWKES, T.; MERRICK, M.; DIXON, R. Interaction of purified NtrC protein with nitrogen regulated promoters from *Klebsiella pneumoniae*. Mol. Gen. Genet., Berlin, v.201, p.492-498, 1985.
- 067 - HAWKES, T.R.; SMITH, B.E. The inactive MoFe protein (*nif B*<sup>-</sup> Kp1) of the nitrogenase from *nif B* mutants of *Klebsiella pneumoniae*. Biochem. J., London, v.223, p.783-792, 1984.



- 068- HENNECKE, H; SHANMUGAM, K.T. Temperature control of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*. Arch. Microbiol., Heidelberg, v.123, p.259-265, 1979.
- 069 - HILL, S.; KAVANAGH, E.P. Roles of *nif F* and *nif J* gene products in electron transport to nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. J.Bacteriol., Washington, v.141, n.2, p.470-471, 1980.
- 070- HOLTEL, A.; MERRICK, M.J. The *Klebsiella pneumoniae* PII proteina (*gln B* gene product) is not absolutely required for nitrogen regulation and is not involved in *nifL*-mediated *nif* gene regulation. Mol.Gen. Genet., Berlin, v.217, p.474-480, 1989.
- 071 - HOOVER, T.R.; IMPERIAL, J.; LUDDEN, P.W.; SHAH, V.K. Homocitrate is a component of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. Biochemistry , Washington, v.28, p.2768-2771, 1989.
- 072 - HOWARD, J.B.; DAVIS, R; MOLDENHAUER, B; CASH, V.L. ; DEAN, D. Fe:S cluster ligands are the only cysteines required for nitrogenase Fe-protein activities. J.Biol.Chem. , Baltimore , v.264, n.19, 1989.
- 073 - HOWARD, K.S.; McLEAN, P.A.; HANSEN, F.B.; LEMLEY, P.V.; KOBLAN, K.S.; ORME-JOHNSON, W.H. Kp *nifM* gene product is required for stabilization and activation of nitrogenase ironprotein in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., Baltimore, v.261, n.2, p.772-778, 1986.
- 074 - IMPERIAL, J.; UGALDE, R.A.; SHAH, V.K.; BRILL, W.J. Role of *nif Q* gene product in the incorporation of molybdenum into nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. J.Bacteriol., Washington, v.158, n.1, p.187-194, 1984.
- 075 - IONNIDIS, I.; BUCK, M. Nucleotide sequence of the *Klebsiella pneumoniae nif D* gene and predicted amino acid sequence of the  $\alpha$  subunit of nitrogenase MoFe protein. Biochem. J., London, v.247, p.287-291, 1987.

- 076 - JACOBSON, M.R.; CASH, V.L.; WEISS, M.C.; LAIRD, N.F.; NEWTON, W.E. DEAN, D.R. Biochemical and genetic analysis of the *nif* USVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. Mol. Gen. Genet., Berlin, v.219, p.49-57, 1989.
- 077- JANSSEN, K.A.; MAGASANIK, B. Glutamine synthetase of *Klebsiella aerogenes* : genetic and physiological properties of mutants in the adenylation system. J. Bacteriol., Washington, v.129, n.2, p. 993-1000, 1977
- 078 - JAYAKUMAR, A; BARNES, Jr. E.M. The role of glutamine in regulation of ammonium transport in *Azotobacter vinelandii*. Arch. Microbiol., Heidelberg, v.231, n.1, p.95-101, 1984.
- 079- JONES, B.L.; MONTY, K.J. Glutamine as a feed-back inhibitor of the *Rhodopseudomonas sphaeroides* nitrogenase system. J.Bacteriol., Washington, v.139, n. 3, p.1007-1013, 1979.
- 080- JOUANNEAU, Y.; MEYER, C.M.; VIGNAIS, P.M. Regulation of nitrogenase activity through iron protein interconversion into an active and an inactive form in *Rhodopseudomonas capsulata*. Biochem. Biophys. Acta., Amsterdã, v.749, p.318-328, 1983.
- 081- 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., Washington, v.158, p.713-72, 1984.
- 082- KANEMOTO, R.H.; LUDDEN, P.W. Amino acid concentrations in *Rhodospirillum rubrum* during expression and switch off of nitrogenase activity. J.Bacteriol., Washington, v.169, n.7, p.3095-43, 1987.
- 083- KEENER, J.; KUSTU, S. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NtrB and NtrC of enteric bacteria : roles of the conserved amino-terminal domain of NtrC. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Washington, v.85, p.4976-4980, 1988.

- 084 - KIM, J. ; REES, D.C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. Biochemistry., Washington, v.33, n.2, p.389-97, 1994.
- 085 - KIM, J. ; REES, D.C. Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Azotobacter vinelandii*. Nature., (Lond), v.360, p.553-560, 1992.
- 086 - KIM, J. ; WOO, D.; REES, D.C. Xray cristal structure of the nitrogenase molybdenum-iron proteina from *Clostridium pasteurianum* at 3.0 -Å resolution. Biochemistry., Washington, v.32, n. 28, p.7104-7115, 1993.
- 087 - KLEINER, D. The transport of NH<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub> across biological membranes. Biochem. Biophys. Acta., Amsterdã, v. 639, p.41-52, 1981.
- 088 KLEINER, D. Ammonium (methylammonium) transport by *Klebsiella pneumoniae*. Biochem Biophys. Acta., Amsterdã, v.688, p.702-708, 1982.
- 089- KONG, Q.; WU, Q.; MA, Z.; SHEN, S. Oxygen sensitivity of the *nif* LA promoter of *Klebsiella pneumoniae*. J.Bacteriol., Washington, v.166, n2, p.353-356, 1986.
- 090- KUST, S.; SANTERO, E.; KEENER, J.; POPHAM, D.; WEIS, D. Expression of  $\sigma^{54}$  (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. Microbiol. Rev., Washington, v.53, p.367-376, 1989.
- 091- LEE, H.; NARBERHAUS, F.; KUSTU, S. In vitro activity of NifL, a signal transduction protein for biological nitrogen fixation. J.Bacteriol., Washington, v.175, n.23, p.7683-7688, 1993.
- 092- LIANG, J.; NIELSEN, G.M. LIES, D.P.; BURRIS, R.H.; ROBERTS, G.P.; LUDDEN, P.W. Mutations in the *draT* and *draG* genes of *Rhodospirillum rubrum* result in loss of regulation of nitrogenase by reversible ADP-ribosylation. J.Bacteriol., v.173, n.21, p.6903-6909. 1991.



- 093- LIANG, Y.Y.; ARSENE, F.; ELMERICH, C. Characterization of *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* Sp7. Their involvement in the regulation of nitrogenase synthesis and activity. Mol.Gen.Genet., Berlin v.240, p.188-196, 1993.
- 094- LIANG, Y.Y.; ZAMAROCZY, M.; ARSENE, F.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA*, and *gln B* gene products. FEMS(Fed. Eur. Microbiol. Soc)Microbiol.Lett., Amsterdã, v.100, p.113-120, 1992.
- 095- LOWE, D.J.; POSTGATE, J.R.; THORNELEY, R.N.F. Biochemical constrain on biological nitrogen fixation. In: MALIK, A.M.; NAQVI, S.H.M.; ALEEN, M.I.H. Nitrogen and The Enviroment. Faisalabad: Nuclear Inst. Agric. Biol, 1985. p.73-91.
- 096- 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., Washington, v.166, n.2, p.513-518, 1986.
- 097- LOWRY, O.M.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol.Chem., Baltimore, v.193, p.267-275, 1951.
- 098 - 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, M.R.; KANEMOTO, R.H. Regulation of nitrogenase activity by reversible ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase. In: BOTHE, H.; BRUIJN, F.J.; NEWTON, W.E. Nitrogen Fixation: Hundred Years After. Proc. 7th Int. Cong. on N= Nitrogen Fixation. Koln (Cologne), 1988. New York: Fischer, 1988. p.157-162.



- 099 - MACHADO, I.M.P.; YATES, M.G.; SOUZA, E.M.; MACHADO, H.B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Cloning and characterization of *nif* HDK genes from *Herbaspirillum seropedicae* strain SMR1. In: XXIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1994: Caxambu). *Resumos...*, 1994. p.57.
- 100 - MAGALHÃES, L.M.; NEYRA, C.A.; DOBEREINER, J. Nitrate and nitrite reductase negative mutants of N<sub>2</sub> fixing *Azospirillum* spp. Arch. Microbiol., Heidelberg, v.117, p.247-252, 1978.
- 101- MAGASANIK, B. Reversible phosphorylation of an enhancer binding protein regulates the transcription of bacterial nitrogen utilization genes. Trends Biochem. Sci., Cambridge v.13, p.475-479, 1988.
- 102- MATHIAS, A.L.; RIGO, L.U.; FUNAYAMA, S; PEDROSA, F.O. L-arabinose metabolism in *Herbaspirillum seropedicae*. J. Bacteriol., Washington, v.171, n.9, p.5206-5209, 1989.
- 103 - MENSINK, R.E.; HAAKER, H. Temperature effects on the MgATP induced electron transfer between the nitrogenase protein from *Azotobacter vinelandii*. Eur.J.Biochem., Heidelberg, v.208, p.295-99, 1992.
- 104 - MERRICK, M.J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella* and *Azotobacter*. In: BOTHE, H.; BRUIJN, F.J.; NEWTON, W.E. Nitrogen Fixation : Hundred Years After. Proc. 7th. Cong. on N=Nitrogen Fixation. Koln (Cologne), 1988. New York, Fischer, 1988. p.293-302.
- 105- MERRICK, M.J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes . In: PALACIOS, R.; MARA, J.; NEWTON, W.E. (eds) New Horizons in Nitrogen Fixation. Netherlands: Nijhoff Publishers, 1992. p.1-12.

- 106- MERRICK, M.; HILL, S. HENNECKE,; HAHN, M. DIXON, R.; KENNEDY, C. Repressor properties of the *nifL* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. Mol.Gen.Genet., Berlin, v.185, p.75-81, 1982.
- 107 - MILLER, J.H. Determination of viable cell counts: bacterial growth curves. In:\_\_\_\_\_. Experiments in molecular genetics. 2ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory, 1972. p.31-6.
- 108- MOAT, A.G.; FOSTER, J.W. Microbial Physiology. 2ed. Singapore:Wiley, 1988. 597p.
- 109- MORETT, E.; BUCK, M. NifA-dependent in vivo protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a proteina binding sit. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Washington, v.85, p.9401-9405, 1988.
- 110 - MORGAN, T.V.; McCracken, J.; ORME-JOHNSON, W.H.; MIMS, W.B.; MORTENSON, L.E.; PEISACH, J. Pulsed electron paramagnetic resonance studies of the interaction of Mg-ATP and D<sub>2</sub>O with the iron protein of nitrogenase. Biochemistry, Washington, v.29, p.3077-3082, 1990.
- 111 - MORNINGSTAR, J.E.; HALES, B.J. Electron paramagnetic resonance study of the vanadium-iron protein of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii* . J Am. Chem. Soc., Washington, v.109, p.6854-6855, 1987.
- 112- MORTENSON, L.E.; THORNELEY, R.N.F. Structure and function of nitrogenase. Annu.Rev. Biochem., Palo Seto, v.48, p. 387-418, 1979.
- 113 - NUR, I.; STEINITZ, Y.L.; OKON, Y.; HENIS, Y. Carotenoid composition and and function in nitrogen-fixing bacteria of the genus *Azospirillum*. J.Gen. Microbiol., Reading, v.122, p.27-32, 1981.

- 114 - OKON, Y.; ALBRECHT, S.L.; BURRIS, R.H. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. J.Bacteriol., Washington, v.127, n.3, p.1248-1254, 1976.
- 115- OW, D.W.; AUSUBEL, F.M. Regulation of nitrogen metabolism genes by *nifA* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. Nature (Lond), v. 301, p.307-317, 1983.
- 116 - PATIL, R.B.; PENGRA, R.M.; YOCH, D.C. Effect of nitrogensupplements on nitrogen fixation by *Aerobacter aerogenes*. Biochim. Biophys. Acta., Amsterdã, v.136, p-1-5, 1967.
- 117 - PAU, R.N.; MITCHENALL, L.A.; ROBSON, R.L. Genetic evidence for an *Azotobacter vinelandii* nitrogenase lacking molybdenum and vanadium. J.Bacteriol., Washington, v.171, n.1, p.124-129, 1989.
- 118 - PAUL, W.; MERRICK, M. The roles of *nifW*, *nif Z* and *nif M* genes of *Klebsiella pneumoniae* in nitrogenase biosynthesis. Eur. J. Biochem., Heidelberg, v.178, p.675-682, 1989.
- 119 - PAUSTIAN, T.D.; SHAH, V.K.; ROBERTS, G.P. Purification and characterization of *nif N* and *nif E* gene products from *Azotobacter vinelandii* . Proc.Natl. Acad. Sci. USA, Washington , v.86, p.6082-6086, 1989.
- 120 - PEDROSA, F.O. Physiology ,biochemistry and genetics of *Azospirillum* and others root-associated nitrogen-fixing bacteria. Critical reviews in plant sciences, Boca Raton, v.6, n.4, p.345-384, 1988.
- 121- 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. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989. p.155-163.



- 122 - PEDROSA, F.O.; STEPHAN, M.; DOBEREINER, J.; YATES, M.G. Hydrogen-uptake hydrogenase activity in nitrogen-fixing *Azospirillum brasilense*. J. Gen. Microbiol., Reading, v.128, p.161-166, 1982.
- 123- PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. *nif* mutants of *Azospirillum brasilense*: evidence for a *nif* a-type regulation. In: KLINGMULLER, W. ed. Azospirillum II: Genetics, Physiology, Ecology. Basel: Birkhauser-Verlag, 1983. p.66-77.
- 124 - PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nif* A and *ntr* (*gln*) type gene products. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc) Microbiol. Lett., Amsterdã, v.23, p.95-101, 1984.
- 125- PEREIRA, J.A.R., CAVALCANTE, V.A.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp and *Herbaspirillum seropedicae*. In: SKINNER, F.A.; BODDEY, R.M.; FENDRIK, (eds). Nitrogen Fixation with non-legumes. Doedrecht: Kluver Academic Publishers, 1989. p. 219-224.
- 126- PIERRARD, J.; LUDDEN, P.W.; ROBERTS, G.P. Posttranslational regulation of nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*: existence of two independent regulatory effects of ammonium. J. Bacteriol., Washington, v.175, n.5, p.1358-1366, 1993.
- 127 - PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DOBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. Plant. Soil., Dordrecht, v. 137, p.61-65, 1991.
- 128 - PLAZINSKI, J.; DART, P.J.; ROLF, B.G. Plasmid visualization and *nif* gene location in nitrogen fixing *Azospirillum* strains. J. Bacteriol., Washington, v.155, n.3, p.1429-1433, 1983.
- 129 - POSTGATE, J.R. Prospects for the exploitation of biological nitrogen fixation. Phil. Trans. R. Soc. Lond., Brighton, v.290, p.143-7, 1980.



- 130 - POSTGATE, J.R. Biological nitrogen fixation: Fundamental. Phil. Trans. R. Soc. Lond., Brighton, v.296, p.375-85, 1982.
- 131 - POSTGATE, J. Nitrogenase. Biologist., London, v.32, n.1, p.43-8, 1985.
- 132- RAPP, B.J.; LANDRUM, D.C.; WALL, J.D. Methylammonium uptake by *Rhodobacter capsulatus*. Arch. Microbiol., Heidelberg, v.146, p.134-141, 1986.
- 133- REINER, O.; OKON, Y. Oxygen recognition in aerotactic behaviour of *Azospirillum brasilense*. In: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY, P.J.; NEWTON, W.E. eds. Nitrogen Fixation Research Progress. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p.522.
- 134 - 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., Washington, v.136, n.1, p.267-279, 1978.
- 135 ROBSON, R.L. Characterization of an oxygen stable nitrogenase complex isolated from *Azotobacter chroococcum*. Biochem. J., London, v.181, p.569-575, 1979.
- 136 - ROBSON, R.L.; CHESHYRE, J.A.; WHEELER, C.; JONES, R.; WOODLEY, P.E.; POSTGATE, J. Genome size and complexity in *Azotobacter chroococcum*. J.Gen.Microbiol., Reading, v.130, p.1603-12, 1984.
- 137 - ROBSON, R.L.; POSTGATE, J.R. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. Ann. Rev. Microbiol., Palo Seto, v.34, p.183-207, 1980.
- 138 - ROBSON, R.L.; WOODLEY, P.R.; PAU, R.N.; EADY, R.R. Structural genes for the vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. EMBO (Eur. Mol. Biol.Organ) J., Oxon, v.8, n.4, p.1217-1224. 1989.

- 139 - SAMBROOK, J. FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning a laboratory manual. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- 140 - SCHOLLHORN, R ; BURRIS, R. H. Acetylene as a competitive inhibitor of N<sub>2</sub> fixation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v.58, n.213-6, 1967.
- 141 - SELLMANN, D. Xray structure analysis of FeMo nitrogenase- Is the problem of N<sub>2</sub> fixation solved? Angew.Chem Int. Ed Engl., Weinheim, v.32, n.1, p.64-7, 1993.
- 142 - SHAH, V.K.; STACEY, G.; BRILL, W.J. Electron transport to nitrogenase. J.Biol.Chem., Baltimore, v.19, n.19, p.12064-12068, 1983.
- 143- SIDOTI, C.; HARWOOD, G.; ACKERMAN, r.; COPPARD, J.; MERRICK, M. Characterisation of mutations in the *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation regulatory gene *nifL* which impair oxygen regulation. Arch. Microbiol., Heidelberg, v.159, p.276-281, 1993.
- 144 - SIMPSON, F.B.; BURRIS, R.H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. Science (Washington DC) v.224, p. 1095-1096, 1984.
- 145- SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A.; Biotecnologia do solo : Fundamentos e perspectivas (eds). Brasília: MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, 1988. 235p.
- 146 - SMITH, B.E.; EADY, R.R. Metalloclusters of the nitrogenases. Eur.J.Biochem., Heidelberg, v.205, n.1, p.1-15, 1992.
- 147- SOUZA, Emanuel Maltempi. Clonagem, caracterização e sequenciamento dos genes *nif A* e *nif B* de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 1990. 245p. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

- 148- SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O. Sequence and structural organization of a *nif A*-like gene and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. J.Gen. Microbiol., Reading, v.137, p.1511-1522, 1991.
- 149- SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; MACHADO, H.B.; STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O. Effect of oxygen and ammonium on the expression of *nif A* and *nif B* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXIII REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1994 : Caxambu) *Resumos...*, 1994. p.57.
- 150- STEFFENS, Maria Berenice Reynaud. Clonagem isolamento e caracterização do gene *rec A* de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78. Curitiba, 1994. 221p. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- 151 - STEFFENS, M.B.R.; RIGO, L.U.; FUNAYAMA, S. ; SOUZA, E.M.; MACHADO, H.B.; PEDROSA, F.O. Cloning of a *recA*-like gene from the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae* strains Z78. Can. J. Microbiol., Ottawa, v. 39, p.1096-1102, 1993.
- 152- STEPHAN, M.P. OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, K.R.S.; MARTINEZ-DRETS, G; DOBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. FEMS (Fed. Eur. Microbio. Soc.)Lett., Amsterdã, v.77, p.67-72, 1991.
- 153 - SUNDARESAN, V.; AUSUBEL, F.M. Nucleotide sequence of the gene coding for the nitrogenase iron protein from *Klebsiella pneumoniae* . J. Biol.Chem. , Baltimore, v. 256, n.6, p.2808-2812, 1981.
- 154- TAL, S.; OKON, Y. Production of the reserve material poly-  $\beta$ -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense*. Can. J. Microbiol., Ottawa, v.31, p.608-613, 1985.



- 155- TEIXEIRA, Kátia Regina. Isolamento e caracterização do operon *glnAntrBC* de *Herbaspirillum seropedicae*Z78. Curitiba, 1991. 108p. Tese (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- 156 - THORNELEY, R.N.F. ; LOWE, D.J. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae* .Biochem J., London, v.215, p.393-403, 1983.
- 157 - THORNELEY, R.N.F. e LOWE, D.J . The mechanism of *Klebsiella pneumoniae* action. Biochem J., London, v.224, p.887-894, 1984.
- 158 - TRIPATHI, A.K.; KLINGMULLER, W. Temperature sensitivity of nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. Can. J. Microbiol., Ottawa, v.38, n.12, p.1238-1241, 1992.
- 159 - TUBB, R.S.; POSTGATE, J.R.; Control of nitrogenasesynthesis in *klebsiella pneumoniae*. J. Gen. Microbiol., Reading, v.79, p.103-117, 1973.
- 160 - UGALDE, R.A.; IMPERIAL, J.; SHAH, V.K.; BRILL, W.J. Biosynthesis of iron-molybdenum cofactor inthe absence of nitrogenase. J.Bacteriol, Washington, v.159, n.3, p.888-893, 1984.
- 161 - YOCH, D.C.; PENGRA, R.M. Effect of amino acids on the nitrogenase system of *Klebsiella pneumoniae*. J. Bacteriol., Washington, v.92, n.3, p. 618-621, 1966.
- 162 - YOCH, D.C.; ZHANG, Z.; CLAYBROOK, D.L. Methylamine metabolism and its role in nitrogenase "switch off" in *Rhodopseudomonas capsulata*. Arch. Microbiol., Heidelberg, v.134, p.45-48, 1983.
- 163- ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol., v. 175, n. 9, p.2507-2515, 1993.



- 164- ZHANG, Y., BURRIS, R.H.; LUDDEN, P.W.; ROBERTS, G.P. Posttranslational of nitrogenase activity by anaerobiosis and ammonium in *Azospirillum brasilense*. J.Bacteriol., Washington, v.175, n.21, p.6781-6788, 1993.
- 165- ZHANG, Y., BURRIS, R.H.; ROBERTS, G.P. Cloning, sequencing, mutagenesis, and functional characterization of *draT* and *draG* genes from *Azospirillum brasilense*. J.Bacteriol., Washington, v.174, n.10, p-3364-3369, 1992.
- 166- ZUMFT, W.G.; CASTILLO, F. Regulatory properties of the nitrogenase from *Rhodopseudomonas palustris*. Arch. Microbiol., Heidelberg, v.117, p.53-60, 1978.